



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
CENTRO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE –
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA GENERALISTA**

JESSÉ DE OLIVEIRA DA SILVA

**TENDÊNCIAS E APLICAÇÕES DE ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS: UMA REVISÃO**

**CAMPINA GRANDE
2022**

JESSÉ DE OLIVEIRA DA SILVA

**TENDÊNCIAS E APLICAÇÕES DE ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS: UMA REVISÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia generalista da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Farmacêutico.

Área de concentração: Farmácia

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Dantas de Medeiros.

**CAMPINA GRANDE
2022**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586t Silva, Jessé de Oliveira da.
Tendências e aplicações de ensaios microbiológicos para quantificação de fármacos antimicrobianos [manuscrito] : uma revisão / Jesse de Oliveira da Silva. - 2022.
31 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , 2022.

"Orientação : Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros , Departamento de Farmácia - CCBS."

1. Controle de qualidade. 2. Agentes antimicrobianos. 3. Métodos microbiológicos. I. Título

21. ed. CDD 615.6

JESSÉ DE OLIVEIRA DA SILVA

**TENDÊNCIAS E APLICAÇÕES DE ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS: UMA REVISÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia generalista da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Farmacêutico.

Área de concentração: Farmácia

Aprovada em: 28/11/2022

BANCA EXAMINADORA

Ana Cláudia D. Medeiros

Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Kilma Gabrielle B. Pimentel

Profa. Me. Kilma Gabrielle Barbosa Pimentel
Centro Universitário de João Pessoa (UNIPÊ)

João Augusto Oshiro Junior

Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação da montagem da placa de petri no método em difusão em ágar de desenho 3x3.....	18
Figura 2 –	Representação da montagem dos tubos de ensaios no método turbidimétrico (3x3).....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados da pesquisa sobre estado da arte das técnicas microbiológicas para quantificação de fármacos antimicrobianos no CQ.....	11
Tabela 2 –	Principais vantagens e limitações dos métodos microbiológicos em físico-químicos no CQA.....	24

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Dados percentuais de validações metodologias para controle de qualidade dos antimicrobianos.....	17
Gráfico 2 – Dados percentuais das classes antimicrobianos testados em validações de bioensaios para controle de qualidade.....	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	9
2.1	Objetivo geral	9
2.2	Objetivos específicos	9
3	METODOLOGIA.....	9
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4.1	Estado da arte das técnicas microbiológicas no controle de qualidade dos antimicrobianos	10
4.1.1	Quantificação de antimicrobianos (ATMs) utilizando ensaios microbiológicos	17
4.1.2	Difusão em ágar (3x3)	18
4.1.3	Turbidimetria (3x3).....	20
4.2	A importância dos métodos microbiológicos na resistência bacteriana	21
4.3	Vantagens e limitações dos métodos microbiológicos em relação aos métodos físico-químicos.....	23
5	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIA.....	25

TENDÊNCIAS E APLICAÇÕES DE ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS: UMA REVISÃO

Jessé de Oliveira da Silva¹

RESUMO

O controle de qualidade (CQ) é um setor imprescindível no âmbito farmacêutico, uma vez que é o ramo responsável por garantir a segurança/confiabilidade e eficácia dos medicamentos. Os ensaios de doseamento ou potência de antimicrobianos visam quantificar a substância ativa estudada em medicamentos. Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se destaca nesse sentido, por ser altamente sensível e possuir baixa vulnerabilidade a interferentes. Entretanto, exige equipamentos de alto custo para as análises e um alto conhecimento para o manuseio do aparelho. Visto isso, novas metodologias vêm sendo desenvolvidas e validadas, como alternativas para os estudos de quantificação de substâncias antimicrobianas. Portanto, o presente estudo tem por objetivo realizar um estado da arte das técnicas microbiológicas para quantificação de fármacos antimicrobianos (ATM). Para tanto, o estudo tratou-se de uma revisão de caráter narrativa, utilizando bases de dados através dos termos indexadores/descriptores, abrangendo artigos publicados nos últimos 20 anos. Desta forma, 56 artigos científicos foram selecionados mediante a inclusão pré-estabelecida. Observou-se que os ensaios microbiológicos são vantajosos, pois as propriedades terapêuticas e os parâmetros medidos do medicamento são os mesmos em relação aos métodos físico-químicos. Entre os métodos, a maior porcentagem é o método em difusão em ágar (DEA), obtendo um valor total de 67,9% (52,8% mostram-se que o desenho mais utilizado foi 3x3) em relação ao método turbidimétrico 3x3 (32,1%). Outro ponto é que a baixa qualidade dos produtos comercializados pode favorecer o desenvolvimento de patógenos resistentes. Por isso, evidencia-se a importância de existir um banco de dados atualizado sobre novos métodos alternativos que demonstrem qualquer sutil alteração na atividade dos antimicrobianos. Os métodos de turbidimetria têm sido amplamente utilizados para quantificação de agentes antimicrobianos de classes farmacológicas diversas, apresentando vantagens em relação ao método de difusão em ágar, devido que alguns fármacos têm dificuldade de difundir em meio sólido, o qual não ocorre no ensaio de turbidimetria. Apesar das diferenças entres os testes, ambos os ensaios conseguem estimar a potência do ATM testado por uma comparação direta com um ATM de referência. A principal diferença é o tempo de execução e maior número de materiais necessários e quantidade de trabalho. Por essa razão, em muitos casos, os métodos microbiológicos são trocados por ensaios físico-químicos nas análises de rotina. Porém, é válido ressaltar que não é recomendável a substituição, pois que os testes microbiológicos são capazes de evidenciar a potência da atividade biológica dos antimicrobianos e são ecologicamente corretos, apresentando vantagens, uma vez que os métodos físico-químicos não conseguem fornecer essa informação e são extremamente poluentes. Portanto, o ideal é utilizar mais de um método analítico ao determinar a qualidade do fármaco ativo em uma formulação farmacêutica ou matéria-prima. Além disso, faz-se necessário mais estudos de desenvolvimentos e validação de novos métodos, melhorias ou o uso dos bioensaios disponíveis, para o controle de qualidade de outros diversos ATMs em diferentes formas farmacêuticas ainda não evidenciadas nas farmacopeias.

Palavra-chave: controle de qualidade; agentes antimicrobianos; métodos microbiológicos.

¹ Universidade Estadual da Paraíba
jessedeoliveiradasilva98@gmail.com

ABSTRACT

Quality control (QC) is an essential sector in the pharmaceutical field, since it is the branch responsible for ensuring the safety/reliability and efficacy of medicines. Antimicrobial dosage or potency assays aim to quantify the active substance studied in drugs. Currently, high performance liquid chromatography (HPLC) stands out in this regard, as it is highly sensitive and has low vulnerability to interferents. However, it requires expensive equipment for analysis and a high level of knowledge for handling the device. Given this, new methodologies have been developed and validated, as alternatives for studies of quantification of antimicrobial substances. Therefore, the present study aims to carry out a state of the art of microbiological techniques for the quantification of antimicrobial drugs (ATM). Therefore, the study was a narrative review, using databases through indexing/descriptors, covering articles published in the last 20 years. In this way, 56 scientific articles were selected through the pre-established inclusion. It was observed that the microbiological assays are advantageous, since the therapeutic properties and the measured parameters of the medicine are the same in relation to the physical-chemical methods. Among the methods, the highest percentage is the agar diffusion method (DEA), obtaining a total value of 67.9% (52.8% show that the most used design was 3x3) compared to the 3x3 turbidimetric method (32.1%). Another point is that the low quality of marketed products may favor the development of resistant pathogens. Therefore, the importance of having an updated database on new alternative methods that demonstrate any subtle alteration in antimicrobial activity is highlighted. Turbidimetry methods have been widely used to quantify antimicrobial agents of different pharmacological classes, with advantages over the agar diffusion method, as some drugs have difficulty diffusing in solid media, which does not occur in the turbidimetry assay. Despite the differences between the tests, both tests manage to estimate the tested ATM power by a direct comparison with a reference ATM. The main difference is execution time and greater number of materials needed and amount of work. For this reason, in many cases, microbiological methods are replaced by physical-chemical tests in routine analyses. However, it is worth noting that replacement is not recommended, since microbiological tests are able to demonstrate the potency of the biological activity of antimicrobials and are ecologically correct, presenting advantages, since physical-chemical methods cannot provide this information and are extremely polluting. Therefore, it is ideal to use more than one analytical method when determining the quality of the active drug in a pharmaceutical formulation or raw material. In addition, further studies of development and validation of new methods, improvements or the use of available bioassays are necessary for the quality control of several other ATMs in different pharmaceutical forms not yet evidenced in pharmacopoeias.

Keywords: quality control; antimicrobial agents; microbiological methods.

1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade (CQ) é um setor imprescindível no âmbito farmacêutico, uma vez que é o ramo responsável por garantir a segurança/confiabilidade e eficácia dos medicamentos. Os compêndios oficiais, como as farmacopéias, exercem um papel primordial nesse sentido. São elas que recomendam e descrevem os métodos analíticos mais empregados que devem/podem ser utilizados nas análises de rotina de controle de qualidade de medicamentos (CQM) (CHAVES et al., 2020).

A garantia da qualidade de medicamentos tem se tornado gradualmente o motivo de inúmeras pesquisas por todo o mundo, no intuito de desenvolver técnicas analíticas adequadas e confiáveis para garantir a quantidade correta do produto finalizado, além de monitorar

possíveis impurezas que possam ocasionar efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos indesejáveis (PINTO et al., 2015; RUGANI; KOGAWA; SALGADO, 2019).

A capacidade de um medicamento manter suas propriedades físicas, químicas, biofarmacêuticas e microbiológicas, são fatores determinantes para a estabilidade de um produto farmacêutico durante sua vida útil. Visto isso, antimicrobianos de má qualidade e sua utilização de maneira irracional acabam contribuindo para uma resistência microbiana (RUGANI; KOGAWA; SALGADO, 2019).

Os ensaios de doseamento ou potência de antimicrobianos visam quantificar a substância ativa contida em medicamentos. Para essa finalidade, existem diversas metodologias, descritas em compêndios oficiais, como por exemplo: técnicas cromatográficas, espectroscópicas, microbiológicas e entre outros (KOGAWA; SALGADO, 2018; TÓTOLI; SALGADO, 2020). Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se destaca nesse sentido, por ser altamente sensível e possuir baixa vulnerabilidade a interferentes. Entretanto, exige equipamentos de alto custo para as análises e um alto conhecimento para o manuseio do aparelho. Visto isso, novas metodologias vêm sendo desenvolvidas e validadas, como alternativas, para os estudos de quantificação de substâncias antimicrobianas (RUGANI; KOGAWA; SALGADO, 2019; TÓTOLI; SALGADO, 2020).

Além disso, os métodos físico-químicos carecem da capacidade de obter e determinar a real atividade biológica dos antimicrobianos. Esse fato demonstra excelência da utilização dos bioensaios no controle de qualidade dessa classe de fármacos (TÓTOLI; SALGADO, 2015). Os dois ensaios biológicos mais utilizados e difundidos são a difusão em ágar (em placas) e a turbidimetria (em tubos). Em particular, ambos conseguem determinar o teor do antimicrobiano estudado (JESUS et al., 2015). Portanto, o presente estudo tem por objetivo realizar um estado da arte das técnicas microbiológicas para quantificação de fármacos antimicrobiano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar um estado da arte das técnicas microbiológicas para quantificação de fármacos antimicrobianos no controle de qualidade (CQ).

2.2 Objetivos específicos

- a) Realizar um levantamento sobre estado da arte das técnicas microbiológicas no controle de qualidade dos antimicrobianos (CQA).
- b) Descrever os principais métodos microbiológicos utilizados para validação de CQA.
- c) Relacionar a importância dos métodos microbiológicos na resistência bacteriana.
- d) Citar as vantagens e limitações dos métodos microbiológicos em relação aos métodos físico-químicos no CQA.

3 METODOLOGIA

O estudo trata-se de uma revisão de caráter narrativa, a pesquisa foi realizada através da busca bibliográfica utilizando bases de dados como: o portal de periódicos da CAPES, Science Direct, Scientific Electronic Library Online (SciELO), PubMed e o Google acadêmico. Para a pesquisa nos bancos de dados, foram utilizados os termos indexadores/descriptores “biological assay”, “bioassay”, “microbiological techniques”, “turbidimetry” e “antimicrobial agents”, de forma isolada ou combinados, sem intervalo de tempo definido. Os termos utilizados estão de

acordo com o vocabulário DeCS/MeSH (Descritores em Ciências da Saúde/Medical Subject Headings).

Após recuperar os dados-alvo, foi conduzida, inicialmente, a leitura prévia dos títulos e resumos para uma seleção inicial. Posteriormente, foi realizada a leitura completa do texto para a aplicação dos critérios de inclusão. Especificamente, para a análise da produção científica identificada, não serão utilizadas técnicas quantitativas e/ou qualitativas específicas de tratamento de dados. Como critérios de inclusão, os trabalhos devem:

- a) ter sido publicados em língua portuguesa ou inglesa;
- b) ter sido publicados nos últimos 20 anos;
- c) ter o texto completo disponível;
- d) conter os termos utilizados nas buscas no título ou palavras-chave, ou o resumo deixar claro que o tema aborda técnicas microbiológicas utilizadas para quantificação de fármacos antimicrobianos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estado da arte das técnicas microbiológicas no controle de qualidade dos antimicrobianos

A seleção de um método analítico adequado para o CQ de formas farmacêuticas e matérias-primas baseia-se em diversos parâmetros como: a origem do medicamento, sua complexidade, o número de amostras e também a disponibilidade de equipamentos e reagentes, onde estes dois últimos são fatores determinantes para a acessibilidade do método (MAHMOUDI et al., 2020a, 2020b). Além disso, ao desenvolver novas metodologias também deve-se levar em consideração a pureza da amostra, a finalidade qualitativa, semiquantitativa ou quantitativa do método (MAHMOUDI et al., 2020a).

As metodologias de ensaio, para determinação e quantificação dos ATMs, mudaram com o passar do tempo (ABDELAZIZ; ELBANNA; GAMALELDEEN, 2012). Para muitos pesquisadores a cromatografia, em especial a CLAE, é essencial pois a técnica fornece medições quantitativas da pureza e também as quantidades e tipos de impurezas presentes nos ATMs (ABDELAZIZ; ELBANNA; GAMALELDEEN, 2012; BRASIL, 2019).

A eficácia terapêutica de um antimicrobiano (ATM) pode ser avaliada pela determinação de sua potência (CHRIST et al., 2015). Dentre os métodos utilizados estão os ensaios microbiológicos (EM). Os EM se dividem em dois: o que utiliza meio de cultura sólido (difusão em ágar) e o que utiliza meio de cultura líquido (turbidimetria) (CHRIST et al., 2015; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Realizada a aplicação dos critérios de inclusão demonstrados na metodologia, foram selecionados 52 artigos para elaboração do presente trabalho. A partir dos artigos escolhidos, foi realizado a montagem da Tabela 1, a qual contém todas as informações referente aos fármacos utilizado, a classe farmacêutica desses fármacos, a forma farmacêutica que os antimicrobianos estavam inseridos, o método validado, o microrganismo utilizado, o meio de cultura, o doseamento, a leitura feita em cada método, a referência e o ano de cada artigo. Diante da Tabela 1 e da leitura completa dos artigos foi possível realizar todos os resultados e a discussão do trabalho.

Tabela 1 – Dados da pesquisa sobre estado da arte das técnicas microbiológicas para quantificação de fármacos antimicrobianos no CQ.

Fármaco	Classe Farmacológica	Forma	Método	Microrganismo	Meio de cultura	Doseamento	Leitura	Referência
Nistatina	Antifúngico	Pó	Difusão em ágar (2x2)	<i>Candida albicans</i>	Ágar Antibiótico	10.0 e 20.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	EISSA; RASHE; EISSA, 2021
Ceftriaxona	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	100.0, 140.0 e 196.0 µg/mL	Espectrofotômetro	TRINDADE; KOGAW; SALGADO, 2021
Danofloxacina	Fluoroquinolonas	Solução	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Ágar Antibiótico n° 11/Ágar Antibiótico n° 1	5.0, 10.0, e 20.0 µg/mL	Paquímetro digital	CORDEIRO et al., 2020
Josamicina	Macrolídeos	Suspensão	Difusão em ágar (3x3)	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Ágar Antibiótico n° 1/Ágar Antibiótico n° 11	0.1, 0.3 e 0.5 µg/mL	Paquímetro digital	MAHMOUDI et al., 2020
Josamicina	Macrolídeos	Comprimido	Difusão em ágar (3x3)	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Ágar Antibiótico n° 1/Ágar Antibiótico n° 11	0.1, 0.3 e 0.5 µg/mL	Paquímetro digital	MAHMOUDI et al., 2020
Roxitromicina	Macrolídeos	Comprimido	Difusão em ágar (3x3)	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	Ágar Antibiótico n° 1/Ágar Antibiótico n° 1	8.37, 41.85 e 83.70 µg/mL	Paquímetro digital	MAHMOUDI et al., 2020
Besifloxacino	Fuoroquinolonas	Suspensão	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	0.5, 2.0 e 8.0 µg/mL	Espectrofotômetro	TÓTOLI & SALGADO, 2019

(Continuação na próxima página)

Tabela 1 – Continuação.

Fármaco	Classe Farmacológica	Forma	Método	Microrganismo	Meio de cultura	Doseamento	Leitura	Referência
Gentamicina	Aminoglicosídeos	Pó	Difusão em ágar (3x1)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Ágar Mueller Hinton	20.0, 40.0, e 80.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	SAVIANO & LOURENÇO, 2019
Cefadroxila	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Cápsula	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	30.0, 60.0 e 120.0 µg/mL	Espectrofotômetro	MARCO & SALGADO, 2018
Ertapenem	Beta-Lactâmicos (Carbapenêmico)	Pó	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 26923	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	12.8, 16.0 e 20.0 µg/mL	Espectrofotômetro	PEDROSO; KOGAWA; SALGADO, 2018
Cefazolina	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Ágar Mueller Hinton	15.0, 30.0 e 60.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	SAVIANO & LOURENÇO, 2018
Cefuroxima	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Ágar Mueller Hinton	15.0, 30.0 e 60.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	SAVIANO & LOURENÇO, 2018
Ceftriaxona	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Ágar Mueller Hinton	20.0, 40.0, 80.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	SAVIANO & LOURENÇO, 2018
Cefepima	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Ágar Mueller Hinton	20.0, 40.0, 80.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	SAVIANO & LOURENÇO, 2018
Rifaximina	Rifamicinas	Comprimido	Turbidimetria (3x3)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 IAL 2393	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	50.0, 70.0 e 98.0 µg/mL	Espectrofotômetro	KOGAWA & SALGADO, 2018
Ácido Fusídico	Antibacteriano esteróide	Creme	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Caldo Tripton Soja (TSB)	0.25, 0.75 e 2.25 µg/mL	Espectrofotômetro	CURBETE & SALGADO, 2016

(Continuação na próxima página)

Tabela 1 – Continuação.

Fármaco	Classe Farmacológica	Forma	Método	Microorganismo	Meio de cultura	Doseamento	Leitura	Referência
Norfloxacino	Fluoroquinolonas	Comprimido	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	25.0, 50.0 e 100.0 µg/mL	Espectrofotômetro	CHIERENTIN & SALGADO, 2015
Claritromicina	Macrolídeos	Comprimido	Difusão em ágar (3x3)	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Ágar Antibiótico n° 11	0.1, 0.3 e 0.5 µg/mL	Paquímetro digital	MAHMOUDI et al., 2015
Roxitromicina	Macrolídeos	Comprimido	Difusão em ágar (3x3)	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Ágar Antibiótico n° 11	0.1, 0.3 e 0.5 µg/mL	Paquímetro digital	SUKE et al., 2015
Tigeciclina	Glicilciclinas	Pó	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Triptona Soja (TSB)	3.0, 3.6 e 4.32 µg/mL	Espectrofotômetro	SILVA & SALGADO, 2015
Linezolida	Oxazolidinonas	Pó	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Ágar Antibiótico n° 3	1.0, 2.0 e 4.0 µg/mL	Espectrofotômetro	SAVIANO et al., 2015
Daptomicina	Lipopeptídeo cíclico	Pó	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	Caldo Antibiótico n° 3	1.0, 2.0 e 4.0 µg/mL	Espectrofotômetro	CHRIST et al., 2015
Daptomicina	Lipopeptídeo cíclico	Pó	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 IAL 2082	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	8.0, 12.0 e 18.0 µg/mL	Espectrofotômetro	TÓTOLI & SALGADO, 2015
Levofloxacina	Fluorquinolonas	Comprimido	Difusão em ágar (5x1)	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884	Ágar Antibiótico n° 11	2.56, 3.20, 4.00, 5.00 e 6.25 mg/mL	Leitor de zona de inibição	DAFALE et al., 2014
Neomicina	Aminoglicosídeos	Pomada	Turbidimetria (3x3)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	3.0, 4.0 e 5.0 µg/mL	Espectrofotômetro	FRANCISCO et al., 2014

(Continuação na próxima página)

Tabela 1 – Continuação.

Fármaco	Classe Farmacológica	Forma	Método	Microorganismo	Meio de cultura	Doseamento	Leitura	Referência
Cefazolina	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 26923	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	6.00, 8.40 e 11.76 µg/mL	Espectrofotômetro	PEDROSO & SALGADO, 2014
Cefuroxima	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Turbidimetria (3x3)	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	30.0, 60.0 e 120.0 µg/mL	Espectrofotômetro	VIEIRA; FIUZA; SALGADO, 2014
Linezolid	Oxazolidinonas	Solução	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Ágar Antibiótico n° 1	25.0, 50.0 e 100.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	SAVIANO; FRANCISCO; LOURENÇO, 2014
Ciprofloxacino	Fluoroquinolonas	Solução	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	4.0, 28.0 e 56.0 µg/mL	Espectrofotômetro	CADADEY & SALGADO, 2013
Besifloxacino	Fluoroquinolonas	Solução	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Ágar Antibiótico n° 11	0.5, 1.0 e 2.0 µg/mL	Paquímetro digital	COSTA et al., 2013
Clorexidina	Antissépticos	Solução	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Ágar Brain Heart Infusion (BHI)	0.5, 1.5 e 4.5 %	Paquímetro digital	FIORENTINO; CORRÊA; SALGADO, 2013
Cefuroxima	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Comprimido	Difusão em ágar (3x3)	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	Ágar Antibiótico n°11	20.0, 10.0 e 5.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	DAFALE et al., 2013
Ceftriaxona	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Difusão em ágar (5x1)	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Ágar Antibiótico n° 1	2.6, 3.2, 4.0, 5.0 e 6.3 µg/mL	Leitor de zona de inibição	LOURENÇO et al., 2013
Ceftriaxona	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	Ágar Antibiótico n° 1	16.0, 32.0 e 64.0 µg/mL	Paquímetro digital	MANFIO et al., 2013

(Continuação na próxima página)

Tabela 1 – Continuação.

Fármaco	Classe Farmacológica	Forma	Método	Microorganismo	Meio de cultura	Doseamento	Leitura	Referência
Ampicilina	Beta-Lactâmicos (Penicilinas)	Pó	Turbidimetria (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 26923	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	2.0, 4.0 e 8.0 µg/mL	Espectrofotômetro	TÓTOLI & SALGADO, 2013
Moxifloxacino	Fluoroquinolonas	Comprimido	Difusão em ágar (3x3)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ágar Antibiótico n° 1	20.0, 40.0, e 80.0 µg/mL	Paquímetro digital	ABDELAZIZ; ELBANNA; GAMALELDE EN, 2012
Moxifloxacino	Fluoroquinolonas	Solução	Difusão em ágar (3x3)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ágar Antibiótico n° 1	20.0, 40.0, e 80.0 µg/mL	Paquímetro digital	ABDELAZIZ; ELBANNA; GAMALELDE EN, 2012
Ceftriaxona	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Ágar Antibiótico n° 1/Ágar Antibiótico n° 2	15.0, 30.0 e 60.0 µg/mL	Paquímetro digital	ALÈSSIO & SALGADO., 2012
Ceftriaxona	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Difusão em ágar (5x1)	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	Ágar Antibiótico n°11	2.56, 3.20, 4.00, 5.00 e 6.25 µg/mL	Espectrofotômetro	DAFALE et al., 2012
Doxiciclina	Tetraciclina	Comprimido	Turbidimetria (3x3)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	4.0, 6.0 e 9.0 µg/mL	Espectrofotômetro	KOGAWA; TOMITA; SALGADO, 2012
Orbifloxacino	Fluoroquinolonas	Comprimido	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Ágar Antibiótico n° 1/Ágar Antibiótico n° 11	16.0, 32.0 e 64.0 µg/mL	Paquímetro digital	CAZEDEY & SALGADO, 2011
Fluconazol	Azóis (Triazol)	Cápsula	Difusão em ágar (3x3)	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Ágar Sabouraud	25.0, 50.0 e 100.0 µg/mL	Paquímetro digital	CORRÊA et al., 2011
Gemifloxacino	Fluoroquinolonas	Comprimido	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Ágar Antibiótico n° 1	0.5, 1.5, e 4.5 µg/mL	Paquímetro digital	PAIM et al., 2011

(Continuação na próxima página)

Tabela 1 – Continuação.

Fármaco	Classe Farmacológica	Forma	Método	Microrganismo	Meio de cultura	Doseamento	Leitura	Referência
Linezolida	Oxazolidinonas	Comprimido	Difusão em ágar (3x3)	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	Ágar Antibiótico n° 1	20.0, 40.0, e 80.0 µg/mL	Paquímetro digital	LOPES & SALGADO, 2021
Gentamicina	Aminoglicosídeos	Pó	Difusão em ágar (3x1)	<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 12228	Ágar Antibiótico n° 11	1.0, 2.0 e 4.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	LOURENÇO & PINTO, 2009
Cefuroxima	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	Ágar Antibiótico n° 1	8.0, 16.0 e 32.0 µg/mL	Paquímetro digital	SCHMIDT et al., 2009
Eritromicina	Aminoglicosídeos	Pó	Difusão em ágar (3x1)	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Ágar Antibiótico n° 11	0,5, 1,0 e 2,0 g/mL	Leitor de zona de inibição	LOURENÇO; KANELO; PINTO, 2007
Ceftazidima	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Ágar Antibiótico n° 2/Ágar Antibiótico n° 1	100.0, 200.0 e 400.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	MORENO & SALGADO, 2007
Cefoxitina	Beta-Lactâmicos (Cefalosporina)	Pó	Difusão em ágar (3x3)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12226	Ágar Antibiótico n° 2/Ágar Antibiótico n° 1	50.0, 100.0 e 200.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	SALGADO & TOZO, 2007
Gatifloxacino	Fluoroquinolonas	Comprimido	Difusão em ágar (3x3)	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	Ágar Antibiótico n° 11	4.0, 8.0 e 16.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	SALGADO; LOPES; LUCCHESI, 2006
Lomefloxacino	Fluoroquinolonas	Comprimido	Difusão em ágar (3x3)	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	Ágar Antibiótico n° 11	2.0, 4.0 e 8.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	GOMES & SALGADO, 2006
Azitromicina	Macrolídeos	Solução	Difusão em ágar (3x3)	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	Ágar Antibiótico n° 11	50.0, 100.0 e 200.0 µg/mL	Leitor de zona de inibição	SALGADO & RONCARI, 2005

Fonte: Dados da pesquisa, 2022

4.1.1 Quantificação de antimicrobianos (ATMs) utilizando ensaios microbiológicos

A quantificação ou doseamento do ATM pode ser feito comparando a dose que inibe o crescimento de microrganismos suscetíveis com a dose de um padrão ATM de referência, nas mesmas condições de trabalho. Vale ressaltar que esse tipo de ensaio não quantifica a substância em si, mas converte a resposta do microrganismo a uma determinada quantidade de substância ativa com o auxílio de uma curva padrão (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SAVIANO; FRANCISCO; LOURENÇO, 2014).

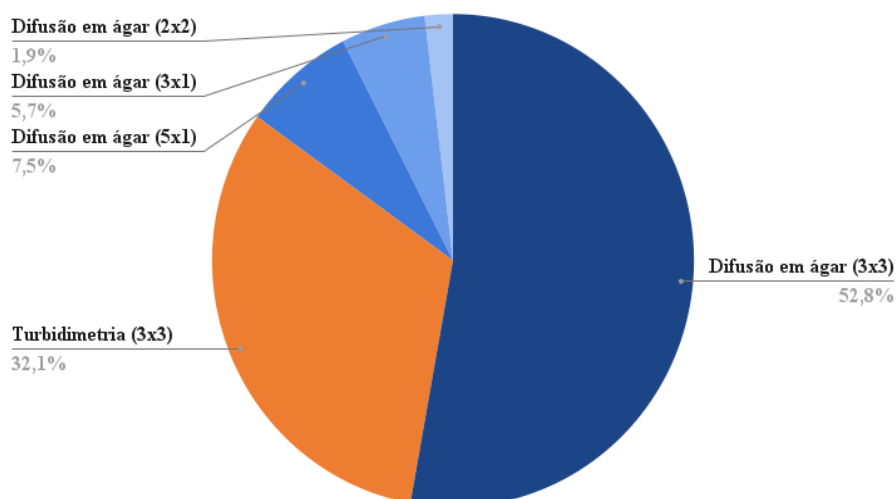
Os ensaios microbiológicos são vantajosos, pois as propriedades terapêuticas e os parâmetros medidos do medicamento são os mesmos. Esse tipo de ensaio é considerado o padrão ouro quando se trata em eliminar quaisquer dúvidas sobre uma possível perda de atividade da molécula (KOGAWA; TOMITA; SALGADO, 2012).

Os excipientes, contidos nas formas farmacêuticas, aparentemente não interferem no resultado final, se mostrando um método seletivo (CORDEIRO et al., 2020; COSTA et al., 2014; MAHMOUDI et al., 2020a, 2020b; MARCO; SALGADO, 2018; PAIM et al., 2011). Impurezas também não interferem no método analítico (MAHMOUDI et al., 2020a). Além disso, os ensaios microbiológicos não necessitam de equipamentos alto custo ou de solventes orgânicos para a sua execução (SAVIANO; FRANCISCO; LOURENÇO, 2014).

Entretanto, esses bioensaios exigem considerável habilidade e experiência para garantir o sucesso das análises (MORENO; SALGADO, 2007; PEDROSO; KOGAWA; SALGADO, 2018). Outro ponto é que alguns produtos de degradação podem (CORDEIRO et al., 2020) ou não (CHRIST et al., 2015) ter atividade biológica, isso acaba diminuindo a seletividade do ensaio em alguns casos.

Dentre dos métodos de bioensaios para controle de qualidade dos antimicrobianos (CQA), a partir da Tabela 1, foi possível determinar a porcentagem de cada método mais utilizados pelos autores na validação para o CQA. No Gráfico 1, evidencia que a maior porcentagem é o método em difusão em ágar (DEA), obtendo um valor total de 67,9% em relação ao método turbidimétrico de 32,1%.

Gráfico 1 – Dados percentuais de validações metodológicas para controle de qualidade dos antimicrobianos.

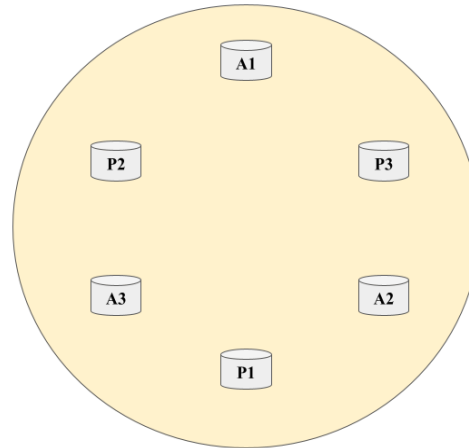


Fonte: Dados da pesquisa, 2022

4.1.2 Difusão em ágar (3x3)

O método em difusão, dentre os 67,9%, 52,8% (Gráfico 1) mostra-se que o desenho mais utilizado foi 3x3, ilustrado na figura 1.

Figura 1 – Representação da montagem da placa de petri no método em difusão em ágar de desenho 3x3.



Fonte: Dados da pesquisa, 2022

Legenda: A1= Amostra teste na concentração x, A2 = Amostra teste na concentração y, A3 = Amostra teste na concentração z, P1 = Padrão na concentração de susceptibilidade baixa, P2 = Padrão na concentração de susceptibilidade média e P3 = Padrão na concentração de susceptibilidade alta.

O ensaio de difusão em ágar (DEA) é um método físico que utiliza o próprio microrganismo como o revelador do ensaio. O microrganismo sensível ao antimicrobiano obtido da American Type Culture Collection (ATCC) que são microrganismos de referência padrão, linhas celulares e outros materiais para pesquisa e desenvolvimento que será testado é semeado em caldo, logo depois do crescimento do microrganismo (depois de 24 horas para bactérias e 48 horas para fungos), é feita uma padronização no espectrofotômetro no comprimento de onda de 580 nm, na transmitância de $25\% \pm 2$ (SAVIANO & LOURENÇO, 2018; CORDEIRO et al., 2020).

Nesse bioensaio, utiliza-se um meio de cultura sólido (ágar) inoculado em um sistema composto por uma única camada ou bicamada (camada base + camada superfície inoculada), distribuído em placas de petri, a camada base é composto por 20 ml do meio ágar em uma placa de petri de diâmetro de 100 mm, altura de 20 mm e fundo plano e espessura de parede uniforme. A camada superfície inoculada é preparada adicionando 2 mL do inóculo padronizado em 100 mL do meio ágar, o qual coloca-se após a solidificação da camada base, a quantidade de 5 ml da camada superfície inoculada, onde a solução estudada se difunde através do meio (MAHMOUDI et al., 2015; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SAVIANO; FRANCISCO; LOURENÇO, 2014; SAVIANO; LOURENÇO, 2019).

Por fim, a placa contendo o ágar base e superfície, é realizado a montagem que está ilustrada na Figura 1. O desenho 3x3 é formado por o antimicrobiano teste (T1, T2 e T3) e antimicrobiano padrão (P1, P2 E P3) ambos são dispostos em três concentrações diferentes (baixa, intermediário e alto). A leitura é realizada em torno de 24 horas com a formação do halo utilizando o paquímetro eletrônico ou um leitor de zona de inibição (SAVIANO & LOURENÇO, 2018; SAVIANO & LOURENÇO, 2018; SAVIANO; FRANCISCO; LOURENÇO, 2014).

A solução de ATM é colocada em contato com o meio de cultura, em uma área restrita, através de cilindros, moldes de aço, discos de papel ou poços/furos no gel, que auxiliam a

difusão da solução no meio. Basicamente, dois fenômenos ocorrem ao mesmo tempo: a difusão do agente antimicrobiano e o crescimento do microrganismo, onde os diâmetros das zonas de inibição são dependentes desses dois fenômenos (SAVIANO; FRANCISCO; LOURENÇO, 2014; MAHMOUDI et al., 2015; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SAVIANO; LOURENÇO, 2019).

A DEA correlaciona o tamanho da zona inibida na placa com a dose do antibiótico testado. Nesse ensaio, é necessário conciliar fenômenos biológicos (meio de cultura, microrganismo sensível, condições de incubação, entre outros) e físicos (capacidade de difusão da solução), com o intuito de medir a distância de difusão, resultando em um halo/zona de inibição de crescimento do microrganismo (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SAVIANO; FRANCISCO; LOURENÇO, 2014; SAVIANO; LOURENÇO, 2019).

O tamanho do halo de inibição pode ser interpretado em função da dose/concentração do ATM, do coeficiente de difusão de um ATM específico, da quantidade e do período de latência (fase *Lag*) do microrganismo (SAVIANO; LOURENÇO, 2019). Quando ocorre a formação de uma zona de inibição isso significa que o crescimento do microrganismo foi inibido pois, ao contrário do resto do meio de cultura (fator de crescimento), a concentração de difusão do agente antimicrobiano foi suficiente para impedir o seu desenvolvimento (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SAVIANO; FRANCISCO; LOURENÇO, 2014).

Alguns fatores podem aumentar ou diminuir o tamanho dos halos de inibição. Esses fatores são relacionados ao medicamento e ao microrganismo (SAVIANO; LOURENÇO, 2018). O coeficiente de difusão, a concentração utilizada, o tipo, a solubilidade e o peso molecular do ATM são alguns dos aspectos relacionados ao medicamento. Dentre os fatores relacionados ao microrganismo estão a origem da cepa microbiana utilizada, a quantidade do inóculo, o meio de cultura escolhido, o volume da camada inoculada e as condições experimentais (pré-incubação, tempo de incubação e temperatura) (SAVIANO; LOURENÇO, 2018, 2019). Portanto, qualquer mudança em um desses fatores pode alterar o resultado final do teste.

Quando comparada à CLAE, o método de DEA possui as vantagens de ser uma técnica mais simples, de baixo custo, onde várias amostras podem ser testadas ao mesmo tempo, não gera resíduos tóxicos e os resultados podem ser obtidos em até 24 horas (MAHMOUDI et al., 2020a; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Geralmente a DEA é o método de escolha para se trabalhar com compostos hidrossolúveis (CHRIST et al., 2015). Logo, uma das limitações do método de DEA é que alguns fármacos possuem a dificuldade de se difundir no meio sólido (PEDROSO; KOGAWA; SALGADO, 2018). O que implica diretamente na zona de inibição, pois é importante ter uma zona de inibição bem definida, de diâmetro suficiente, para a validação do método (PEDROSO; KOGAWA; SALGADO, 2018).

Outro ponto é que as medições do diâmetro das zonas de inibição, obtidas por paquímetros convencionais, resultam em um maior incerteza de medição dependendo do formato do halo (ou seja, circular ou oval) (SAVIANO; LOURENÇO, 2019). Além disso, quando comparado à turbidimetria (TBD), o método requer um maior período de incubação do microrganismo (16-18 horas) (BRASIL, 2019), podendo chegar até 24 horas (FRANCISCO; LOURENÇO, 2014; MAHMOUDI et al., 2015; SAVIANO; SAVIANO; LOURENÇO, 2018). As temperaturas variam de 32 a 38 °C (BRASIL, 2019), com exceção dos fungos, onde o crescimento ocorre a uma temperatura ambiente (25 °C) por 24 horas (CORRÊA et al., 2012).

Uma alternativa para contornar esse maior tempo de incubação, sem afetar os resultados, é utilizando indicadores de viabilidade celular, como os sais de tetrazólio (SAVIANO; LOURENÇO, 2018). Um exemplo é o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT). Estudos utilizando o CTT relataram uma diminuição do período de incubação de 22 horas para 6 horas (GALVÃO; SAVIANO; LOURENÇO, 2016; SAVIANO; LOURENÇO, 2018;

YAMAMOTO; PINTO, 1996). O CTT geralmente é adicionado ao final do período de incubação, para não influenciar no crescimento microbiano, com o objetivo de tornar os halos de inibição mais delimitados, com uma coloração avermelhada, possibilitando uma melhor visualização e consequentemente uma melhor medição dos halos (SAVIANO; LOURENÇO, 2018).

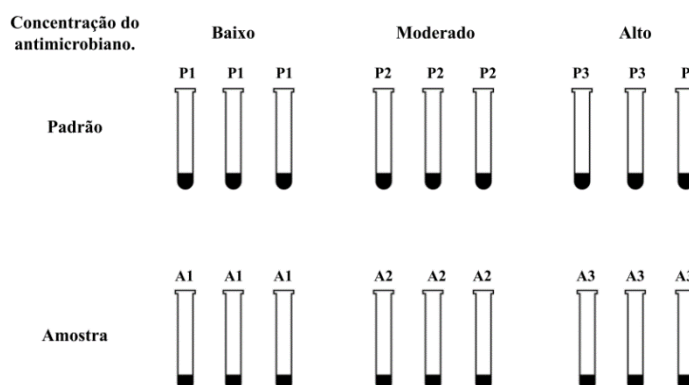
Por fim, foi observado através dos estudos analisados que o método de difusão em ágar, o desenho 3x3, 5x1, 3x1 e 2x2 (Gráfico 1), diante de aspectos diferentes como: forma farmacêutica, lotes diferenciados e diferentes concentrações, apresentam resultados insignificante quando realizada a comparação da faixa de aplicação de cada tipo de desenho, ou seja, não demonstrando diferença nos resultados na validação da quantificação dos ATMs. No entanto, o desenho 3x1 e 3x3 evidenciou como o mais adequado para análise de rotina no laboratório de CQA, pois oferece o uso de menos materiais, com isso, diminuindo o custo e simplicidade da execução do experimento e do cálculo de potência (LOURENÇO & PINTO, 2009; DAFALE et al., 2012; SAVIANO & LOURENÇO, 2019; EISSA; RASHE; EISSA, 2021).

Em relação ao desenho 5x1 mostrou-se também ideal para análises de rotina no CQA, porque permite avaliar um número de amostra maior de forma simultânea, porém, devido a correção necessária ser realizada, acaba dificultando os cálculos e elevando a chance de erros. Ademais, o desenho 2x2, é indicado para pesquisa de desenvolvimento, pois proporciona dados acerca do paralelismo entre a curva padrão e a amostra e significância da regressão, com isso, possibilitando a avaliação da validade do teste (LOURENÇO & PINTO, 2009; DAFALE et al., 2012; SAVIANO & LOURENÇO, 2019; EISSA; RASHE; EISSA, 2021).

4.1.3 Turbidimetria (3x3)

No método de turbidimetria entre os desenhos disponíveis na literatura, foi observado no levantamento dos dados que o único desenho usado foi 3x3, apresentando no Gráfico 1, representando cerca de 32,1% dos desenhos de cada método utilizados pelos autores. Essa metodologia utiliza-se inicialmente o microrganismo ATCC, o qual é suscetível ao antimicrobiano da amostra teste (A1, A2, A3) como também para o antibiótico padrão (P1, P2 e P3) em diferentes concentrações (baixo, moderado, alto), ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Representação da montagem dos tubos de ensaios no método turbidimétrico (3x3).



Fonte: Dados da pesquisa, 2022

O microrganismo é cultivado em caldo específico para crescimento durante 24h para bactéria e 48h para fungos (suspensão/inóculo), logo após o período de crescimento, a suspensão é padronizada (TÓTOLI & SALGADO, 2019; TRINDADE; KOGAW; SALGADO, 2021).

São usados 3 tubos para o ATM padrão e 3 tubos para o ATM da amostra teste em diferentes concentrações (baixa, moderado e alto) sendo realizada em triplicata, conforme mostrado na imagem 2, adicionando no tubo 200 µL. Além do ATM, em todos os tubos contém 1 mL da suspensão do microrganismo e 10 mL do caldo, sendo o caldo Brain Heart Info mais utilizado pelos autores na validação do método para CQA (PEDROSO; KOGAWA; SALGADO, 2018; MARCO & SALGADO, 2018).

Ademais, os tubos são colocados no *shaker* na temperatura ideal para cada microrganismo durante 4 horas e percorrido esse tempo é adicionado 0,5 mL de solução de formaldeído a 12% em cada tubo para interromper o crescimento do microrganismo. Por fim, é realizada o reajuste do fotômetro com o tubo contendo o controle negativo (10 mL do caldo com 0,5 mL de solução de formaldeído) e com isso é feito a leitura da absorvância de cada tubo no espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm. Como controle de teste positivo, usa-se um tubo contendo 10 mL de caldo, 0,8 mL de suspensão do microrganismo padronizado e 0,5 mL de solução de formaldeído após a incubação (KOGAWA & SALGADO, 2018; CURBETE & SALGADO, 2016).

A análise microbiológica turbidimétrica é menos utilizado em relação ao método em difusão em ágar, comprovando através do Gráfico 1, representando cerca de 32,1% dos artigos analisados em comparação com o método de DEA (67,9%), porém é um ensaio que assemelha-se com as condições clínicas (CHRIST et al., 2015). Esse método determina a potência de um medicamento medindo a turbidez (absorvância) causada pelo agente antimicrobiano ao inibir o crescimento do microrganismo em um meio de cultura líquido (KOGAWA; TOMITA; SALGADO, 2012; PEDROSO; KOGAWA; SALGADO, 2018).

Uma das principais vantagens da TBD tem relação com o meio de cultura utilizado. O uso de um meio líquido garante que as soluções testadas consigam se difundir totalmente pelo meio, conseqüentemente, menores concentrações dos ATMs são capazes de obter respostas satisfatórias dos microrganismos (CURBETE; SALGADO, 2016). O ensaio turbidimétrico também não necessita de solventes orgânicos para a sua execução, portanto, não produz resíduos químicos no meio ambiente. Além disso, quando comparado com o ensaio de DEA, a TBD requer um tempo menor de análise devido a um menor tempo de incubação do microrganismo, necessitando de aproximadamente 3-5 horas, a uma temperatura de 35 a 37,5 °C (BRASIL, 2019; CHRIST et al., 2015; CURBETE; SALGADO, 2016; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SILVA; SALGADO, 2015).

Apesar das diferenças entres os testes, ambos os ensaios conseguem estimar a potência do ATM testado por uma comparação direta com um ATM de referência (CHRIST et al., 2015; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; KIM et al., 2016; SAVIANO; LOURENÇO, 2018).

4.2 A importância dos métodos microbiológicos na resistência bacteriana

A resistência bacteriana (RA) representa um problema de saúde pública mundial. Segundo a Fundação Oswaldo Cruz, o índice de detecção de resistência a antibióticos em 2020, ultrapassou cerca de 3,7 mil amostras de microrganismos multirresistentes a diversos antimicrobianos. Dentre as causas que contribuem para o aumento da RA, tem-se o uso irracional de ATMs e também a má qualidade do produto farmacêutico (SOUZA, 2020).

Um fator que pode favorecer o desenvolvimento de patógenos resistentes a ATMs é a baixa qualidade dos produtos comercializados. Neste sentido, o CQ desempenha um papel fundamental para garantir a dosagem correta do medicamento, e preventivamente ajuda a minimizar o desenvolvimento de microrganismos resistentes (PEDROSO; KOGAWA; SALGADO, 2018).

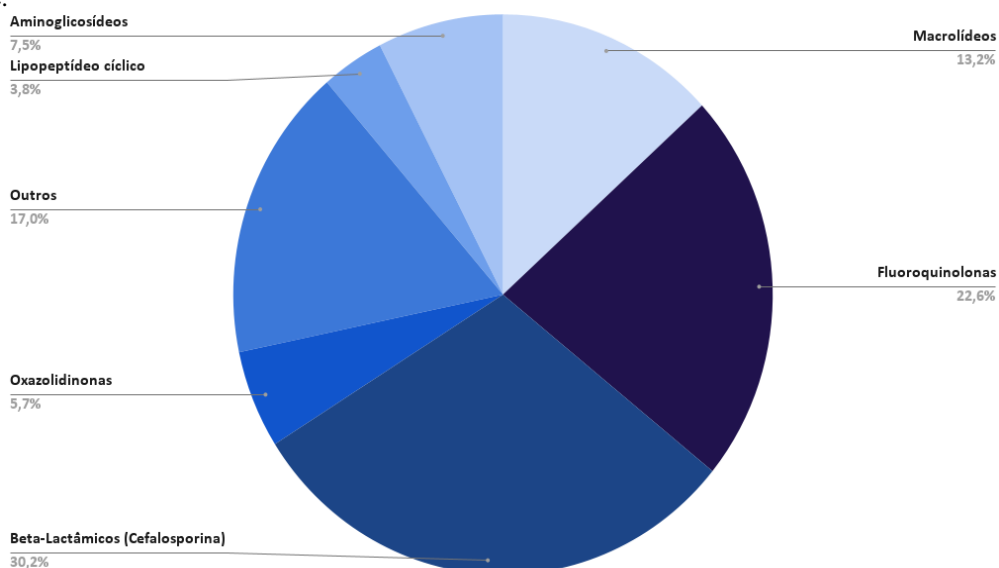
A garantia de qualidade dos antimicrobianos é indispensável, principalmente devido ao surgimento de bactérias produtoras de enzimas conhecidas como beta-lactamases que tem a

capacidade de inativar o anel beta-lactâmico de alguns fármacos que apresentam na sua estrutura o anel, que é responsável pela ação na inibição na parede celular bacteriana. No entanto, devido à produção das enzimas beta-lactamases, esses antimicrobianos perdem sua atividade. Existem várias beta-lactamases, como exemplo, ESBL (beta-lactamase de espectro estendido), AMPc, KPC (Carbapenemases), MBL (Metallo-beta-lactamases) e OXA (Oxacilinas). A maioria das resistências demonstradas, apresentam ação contra os betas-lactâmicos. No levantamento feito pelo presente trabalho foi possível evidenciar no Gráfico 2, as classes antimicrobianas utilizadas nas validações de bioensaios. Entre as diversas classes, foi observado que 30,2% estão as cefalosporinas que são beta-lactâmicos de amplo espectro e entre os outros (17%) no Gráfico 2, estão as penicilinas e os carbapenêmicos que são também betas-lactâmicos, porém outras classes podem apresentar resistências diante das superbactérias, como os aminoglicosídeos representados no gráfico 2 em cerca de 7,5 %, fluoroquinolonas no valor de 22,6% e os macrolídeos de 22,6% (TRONCOSO & ALENCAR, 2020).

Nesse sentido, por causa do crescente aumento de RA e a carência de desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, é evidente a importância de garantir a qualidade dos agentes antimicrobianos disponíveis atualmente no mercado, Por isso, faz-se necessário dentro de um laboratório de controle de qualidade, existir um banco de dados atualizados sobre novos métodos alternativos que demonstrem qualquer sutil alteração na atividade dos antimicrobianos que não são demonstrados nos métodos físico-químico e assim evitar o surgimento de mais cepas multirresistentes devido à baixa qualidade dos produtos antimicrobianos (CHRIST et al., 2015).

Em relação aos métodos e as classes de antimicrobianos utilizados, estudos indicam que ATMs com peso molecular de até 700 g/mol^{-1} conseguem se difundir no meio sólido em 5-7 horas (SAVIANO; LOURENÇO, 2018). Compreendendo isso, alguns fármacos de classes distintas se beneficiam desse aspecto como os aminoglicosídeos (por exemplo, amicacina $585,60 \text{ g/mol}^{-1}$, apramicina $539,58 \text{ g/mol}^{-1}$, gentamicina $477,60 \text{ g/mol}^{-1}$, neomicina $614,65 \text{ g/mol}^{-1}$ e tobramicina $467,52 \text{ g/mol}^{-1}$), beta-lactâmicos (por exemplo, cefalexina $347,39 \text{ g/mol}^{-1}$, imipenem $299,35 \text{ g/mol}^{-1}$ e meropenem $383,46 \text{ g/mol}^{-1}$), fluoroquinolonas (por exemplo, ciprofloxacino $331,34 \text{ g/mol}^{-1}$, levofloxacino $361,37 \text{ g/mol}^{-1}$ e moxifloxacino $401,43 \text{ g/mol}^{-1}$), macrolídeos (por exemplo, azitromicina $748,99 \text{ g/mol}^{-1}$, claritromicina $747,95 \text{ g/mol}^{-1}$ e eritromicina $733,93 \text{ g/mol}^{-1}$) penicilinas (por exemplo, amoxicilina $365,40 \text{ g/mol}^{-1}$).

Gráfico 2 – Dados percentuais das classes antimicrobianos testados em validações de bioensaios para controle de qualidade.



Fonte: Dados da pesquisa, 2022

Em relação ao método de turbidimetria tem sido amplamente utilizada para quantificação de agentes antimicrobianos de classes farmacológicas diversas, apresentando vantagens em relação a difusão em ágar, uma vez que alguns fármacos têm dificuldade de difundir em meio sólido, fato que não ocorre no ensaio de turbidimetria (CAZEDEY; SALGADO, 2013; PEDROSO; KOGAWA; SALGADO, 2018; SILVA; SALGADO, 2015).

4.3 Vantagens e limitações dos métodos microbiológicos em relação aos métodos físico-químicos

Dos estudos realizados nas validações de métodos microbiológicos, a maioria dos autores compararam o “método ouro” que são os ensaios físico-químicos, usando como referência HPLC, com os métodos microbiológicos para quantificação de formas farmacêuticas diversas (Tabela 1). Para isso, utilizaram métodos estatísticos, como exemplo o Teste t de *Student* em que foi observado que os métodos foram estatisticamente equivalentes, ao nível de significância de 5%, apresentando valores de t calculado entre 0,29 - 0,82 menor que t crítico entre 2,23 - 4,30, além disso, todos os métodos avaliados tiveram valores de especificidade na quantificação dos ATM em diferentes formas farmacêuticas na faixa adequada recomendadas pelas farmacopeias entre 90-110%. Com isso, através do Teste T de *Student* foi possível concluir que ambos os métodos físico-químicos e microbiológicos são intercambiáveis (TÓTOLI & SALGADO, 2015; EISSA; SAVIANO & LOURENÇO, 2019; RASHE; EISSA, 2021).

Nesse sentido, é possível observar que através do método estático relatado anteriormente, foi realizada a comparação dos métodos microbiológicos e físico-químicos, o qual são metodologias totalmente diferentes. Por isso, deve-se levar em consideração as seguintes desvantagens e vantagens de cada método aplicado no CQA. Na Tabela 2, é apresentado as principais diferenças do ensaio físico-químico (HPLC) em relação aos métodos microbiológicos. No geral, a principal diferença é o tempo de execução, maior número de materiais necessários e quantidade de trabalho, por essa razão, em muitos casos, os métodos microbiológicos são trocados por ensaios físico-químicos no CQA nas análises de rotina. Entretanto, essa substituição não é recomendada, pois os métodos microbiológicos evidenciam a atividade biológica dos ATMs, característica não evidenciada pelos ensaios físico-químicos. Regularmente, o grupo farmacofórico responsável e essencial pela ação farmacológica não é evidenciado por ensaios físico-químicos, conseqüentemente, podem fornecer informações equivocadas sobre a qualidade do antimicrobiano (TÓTOLI & SALGADO, 2015; CURBETE & SALGADO, 2016; KOGAWA & SALGADO, 2018).

Desse modo, os métodos microbiológicos são usados para determinar o potencial dos antimicrobianos, por isso, são importantes nos processos de CQA e fabricação. No entanto, os métodos físico-químicos (HPLC) apresentam vantagens devido sua rapidez, seletividade e detecção de impurezas e produtos de degradação, porém, é um ensaio que necessita de mão de obra especializada, cromatógrafo, solventes com elevado índice de pureza e colunas cromatográfica. Desse modo, torna-se um método caro e além disso prejudicial ao meio ambiente, gerando mais custos para as empresas tratar os resíduos tóxicos. Portanto, mesmo que os ensaios microbiológicos não tenham seletividade para diferenciar produto de degradação e impurezas, o qual podem apresentar atividade biológicas ou não, é o ensaio considerado ecologicamente correto, porque não faz uso de solventes orgânicos no seu experimento, estando inserido na linha com a tendência mundial. Além de tudo, cada vez cresce o uso e o reconhecimento das técnicas microbiológicas nas análises no CQA (ABDELAZIZ; ELBANNA; GAMALELDEEN, 2012; TÓTOLI & SALGADO, 2015; TÓTOLI & SALGADO, 2018).

Tabela 2 – Principais vantagens e limitações dos métodos microbiológicos em físico-químicos no CQA.

	Vantagens	Limitações	Referências
Método Físico-Químico (HPLC)	Rápido, preciso e exato na quantificação de antibióticos e produtos de degradação.	Equipamentos especializados ou sofisticados.	TÓTOLI & SALGADO, 2018; ABDELAZIZ; ELBANNA; GAMALELDE EN, 2012.
	Realizar separações e análises quantitativas de um grande número de substâncias presentes em uma amostra.	Reagentes caros.	
	Permite análises repetitivas e reprodutivas.	Interferência dos excipientes.	
	Leitura em poucos minutos, com alta resolução, sensibilidade e eficiência.	Não representa a potência dos antimicrobianos nem pode prever a perda de atividade.	
Método Microbiológico (Difusão em ágar)	Não possui instrumentos especializados e sofisticados.	Maior gasto de energia elétrica.	MAHMOUDI et al., 2020; TÓTOLI & SALGADO, 2018.
	Baixo custo e os procedimentos simples.	24 horas para leitura.	
	Técnica ecológica por não ser produtor de resíduo ou solvente.	Os produtos de degradação podem ou não ter atividade biológica, diminuindo a seletividade.	
	Representa a potência dos antimicrobianos e podem prever a perda de atividade.		
Método Microbiológico (Turbidimetria)	Não possui instrumentos especializados e sofisticados.	Maior gasto de energia elétrica.	TÓTOLI & SALGADO, 2019; DE MARCO & SALGADO, 2018.
	Técnica ecológica por não ser produtor de resíduo ou solvente.	3 – 5 horas para leitura.	
	Representa a potência dos antimicrobianos e podem prever a perda de atividade.	Os produtos de degradação podem ou não ter atividade biológica, diminuindo a seletividade.	
	Manejo mais fácil em relação aos outros métodos.		

Fonte: Dados da pesquisa, 2022

5 CONCLUSÃO

Para uma boa rotina de controle de qualidade de medicamentos, é necessário o uso de métodos analíticos, totalmente validados, com o objetivo de alcançar resultados reprodutíveis e confiáveis que possam ser interpretados de maneira adequada. Nesse sentido, o ideal é utilizar mais de um método analítico ao determinar a qualidade do fármaco ativo em uma formulação farmacêutica ou matéria-prima.

Dentre os métodos utilizados pelos autores, cerca de 67,9% usaram difusão em ágar, representando o ensaio mais utilizado na validação e 52,8% utilizando o desenho 3x3, o qual evidenciou como o mais adequado para análise de rotina no laboratório de CQA. Além disso, o método de difusão em ágar é bastante útil para o CQA de diversas classes farmacológicas

com peso molecular de até 700 g mol⁻¹ que conseguem se difundir no meio sólido. O uso do sais de tetrazólio mostrou-se útil na diminuição do período de incubação de 22 horas para 6 horas, tornando os halos de inibição mais delimitados, com uma coloração avermelhada.

Por outro lado, os métodos turbidimétricos que representam 32,1% dos ensaios usados, além de serem mais rápidos em relação ao método de difusão em ágar, não tem problema relacionado à difusão dos medicamentos, porém, são poucos estudos relacionados ao ensaio por turbidimetria nas validações de ATM no CQ.

Nesse sentido, ambos os métodos mostraram-se seletivos, robustos, precisos e exatos para quantificação de todos os ATMs mostrado na tabela 1, nas diferentes forma farmacêuticas, não ocorrendo nenhuma interferência dos excipientes na composição do medicamento, além de mostrarem resultados semelhantes ao testes padrão ouro (físico-químicos), a partir dos estudos através da utilização estatística, ambos os métodos são intercambiáveis, não apresentando diferenças na quantificação dos ATMs avaliados.

No entanto, os ensaios físico-químicos por mais seletivos, não são capazes de estimar atividade biológica dos ATMs, além do alto custo e ecologicamente poluente devido aos solventes usados. Entretanto, os métodos microbiológicos são ideais para verificar a perda de ação dos ATMs, mostrando ser uma metodologia de baixo custo, simples e não poluente, porém, por mais seletivo, preciso e específico os métodos validados pelos autores, em alguns situações podem evidenciar atividade biológica na presença de compostos de degradação e substâncias adulteradas na composição do ATMs, ocorrendo resultados com baixa confiabilidade. Com isso, deve-se levar em consideração as limitações de cada teste.

Portanto, a garantia de qualidade dos antimicrobianos torna-se como fator importante, principalmente devido ao surgimento de bactérias multirresistentes, principalmente a má qualidade do produto farmacêutico, conseqüentemente, ocorrendo o tratamento ineficaz e problemas sérios à saúde da população.

Nesse sentido, é extremamente fundamental criar um banco de dados atualizados sobre novos métodos alternativos que demonstrem qualquer sutil alteração na atividade dos antimicrobianos que não são demonstrados nos métodos físico-químicos, para mais, implantar os bioensaios nos laboratórios de CQA para assegurar a efetividade e qualidade do lote fabricado para comercialização, com esse propósito, evitar o surgimento de mais cepas multirresistentes devido a baixa qualidade dos ATMs.

Para tanto, faz-se necessário mais estudos de desenvolvimentos e validação de novos métodos, melhorias ou o uso dos bioensaios disponíveis, para o CQA de outros diversos ATMs em diferentes formas farmacêuticas ainda não evidenciadas nas farmacopeias.

REFERÊNCIA

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

ALÉSSIO, P. V.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a successful microbiological agar assay for determination of ceftriaxone sodium in powder for injectable solution. **Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 334-342, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia Brasileira, 6^a ed. RDC nº 298, de 12 de Agosto de 2019.

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

CAZEDEY, E. C. L.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a microbiological agar assay for determination of orbifloxacin in pharmaceutical preparations. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 3, p. 572-581, 2011.

CORDEIRO, E. W. F.; HILGERT, R. M.; BATISTA, L. A. C.; SOUZA, R. O.; OLIVEIRA, L. F. S.; MACHADO, M. M.; MALESUKI, M. D.; PAULA, F. R.; STOPIGLIA, C. D. O.; PAIM, C. S. Validation of an analytical method by high-performance liquid chromatography and microbiological assay, biological safety and in silico toxicity for danofloxacin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, 2020.

CORRÊA, J. C. R.; CARNAVALLI, F.; SALGADO, H. R. N. Bioassay for antifungal drugs quality control. **A critical review. WJPP S**, v. 9, n. 1, p. 1505-19, 2020.

CORRÊA, J. C. R.; REICHMAN, C.; SALGADO, H. R. N.; VIANNA-SOARES, C. D. Performance characteristics of high performance liquid chromatography, first order derivative UV spectrophotometry and bioassay for fluconazole determination in capsules. **Química Nova**, v. 35, p. 530-534, 2012.

COSTA, M. C. N.; BARDEN, A. T.; ANDRADE, J. M., OPPE, T. P.; SCHAPOVAL, E. E. Quantitative evaluation of besifloxacin ophthalmic suspension by HPLC, application to bioassay method and cytotoxicity studies. **Talanta**, v. 119, p. 367-374, 2014.

CHAVES, J. et al. BIOASSAY FOR ANTIFUNGAL DRUGS QUALITY CONTROL . A CRITICAL REVIEW. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1505–1519, 2020.

CHIERENTIN, L.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of norfloxacin in tablets. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 629-635, 2015.

CHRIST, A. P.; MACHADO, M. S.; RIBAS, K. G.; SCHWARZBOLD, A. V.; SILVA, C. D. B. D.; ADAMS, A. I. H. A fully validated microbiological assay for daptomycin injection and comparison to HPLC method. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 775-783, 2015.

CURBETE, M. M.; SALGADO, H. R. N. Rapid turbidimetric assay for quantification of fusidic acid in a dermatological cream. **Talanta**, v. 153, p. 51-56, 2016.

DAFALE, N. A.; AGARWAL, P. K.; SEMWAL, U. P.; SINGH, G. N. Development and validation of microbial bioassay for the quantification of potency of the antibiotic cefuroxime axetil. **Analytical Methods**, v. 5, n. 3, p. 690-698, 2013.

DAFALE, N. A.; SEMWAL, U. P.; AGARWAL, P. K.; SHARMA, P.; SINGH, G. N. Development and validation of microbial bioassay for quantification of Levofloxacin in pharmaceutical preparations. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 5, n. 1, p. 18-26, 2015.

DAFALE, N. A.; SEMWAL, U. P.; AGARWAL, P. K.; SHARMA, P.; SINGH, G. N. Quantification of ceftriaxone sodium in pharmaceutical preparations by a new validated microbiological bioassay. **Analytical Methods**, v. 4, n. 8, p. 2490-2498, 2012.

DE MARCO, B. A.; SALGADO, H. R. N. Rapid stability-indicative turbidimetric assay to determine the potency of cefadroxil monohydrate capsules. **Analytical Methods**, v. 10, n. 6, p. 660-666, 2018.

EISSA, D. E.; RASHED, E. R.; EISSA, M. E. Suitability system of microbiological method for nystatin potency determination in the routine analysis using agar diffusion method. **SciMedicine Journal**, v. 3, n. 4, p. 302-315, 2021.

GALVÃO, G. V.; SAVIANO, A. M.; LOURENÇO, F. R. Reduced incubation time for inhibition zone formation based on diffusion and growth mechanism elucidation. **Analytical Methods**, v. 8, n. 19, p. 3885–3891, 2016.

GOMES, G. Cristiani; SALGADO, H. R. N. Microbiological assay for lomefloxacin in coated tablets. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p. 1077-1079, 2006.

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

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

KIM, S.; THIESSEN, P. A.; BOLTON, E. E.; CHEN, J.; FU, G.; GINDULYTE, A.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; SHOEMAKER, B. A.; WANG, J.; YU, B.; ZHANG, J.; BRYANT, S. H. PubChem substance and compound databases. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D1202-D1213, 2016.

KOGAWA, A. C.; TOMITA, L. K.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a stability-indicative turbidimetric assay to determine the potency of doxycycline hyclate in tablets. **International Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 8, p. 316, 2012.

KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Optimization of microbiological method by turbidimetry for quantification of rifaximin tablets: validation, application and evaluation of degraded compounds. **Pharm Anal Acta**, v. 7, n. 518, p. 2, 2016.

LOPES, C. C. G. O.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a stability-indicative agar diffusion assay to determine the potency of linezolid in tablets in the presence of photodegradation products. **Talanta**, v. 82, n. 3, p. 918-922, 2010.

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

LOURENÇO, F. R.; KANEKO, T. M.; PINTO, T. J. A. Validation of erythromycin microbiological assay using an alternative experimental design. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 4, p. 1107-1110, 2007.

LOURENÇO, F. L.; TRAPLE, M. A. L.; OKAMOTO, R. T.; PINTO, T. J. A. Development and validation of microbiological assay for ceftriaxone and its application in photo-stability study. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 1, p. 77-81, 2013.

MAHMOUDI, A.; FOURAR, R. A.; BOUKHECHEM, M. S.; ZARKOUT, S. Microbiological assay for the analysis of certain macrolides in pharmaceutical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1-2, p. 285-291, 2015.

MAHMOUDI, A.; TERTIS, M.; SIMON, L. M.; VAN, A. S.; FRANCIA, S.; JUNIE, L. M.; SANDULESCU, R. Correlated quantification using microbiological and electrochemical assays for roxithromycin determination in biological and pharmaceutical samples. **Talanta**, v. 211, p. 120703, 2020a.

MAHMOUDI, A.; ZARKOUT, S.; SCHEPDAEL, A. V.; BOUKHECHEM, M. S.; BOUJELLA, H.; SIMON, L. M.; FRANCIA, S.; PIRRO, E. Validated Microbiological Assay for Josamycin Determination in its Pharmaceutical Formulations. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 10, n. 1, p. 33-37, 2020b.

MANFIO, M. L.; AGARRAYUA, D. A.; MACHADO, J. C.; SCHMIDT, C. A. A fully validated microbiological assay to evaluate the potency of ceftriaxone sodium. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 753-762, 2013.

MENEZE, M. Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia. **Portal FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz)**, 2021. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/deteccao-de-bacterias-resistentes-antibioticos-triplicou-na-pandemia#:~:text=Em%202020%2C%20primeiro%20ano%20da,2019%2C%20per%C3%ADodo%20pr%C3%A9%20pandemia>> . Acesso em: 10/11/2022.

MORENO, A. H.; SALGADO, H. R. N. Microbiological assay for ceftazidime injection. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 5, p. 1379-1382, 2007.

PAIM, C. S.; FUHR, F.; BARTH, A. B.; GONÇALVES, C. E.; NARDI, N.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. Gemifloxacin mesylate (GFM) stability evaluation applying a validated bioassay method and in vitro cytotoxic study. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1774-1779, 2011.

PEDROSO, T. M.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Validation and Routine Application of a Versatile Bioassay for Quantification of Ertapenem Sodium. **J. Pharmacol. Toxicol. Stud**, v. 6, p. 1-9, 2018.

PEDROSO, T. M.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a microbiological assay by turbidimetry to determine the potency of cefazolin sodium in the lyophilized powder form. **Analytical Methods**, v. 6, n. 5, p. 1391-1396, 2014.

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

RUGANI, K. DE S.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Review for Analytical Methods for the Determination of Sodium Cephalothin. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 187–194, 2019.

SALGADO, H. R. N.; LOPES, C. C. G. O.; LUCCHESI, M. B. B. Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 40, n. 2, p. 443-446, 2006.

SALGADO, H.; RONCARI, A. Microbiological assay for the determination of azithromycin in ophthalmic solutions. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 40, n. 6, p. 544, 2005.

SALGADO, H. R. N.; TOZO, G. C. G. Microbiological assay for ceftiofur sodium in dosage form. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 2, p. 452-455, 2007.

SAVIANO, A. M.; LOURENÇO, F. R. Rapid microbiological methods (RMMs) for evaluating the activity of cephalosporin antibiotics employing triphenyltetrazolium chloride. **Talanta**, v. 185, p. 520-527, 2018.

SAVIANO, A. M.; LOURENÇO, F. R. Using image analysis to determine gentamicin potency by agar diffusion microbiological assay and its measurement uncertainty. **Measurement**, v. 146, p. 315-321, 2019.

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

SAVIANO, A. M.; FRANCISCO, F. L.; OSTRONOFF, C. S.; LOURENÇO, F. R. Development, optimization, and validation of a microplate bioassay for relative potency determination of linezolid using a design space concept, and its measurement uncertainty. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 5, p. 1267-1275, 2015.

SCHMIDT, C. A.; AGARRAYUA, D. A.; LAPORTA, L. V.; MACHADO, J. C.; MANFIO, M. L.; BITTENCOURT, C. F. Development and validation of a microbiological agar assay for determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical preparations. **Journal of microbiological methods**, v. 77, n. 3, p. 308-315, 2009.

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

SOUZA, J. R. A importância do controle de qualidade efetivo em antibióticos. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Farmácia – Faculdade Pitágoras, Bacabal, 2020.

SUKE, S. G.; CHAHANDE, A. D.; KASLIWAL, R. H.; ASNANI, A. J. Roxithromycin potency quantification in pharmaceutical preparation by applying a validated bioassay method and comparison with HPLC analysis. In: *Annales Pharmaceutiques Françaises*. **Elsevier Masson**, v. 73, n. 5, p. 340-350, 2015.

TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of ampicillin sodium in powder for injectable solution. **Analytical Methods**, v. 5, n. 21, p. 5923-5928, 2013.

TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Miniaturized turbidimetric assay: a green option for the analysis of besifloxacin in ophthalmic suspension. **Talanta**, v. 209, p. 120532, 2020.

TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Rapid turbidimetric assay to determine the potency of daptomycin in lyophilized powder. **Pharmaceutics**, v. 7, n. 3, p. 106-121, 2015.

TRINDADE, M. T.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N.. Turbidimetric Method: A Multi-Advantageous Option for Assessing the Potency of Ceftriaxone Sodium in Powder for Injection. **Journal of AOAC International**, v. 104, n. 1, p. 204-210, 2021.

TRONCOSO, A. T. Atualidades em resistência bacteriana: uma revisão bibliográfica. **Revista da Faculdade de Medicina de Teresópolis**, v. 4, n. 1, 2020.

VIEIRA, D. C. M.; FIUZA, T. F. M.; SALGADO, H. R. N. Development and Validation of a Rapid Turbidimetric Assay to Determine the Potency of Cefuroxime Sodium in Powder for Injection. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 656-666, 2014.

KOGAWA, A. C.; NUNES SALGADO, H. R. Rifaximin stability: A look at UV, IR, HPLC, and turbidimetry methods. **Journal of AOAC International**, v. 101, n. 2, p. 410-413, 2018.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus por tudo que fez e faz na minha vida, toda honra e glória a ele pelas conquistas alcançadas e as que virão.

Agradecer aos meus pais, por terem sido meus maiores apoiadores fazendo o possível para me manter no curso, amo muitos vocês dois e terão minha gratidão eterna. A Vó Maria e Tia Nevinha pelo carinho, amor e cuidado, gratidão por toda ajuda que vocês me deram.

Ao meu irmão mais velho Lucas e minha cunhada Thaynan por serem meus maiores incentivadores da minha profissão e do meu sucesso.

Ao meu irmão do meio Mateus e minha cunhada Manuela por serem a alegria em momentos estressantes e tenebrosos, me ajudando sempre quando precisei. A toda minha família, Vó Deta, Tias, Tios, primos e agregados. Em especial e meu carinho enorme as minhas Primas Thaís, Mariana, Wilima e Gilvânia pelo carinho, amizade, companheirismo e por me socorrer com o notebook para escrever meu tcc, minha gratidão.

Agradeço ao meu orientador Felipe Hugo que me acolheu no LABDEM e que pude passar 3 anos desenvolvendo pesquisa, minha gratidão enorme e saiba que tenho como grande referência de profissional que um dia desejo chegar. Aos meus companheiros de laboratório, em especial a minha grande amiga, Kilma Pimentel, obrigado pelos ensinamentos e a oportunidade de acompanhar sua trajetória no mestrado e aos demais Virmerson, Niedja, Ana Clara, Davi e Myllena por toda ajuda nas minhas pesquisas e no meu TCC.

Quero agradecer à Professora Ana Cláudia por ter aceito meu convite para ser minha orientadora do TCC e ao Professor João Oshiro ter aceito participar da minha banca, minha gratidão.

Quero agradecer em especial a minha amiga Ester por toda reciprocidade e companheirismo, por todas as vezes que sempre precisei você esteve para me ajudar e me acolher até no meu TCC, amo vc.

Agradeço também aos meus amigos que sempre me acolheram quando precisei dormir em Campina Grande, Rayane, Yasmim, Kilma, Ester e aos familiares de cada um em terem me tratado com muito amor e carinho.

Gratidão aos amigos dentro e fora da universidade que me ajudaram muito até aqui, dedico a: Karen, Misael, Brenda, Analara, Esdras, Pedro, Alessandra, Tatiane, Walisson, Luana, Leda, Giovanna, José, Ellen, Laís, Marianna, Camila, Jefferson, Joyce, Narynha, João Victor, João Lucas, Fabrício, Sonali, João Victor Belo, Liat.