

DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO DO NORFLOXACINO. MÉTODO DA DIFUSÃO EM ÁGAR (CILINDROS EM PLACAS)*

Pedro Eduardo FRÖEHLICH**
Elfrides Eva Scherman SCHAPOVAL***

RESUMO: Sendo o norfloxacino um agente antimicrobiano recente e sendo o ensaio microbiológico de difusão em ágar (cilindros em placas) muito utilizado na avaliação da potência destes fármacos, os autores propuseram o método, utilizando o microorganismo Bacillus subtilis. Este novo ensaio baseia-se nos trabalhos microbiológicos existentes e pretende servir como referência para os ensaios físico-químicos a serem propostos. O método mostrou-se sensível e reprodutível na avaliação da atividade percentual do norfloxacino.

UNITERMOS: Norfloxacino; doseamento; método microbiológico; cilindros em placas.

INTRODUÇÃO

O doseamento de antibióticos por métodos microbiológicos tem sido largamente utilizado por traduzir, de maneira satisfatória, a potência antibacteriana dos mesmos³.

O norfloxacino (ácido 1-etil-6-flúor-1,4-diidro-4oxo-7-(1-piperazínil)-3-quinolinocarboxílico) é o primeiro de uma nova geração de agentes antimicrobianos, derivados do ácido nalidíxico².

Alguns testes preliminares foram realizados objetivando a adaptação da metodologia existente^{1,4,5} para o ensaio microbiológico dos cilindros em placas, uma vez que não foram encontradas referências para o norfloxacino em códigos oficiais por se tratar de um fármaco recente⁷.

* Parte do trabalho de dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia no Curso de Pós-Graduação em Farmácia – Faculdade de Farmácia – Universidade do Rio Grande do Sul – 90610 – Porto Alegre – RS.

** Mestrando – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – 90610 – Porto Alegre – RS.

*** Departamento de Produção e Controle de Medicamentos – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – 90610 – Porto Alegre – RS.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Padrão

A solução padrão foi preparada no momento do ensaio. Pesou-se o equivalente a 50,0 mg de norfloxacino anidro com o auxílio de 20 ml de NaOH 0,1M, e colocou-se sob agitação por 15min. A seguir, o volume foi completado com tampão fosfato pH 8,0, em balão volumétrico de 50,0 ml.

A partir desta solução preparou-se soluções contendo 10, 20 e 40 microgramas/ml de norfloxacino, utilizando-se tampão fosfato pH 8,0⁶.

2. Matéria-Prima

Seguiu-se o mesmo procedimento utilizado no preparo do padrão, porém, preparou-se apenas uma diluição, contendo o equivalente a 20 microgramas/ml de norfloxacino.

3. Produto Acabado

Analisou-se comprimidos orais contendo, cada um, 400 mg de norfloxacino.

Através do peso médio dos comprimidos e do teor de umidade dos mesmos (Karl-Fischer), pesou-se o equivalente a 50,0 mg de norfloxacino e seguiu-se o mesmo procedimento adotado na preparação da matéria-prima.

A diluição final foi filtrada na hora do uso, com papel de filtro Whatman 40.

4. Inóculo

Realizaram-se testes preliminares com o objetivo de adaptar os dados da bibliografia ao método dos cilindros em placas e às condições de trabalho. Utilizaram-se 3 microorganismos: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus Luteus* ATCC 9341 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 – P; meios de cultura diferentes: números 1 e 11 de GROVE-RANDAL e diferentes pH: 6, 7 e 8.

Após análise dos resultados preliminares adotou-se a seguinte metodologia: o microorganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, mantido em meio inclinado n^o 1, por 120 h, à 35-37°C, em estufa microbiológica Heraeus, foi repicado para caldo simples e deixado desenvolver-se por 24 h., nas mesmas condições. No momento do ensaio, esta última cultura foi diluída a 1% v/v e mantida a 48°C.

5. Cilindros

Utilizou-se cilindros de aço inoxidável com 8 mm de diâmetro externo, 6 mm de diâmetro interno e 10 mm de altura, lavados e esterilizados a 180°C, durante 2 horas.

6. Placas

Placas de Petri, com 20 mm de altura e 100 mm de diâmetro, foram lavadas e esterilizadas a 180°C, por 2 horas, sendo, posteriormente, distribuídas em câmara de fluxo laminar VECO, modelo HLFS 12M.

7. Ensaio

Distribuídas as placas no fluxo laminar, cada uma recebeu 20 ml do meio de cultura de base (n^o 11). Após a solidificação da camada de base, adicionou-se 6 ml de inóculo em cada placa, deixando-se solidificar numa camada homogênea e lisa. Em seguida, distribuiu-se 4 cilindros por placa. Em cada cilindro adicionou-se 0,200 ml de solução de norfloxacino, com pipeta automática. A distribuição da solução nas placas foi aleatória, utilizando-se assim 24 cilindros para cada diluição da curva padrão, para a matéria-prima e para o produto acabado.

As placas foram fechadas e incubadas à 35-37°C, durante 20 h. Ao final desse tempo, mediu-se os halos de inibição, ao centésimo de milímetro, com o auxílio de paquímetro Polaris 6411 G15.

RESULTADOS

Foram plotados no gráfico "logaritmo da concentração versus diâmetro dos halos de inibição" os pontos relativos às médias aritméticas de 24 medidas de halos, para cada diluição da curva padrão, para a matéria-prima e para o produto acabado. Uma vez traçada a curva padrão, foram plotadas as médias das medidas referentes à matéria-prima e ao produto acabado, conforme indicado na Figura 1.

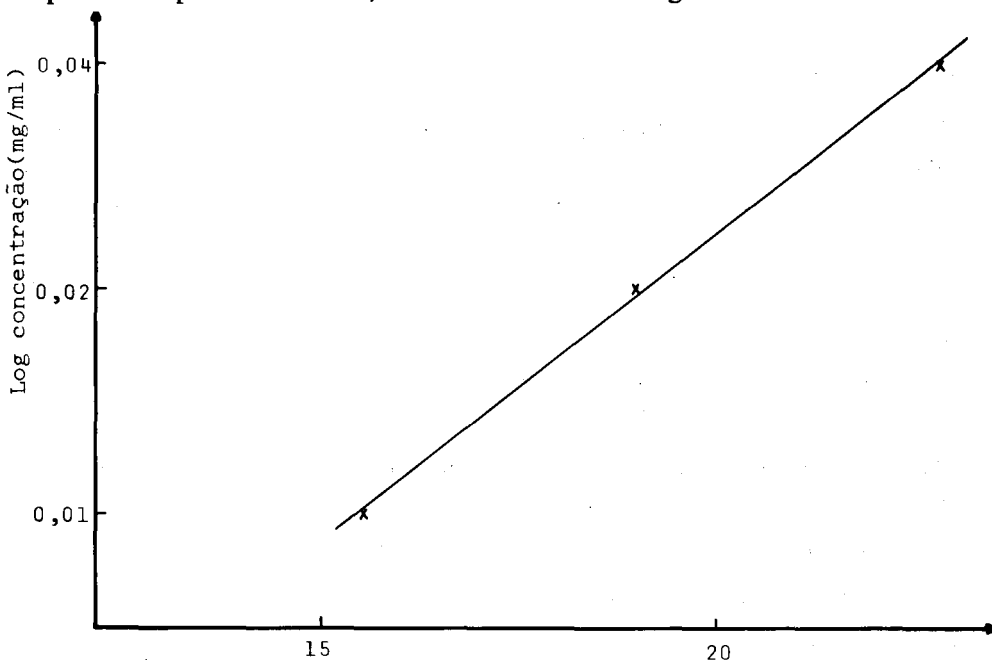


FIG. 1 - Determinação gráfica da atividade percentual do norfloxacino. Diâmetro dos halos (mm)
Rev. Ciênc. farm., São Paulo, 12: 161-165, 1990.

DISCUSSÃO

Os métodos microbiológicos de doseamento, de uma maneira geral, requerem um maior número de cuidados por parte do analista e um maior número de dados para a obtenção dos resultados, em relação aos métodos físico-químicos em geral.

O método microbiológico de difusão em ágar (cilindros em placas) foi adaptado em virtude da inexistência de dados na bibliografia para o uso deste método no doseamento do norfloxacin.

Através dos resultados, pôde-se observar, também, que a escolha do microorganismo, quanto do meio de cultura e do pH foram adequadas, uma vez que o ensaio mostrou sensibilidade e reprodutividade.

A análise da variância demonstrou que nenhum dos 3 ensaios desviou significativamente para $p=0,05$.

CONCLUSÃO

Observando-se o desenvolvimento do método e os resultados obtidos, conclui-se que o método microbiológico de difusão em ágar (cilindros em placas), nas condições utilizadas, é adequado para a determinação da atividade percentual do norfloxacin.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração da bolsista Simone Bortolan no desenvolvimento dos trabalhos práticos.

Agradecemos a Merck, Sharp & Dohme pelo fornecimento do padrão, matéria-prima e produto acabado.

FRÖEHLICH, P. E. & SCAPOVAL, E. E. S. – Microbiological cilinder-plate assay method of norfloxacin. *Rev. Ciênc. farm.*, São Paulo, 12: 161-165, 1990.

ABSTRACT: The authors used an adopted microbiological cilinderplate assay method to determine the percentual activity of norfloxacin. Some adaptations were necessary because there are no official microbiological cilinder-plate assay methods in the official codes. Bacillus subtilis was used. The method proved adequate to determine the percentual activity of norfloxacin.

KEY-WORDS: Norfloxacin; microbiological cilinder-plate assay method.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLAND, J. *et alii* – Bioassay procedures for norfloxacin. *Eur. J. Clin. Microbiol*, 2: 249-52. 1983.
2. GOLDSTEIN, E. J. C. – Norfloxacin, a fluroquinolone antibacterial agent: classification, mechanism of action, and in vitro activity. *Am. J. Med.*, 82 (Suppl. 6 B): 13-17, 1987.
3. GROVE, D. C. & RANDALL, W. A. – *Assay methods of antibiotics*. New York, Medical Encyclopedia, 1955. 238 p.
4. SHUNGU, D. L. *et alii* – Multicenter evaluation of the proposed quality control limits and interpretive zone standards for in vitro susceptibility testing with norfloxacin. *J. Clin. Microb.*, 18: 988-91, 1983.
5. SHUNGU, D. L. *et alii* – Tentative interpretive standards for disk diffusion susceptibility testing with norfloxacin (MK-0366, AM-715). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23: 256-60, 1983.
6. THE UNITED States pharmacopeia. 21. ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 1985. p. 1420.
7. UNITED States M.I. ou P.I. n. 4,292,317. *1,4-diidro-quinolone-3-carboxilic acid derivatives, process for their preparation and composition containing them*. sept. 29, 1981.

Recebido em 18.01.90