**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

# Desenvolvimento de método colorimétrico para determinação de sulfato de neomicina empregando os conceitos de qualidade por design analítico (AQbD)

**Patrícia Cristina de Santana**

São Paulo
2019

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

# Desenvolvimento de método colorimétrico para determinação de sulfato de neomicina empregando os conceitos de qualidade por design analítico (AQbD)

**Patrícia Cristina de Santana**

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo
2019

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o
programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e
adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

D231d

DE SANTANA, PATRICIA CRISTINA
Desenvolvimento de método colorimétrico para determinação de sulfato de neomicina empregando os conceitos de qualidade por design analítico (AQbD) / PATRICIA CRISTINA DE SANTANA. - São Paulo, 2019.
82 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: LOUREN?O, FELIPE REBELLO

1. Qualidade por Design Analítico (AQbD). 2. Doseamento Microbiológico. 3. Sulfato de Neomicina. 4. Resazurina. 5. Sistema RGB. I. T. II. LOURENÇO, FELIPE REBELLO, orientador.

**Patrícia Cristina de Santana**

Desenvolvimento de método colorimétrico para determinação de sulfato de neomicina empregando os conceitos de qualidade por design analítico (AQbD)

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

Orientador/presidente

_____

1º examinador

_____

2º examinador

_____

3º examinador

São Paulo, _____de _____de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar saúde, força e coragem para superar as dificuldades; protegendo minha vida e me guiando.

Ao meu marido Marcio Contardi, que em todos os momentos sempre permaneceu ao meu lado e me incentivou mesmo nas horas mais difíceis.

Aos meus pais, Sandra e Heloiso, por acreditarem em mim, por todo amor e dedicação. Também gostaria de expressar minha gratidão à minha querida vovó Shirley por seu amor e carinho incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço pela oportunidade, apoio e dedicação para que a realização desta conquista pudesse ser concretizada.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

SANTANA, P.C. **Desenvolvimento de método colorimétrico para determinação de sulfato de neomicina empregando os conceitos de qualidade por design analítico (AQbD)**. 82p. (Qualificação de Mestrado) – Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Para efetivamente tratar uma infecção, é necessário que o antibiótico possua atividade antimicrobiana adequada e seja capaz de inibir o crescimento do microrganismo patogênico. O doseamento microbiológico é uma metodologia indicada para a análise do antimicrobiano de forma simples, quando comparado com outras metodologias. A *Food and Drug Administration* (FDA) tem encorajado uma abordagem proativa para introduzir inovações e benefícios associados ao processo de produção farmacêutica. A Qualidade por Design Analítico (AQbD) ajuda no desenvolvimento de métodos analíticos robustos e de baixo custo, que são aplicáveis durante todo ciclo de vida do produto. Os métodos microbiológicos tradicionais, de forma geral, apresentam baixa reprodutibilidade e alta incerteza. Desta forma, justifica-se o desenvolvimento de métodos microbiológicos alternativos para a análise de antimicrobianos empregando-se os conceitos de Qualidade por Design Analítico, com a finalidade de melhorar a reprodutibilidade e reduzir a incerteza final. O objetivo deste trabalho foi aplicar o conceito de Qualidade por Design Analítico (AQbD) no desenvolvimento de método colorimétrico para análise de sulfato de neomicina. O sulfato de neomicina é um antimicrobiano aminoglicosídeo amplamente empregado no tratamento de infecções cutâneas ou mucosas, tais como queimaduras, úlceras, e dermatites infecciosas. Métodos cromatográficos como a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, de pareamento iônico ou cromatografia iônica com derivatização (pré ou pós-coluna) são utilizados para a análise de aminoglicosídeos, inclusive sulfato de neomicina. Contudo, de acordo com as farmacopeias, o método microbiológico é o método analítico de escolha para a análise de sulfato de neomicina e outros aminoglicosídeos. A análise colorimétrica é um método amplamente utilizado para a detecção e quantificação de diferentes substâncias, incluindo o crescimento microbiano em estudos de eficácia terapêutica. Neste trabalho, propomos o uso de resazurina como marcador colorimétrico. O indicador sofre uma reação de oxido-redução na qual altera a coloração em resposta à redução química resultante do crescimento celular. O uso de microplacas para a análise colorimétrica é uma alternativa ao método realizado em tubos de ensaio. Uma alternativa ao uso de espectrofotômetros para a análise colorimétrica é o uso de aparelhos *smartphones,* pois são equipados com CPUs rápidas, câmeras de alta resolução e sensores de imagem. O processamento da imagem captada pela câmera do dispositivo é utilizado como um analisador colorimétrico. Portanto, a aplicação dos conceitos de Qualidade por Design Analítico (AQbD) possibilitou o desenvolvimento racional de método microbiológico colorimétrico para análise de sulfato de neomicina.

**PALAVRAS-CHAVE:** Qualidade por Design Analítico (AQbD), Doseamento Microbiológico, Sulfato de Neomicina, Resazurina, Sistema RGB.

SANTANA, P.C. **Development of a colorimetric method for determination of neomycin sulphate using the concepts of quality by analytical design (AQbD)** 82p. (Qualificação de Mestrado) – Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

To effectively treat an infection, the antibiotic must have adequate antimicrobial activity and be capable of inhibiting the growth of the pathogenic microorganism. The microbiological assay is an indicated methodology for the analysis of the antimicrobial in a simple way, when compared with other methodologies. The Food and Drug Administration (FDA) has encouraged a proactive approach to introducing innovations and benefits associated with the pharmaceutical production process. Analytical Design Quality (AQbD) assists in the development of robust, low cost analytical methods that are applicable throughout the product life cycle. Traditional microbiological methods, in general, have low reproducibility and high uncertainty. Thus, it is justified the development of alternative microbiological methods for the analysis of antimicrobials using the concepts of Quality by Analytical Design, in order to improve reproducibility and reduce final uncertainty. The objective of this work was to apply the concept of Quality by Analytical Design (AQbD) in the development of a colorimetric method for the analysis of neomycin sulfate. Neomycin Sulfate is an aminoglycoside antimicrobial widely used in the treatment of cutaneous or mucosal infections, such as burns, ulcers, and infectious dermatitis. Chromatographic methods such as reverse phase high performance liquid chromatography, ion-pairing or ion chromatography with derivatization (pre or post-column) are used for the analysis of aminoglycosides, including neomycin sulfate. However, according to pharmacopoeias, the microbiological method is the analytical method of choice for the analysis of neomycin sulphate and other aminoglycosides. Colorimetric analysis is a widely used method for the detection and quantification of different substances, including microbial growth in studies of therapeutic efficacy. In this work, we propose the use of resazurin as a colorimetric marker. The indicator undergoes an oxidation-reduction reaction in which it alters the coloration in response to the chemical reduction resulting from cell growth. The use of microplates for colorimetric analysis is an alternative to the method carried out in test tubes. An alternative to the use of spectrophotometers for colorimetric analysis is the use of smartphones because they are equipped with fast CPUs, high resolution cameras and image sensors. The image processing captured by the device's camera is used as a colorimetric analyzer. Therefore, the application of the concepts of Quality by Analytical Design (AQbD) allowed the rational development of a microbiological colorimetric method for analysis of neomycin sulfate.

**KEY WORDS:** Analytical quality by design (AQbD), Microbiological Dosing, Neomycin Sulfate, Resazurin, RGB System.

**SUMÁRIO**

**LISTA DE ABREVIATURAS** 9

**LISTA DE FIGURAS** 11

**LISTA DE TABELAS** 13

**1. INTRODUÇÃO** 17

**2. REVISÃO DE LITERATURA** 23

**2.1. SULFATO DE NEOMICINA** 23

**2.2. DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS** 25

2.2.1. Influência do microrganismo 27

2.2.2. Influência do tempo e temperatura 28

2.2.3. Influência da concentração de resazurina 29

2.2.4. Influência da concentração de antibiótico 31

**2.3. DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO EMPREGANDO AQBD** 31

**2.4. ENSAIO COLORIMÉTRICO EM MICROPLACA COM LEITURA RGB** 35

**3. OBJETIVOS** 39

**4. MATERIAL E MÉTODOS** 43

4.1. Material 43

4.1.1. Meio de cultura e reagentes 43

4.1.2. Equipamentos e materiais 43

4.1.3. Soluções 44

4.2. Método 45

4.2.1. Etapas do AQbD 45

4.2.1.1. Estabelecimento de perfil analítico alvo (ATP) 45

4.2.1.2. Estudo da análise de risco 45

4.2.1.3. Planejamento de experimentos (DoE) 45

4.2.1.3.1. Tempo de incubação 46

4.2.1.3.2. Influência da concentração de microrganismo e resazurina 47

4.2.1.3.3. Otimização do ensaio microbiológico colorimétrico 48

4.2.1.4. Validação do método 49

4.2.2. Ensaio colorimétrico em microplaca com leitura em aplicativo RGB 50

**5. RESULTADOS E DISCUSSÃO** 53

5.1. Estabelecimento de perfil analítico alvo (ATP) 53

5.2. Análise de risco 53

5.3. Planejamento de experimentos 55

**6. CONCLUSÕES** 73

**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 77

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AQbD | *Analytical Quality by Design* (Qualidade por Design Analítico) |
| ATP | *Analytical Target Profile* (Perfil do Alvo Analítico) |
| DoE | *Design of Experiments* (Delineamento Experimental) |
| FDA | *Food and Drug Administration* |
| FMEA | *Failure Mode Effects Analysis* (Análise dos Modos de Falha e seus Efeitos) |
| ICH | *International Conference on Harmonisation* |
| MODR | *Method Operable Design Region* (Região de Design Operável do Método) |
| PAT | *Process Analytical Technology* (Tecnologia Analítica do Processo) |
| QbD | *Quality by Design* (Qualidade por *Design*) |
| USP | *United States Pharmacopeia* |

## LISTA DE FIGURAS


**Figura 1.** Estrutura molecular do sulfato de neomicina..... 23

**Figura 2.** Estrutura molecular da resazurina e resorufina..... 29

**Figura 3.** Diagrama de causa-efeito (diagrama de Ishikawa) dos parâmetros analíticos potencialmente críticos que podem afetar o desempenho do método microbiológico para análise de antimicrobianos e antibióticos..... 54

**Figura 4** Gráfico 3D da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *B. subtilis* (*Y1*) em função do tempo de incubação (*X1*) e quantidade de inóculo (*X2*), sendo a concentração de resazurina (*X3*) fixada em 4 µg/mL..... 59

**Figura 5.** Gráfico 3D da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *S. aureus* (*Y2*) em função do tempo de incubação (*X1*) e quantidade de inóculo (*X2*), sendo a concentração de resazurina (*X3*) fixada em 4 µg/mL..... 60

**Figura 6.** Gráfico 3D da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *E. coli* (*Y3*) em função do tempo de incubação (*X1*) e quantidade de inóculo (*X2*), sendo a concentração de resazurina (*X3*) fixada em 4 µg/mL..... 61

**Figura 7** Gráfico da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *S. aureus* (Y2) em função das concentrações de neomicina (X4, 8 a 1000 µg/mL), considerando 30 (A) ou 90 (B) minutos de incubação (X1) 62

e diluições de 1:10 ou 1:100 dos inóculos (X2), e concentração de resazurina (X3) de 4 µg/mL……...

**Figura 8** Gráfico do modelo de regressão logística de 4 parâmetros para a quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *S. aureus* (*Y2*) em função das concentrações de neomicina (*X4*, 8 a 1000 µg/mL), considerando 90 minutos de incubação (*X1*), diluição de inóculo 1:10 (*X2*) e concentração de resazurina (*X3*) de 4 µg/mL..... 63

**Figura 9** Tubos contendo concentrações de neomicina na faixa de 1,0 a 250 µg/mL, nos quais podem ser observados crescimento microbiano gradual evidenciado pela diferença de coloração (azul e rosa)..... 65

**Figura 10** Microplaca contendo diferentes concentrações de neomicina e meio de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus* nas proporções de 1:4 e 1:10, imediatamente após a transferência das soluções (t0)..... 68

**Figura 11** Microplaca contendo diferentes concentrações de neomicina e meio de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus* nas proporções de 1:4 e 1:10, após 3 horas de incubação (t180)..... 69

## LISTA DE TABELAS


**Tabela 1.** Microrganismos-teste, tempo de incubação e proporção de inóculo utilizados nos ensaios para determinação do tempo de incubação..... 46

**Tabela 2.** Estudo da influência da concentração de microrganismo e resazurina no crescimento microbiano..... 47

**Tabela 3.** Análise de variância da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (*Y1*), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (*Y2*), *Escherichia coli* (ATCC 8739) (*Y3*) em função do tempo de incubação (*X1*), quantidade de inóculo (*X2*) e concentração de resazurina (*X3*)..... 56

**Tabela 4.** Equações de regressão e coeficientes de correlação da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *B. subtilis* (*Y1*), *S. aureus* (*Y2*) e *E. coli* (*Y3*) em função do tempo de incubação (*X1*), quantidade de inóculo (*X2*) e concentração de resazurina (*X3*)..... 57

**Tabela 5.** Equações do modelo de regressão logística de 4 parâmetros e coeficientes de correlação da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *S. aureus* (*Y2*) em função das concentrações de neomicina e cefazolina (*X4*, 8 a 1000 µg/mL), considerando 90 minutos de incubação (*X1*), diluição de inóculo 1:10 (*X2*) e concentração de resazurina (*X3*) de 4 µg/mL..... 64

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

Agentes antimicrobianos são utilizados no tratamento de infecções bacterianas desde os primórdios do século XX. Seu uso frequente e muitas vezes irracional é uma importante questão, podendo ocasionar no surgimento de cepas resistentes. O sucesso da terapia antimicrobiana está diretamente relacionado com o potencial do fármaco em questão (LOURENÇO et al., 2014).

Para efetivamente tratar uma infecção, é necessário que o antibiótico possua atividade antimicrobiana adequada e seja capaz de inibir o crescimento do microrganismo patogênico (LOURENÇO et al., 2016). O doseamento microbiológico é uma metodologia indicada para a análise do antimicrobiano de forma simples, quando comparado com outras metodologias (FIORENTINO et al., 2013). Trata-se de um método utilizado para antimicrobianos, particularmente para aqueles que não podem ser caracterizados apenas por suas propriedades físico-químicas, sendo útil para avaliação da ação do fármaco frente ao microrganismo-teste utilizado como reagente biológico (PEDROSO et al., 2014).

A *Food and Drug Administration* (FDA) tem encorajado uma abordagem proativa para introduzir inovações e benefícios associados ao processo de produção farmacêutica. Esta abordagem proativa inclui o uso de Qualidade por Design (QbD) e a Tecnologia Analítica de Processo (PAT), a qual é baseada no conceito de que a qualidade do produto é construída e avaliada durante o processo de produção farmacêutica. PAT é um sistema que visa o planejamento, análise e controle do processo por meio de medições rápidas dos parâmetros críticos de qualidade e desempenho (LOURENÇO et al., 2016).

O guia Q8(R2) do guia ICH descreve Qualidade por Design como “uma abordagem sistemática para desenvolvimento farmacêutico que começa com objetivos pré-definidos e enfatiza o produto, assim como o entendimento e controle dos processos, baseado em dados científicos sólidos e gestão do risco da qualidade”. O conceito de Qualidade por Design (QbD) na indústria farmacêutica foi introduzido para melhorar a robustez do processo de fabricação, a fim de facilitar a qualidade do produto e a sua fabricação em termos de "seis sigma”. “Seis sigma” é um termo designado para nomear um sistema de práticas desenvolvidas para a melhoria sistemática dos processos, que eliminam os defeitos com significância estatística (PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8 , 2009).

A qualidade no processo de fabricação de medicamentos é extremamente importante, uma vez que esta assegura que o medicamento apresenta os atributos que garantem a eficácia e segurança esperadas. Neste contexto, os métodos analíticos são fundamentais para assegurar resultados confiáveis que permitam a tomada de decisão quanto à aprovação/reprovação dos lotes de medicamentos produzidos. A metodologia analítica e o desenvolvimento de um produto farmacêutico estão interligados durante todo o ciclo de vida do medicamento (PARR et al., 2018)

Muitos pesquisadores relataram que assim como é feito para o desenvolvimento farmacêutico, também existem oportunidades similares para aplicação do QbD para o desenvolvimento analítico, chamado de Qualidade por Design Analítico. A Qualidade por Design Analítico (AQbD) ajuda no desenvolvimento de métodos analíticos robustos e de baixo custo, que são aplicáveis durante todo ciclo de vida do produto. A aplicação do conceito QbD

ao método analítico é justificável devido às muitas variáveis que afetam significativamente o desempenho do método analítico. Essas variáveis podem ser: configurações do instrumento, características da amostra, parâmetros do método e modelos de calibração (LOURENÇO et al., 2014).

Em particular, o desempenho do doseamento microbiológico de antibióticos depende da espécie e quantidade de microrganismo-teste utilizado, das condições de incubação (tempo e temperatura), composição do meio de cultura, concentração do antibiótico, dentre outros fatores (LOURENÇO et al., 2014).

Dentre as diversas classes de antimicrobianos passíveis de serem analisadas por métodos microbiológicos, podemos destacar os β-lactâmicos (cefazolina, amoxicilina), os aminoglicosídeos (gentamicina, neomicina), os macrolídeos (eritromicina, azitromicina), os glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina), as fluorquinolonas (norfloxacino, ciprofloxacino), dentre outros (PRADO et al., 2003).

Os métodos microbiológicos tradicionais, de forma geral, apresentam baixa reprodutibilidade e alta incerteza. Desta forma, justifica-se o desenvolvimento de métodos microbiológicos alternativos para a análise de antimicrobianos empregando-se os conceitos de Qualidade por Design Analítico, com a finalidade de melhorar a reprodutibilidade e reduzir a incerteza final.

# REVISÃO DE LITERATURA

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. SULFATO DE NEOMICINA

O sulfato de neomicina é um antimicrobiano aminoglicosídeo amplamente empregado no tratamento de infecções cutâneas ou mucosas, tais como queimaduras, úlceras, e dermatites infecciosas. É eficiente contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micobactérias. O sulfato de neomicina inibe a síntese de proteínas, por meio do erro na leitura do código genético da bactéria (BRUNTON et al., 2012).

Sua composição é uma mistura de sulfatos de substâncias produzidas por *Streptomyces fradiae*, com características físicas como a alta solubilidade em água, coloração amarelada e alta higroscopicidade (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Na forma de sulfato é muito estável, e não é inativado por produtos do metabolismo bacteriano ou por enzimas presentes no pus e exsudatos (ANVISA, 2013). O principal componente da mistura é o sulfato de 2-desoxi-4-O-(2,6-diamino-2,6-didesoxi-α-D-glicopiranosil)-5-O-[3-O-(2,6-diamino-2,6-didesoxi-β-L-idopiranosil)-β-Dribofuranosil]-D-estreptamina (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

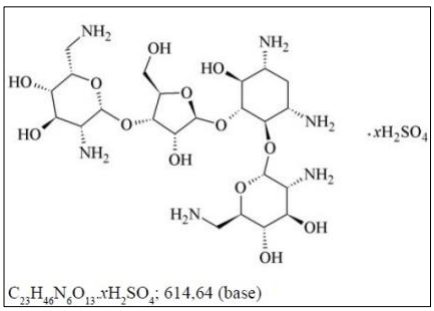



**Figura 1.** Estrutura molecular do sulfato de neomicina (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Comercialmente, o sulfato de neomicina pode ser encontrado isolado ou associado a outros princípios ativos em preparações tópicas, orais ou otológicas. Possui apresentações farmacêuticas na forma de medicamento genérico, similar e referência (GUIA DE REMÉDIOS BRP, 2016/17). Algumas destas formulações são:

- Nebacetin ® (sulfato de neomicina 5 mg/g + bacitracina 250 UI/g): pomada dermatológica indicada para o tratamento de infecções bacterianas da pele, otite externa, infecções da mucosa nasal, furúnculos, acne infectada, úlceras cutâneas, queimaduras infectadas, dentre outros (ANVISA, 2009).
- Oto-xilodase ® (cloridrato de lidocaína 50 mg/mL + sulfato de neomicina 5 mg/mL + hialuronidase 100 UTR/mL): solução otológica indicada para o tratamento de otites (ANVISA, 2009).
- Bismu-jet ®: sulfato de neomicina 25 mg/mL + tartarato de bismuto e sódio 25 mg/mL + cloridrato de procaína 15 mg/mL): suspensão oral indicada como auxiliar no tratamento das afecções bucais (ANVISA, 2014).

Estudos demonstraram que o sulfato de neomicina pode apresentar efeitos tóxicos como nefrotoxicidade e ototoxicidade (BRUNTON et al., 2012). Os efeitos mais comumente relatados em casos de superdoses são lesão renal e surdez neural irreversível, contudo nenhum efeito tóxico é esperado quando utilizada a dose recomendada (ANVISA, 2009; ADAMS et al., 1996).

Métodos cromatográficos como a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, de pareamento iônico ou cromatografia iônica com derivatização (pré ou pós-coluna) são utilizados para a análise de aminoglicosídeos, inclusive sulfato de neomicina (STEAD, 2000). Contudo, de acordo com as farmacopeias, o método microbiológico é o método analítico de

escolha para a análise de sulfato de neomicina e outros aminoglicosídeos (ADAMS et al., 1996; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

## 2.2. DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS

Métodos microbiológicos são recomendados por compêndios oficiais para determinação da potência destes agentes em preparações farmacêuticas, sendo os mais utilizados o ensaio de difusão em ágar e o ensaio turbidimétrico (LOURENÇO et al., 2016). Diversas farmacopeias exigem ensaios microbiológicos como método de controle de qualidade de matérias-primas de antimicrobianos e suas formulações farmacêuticas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012)

O ensaio de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, baseia-se na formação de zonas de inibição, que aparecem devido à difusão do agente antimicrobiano no meio de cultura sólido e ao crescimento microbiano que ocorre concomitantemente (OSTROSKY et al., 2008). Neste método, o agente antimicrobiano é aplicado a uma porção limitada do ágar, normalmente dentro de cilindros metálicos, discos de papel ou cortes cilíndricos diretamente no ágar. Durante o período de incubação, o microrganismo previamente inoculado no meio de cultura cresce, o que permite a observação de áreas onde a difusão do agente antimicrobiano ocorreu. As zonas de inibição são as regiões do meio de cultura em que não houve crescimento microbiano como resultado da difusão do fármaco (LOURENÇO et al., 2016). O ensaio de difusão em ágar é uma técnica usual para doseamento

microbiológico, porém este não fornece resultados imediatos, pois requer período de incubação de cerca de 18 a 24 horas (LEHTINEN et al., 2006).

O ensaio turbidimétrico é um método fotométrico realizado em meio de cultura líquido, que avalia de forma quantitativa, a inibição do crescimento microbiano frente à ação do antibiótico analisado (PEDROSO et al., 2014). Este ensaio consiste em tubos contendo suspensão do microrganismo-teste em meio de cultura aos quais são adicionadas uma soluções-teste de antimicrobiano. Em seguida, os tubos são incubados em condições adequadas e o crescimento microbiano é medido empregando leitura fotométrica (LOURENÇO, 2009). A turbidez gradual gerada pelo crescimento do microrganismo é medida pelos valores de absorbância ou transmitância. Trata-se de um método simples e rápido, pois a atividade do antimicrobiano é medida diretamente em função do crescimento microbiano presente no meio de cultura (PEDROSO et al., 2014).

Embora o meio de cultura líquido seja mais vulnerável à degradação, o ensaio turbidimétrico ainda é considerado mais eficaz e rápido quando comparado com o ensaio de difusão em ágar (CAZEDEY et al., 2013). Neste método, o antimicrobiano poderá influenciar a carga microbiana gerada a partir do crescimento por meio do aumento do tempo de geração, aumento do tempo de fase lag e/ou por meio da morte de parte dos microrganismos (HEWITT, 1977).

A análise colorimétrica é um método amplamente utilizado para a detecção e quantificação de diferentes substâncias, incluindo o crescimento microbiano em estudos de eficácia terapêutica. Neste tipo de análise, um marcador colorimétrico é utilizado para a detecção de variações metabólicas do

meio. Usualmente, utilizam-se sais de tetrazólio como marcador colorimétrico. Porém, os sais de tetrazólio apresentam limitação devido a sua atividade antimicrobiana, o que exige que o reagente seja adicionado ao final do tempo de incubação (SAVIANO et al., 2015). Neste trabalho, propomos o uso de resazurina como marcador colorimétrico. A resazurina apresenta menor toxicidade quando comparada aos sais de tetrazólio, o que possibilita seu emprego desde o início do ensaio. Desta forma, é possível acompanhar o crescimento microbiano ao longo da incubação, através da mudança de coloração azul para rosa (ALAMARBLUE®).

A seguir, são apresentados os principais fatores de influência para o ensaio microbiológico colorimétrico empregando resazurina.

### 2.2.1. Influência do microrganismo

A escolha do microrganismo é fundamental para o bom desempenho do método microbiológico, pois este se baseia na inibição do microrganismo-teste perante o antimicrobiano (LOURENÇO et al., 2011). Cada microrganismo responderá de forma diferente de acordo com o antibiótico utilizado, variando a resposta inibitória perante as variações de concentrações do fármaco (HEWITT, 1977).

A carga microbiana utilizada influenciará diretamente na resposta do antimicrobiano em questão, pois uma elevada carga poderá diminuir o tempo de incubação. Da mesma forma, uma pequena carga microbiana poderá acarretar em ensaios com elevados tempos de incubação (HEWITT, 1977).

Sendo assim, é imprescindível a avaliação da influência do inóculo para cada método a ser utilizado (LOURENÇO, 2009).

### 2.2.2. Influência do tempo e temperatura

A taxa de crescimento microbiano é influenciada diretamente pela temperatura utilizada e tempo de incubação empregado. A maior parte das bactérias crescem em temperaturas por volta de 37 ± 1ºC. Alterações de temperatura poderão ocasionar na diminuição do crescimento bacteriano, necessitando de um aumento no tempo de incubação para que a população desejada seja alcançada. Durante a execução do ensaio, todos os tubos analisados devem ser mantidos à mesma temperatura, sendo recomendável o uso de banho de água por apresentar maior homogeneidade de temperatura quando comparado com estufas bacteriológicas (KAVANAGH, 1963).

O tempo de incubação utilizado para o experimento deve ser aquele ideal para que o controle positivo atinja a leitura esperada. Para isto, um estudo do tempo necessário para o microrganismo-teste utilizado deve ser realizado, a fim de se estabelecer o tempo mínimo satisfatório de análise (KAVANAGH, 1963).

2.2.3. Influência da concentração de resazurina

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) é um corante solúvel em água, amplamente utilizado como indicador de crescimento fluorométrico/colorimétrico, baseado na detecção de atividade metabólica de bactérias e células de mamíferos. O indicador sofre uma reação de oxido-redução na qual altera a coloração em resposta à redução química resultante do crescimento celular (BORRA et al., 2009). O uso da resazurina foi inicialmente relatado por Pesch e Simmert no ano de 1929, em um estudo para quantificar a carga microbiana presente no leite (SILANIKOVE et al., 2012). O processo de redução da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) em resorufina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona) ocorre na mitocôndria da célula (BORRA et al., 2009), conforme apresentado na **Figura 2**.

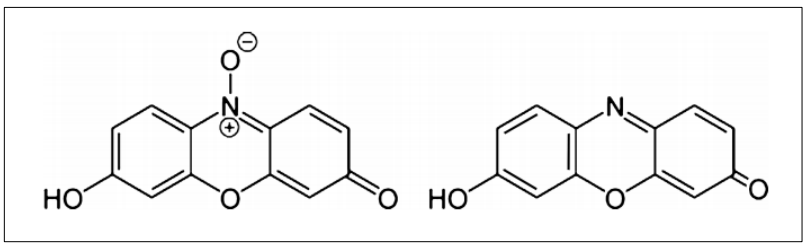



**Figura 2.** Estrutura molecular da resazurina (esquerda) e resorufina (direita) (SILANIKOVE et al., 2012).

O uso da resazurina em ensaios microbiológicos demonstrou ser vantajoso pois o indicador exibe fluorescência frente a redução metabólica; apresenta toxicidade mínima para células vivas; e produz uma mudança nítida

e estável de fácil interpretação. Outra importante característica é que o indicador não apresenta capacidade carcinogênica (ALAMARBLUE®).

À medida que o crescimento microbiano ocorre, a atividade metabólica inata resulta em uma redução química da resazurina. O crescimento continuado mantém um ambiente reduzido, enquanto a inibição do crescimento mantém um ambiente oxidado. A redução relacionada ao crescimento microbiano causa a mudança do indicador de sua forma oxidada (não fluorescente, azul) para a forma reduzida (fluorescente, vermelha) (ALAMARBLUE®). Desta forma, o monitoramento da reação pode ser realizado utilizando-se a medição de fluorescência ou baseada em absorbância. A fluorescência é monitorada em 530-560 nm de comprimento de onda de excitação e 590 nm de comprimento de onda de emissão. A absorbância é monitorada em 570 nm e 600 nm (BORRA et al., 2009).

A proporção entre a concentração de resazurina e a carga microbiana deve ser tal que permita que a mudança de coloração ocorra em tempo suficiente para evidenciar o crescimento microbiano gradual, devido às diferentes concentrações de antimicrobiano ou antibiótico. Se a concentração de resazurina for baixa em relação a quantidade de microrganismo, toda a resazurina pode ser reduzida sem que se evidencie o crescimento microbiano gradual. Por outro lado, se a concentração de resazurina for alta em relação a quantidade de microrganismo, pode levar um longo tempo para que se visualize a redução da resazurina, o que pode ocorrer quando o crescimento gradual já não consiga mais ser evidenciado (ALAMARBLUE®).

### 2.2.4. Influência da concentração de antibiótico

A diferença de concentrações do antimicrobiano influenciará diretamente na carga microbiana existente ao final do período de incubação, o que produz crescimento microbiano gradual que será analisado pelos diferentes valores de absorbância ou transmitância. A turbidez resultante do crescimento microbiano é inversamente proporcional à concentração de antimicrobiano, ou seja, quanto maior a concentração do antimicrobiano, menor será a turbidez decorrente do crescimento microbiano (LOURENÇO, 2009). A curva dose-resposta apresenta relação linear quando a densidade óptica (ou a porcentagem de transmitância) é plotada contra o log da concentração do antimicrobiano. O logaritmo da concentração é utilizado pois permite a construção de uma reta, sendo a maneira mais simples para unir os pontos da curva dose-resposta. Outros modelos de regressão podem ser necessários para estabelecer a relação entre o crescimento microbiano e a concentração do antibiótico, como por exemplo o modelo de regressão logística de quatro parâmetros (KAVANAGH, 1963).

## 2.3. DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO EMPREGANDO AQBD

O desenvolvimento de métodos analíticos, empregando a abordagem tradicional, envolve o monitoramento da influência de um fator de cada vez nos resultados do experimento. Este tipo de análise pode ser tediosa e lenta; exigindo um grande número de ensaios e materiais durante sua execução. Além disso, os métodos analíticos desenvolvidos empregando esta abordagem

podem apresentar limitações como baixa reprodutibilidade e alta incerteza de medição (LOURENÇO et al., 2014).

A incerteza nos resultados pode surgir de muitas fontes possíveis, incluindo amostragem; efeitos e interferências; condições ambientais; incertezas de equipamentos volumétricos e de massa; incertezas de equipamentos de espectrofotometria e cromatografia; incertezas de respostas biológicas e microbiológicas; pureza dos reagentes e substâncias químicas de referência; validação do método e variabilidade aleatória (LOURENÇO et al., 2014). Sendo assim, métodos alternativos têm sido desenvolvidos com a finalidade de reduzir o tempo de análise e os custos envolvidos, aumentando também a sensibilidade de detecção do método (HOLOWACHUCK et al., 2003).

Por outro lado, o desenvolvimento de métodos analíticos empregando o conceito AQbD, permite identificar e compreender como os parâmetros analíticos críticos afetam o desempenho do método analítico. Isso permite que sejam estabelecidas estratégias de controle, o que garante o desempenho adequado do método, ou seja, resultados analíticos confiáveis e com baixa incerteza de medição (LOURENÇO et al., 2016). O desempenho do doseamento microbiológico de antibióticos depende de diversos fatores, tendo sido os principais deles mencionados anteriormente (ver itens 2.2.1 a 2.2.4).

Considerando os diversos fatores que podem afetar o desempenho dos métodos microbiológicos, inclusive com a possibilidade de existir interação entre alguns dos fatores, justifica-se o emprego da abordagem AQbD no desenvolvimento de métodos microbiológicos alternativos para a análise de antimicrobianos em produtos farmacêuticos.

As etapas para o desenvolvimento de um método analítico robusto e eficaz empregando-se o conceito de Qualidade por Design Analítico consiste em:

- Estabelecimento do Perfil Alvo Analítico (*Analytical Target Profile* - ATP): etapa inicial do AQbD com a definição do escopo do método e das características que o método analítico deve apresentar, para garantir seu desempenho apropriado. O ATP geralmente envolve a seleção de três principais aspectos: o alvo da análise, a técnica e os requisitos do método. (FUKUDA et al., 2018).
- Identificação das características de desempenho do método analítico (*Identifying of Analytical Method Performance Characteristics - AMPC*): é a próxima fase do AQbD, representada pelas características de desempenho que o método analítico deve apresentar, tais como especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção/quantificação. As AMPCs correspondem às características do método que interferem diretamente no ATP, sendo necessário o controle das mesmas, afim de garantir o desempenho do método analítico durante sua aplicação na rotina. (FUKUDA et al., 2018)
- Análise de Risco (*Risk assessment*): nesta fase são determinados os fatores potencialmente críticos para as respostas analíticas de interesse que impactam o ATP. Dentre os fatores críticos nesta etapa estão: características da amostra, método de preparo da amostra, tempo de análise, experiência do analista, concentração dos reagentes, dentre outros (FUKUDA et al., 2018). Algumas ferramentas de análise podem ser empregadas para determinação das fontes de risco associadas ao

método, como *Failure Mode Effect Analysis* (FMEA) e Diagrama de Ishikawa (espinha de peixe) (FUKUDA et al., 2018).

- Planejamento de Experimento (*Design of Experiments* - DoE): o delineamento de experimento corresponde ao estabelecimento da relação entre os parâmetros analíticos críticos (*Critical Analytical Parameters – CAP*) (por exemplo, composição do meio de cultura, quantidade de microrganismo, etc.) que afetam a resposta analítica de interesse (por exemplo, alteração de coloração da resazurina em função do crescimento microbiano) (RANGA et al., 2014). Esta fase inclui as seguintes etapas:

  - Triagem: identificação dos parâmetros analíticos potencialmente críticos relevantes para a otimização do método (PERAMAN et al., 2015).

  - Otimização: estabelecimento da relação entre as variáveis de entrada (parâmetros analíticos críticos) e as respostas de interesse (PERAMAN et al., 2015).

  - Seleção da ferramenta DoE: trata-se das diferentes ferramentas matemáticas empregadas que permitem expressar a correlação entre variáveis de entrada e resultados obtidos, podendo ser empregadas em diferentes fases do processo. Algumas delas são: Planejamento fatorial completo; Planejamento fatorial fracionário; Planejamento Plackett-Burman; Delineamento de Compósito Central e Delineamento Box-Behnken (PERAMAN et al., 2015).

- Região de Design Operável do Método (*Method Operable Design Region* - MODR): corresponde a um espaço multidimensional delineado com

base nas variáveis e configurações do método, no qual é assegurada a performance delineada no ATP e assim, a qualidade do resultado analítico. Os resultados obtidos são tratados com ferramentas estatísticas adequadas, sendo expressados por forma gráfica ou por modelo matemático, com a finalidade de estabelecer a área de operação do método com a melhor performance (FUKUDA et al., 2018).

- Validação do Método: consiste na etapa final de desenvolvimento do método. Estabelece a confirmação das características de desempenho do método, garantindo o atendimento ao ATP durante seu uso em rotina (PARR et al., 2018).

## 2.4. ENSAIO COLORIMÉTRICO EM MICROPLACA COM LEITURA RGB

O uso de microplacas para a análise colorimétrica é uma alternativa ao método realizado em tubos de ensaio. Suas vantagens incluem a utilização de uma única microplaca com 96 poços dispensando o uso de diversos tubos de ensaio e baixo volume de reagentes, promovendo a diminuição no tempo de preparo do método (LOURENÇO et al., 2011).

Tradicionalmente, a colorimetria é realizada por uma verificação da alteração de coloração a olho nu ou com a ajuda de espectrofotômetros ou leitores de microplaca, na qual a intensidade da cor é medida por meio da absorção da luz em função do comprimento de onda. O uso destes equipamentos exige um local apropriado para sua utilização devido ao seu

grande volume, além de possuírem um elevado custo para aquisição (PHADUNGCHAROEN et al., 2019).

Atualmente, o uso da tecnologia para o aprimoramento das técnicas laboratoriais, com a finalidade de redução no tempo de análise e facilidade na detecção dos resultados, é fundamental para a otimização dos métodos científicos (TIBES, 2014). Nas últimas décadas, a popularização dos dispositivos móveis, *tablets* e *smartphones* têm facilitado a utilização de *softwares* capazes de amplificar a sensibilidade e especializar o uso destes dispositivos (TIBES, 2014). Uma alternativa ao uso de espectrofotômetros para a análise colorimétrica é o uso de aparelhos *smartphones,* pois são equipados com CPUs rápidas, câmeras de alta resolução e sensores de imagem. Além disso, possuem fácil manuseio, não são volumosos e apresentam como principal característica a quebra da limitação da mobilidade (PHADUNGCHAROEN et al., 2019).

O processamento da imagem captada pela câmera do dispositivo é utilizado como um analisador colorimétrico. A luz incide sobre os sensores da câmera criando um espaço de cor com detecção das variações de pigmentações das cores Vermelho-Verde-Azul (RGB). Desta forma, valores de pixels destas colorações primárias são utilizados para estabelecer a relação entre valores e concentrações de pixels da imagem do analito, podendo ser empregadas equações matemáticas para a determinação de suas intensidades (PHADUNGCHAROEN et al., 2019).

# OBJETIVOS

## 3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é aplicar o conceito de Qualidade por Design Analítico (AQbD) no desenvolvimento de método colorimétrico para análise de sulfato de neomicina.

São objetivos específicos:

- Estabelecer o perfil analítico alvo (*Analytical Target Profile* - ATP) do método a ser desenvolvido, considerando as características de desempenho desejadas;
- Realizar análise de risco para identificação dos parâmetros analíticos potencialmente críticos;
- Realizar o planejamento de experimentos (DoE) com a finalidade de estabelecer como os parâmetros analíticos críticos afetam o desempenho do método microbiológico;
- Definir a região de operação de Design do método microbiológico (*Method Operable Design Region* - MODR);
- Validar o método microbiológico quanto aos parâmetros de especificidade/seletividade, precisão, linearidade, robustez e exatidão, no contexto do AQbD;
- Propor ensaio colorimétrico em microplaca empregando leitura em aplicativo RGB.

# MATERIAL E MÉTODOS

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1. Material

### 4.1.1. Meio de cultura e reagentes

Foi utilizado o meio de cultura líquido BD™ *Tryptic Soy Broth* (TSB), composto por: triptona 17,0 g/L, digestão papaica de farinha de soja 3,0 g/L, glicose 2,5 g/L, cloreto de sódio 5,0 g/L e fosfato dipotássico 2,5 g/L, com pH 7,3 ±2. O preparo do meio de cultura foi realizado de acordo com as orientações do fabricante. A substância química de referência (SQR) de sulfato de neomicina foi adquirida da Farmacopéia Americana (*United States Pharmacopeia*), lote M1I253. A resazurina foi adquirida pela INLAB®, lote 838.273.

### 4.1.2. Equipamentos e materiais

Foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos: estufa bacteriológica (SPLabor, Brasil), esterilizador a vapor tipo autoclave (Lutz Ferrando, Brasil), espectrofotômetro UV-Vis (Unicam), balança analítica (Shimadzu, Japão), centrífuga (Fanem, Brasil), dentre outros equipamentos necessários. Ainda foram utilizadas pipetas volumétricas, balões volumétricos, placas de Petri estéreis descartáveis, tubos plásticos estéreis descartáveis, pipetas graduadas estéreis descartáveis, dentre outros materiais necessários.

Os microrganismos *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) foram utilizados como reagentes biológicos.

4.1.3. Soluções

a) Soluções padrão de referência sulfato de neomicina

Foram pesados 16,7 mg do padrão de referência de sulfato de neomicina (equivalente a 10,0 mg de neomicina base) e diluídos em 10 mL de água destilada. No momento do ensaio, foram realizadas diluições de forma a obter as concentrações finais de 8,0; 16,0; 31,0; 62,0; 125,0; 250,0; 500,0 e 1000,0 µg/mL, empregando água como diluente.

c) Soluções padrão de resazurina

Foram pesados 10,0 mg de resazurina e diluídos em meio de cultura líquido TSB. Diluições desta solução estoque foram realizadas para obtenção das concentrações 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 µg/mL de resazurina.

## 4.2. Método

### 4.2.1. Etapas do AQbD

#### 4.2.1.1. Estabelecimento de perfil analítico alvo (ATP)

Foi estabelecido o perfil analítico alvo (ATP) do método desenvolvido para doseamento microbiológico de sulfato de neomicina, considerando as características de desempenho desejadas.

#### 4.2.1.2. Estudo da análise de risco

Foi realizada uma análise de risco qualitativa, empregando-se diagrama de causa-efeito (diagrama de Ishikawa), para identificação dos parâmetros analíticos potencialmente críticos que possam afetar o desempenho do método microbiológico.

#### 4.2.1.3. Planejamento de experimentos (DoE)

O método microbiológico para análise de antimicrobiano foi desenvolvido e otimizado utilizando-se planejamento fatorial e análise de superfície de resposta, com a finalidade de estabelecer como os parâmetros analíticos críticos afetam o desempenho do método.

4.2.1.3.1. Tempo de incubação

Ensaios para a determinação do tempo de incubação foram realizados com os microrganismos *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 8739). Foi preparada uma subcultura dos microrganismos empregando-se TSB e incubado a 37 ± 1ºC por 16-18h. A partir do crescimento obtido, foi realizado ajuste de quantidade de inóculo para 25 % de transmitância em 580 nm e posteriormente foi realizada diluição 1:10, conforme **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Microrganismos-teste, tempo de incubação e proporção de inóculo utilizados nos ensaios para determinação do tempo de incubação.

| **Microrganismo** | **Tempo** | **Inóculo (%)** |
|---|---|---|
| *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) | 90 minutos | 10,0 do inóculo 25% |
| *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) | 90 minutos | 10,0 da diluição 1:10 |
| *Escherichia coli* (ATCC 8739) | 90 minutos | 10,0 do inóculo 25% |
| *Escherichia coli* (ATCC 8739) | 90 minutos | 10,0 da diluição 1:10 |
| *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) | 180 minutos | 10,0 do inóculo 25% |
| *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) | 180 minutos | 10,0 da diluição 1:10 |

4.2.1.3.2. Influência da concentração de microrganismo e resazurina

Foi realizado um ensaio específico para estudar os efeitos das concentrações de microrganismo (inóculo 0,1, 1,0 e 10%) e resazurina (2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL) no crescimento microbiano (**Tabela 2**). Todos os ensaios foram realizados utilizando-se meio de cultura líquido e incubados a 37 ± 1ºC. Cada microrganismo foi submetido ao tempo de incubação previamente determinado no ensaio de tempo de incubação. Os resultados foram utilizados para otimização das concentrações de inóculo e resazurina no ensaio rápido.

**Tabela 2.** Estudo da influência da concentração de microrganismo e resazurina no crescimento microbiano.

| Ensaio | Inóculo (%) | Resazurina (µg/mL) |
|---|---|---|
| #1 | 10 | 2,0 |
| #2 | 10 | 4,0 |
| #3 | 10 | 6,0 |
| #4 | 1,0 | 2,0 |
| #5 | 1,0 | 4,0 |
| #6 | 1,0 | 6,0 |
| #7 | 0,1 | 2,0 |
| #8 | 0,1 | 4,0 |
| #9 | 0,1 | 6,0 |

4.2.1.3.3. Otimização do ensaio microbiológico colorimétrico

Após a definição do microrganismo-teste (*Staphylococcus aureus*) e da concentração de resazurina (4 µg/mL), foram realizados ensaios de otimização do ensaio microbiológico colorimétrico quanto às quantidades de inóculo e concentrações de antimicrobiano utilizadas.

Foram preparados tubos de ensaios contendo misturas de suspensão inóculo (10% de inóculo a partir de uma suspensão 25% de transmitância e de suas diluições 1:10 e 1:100), solução de sulfato de neomicina (nas concentrações 8,0; 16,0; 31,0; 62,0; 125,0; 250,0; 500,0; e 1000,0 µg/mL) e meio de cultura TSB com adição de resazurina (4 µg/mL). Adicionalmente, foram preparados controles negativos (sem inóculo) e positivo (sem antimicrobiano). Os tubos foram incubados a 37 ± 1ºC por até 90 minutos.

As leituras das respostas colorimétricas foram realizadas a 570 nm e 600 nm, utilizando-se espectrofotômetro. A porcentagem de resazurina reduzida foi calculada a partir da equação apresentada a seguir:

$$\%Red = \frac{\varepsilon_{\lambda 600}^{Ox} \times A_{570} - \varepsilon_{\lambda 570}^{Ox} \times A_{600}}{\varepsilon_{\lambda 570}^{Red} \times A^{cn}{}_{600} - \varepsilon_{\lambda 600}^{Red} \times A^{cn}{}_{570}}$$

Onde: $\varepsilon_{\lambda 570}^{Ox}$ e $\varepsilon_{\lambda 600}^{Ox}$ são as absortividades da resazurina na forma oxidada a 570 e 600 nm, respectivamente; $\varepsilon_{\lambda 570}^{Red}$ e $\varepsilon_{\lambda 600}^{Red}$ são as absortividades da resazurina na forma reduzida a 570 e 600 nm, respectivamente; $A_{570}$ e $A_{600}$ são as absorbâncias do tubo teste a 570 e 600 nm, respectivamente; e $A^{cn}{}_{570}$ e $A^{cn}{}_{600}$

são as absorbâncias do tubo controle negativo a 570 e 600 nm (ALAMARBLUE®).

4.2.1.4. Validação do método

De acordo com os experimentos realizados nas etapas de otimização do método, as condições experimentais otimizadas foram definidas como: a) Microrganismo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); b) Inóculo: ajuste em 25% T e diluição 1:10; c) Resazurina 4,0 µg/mL; d) Concentração de antimicrobiano: 8,0; 16,0; 31,0; 62,0; 125,0; 250,0; 500,0; e 1000,0 µg/mL; e) Tempo de incubação: 90 minutos; e f) Temperatura de incubação: 37 ± 1ºC.

O ensaio microbiológico colorimétrico foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e robustez.

A linearidade foi avaliada pelo ensaio de oito concentrações do padrão de referência sulfato de neomicina (8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 125; 250,0; 500,0 e 1000,0 µg/mL). Os dados obtidos das curvas analíticas foram avaliados por análise de regressão e por análise de variância (ANOVA) para confirmação do paralelismo entre elas.

A precisão do ensaio foi avaliada em dois níveis: a) repetibilidade; e b) precisão intermediária. A repetibilidade foi mensurada como o desvio padrão relativo de quatro amostras analisadas no mesmo dia e sob as mesmas condições de trabalho. A precisão intermediária foi avaliada pela análise de quatro amostras em três dias diferentes.

A exatidão ($Rec\% = Q_{experimental}/Q_{teórica}$) foi avaliada como a quantidade de sulfato de neomicina recuperada ($Q_{experimental}$) em relação a quantidade teórica adicionada ($Q_{teórica}$), empregando-se substância química de referência de sulfato de neomicina (USP RS).

A robustez foi avaliada pelo planejamento compósito central durante o desenvolvimento e otimização do ensaio, que permitiu a avaliação da influência das concentrações de sulfato de neomicina, resazurina e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) simultaneamente no crescimento microbiano.

### 4.2.2. Ensaio colorimétrico em microplaca com leitura em aplicativo RGB

O ensaio foi realizado com as condições experimentais otimizadas para microplaca. Vinte microlitros (20 μL) das soluções do padrão de sulfato de neomicina (nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 125; 250,0; 500,0 e 1000,0 μg/mL) foram adicionados nos poços da microplaca. Em seguida, 160 μL de solução de resazurina 8 μg/mL foram adicionados aos poços. Alíquotas de 20 μL do meio de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), com ajuste de 25% T e diluição 1:4, foram transferidas para cada poço da microplaca.

A incubação foi realizada a 37 ± 1ºC / 200 RPM, por 3 horas. Ao final da incubação, a leitura da resposta colorimétrica foi realizada utilizando-se o aplicativo RGB Color Detector ®.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Estabelecimento de perfil analítico alvo (ATP)

O perfil analítico alvo do método microbiológico para análise de antimicrobianos abrange: 1) exatidão e precisão adequados (incerteza alvo de 2,5%, considerando-se uma faixa de especificação de 90 a 130%); 2) boa relação dose-resposta numa faixa ampla de concentração de antimicrobiano (por exemplo, faixa de concentração entre 1 a 1000 µg/mL); 3) tempo de incubação reduzido (preferencialmente inferior a 2 horas).

### 5.2. Análise de risco

O diagrama de causa-efeito (diagrama de Ishikawa) apresentado na **Figura 3** identifica, de forma esquemática, os parâmetros analíticos potencialmente críticos que podem afetar o desempenho do método microbiológico para análise de antimicrobianos.

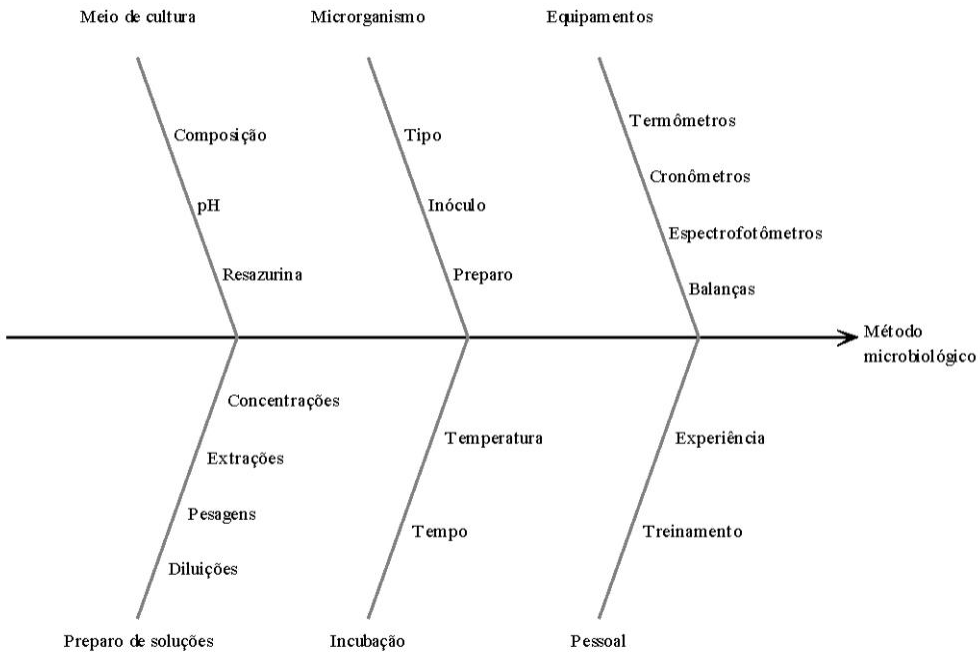



**Figura 3.** Diagrama de causa-efeito (diagrama de Ishikawa) dos parâmetros analíticos potencialmente críticos que podem afetar o desempenho do método microbiológico para análise de antimicrobianos.

Pela nossa experiência, os parâmetros que podem ser considerados críticos dentre os identificados na **Figura 3**, e por este motivo foram selecionados para a etapa de planejamento de experimentos, são:

1) Tipo de microrganismo: o tipo de microrganismo escolhido deverá apresentar sensibilidade ao antimicrobiano utilizado, permitindo a inibição de seu crescimento pelo antibiótico.

2) Inóculo: A concentração da carga microbiana presente no inóculo deve ser ajustada, de forma que a velocidade do crescimento microbiano permita a detecção da ação do fármaco.

3) Concentração de resazurina: a intensidade da coloração obtida, resultante da concentração de resazurina utilizada no ensaio colorimétrico, é fundamental para a quantificação da atividade metabólica do microrganismo e sua inibição frente ao antimicrobiano estudado.

4) Concentração do antimicrobiano: a variação de concentração do antimicrobiano está diretamente relacionada ao aumento da carga microbiana. Desta forma, é imprescindível que a concentração do antimicrobiano seja capaz de produzir inibição efetiva perante o crescimento do patógeno.

## 5.3. Planejamento de experimentos

A escolha do microrganismo é fundamental em ensaios microbiológicos, uma vez que o antimicrobiano deve inibir o crescimento microbiano. De acordo com os resultados, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) apresentou o crescimento mais adequado quando comparado a *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). *Escherichia coli* (ATCC 8739) apresentou um crescimento muito intenso devido suas características metabólicas. Já o *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) apresentou crescimento irregular e demorado, impossibilitando sua utilização por não atender ao ATP quanto ao tempo reduzido de incubação. O *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) apresentou crescimento regular, sendo, portanto, o microrganismo escolhido para o método microbiológico.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

(*Y1*), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (*Y2*), *Escherichia coli* (ATCC 8739) (*Y3*) e em função do tempo de incubação (*X1*), da quantidade de inóculo (*X2*) e da concentração de resazurina (*X3*) estão apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Análise de variância da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (*Y1*), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (*Y2*), *Escherichia coli* (ATCC 8739) (*Y3*) em função do tempo de incubação (*X1*), quantidade de inóculo (*X2*) e concentração de resazurina (*X3*).

| Fonte | *Y1* | | | *Y2* | | | *Y3* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | g.l. | SQ | p-valor | g.l. | SQ | p-valor | g.l. | SQ | p-valor |
| Regressão | 4 | 23,8022 | 0,000 | 4 | 29,414 | 0,000 | 5 | 39,090 | 0,000 |
| *X1* | 1 | 4,5436 | 0,000 | 1 | 12,608 | 0,000 | 1 | 28,039 | 0,000 |
| *X2* | 1 | 4,6339 | 0,000 | 1 | 11,695 | 0,000 | 1 | 6,894 | 0,000 |
| *X3* | | | | | | | 1 | 3,263 | 0,002 |
| *X1X1* | 1 | 0,9199 | 0,028 | 1 | 7,1277 | 0,000 | 1 | 23,068 | 0,000 |
| *X2X2* | | | | | | | | | |
| *X3X3* | | | | | | | | | |
| *X1X2* | 1 | 2,0518 | 0,002 | 1 | 8,8954 | 0,000 | 1 | 4,874 | 0,000 |
| *X1X3* | | | | | | | | | |
| *X2X3* | | | | | | | | | |
| Erro | 31 | 5,3396 | | 48 | 11,273 | | 47 | 14,156 | |
| Total | 35 | 29,1419 | | 52 | 40,687 | | 52 | 53,246 | |

g.l. = graus de liberdade, SQ = soma dos quadrados e p-valor = nível de significância.

Um planejamento de experimentos foi realizado para estudar como as concentrações de microrganismo (inóculo 0,1 a 10%), resazurina (2,0; 4,0 e 6,0 µg/ mL) e sulfato de neomicina (variando de 8,0 a 1000 mg/mL) interferem no crescimento do microrganismo. Foi obtido um modelo matemático que explica a quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento microbiano de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (*Y1*), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (*Y2*), *Escherichia coli* (ATCC 8739) (*Y3*) em função do tempo de incubação (*X1*), quantidade de inóculo (*X2*) e concentração de resazurina (*X3*). Este modelo apresentou valores de coeficiente de correlação e ajuste adequados. Os coeficientes deste modelo são apresentados na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Equações de regressão e coeficientes de correlação da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *B. subtilis* (*Y1*), *S. aureus* (*Y2*) e *E. coli* (*Y3*) em função do tempo de incubação (*X1*), quantidade de inóculo (*X2*) e concentração de resazurina (*X3*).

| Equação de regressão | $R^2$ | $R^2$aj | $R^2$pred |
|---|---|---|---|
| $Ln(Y1) = 2{,}173 + 0{,}01854X1 + 0{,}735X2 - 0{,}000044X1^2 - 0{,}00436X1X2$ | 81,68% | 79,31% | 74,58% |
| $Ln(Y2) = 2{,}300 + 0{,}02711X1 + 0{,}982X2 - 0{,}000108X1^2 - 0{,}00849X1X2$ | 72,29% | 69,99% | 66,43% |
| $Ln(Y3) = 2{,}813 + 0{,}04042X1 + 0{,}754X2 - 0{,}1528X3 - 0{,}000194X1^2 - 0{,}00629X1X2$ | 73,41% | 70,59% | 65,28% |

$R^2$ = coeficiente de correlação, $R^2$aj = coeficiente de correlação ajustado, e $R^2$pred = coeficiente de correlação de predição.

A resazurina foi utilizada como um indicador de viabilidade, pois somente células microbianas viáveis são capazes de reduzirem a resazurina, alterando sua coloração azul para rosa. Observou-se que após um longo período de incubação (180 minutos) ou concentrações elevadas de inóculo, a resazurina adquiriu cor esbranquiçada devido à perda de coloração. Este fato pode ter ocorrido pela redução total da resazurina, seguido de degradação. Esta alteração pode aumentar as chances de erro na determinação fotométrica. Desta forma, foram padronizados tempos ideias de incubação para cada microrganismo de acordo com os pontos ótimos observados em suas colorações e leituras fotométricas.

Os gráficos de superfície resposta do crescimento microbiano (medido como porcentagem de resazurina reduzida) de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) em função do tempo de incubação (*X1*) e da quantidade de inóculo (*X2*) estão apresentados nas **Figuras 4, 5 e 6**. Na faixa estudada, a concentração de resazurina (*X3*) não afetou a resposta para nenhum dos microrganismos, apesar de ter apresentado p-valor significativo para a *Escherichia coli* (**Tabela 2**).

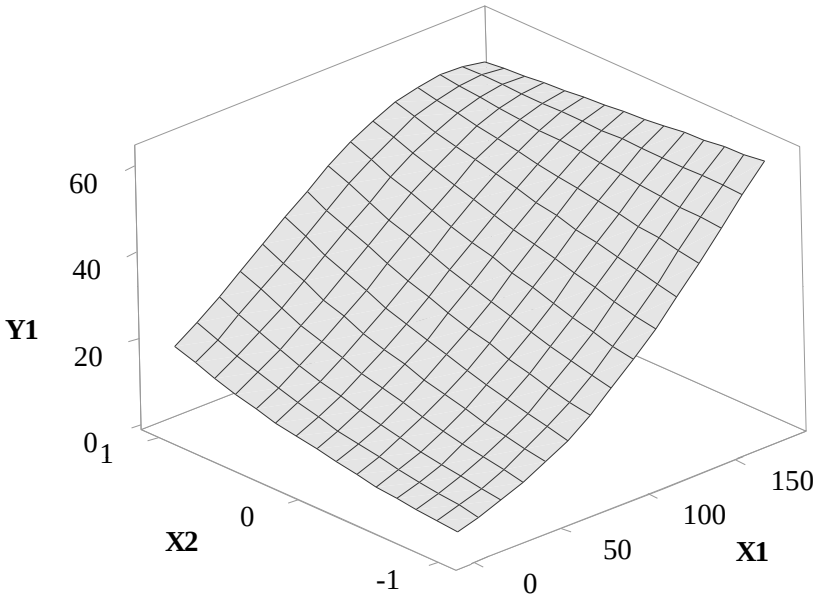



**Figura 4.** Gráfico 3D da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *B. subtilis* (*Y1*) em função do tempo de incubação (*X1*) e quantidade de inóculo (*X2*), sendo a concentração de resazurina (*X3*) fixada em 4 µg/mL.

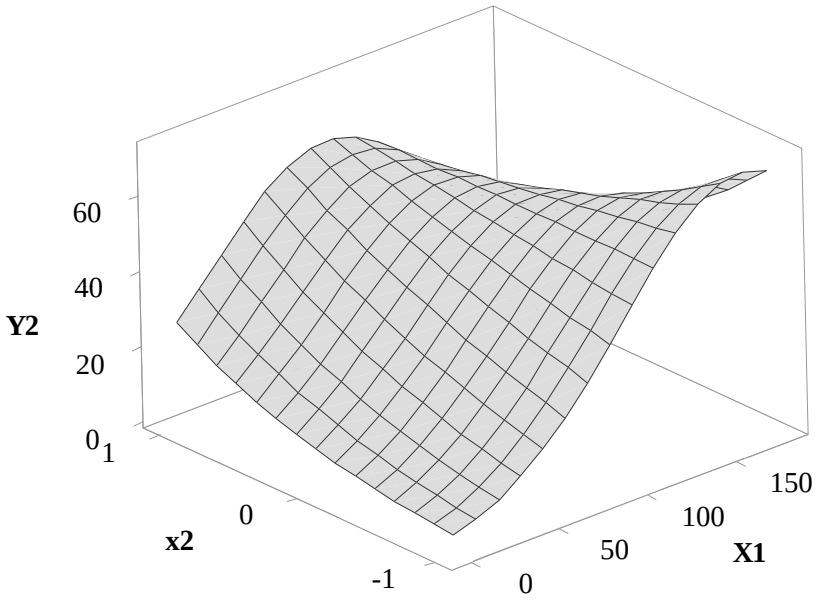



**Figura 5.** Gráfico 3D da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *S. aureus* (*Y2*) em função do tempo de incubação (*X1*) e quantidade de inóculo (*X2*), sendo a concentração de resazurina (*X3*) fixada em 4 µg/mL.

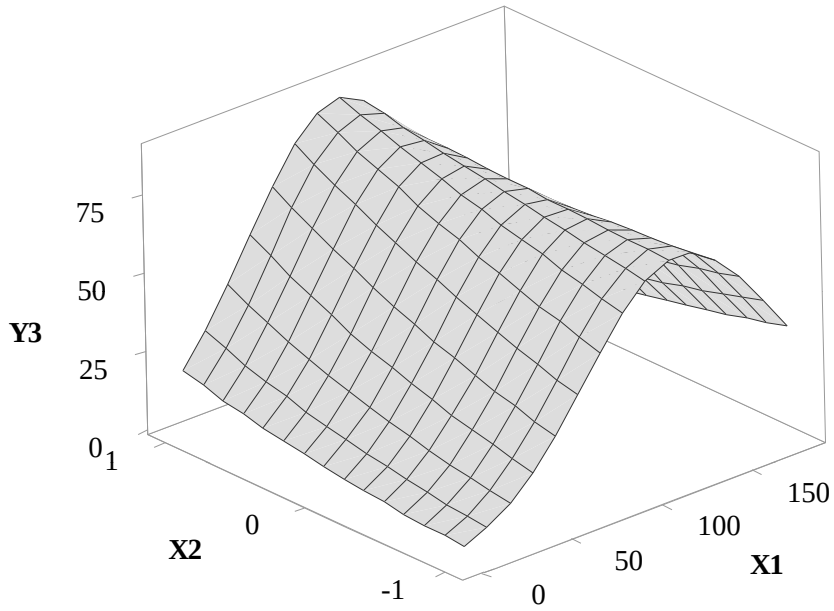



**Figura 6.** Gráfico 3D da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *E. coli* (*Y3*) em função do tempo de incubação (*X1*) e quantidade de inóculo (*X2*), sendo a concentração de resazurina (*X3*) fixada em 4 µg/mL.

Portanto, de acordo com os experimentos realizados, as condições experimentais otimizadas foram definidas como: a) Microrganismo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); b) Inóculo: ajuste em 25% T e diluição 1:10; c) Resazurina 4,0 µg/mL; d) Concentração de antimicrobiano: 8,0; 16,0; 31,0; 62,0; 125,0; 250,0; 500,0; e 1000,0 µg/mL; e) Tempo de incubação: 90 minutos; e f) Temperatura de incubação: 37 ± 1ºC.

O gráfico da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *S. aureus* em função das concentrações de sulfato de neomicina (8 a 1000

µg/mL), considerando 30 (A) ou 90 (B) minutos de incubação e diluições de 1:10 ou 1:100 dos inóculos, e concentração de resazurina de 4 µg/mL, estão apresentados na **Figura 7**.

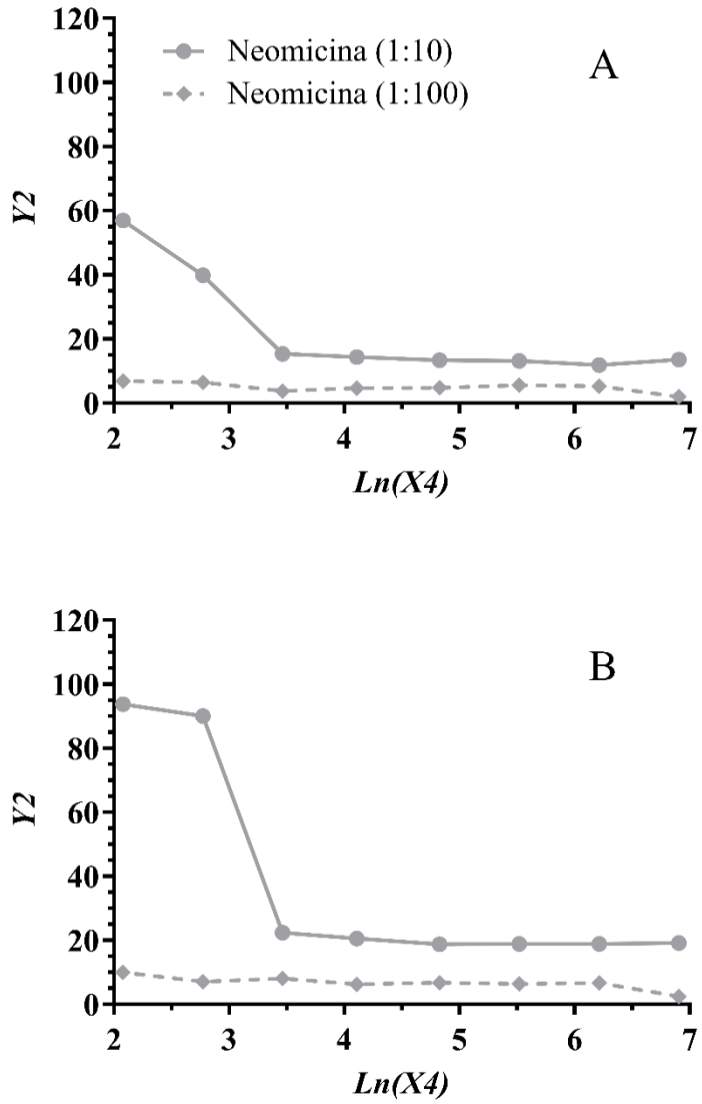



**Figura 7.** Gráfico da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *S. aureus* (*Y2*) em função das concentrações de neomicina (*X4*, 8 a 1000 µg/mL), considerando 30 (A) ou 90 (B) minutos de incubação (*X1*) e diluições de 1:10 ou 1:100 dos inóculos (*X2*), e concentração de resazurina (*X3*) de 4 µg/mL.

Notamos que a quantidade de resazurina reduzida para inóculo 1:100 foi muito baixa, o que indica que este parâmetro pode afetar o desempenho do método microbiológico para a análise de sulfato de neomicina. Quando foi utilizado inóculo 1:10, a redução de resazurina ainda se apresentou abaixo do esperado após 30 minutos de incubação, porém atingiu valores adequados após 90 minutos de incubação.

Considerando as condições otimizadas descritas anteriormente, podemos perceber que existe uma relação dose-resposta adequada. Porém, o ajuste de um modelo linear seria possível apenas em uma pequena faixa de concentração, a saber: de 20 a 30 µg/mL para sulfato de neomicina, conforme pode ser constatado na **Figura 8**.

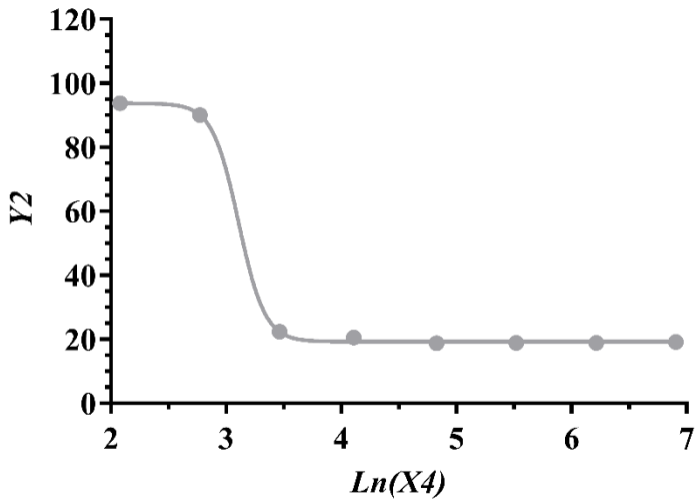



**Figura 8.** Gráfico do modelo de regressão logística de 4 parâmetros para a quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *S. aureus* (*Y2*) em função das concentrações de sulfato de neomicina (*X4*, 8 a 1000 µg/mL), considerando 90 minutos de incubação (*X1*), diluição de inóculo 1:10 (*X2*) e concentração de resazurina (*X3*) de 4 µg/mL.

Por este motivo, optou-se por adotar um modelo de regressão logística de 4 parâmetros, o que possibilitou o ajuste de equações que estabelecem a relação dose-resposta, ou seja, a quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *S. aureus* em função das concentrações de sulfato de neomicina, numa faixa de concentração de 8 a 1000 µg/mL (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Equações do modelo de regressão logística de 4 parâmetros e coeficientes de correlação da quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *S. aureus* (*Y2*) em função das concentrações de sulfato de neomicina (*X4*, 8 a 1000 µg/mL), considerando 90 minutos de incubação (*X1*), diluição de inóculo 1:10 (*X2*) e concentração de resazurina (*X3*) de 4 µg/mL.

| Substância | Equação de regressão logística de 4 parâmetros | $R^2$ |
|---|---|---|
| Neomicina | $Y2 = 19{,}24 + \frac{(93{,}72 - 19{,}24)}{\left(1 + e^{\left(-3{,}815\left(3{,}11 - \ln(X2)\right)\right)}\right)}$ | 99,97% |

$R^2$ = coeficiente de correlação.

5.1.4. Validação do método (Definição das características de performance do método)

O ensaio microbiológico colorimétrico foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e robustez.

Linearidade: Optou-se por adotar um modelo de regressão logística de 4 parâmetros, o que possibilitou o ajuste de equações que estabelecem a relação dose-resposta, ou seja, a quantidade de resazurina reduzida a partir do crescimento de *S. aureus* em função das concentrações de sulfato de neomicina, numa faixa de concentração de 8 a 1000 µg/mL. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9534, e a equação de regressão foi $Y = 2{,}06 + \frac{(132{,}66-2{,}06)}{\left(1+e^{\left(-1{,}401\left(0{,}789-\ln(X)\right)\right)}\right)}$. Os tubos contendo concentrações de sulfato de neomicina na faixa de 1,0 a 250 µg/mL, nos quais podem ser observados crescimento microbiano gradual evidenciado pela diferença de coloração (azul e rosa), estão apresentados na **Figura 9**.

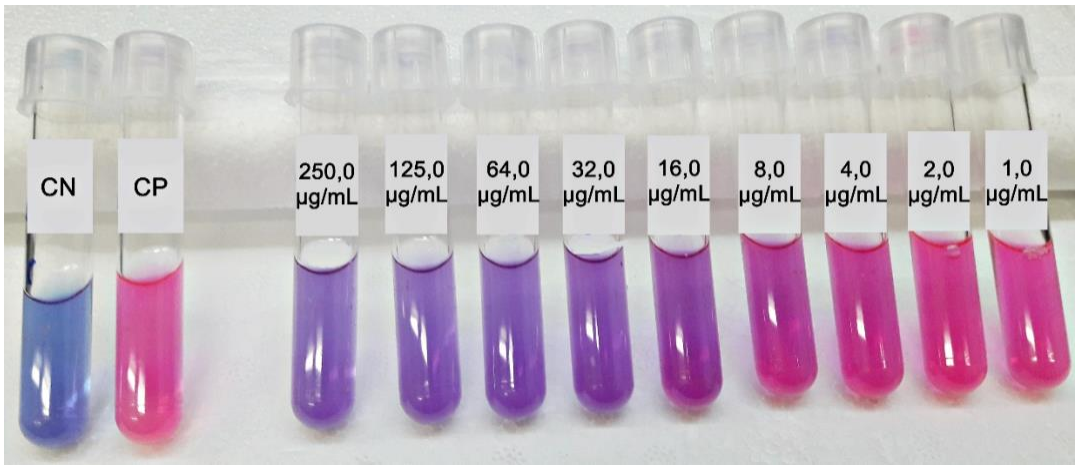



**Figura 9.** Tubos contendo concentrações de sulfato de neomicina na faixa de 1,0 a 250 µg/mL, nos quais podem ser observados crescimento microbiano gradual evidenciado pela diferença de coloração (azul e rosa).

Precisão: O método apresentou precisão satisfatória, com valores de desvio padrão de 3,4% e 5,2%, para as condições de repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente.

Exatidão: A recuperação média foi de 100,4%, demonstrando que o doseamento microbiológico colorimétrico com emprego de resazurina apresentou exatidão satisfatória.

Robustez: O método apresentou-se robusto dentro da faixa de estudo. Destacamos que a quantidade de microrganismo utilizada do ensaio e o tempo de incubação foram os parâmetros analíticos que apresentaram maior influência na resposta, devendo ser controlados para a garantia da robustez do método.

Considerando-se os valores de exatidão (100,4%) e precisão (3,4%), a incerteza combinada do doseamento microbiológico foi de 3,4%, portanto, acima da incerteza alvo (2,5%). Para garantir a performance esperada do doseamento microbiológico, faz-se necessário a análise das amostras em duplicata (n = 2), o que nos leva a incerteza final de 2,4%, portanto abaixo da incerteza alvo (2,5%).

## 5.2. Ensaio colorimétrico em microplaca com leitura RGB

O método em tubos exige o uso de equipamento espectrofotômetro de absorção na região do visível (570 e 600 nm) para o cálculo da quantidade de resazurina reduzida em função do crescimento microbiano. Alternativamente, pode-se utilizar sistema de microplacas com leitura em aplicativo de análise de cor do tipo RGB (*Red*, *Green* e *Blue*), utilizado em dispositivos móveis como celulares *smartphones* e *tablets*. O aplicativo permite a decomposição da cor obtida a partir da análise de imagem (foto da microplaca) em vermelho (*Red*),

verde (*Green*) e azul (*Blue*), indicando valores numéricos que correspondem a intensidade de cada cor do sistema RGB. O emprego deste tipo de aplicativo RBG permite quantificar o crescimento microbiano em decorrência da coloração avermelhada (rosa) formada pela redução de resazurina em função da concentração do antimicrobiano em estudo (BORRA et al., 2009).

O uso de microplacas para a análise colorimétrica é uma alternativa ao método realizado em tubos de ensaio. Suas vantagens incluem a utilização de uma única microplaca com 96 poços dispensando o uso de diversos tubos de ensaio e baixo volume de reagentes, promovendo a diminuição no tempo de preparo do método (LOURENÇO et al., 2011).

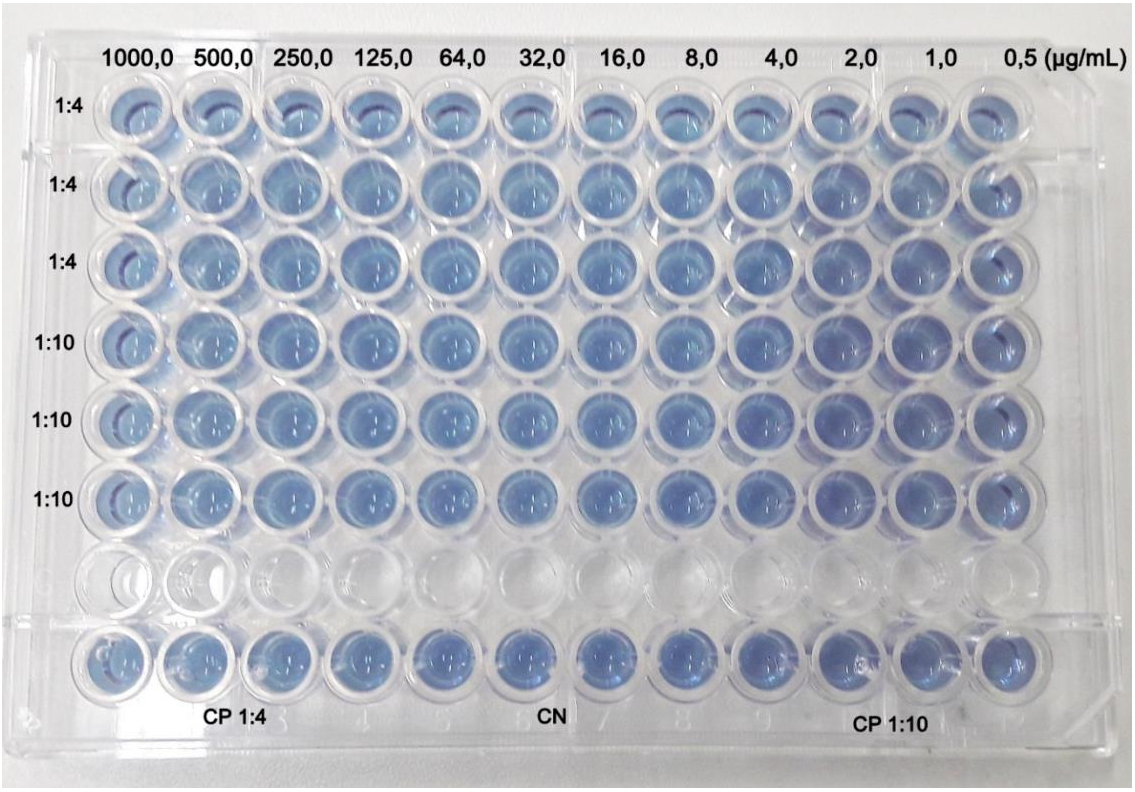
Devido à baixa capacidade de armazenamento dos poços da microplaca, os volumes utilizados foram adaptados de forma a obter a melhor visualização da intensidade de coloração da resazurina. Desta forma, elevamos a concentração de resazurina de 4 μL/mL para 8 μL/mL.

O inóculo utilizado para o estudo em microplaca foi ajustado de acordo com a capacidade dos poços. Sendo assim, devido ao baixo volume de 20 μL adicionado aos poços, definiu-se a necessidade de utilizar uma maior concentração da carga bacteriana presente no inóculo. Utilizou-se meio de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), com ajuste de 25% T e diluição 1:4.

Um tempo de incubação maior também foi necessário para que a diferenciação de coloração fosse observada. Este aumento do tempo é justificável, visto que, quanto menor a carga bacteriana presente no inóculo, maior será o tempo necessário para que o crescimento bacteriano reduza a resazurina presente no meio. As fotos da microplaca contendo diferentes

concentrações de sulfato de neomicina e meio de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus* nas proporções de 1:4 e 1:10, imediatamente após a transferência das soluções (t0) e após 3 horas de incubação (t180), estão apresentadas nas **Figuras 10 e 11**, respectivamente.

**Figura 10.** Microplaca contendo diferentes concentrações de sulfato de neomicina e meio de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus* nas proporções de 1:4 e 1:10, imediatamente após a transferência das soluções (t0).




Fonte: O autor

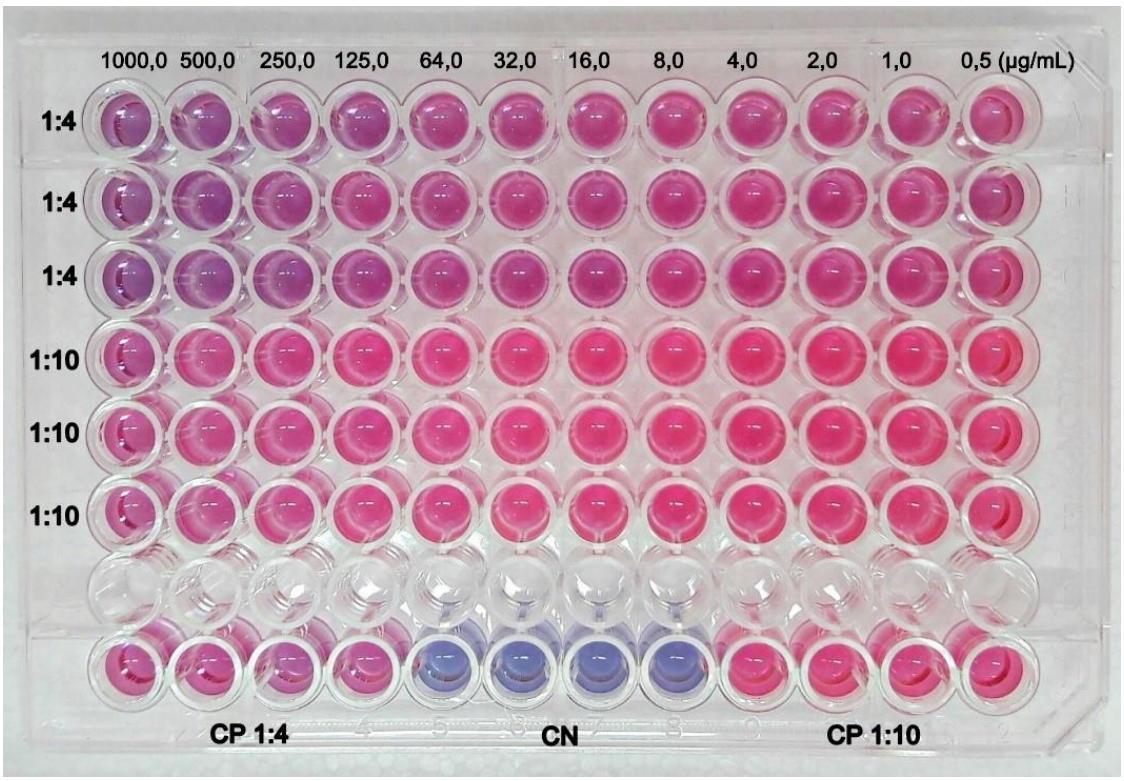



**Figura 11.** Microplaca contendo diferentes concentrações de sulfato de neomicina e meio de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus* nas proporções de 1:4 e 1:10, após 3 horas de incubação (t180).

A partir das leituras de intensidade de coloração vermelha (segundo sistema RGB) usando a foto da microplaca (**Figura 11**), foi possível determinar a potência de sulfato de neomicina presente na amostra em comparação com a substância química de referência (SQR). A potência foi calculada como a razão entre as concentrações capazes de inibir 50% do crescimento para as curvas de regressão logística de 4 parâmetros de amostra e de SQR ($Pot\% = IC50\%_{amostra}/IC50\%_{SQR}$). O valor de potência obtido para a amostra de sulfato de neomicina foi de 98,5% (intervalor de confiança 95% de 95,0 a 102,1%), o que indica que a amostra atende a especificação (de 90 a 135% do valor rotulado de sulfato de neomicina).

# CONCLUSÕES

## 6. CONCLUSÕES

- O perfil analítico alvo (*Analytical Target Profile* - ATP) do método estabelecido permitiu atingir as características de desempenho desejadas (precisão e exatidão aceitáveis, ampla faixa de concentração do antimicrobiano, e tempo de incubação reduzido);
- A análise de risco (diagrama de Ishikawa) possibilitou identificar os parâmetros analíticos potencialmente críticos, a saber: tipo de microrganismo, inóculo, concentração de resazurina e concentração de antimicrobiano;
- O planejamento de experimentos (DoE) permitiu estabelecer modelos matemáticos que relacionam o crescimento microbiano com os parâmetros analíticos críticos;
- A região de operação de Design do método microbiológico (*Method Operable Design Region* - MODR) possibilitou encontrar a combinação das condições analíticas necessárias para o desempenho adequado do método;
- A avaliação dos parâmetros de especificidade/seletividade, precisão, linearidade, robustez e exatidão permitiram validar o método microbiológico proposto;
- A emprego da leitura em aplicativo RGB permitiu propor ensaio colorimétrico em microplaca para a determinação da potência de sulfato de neomicina.

- Portanto, a aplicação dos conceitos de Qualidade por Design Analítico (AQbD) possibilitou o desenvolvimento racional de método microbiológico colorimétrico para análise de sulfato de neomicina.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**ADAMS E. [et al.]** Neomycin: microbiological or liquid chromatography? [Periódico] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. - november de 1996. - Vol. 17. - pp. 757-766.

**ALAMARBLUE®** [Patente] : 5,501,959. - EUA.

**ANVISA** Bismu-jet. - Hortolândia : EMS, 2014.

**ANVISA** Nebacetin. - Jaguariúna : Takeda Pharma LTDA., 2009.

**ANVISA** OTO-XILODASE®. - São Paulo : Apsen Farmacêutica S.A., 2013.

**BORRA R. C. [et al.]** A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays [Artigo] // Braz. oral res.. - São Paulo : [s.n.], 2009. - 3 : Vol. 23. - pp. 255-262.

**BORRA R.C. [et al.]** A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays [Periódico] // Braz Oral Res. - São Paulo : Braz Oral Res, 2009. - 3 : Vol. 23. - pp. 255-262.

**BRUNTON L.L., CHABNER B.A. e KNOLLMANN B.B.** As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman [Livro]. - São Paulo : ArtMed, 2012. - 12 : p. 2079.

**CAZEDEY E. C. L. e SALGADO H. R. N.** A novel and rapid microbiological assay for ciprofloxacin hydrochloride [Periódico] // Journal of Pharmaceutical Analysis. - Araraquara : [s.n.], April de 2013. - Vol. 3. - pp. 382-386. - 5.

**FARMACOPEIA BRASILEIRA** Farmacopeia Brasileira [Periódico]. - Brasília : FioCruz, 2010. - 5 : Vol. 2. - p. 1320.

**FIORENTINO F. A. M., CORRÊA M. A. e SALGADO H. R. N.** Development and validation of a microbiological assay for determination of chlorhexidine digluconate in aqueous solution [Periódico] // Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. - apr/jun de 2013. - 2 : Vol. 49. - pp. 351-358.

**FUKUDA I. M. [et al.]** Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD) [Periódico]. - São Paulo : Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. - Vol. 54. - pp. 1-16.

**GUIA DE REMÉDIOS BRP** Guia de Remédios BRP [Seção do Livro]. - Porto Alegre : Artmed, 2016/17. - 13 : Vol. 1.

**HEWITT W.** Microbiological asssay: an introduction to quantitative principles and evaluation [Livro]. - New York : Academic Press, 1977.

**HOLOWACHUCK S. A., BAL'A M. F. e BUDDINGTON R. K.** A kinetic microplate method for quantifying the antibacterial properties of biological fluids

[Periódico] // Journal of Microbiological Methods. - June de 2003. - Vol. 55. - pp. 441-446.

**KAVANAGH F.** Analytical microbiology [Livro]. - [s.l.] : Academic Press, 1963. - 1.

**LEHTINEN J. [et al.]** Real-time monitorinf of antimicrobial activity with the multirapameter microplate assay [Periódico] // Journal of Microbiological Methods. - February de 2006. - Vol. 66. - pp. 381-389.

**LOURENÇO F. R. e PINTO T. J. A.** Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system [Periódico] // Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. - São Paulo : [s.n.], jul/sept de 2011. - Vol. 47. - pp. 574-584. - 3.

**LOURENÇO F.R. [et al.]** Development and validation of a microplate bioassay for Nystatin using Analytical Quality by Design (QbD) approach [Artigo] // Latin American Journal of Pharmacy. - São Paulo : [s.n.], 2016. - 8 : Vol. 35.

**LOURENÇO F.R. [et al.]** Development, optimatization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products [Artigo] // Journal of Microbiological Methods. - São Paulo : Elsevier, 2014.

**LOURENÇO F.R.** Doseamento microbiológico de apramicina - desenvolvimento e validação de método empregando leitura cinética em

microplacas [Online] // Biblioteca Digital USP. - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2009. - 08 de 05 de 2017. - http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-22082011-162749/pt-br.php.

**LOURENÇO F.R., GALVÃO G.V. e SAVIANO A.M.** Reduced incubation time for inhibition zone formation based on diffusion and growth mechanism elucidation [Artigo]. - São Paulo : [s.n.], 2016. - 3885 : Vol. 8.

**OSTROSKY E. A. [et al.]** Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais [Artigo] // Revista Brasileira de Farmacognosia. - João Pessoa : [s.n.], 2008. - 2. - Vol. 18. - pp. 301-307.

**PARR M.K. e SCHIMDT A. H.** Life cycle management of analytical methods [Periódico] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. - Berlim : [s.n.], january de 2018. - Vol. 147. - pp. 506-517.

**PEDROSO T. M. e 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 [Periódico] // Analytical Methods. - 2014. - Vol. 6. - pp. 1391-1396.

**PERAMAN R., BHADRAYA K. e REDDY Y.P.** Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics [Periódico]. - Índia : International Journal of Analytical Chemistry, 2015. - Vol. 2015. - pp. 1-9.

**PHADUNGCHAROEN N., PATROJANASOPHON P. e OPANASOPIT P.** Smartphone-based Ellman's colourimetric methods for the analysis of D-penicillamine formulation and thiolated polymer [Periódico] // International Journal of Pharmaceutics. - Thailand : Elsevier, 2019. - Vol. 558. - pp. 120-127.

**PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8** PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8 (R2) [Online] // ICH. - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL, 2009. - 08 de maio de 2017. - http://www.ich.org.

**PRADO F. C., RAMOS J. e VALLE J. R.** Atualização terapêutica [Livro]. - São Paulo : Artes Médicas, 2003. - 21 : pp. 318-321.

**RANGA S. [et al.]** A Review on Design OF Experiments (DOE) [Periódico] // INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CHEMICAL SCIENCES . - Índia : [s.n.], 2014. - Vol. 03. - pp. 216-224.

**SAVIANO A.M [et al.]** Development, Optimization, and Validation of a Microplate Bioassay for Relative Potency Determination of Linezolid Using a Design Space Concept, and its Measurement Uncertainty [Periódico] // Journal of AOAC International. - 2015. - 05 : Vol. 98. - pp. 1267-1275.

**SILANIKOVE NISSIM e SHAPIRO FIRA** Combined Assays for Lactose and Galactose by Enzymatic Reactions [Periódico] // Dietary Sugars: Chemistry, Analysis, Function and effects / ed. Preedy Victor R. - Israel : Royal Society of Chemistry, 2012. - pp. 395-404.

**STEAD D. A.** Current methodologies for the analysis of aminoglycosides [Artigo] // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.. - 2000. - Vols. 747(1-2). - pp. 69-93.

**TIBES C. M. S.** Aplicativo móvel para prevenção e classificação de úlceras por pressão. - São Carlos : [s.n.], 2014.

**UNITED STATES PHARMACOPEIA** UNITED STATES PHARMACOPEIA [Livro]. - Rockville : [s.n.], 2012. - 35.