

## CONTRIBUIÇÃO AO DOSEAMENTO DE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS. I. MÉTODO MICROBIOLÓGICO DOS CILINDROS EM PLACAS\*

Raul Cesar EVANGELISTA\*\*  
Elfrides Eva Scherman SCHAPOVAL\*\*\*

---

*RESUMO: Os autores utilizaram um método microbiológico de cilindros em placas, adaptado para determinar a atividade percentual da amicacina, canamicina, estreptomina, neomicina e sisomicina, com o objetivo de comparar esses resultados com os que seriam obtidos por vários métodos físico-químicos a serem testados para esses antibióticos. Algumas novas adaptações foram necessárias porque alguns dos antibióticos não apresentavam métodos microbiológicos, usando cilindros em placas, oficializados para o seu doseamento, ou, mesmo, não estavam inscrito em códigos oficiais. Foi utilizado Staphylococcus epidermidis para o ensaio da neomicina e Bacillus subtilis para os ensaios dos outros antibióticos. Os métodos mostraram-se adequados para a avaliação da atividade percentual dos antibióticos.*

*UNITERMOS: Antibióticos aminoglicosídicos, doseamento; método microbiológico, cilindros em placas.*

---

### 1. INTRODUÇÃO

O doseamento de antibióticos por métodos microbiológicos traduz com grande fidelidade o estado dessas substâncias, pois informa sobre sua característica peculiar, a potência antibacteriana, difícil de ser quantificada por métodos físico-químicos.

Métodos microbiológicos de cilindros em placas, adaptados de códigos oficiais<sup>4,7</sup> e de GROVE & RANDAL<sup>5</sup>, foram desenvolvidos para a avaliação da potência antibacteriana dos antibióticos aminoglicosídicos amicacina, canamicina, estreptomina, neomicina e sisomicina, com o objetivo de comparar os resultados com os que seriam obti-

dos por métodos físico-químicos, adaptados por CAMPOS<sup>3</sup> para a gentamicina, a serem testados nos antibióticos em estudo.

Algumas adaptações se fizeram necessárias, uma vez que alguns dos antibióticos estudados não apresentavam doseamento oficial por método de cilindros em placas, ou mesmo, não constavam ainda nos códigos oficiais<sup>2,4,5,6,7</sup>.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

As concentrações das soluções dos padrões e das amostras dos antibióticos em estudo estão expressas em quantidade da base pura por volume, nos casos da amicacina, canamicina e sisomicina, e em quantidade do

---

\* Parte do trabalho de dissertação apresentado para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia no Curso de Pós-Graduação em Farmácia UFRGS — 90.000 — Porto Alegre — RS.

\*\* Departamento de Fármacos e Medicamentos — Faculdade de Ciências Farmacêuticas — UNESP — 14.800 — Araraquara — SP.

\*\*\* Departamento de Produção e Controle de Medicamentos — Faculdade de Farmácia — UFRGS. 90.000 — Porto Alegre — RS.

sulfato por volume, nos casos da estreptomina e neomicina.

### 2.1. Amostras

Foram utilizadas amostras comerciais dos sulfatos de amicacina (solução injetável), canamicina (solução injetável), estreptomina (pó para injetável) e sisomicina (solução injetável). Fez-se uso, também, de pomada de neomicina, preparada anteriormente por BAPTISTA<sup>1</sup>, segundo a composição seguinte: sulfato de neomicina 0,05 g; polietilenoglicol 4000 4,14 g e polietilenoglicol 400 5,81 g.

Destas amostras foram preparadas soluções estoque dos antibióticos na concentração de 1 mg/ml, usando-se, como solvente, solução tampão fosfato 0,1 M n.º 3, pH 8,0<sup>4,5,7</sup>. A partir destas soluções estoque foram realizadas, em câmara de fluxo laminar (Laminar flow BSH), no momento do ensaio, diluições sucessivas, até serem obtidas soluções dos antibióticos nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 µg/ml.

A amostra de estreptomina (pó para injetável) foi previamente seca a 60°C, durante 3 h, sob pressão de 5 mmHg<sup>4</sup>.

Para a preparação da amostra de neomicina (pomada), após homogeneização prévia, foram pesados 10 g de pomada, aos quais foram adicionados 50 ml de acetona p.a. Aqueceu-se, por 3 minutos, em banho-maria, sob agitação constante, até a total dissolução da pomada. A suspensão obtida foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos, em centrifugador Janetski K23. Dissolveu-se o resíduo e completou-se o volume com a solução tampão fosfato, obtendo-se solução de sulfato de neomicina na concentração de 1 mg/ml<sup>1</sup>.

### 2.2. Padrões

Foram preparadas soluções estoque dos padrões dos antibióticos na concentração de 1 mg/ml, usando-se, como solvente, água destilada, para a estreptomina, e solução

tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, para os outros antibióticos<sup>4,5,7</sup>. Os padrões de sulfato de estreptomina e de sulfato de neomicina foram previamente secos a 60°C, por 3 h, sob pressão de 5 mmHg<sup>4</sup>.

A partir destas soluções estoque foram preparadas, no momento do ensaio, utilizando-se os respectivos solventes, soluções dos antibióticos nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 µg/ml.

### 2.3. Microorganismos teste

Utilizou-se *Bacillus subtilis* ATCC 6633, para os ensaios da amicacina, canamicina, estreptomina e sisomicina. O microrganismo, mantido em meio n.º 1, inclinado, segundo GROVE & RANDALL<sup>5</sup>, por 120 h, a 32-35°C, em estufa microbiológica Heraeus, foi repicado para caldo simples e deixado desenvolver-se por 24h à mesma temperatura. No momento do ensaio, esta última cultura foi diluída a 2% v/v em meio de cultura n.º 5<sup>5</sup>, mantido a aproximadamente 42°C. Para o ensaio da neomicina, utilizou-se *Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228. O microrganismo, mantido em meio n.º 1<sup>5</sup>, inclinado, por 24 h, a 32-35°C, foi repicado para caldo simples e desenvolvido, por 24 h, à mesma temperatura. No momento do ensaio, esta última cultura foi diluída, a 2% v/v, em meio de cultura n.º 11<sup>5</sup>, mantido a aproximadamente 42°C.

### 2.4. Cilindros

Foram utilizados cilindros de aço inoxidável, com 8 mm de diâmetro externo, 6 mm de diâmetro interno e 10mm de altura, lavados e esterilizados a 180°C, por 2 h.

### 2.5. Placas

Placas de Petri, com 20 mm de altura e 100 mm de diâmetro, foram lavadas com água destilada e esterilizadas a 180°C, por 2 h, sendo, posteriormente, distribuídas em câmara de fluxo laminar. Foram usadas doze placas para cada determinação, isto é, quatro placas para cada diluição.

## 2.6. Ensaio

Após a distribuição das placas, cada uma recebeu aproximadamente 20 ml do meio utilizado como camada de base, n.º 5 (amicacina, canamicina, estreptomomicina e sisomicina) ou n.º 11 (neomicina). Após a solidificação da camada de base, foram adicionados, a cada placa, 4 ml do inóculo, deixando-se solidificar. Em seguida, foram colocados quatro cilindros, dois para receberem as soluções dos padrões e os outros dois para as soluções das amostras. Em cada cilindro foram colocadas três gotas da diluição correspondente. As placas com *B. subtilis* foram incubadas a 32-35°C e as placas com *S. epidermidis* a 35-37°C, por 16-18 h, para o aparecimento dos halos de inibição, que

foram medidos, ao centésimo do milímetro, por meio de paquímetro Polaris 6411 G15.

## 3. RESULTADOS

Foram plotados num gráfico “logaritmo da concentração versus diâmetro dos halos de inibição” os pontos relativos às médias aritméticas de oito medidas de halos, para cada uma das três diluições do padrão e da amostra. Após traçarem-se duas curvas paralelas, referentes ao padrão e à amostra, o resultado foi obtido através da razão entre os logaritmos das concentrações do padrão e da amostra capazes de provocar o mesmo grau de inibição, conforme está indicado na Fig. 1.

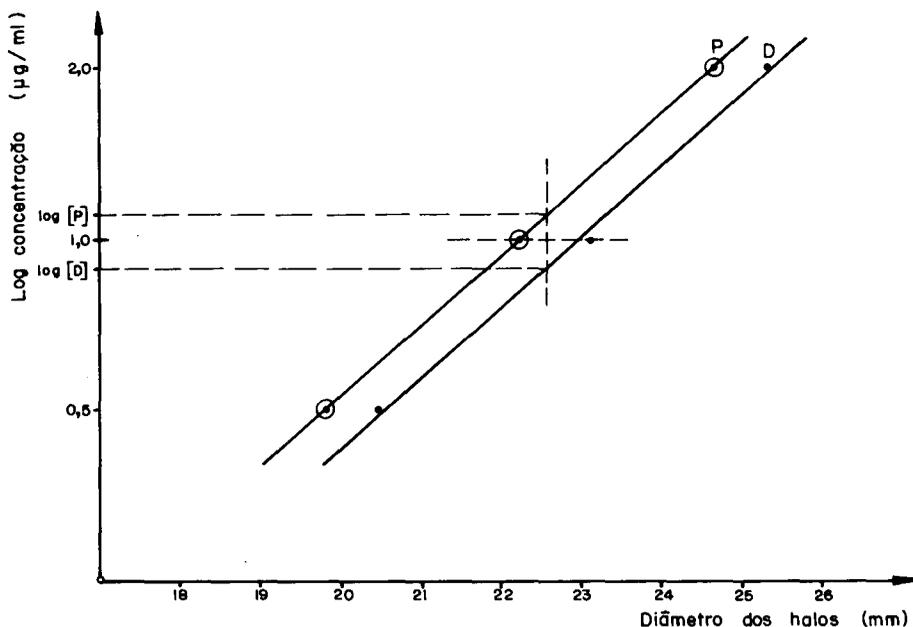


FIG. 1 — Representação gráfica da determinação da atividade percentual de antibiótico aminoglicosídico (A%). P = Padrão, D = Amostra, A% =  $\log [P] / \log [D] \times 100$ .

## 4. DISCUSSÃO

O método dos cilindros em placas, apesar de requerer cuidados minuciosos por parte do executante e um maior número de dados para a obtenção dos resultados, em relação aos métodos físico-químicos em geral,

mostrou ser reprodutível e foi de inestimável valor para a avaliação dos outros métodos estudados. Assim, por exemplo, a baixa atividade encontrada para a peomicina reflete fielmente os resultados obtidos por BAPTISTA<sup>1</sup>.

Algumas adaptações foram necessárias, em virtude da inexistência, em alguns casos, de técnica oficializada de ensaio microbiológico com cilindros em placas.

Dessa maneira, preferiu-se analisar a amicacina pelo método dos cilindros em placas em lugar do método turbidimétrico oficial com *Staphylococcus aureus*. Utilizou-se *Bacillus subtilis* por ser microrganismo não patogênico, e esta escolha baseou-se nas condições preconizadas para o ensaio da estreptomomicina e para a verificação do conteúdo de canamicina B em preparações de canamicina<sup>4</sup>.

Para a sisomicina, que não estava inscrita em nenhum dos códigos oficiais consultados e, conseqüentemente, não apresentava nenhuma indicação técnica para o seu doseamento microbiológico, foi necessária a montagem de todo o método. Neste sentido, e por analogia com os outros antibióticos estudados, verificou-se que era possível o seu doseamento, utilizando-se técnica idêntica. Preferiu-se preparar as soluções estoque de amicacina e de sisomicina com a solução

tampão fosfato, em lugar de fazê-lo com água destilada, para que se tivesse maior segurança quanto à estabilidade desses antibióticos e para manter-se a uniformidade da adaptação do método.

As placas foram incubadas a 32-35°C, porque verificou-se na prática, que essa temperatura promovia o aparecimento de halos de inibição satisfatórios para o desenvolvimento da metodologia, ao invés de fazê-lo a 37°C, como indicam alguns códigos oficiais.

## 5. CONCLUSÕES

Observando-se o desenvolvimento das técnicas e os resultados obtidos, conclui-se que o método microbiológico dos cilindros em placas, nas condições apresentadas, é adequado para a determinação da atividade percentual dos antibióticos estudados. Verificou-se, ainda, que o método microbiológico deverá acompanhar os métodos físico-químicos, para maior segurança na determinação dos antibióticos aminoglicosídicos.

---

EVANGELISTA, R.C. & SCHAPOVAL, E.E.S. — Contribution to the quantitative determination of aminoglycosidic antibiotics in pharmaceutical preparations. I. Microbiological cylinder-plate assay method. *Rev. Ciênc. farm.*, São Paulo, 5:17-20, 1983.

**ABSTRACT:** The authors used an adapted microbiological cylinder-plate assay method to determine the percentual activity of amikacin, kanamycin, streptomycin, neomycin, and sisomicin in order to compare these results with those which would be obtained by means of several physico-chemical assay methods to be tested in these antibiotics. Some new adaptations were necessary, because some antibiotics studied had no official microbiological cylinder-plate assay method and sisomicin was not listed in the official codes. *Staphylococcus epidermidis* was used in neomycin assay and *Bacillus subtilis* in the others. The methods proved adequate to determine the percentual activity of the antibiotics.

**KEY-WORDS:** Aminoglycosid antibiotics; microbiological cylinder-plate, assay method.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAPTISTA, E.R.—*Contribuição ao estudo do antibiótico neomicina na forma farmacêutica pomada*. Porto Alegre, Faculdade de Farmácia, UFRGS, 1980. (Dissertação — Mestrado).
2. BRITISH pharmacopeia.—London, Her Majesty's Stationary, 1973. p. 217.
3. CAMPOS, L.M.M. — *Contribuição ao controle de qualidade de produtos farmacêuticos contendo o antibiótico gentamicina*. Porto Alegre, Faculdade de Farmácia, UFRGS, 1980. (Dissertação — Mestrado).
4. CODE of federal regulations.—Food and drug administration. 21. Washington, Federal Register, 1977. p. 429-90.
5. GROVE, D.C. & RANDALL, W.A.—*Assay methods of antibiotics*. New York, Medical Encyclopedia, 1955. p. 34-50.
6. PHARMACOPÉE française.— 9 ed. Paris, Maisonneuve, 1972. p. 581-4.
7. UNITED STATES pharmacopeia.—20. rev. Rockville, United States Pharmacopeil Convention, 1980. p. 882-900.