

***DOSAGEM MICROBIOLÓGICA
DE ANTIBIÓTICOS***
ASPECTOS TEÓRICOS E PRÁTICOS

PROF. FELIPE R. LOURENÇO
2015



DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO

“A atividade (potência) dos antibióticos pode ser demonstrada sob condições específicas através de seu efeito sobre o crescimento de microrganismo-padrão sensível.”

MÉTODO DE DIFUSÃO EM AGAR

Dois fenômenos ocorrem simultaneamente:

1. Difusão do antibiótico
2. Crescimento microbiano

Resultando na zona de inibição de crescimento.



DIFUSÃO VS. CRESCIMENTO

- Difusão

$$x^2 = 4 \times D \times \ln\left(\frac{m_o}{m}\right) \times t$$

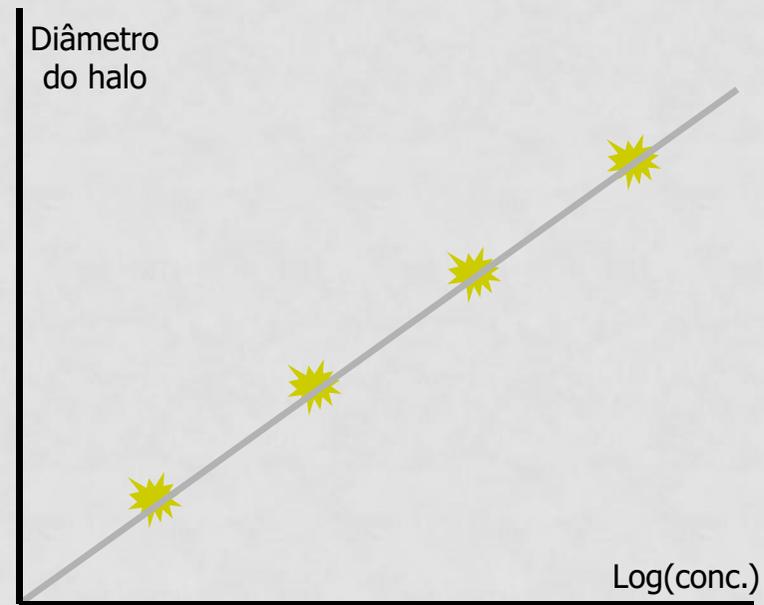
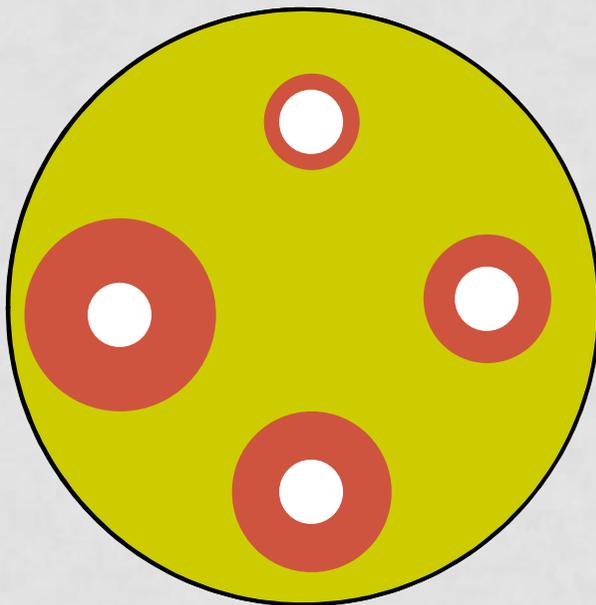
- Crescimento

$$t = L + G \times \log_2\left(\frac{N}{N_o}\right)$$

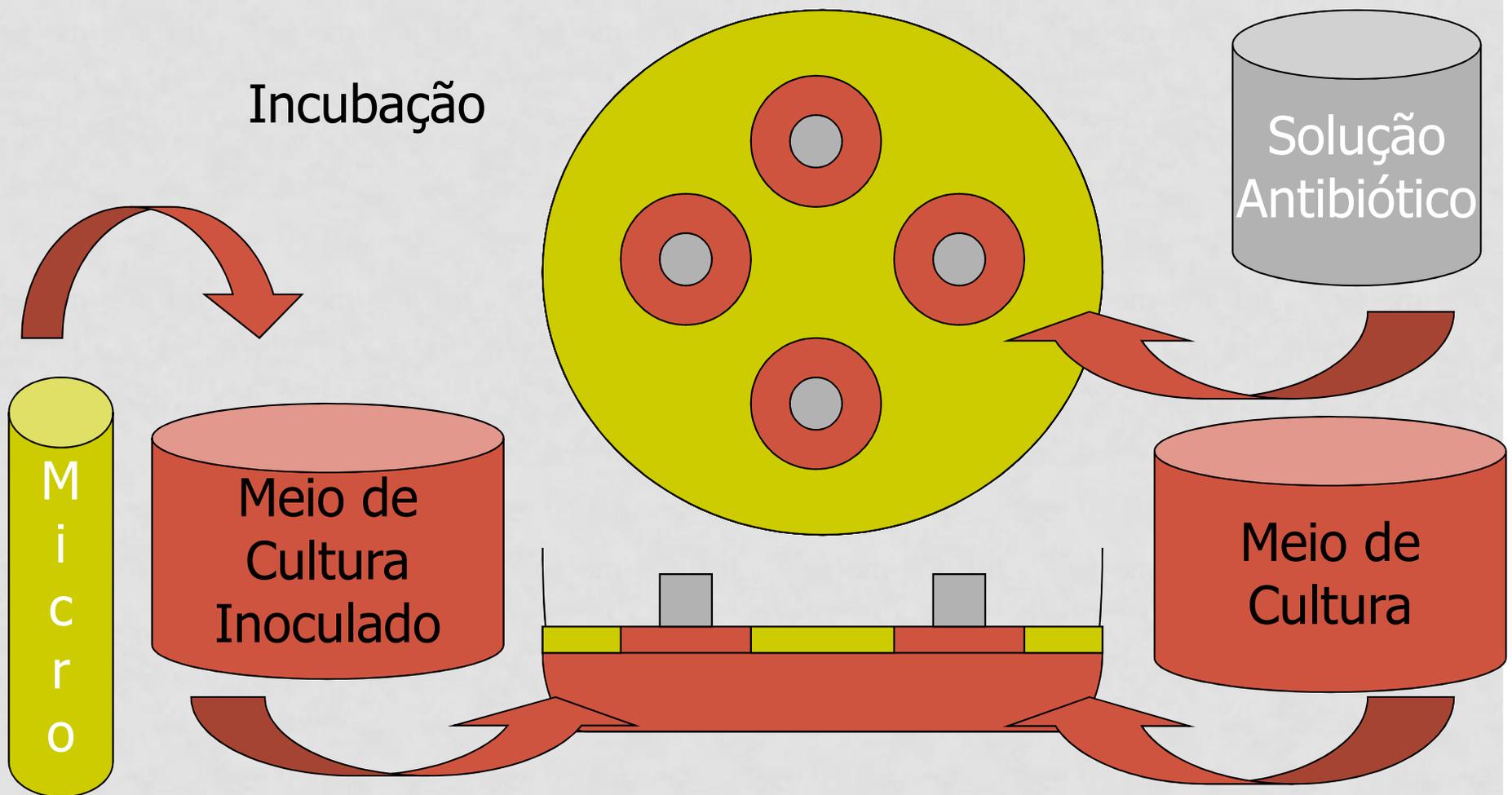
$$x^2 \propto \ln(m_o)$$

RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA

ANTIBIÓTICOS

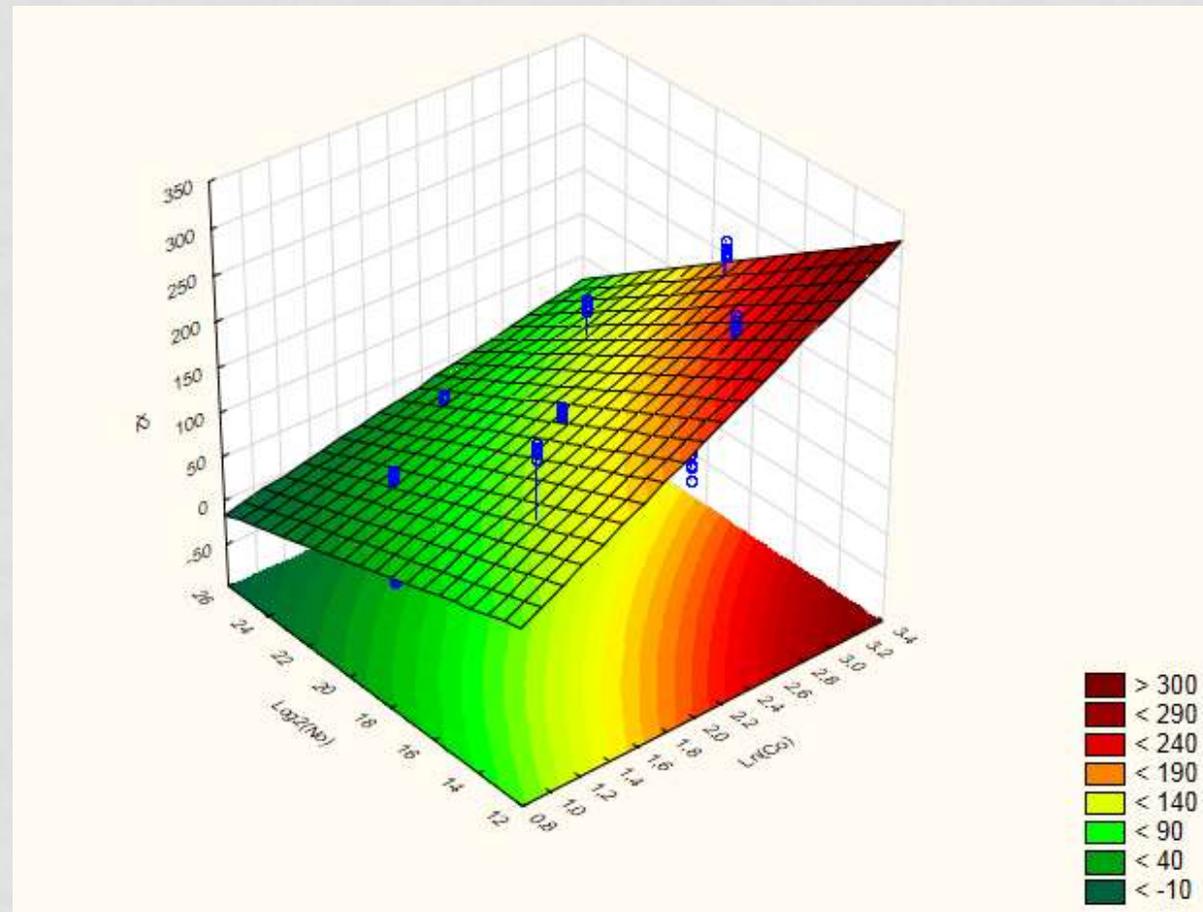


ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE DIFUSÃO EM AGAR



FATORES DE INFLUÊNCIA

- Quantidade de microrganismo (inóculo)



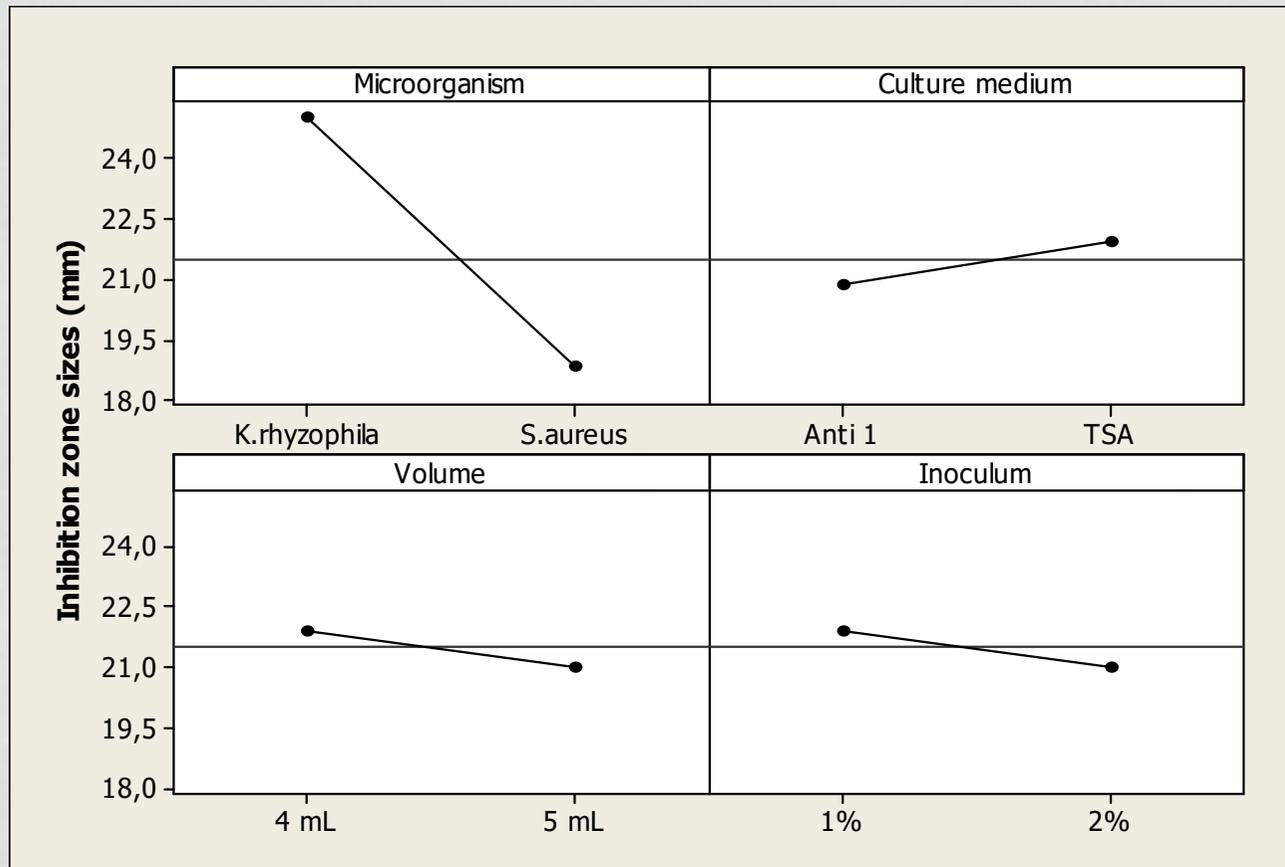
FATORES DE INFLUÊNCIA

- Meio de cultura: Composição e pH

Composição	1	2	3	5	9	11	15	19
Peptona (g)	6,0	6,0	5,0	6,0	-	6,0	10,6	9,4
Digesto Pancreático de Caseína (g/L)	4,0	-	-	-	17,0	4,0	-	-
Digesto Papáico de Soja (g/L)	-	-	-	-	3,0	-	-	-
Extrato de Carne (g/L)	1,5	1,5	1,5	1,5	-	1,5	10,6	2,4
Extrato de Levedura (g/L)	3,0	3,0	1,5	3,0	-	3,0	-	4,7
Fosfato de Potássio Monobásico (g/L)	-	-	1,32	-	-	-	-	-
Fosfato de Potássio Bibásico (g/L)	-	-	3,68	-	2,5	-	-	-
Cloreto de sódio (g/L)	-	-	3,5	-	5,0	-	3,0	10,0
Dextrose (g/L)	1,0	-	1,0	-	2,5	1,0	-	10,0
Agar (g/L)	15,0	15,0	-	15,0	20	15,0	17,0	23,5
pH	6,5-6,7	6,5-6,7	6,9-7,1	7,7-7,9	7,2-7,4	8,2-8,4	6,9-7,1	6,0-6,2

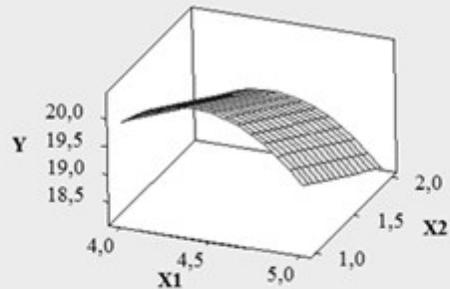
FATORES DE INFLUÊNCIA

- Microrganismo, meio de cultura e inóculo



FATORES DE INFLUÊNCIA

(A)



(A)

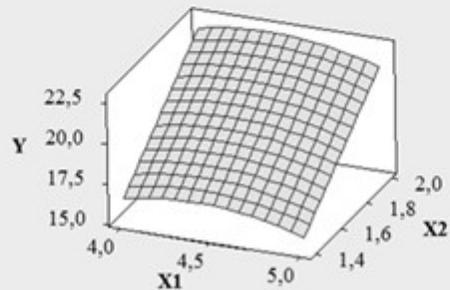
Y = tamanho dos halos

X1 = volume de meio de cultura

X2 = tamanho do inóculo

Para uma concentração de antibiótico fixada

(B)



(B)

Y = tamanho dos halos

X1 = volume de meio de cultura

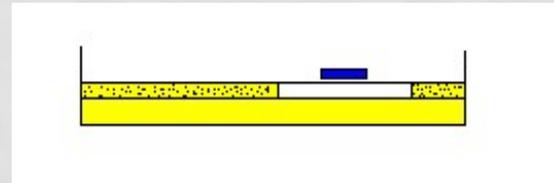
X2 = concentração de antibiótico

Para um tamanho de inóculo fixado

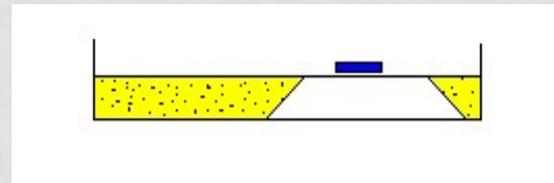
FATORES DE INFLUÊNCIA

- Espessura do agar

- Bicamada

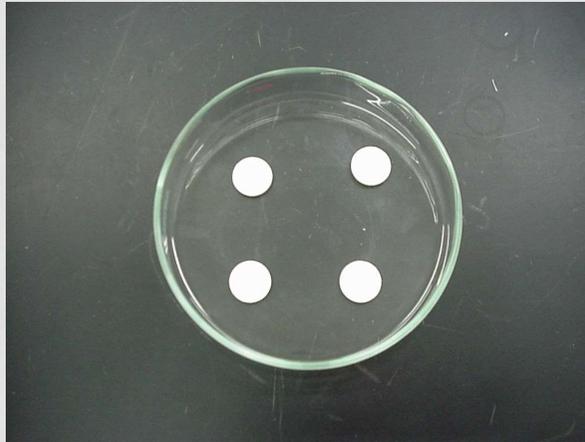


- Monocamada



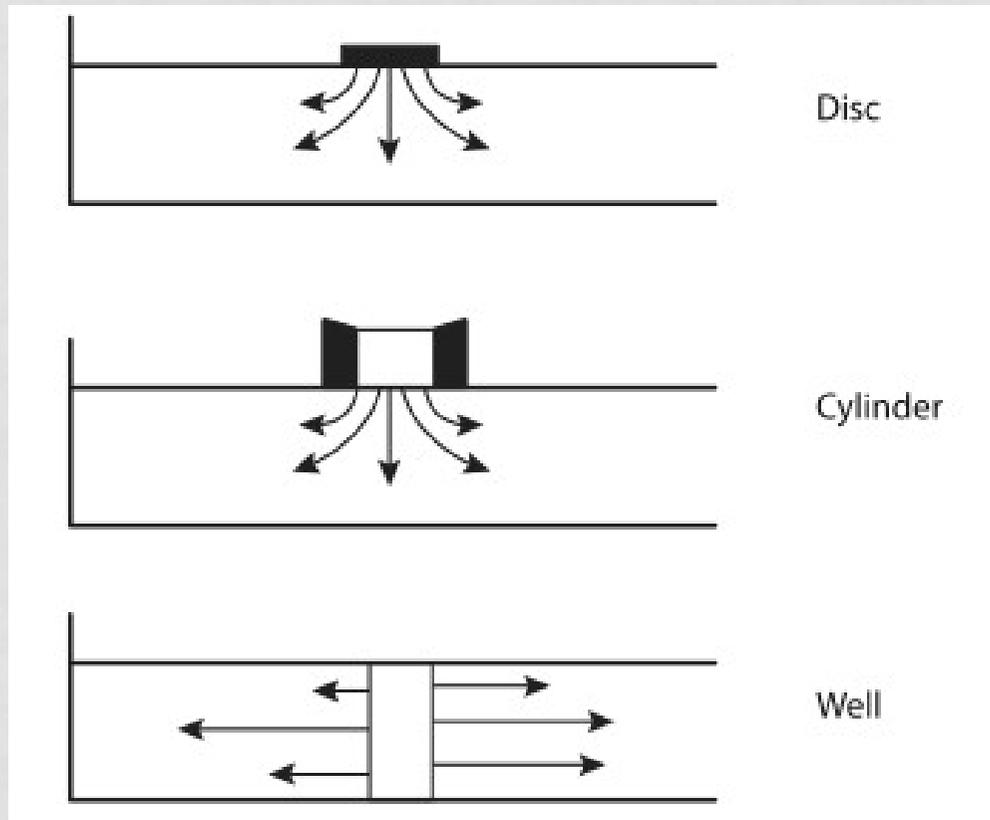
FATORES DE INFLUÊNCIA

- Dispositivo de aplicação das soluções



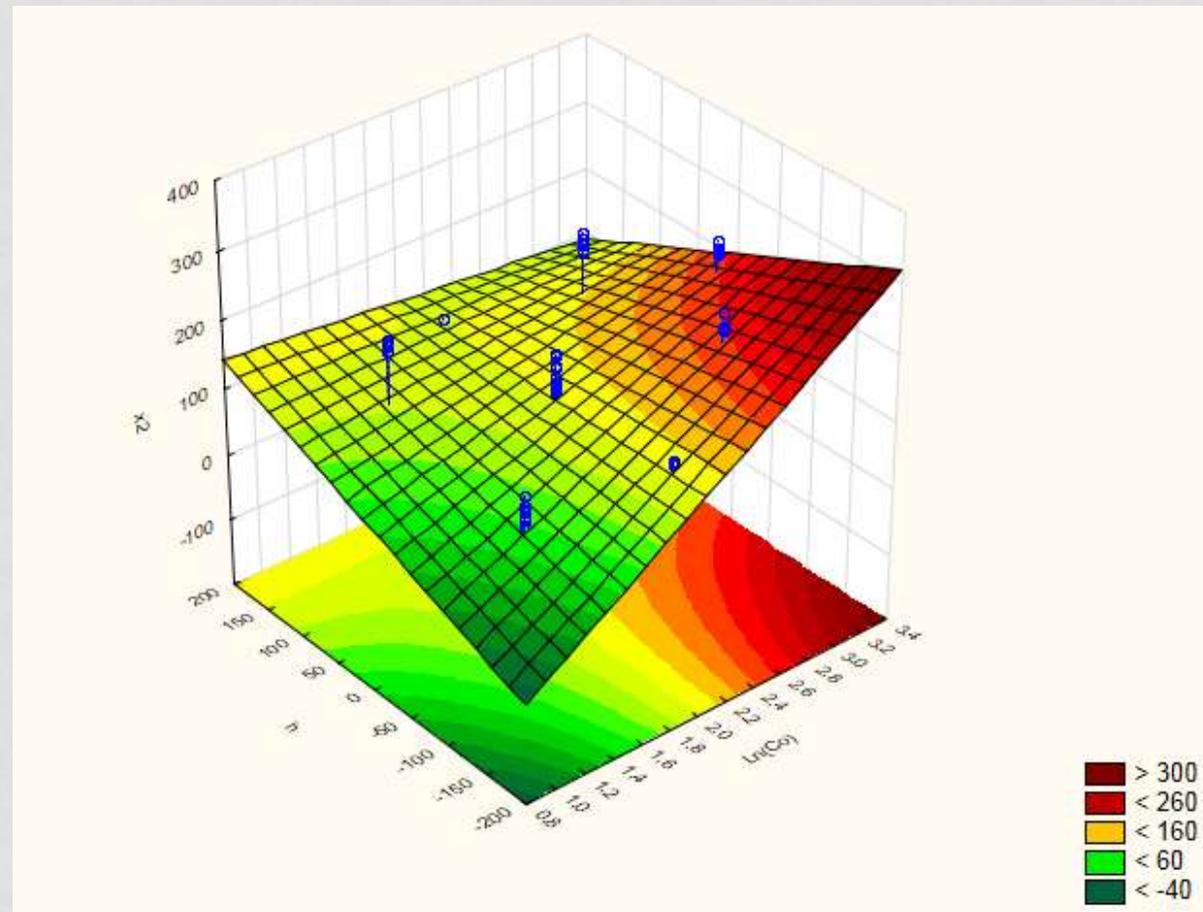
FATORES DE INFLUÊNCIA

- Dispositivo de aplicação das soluções



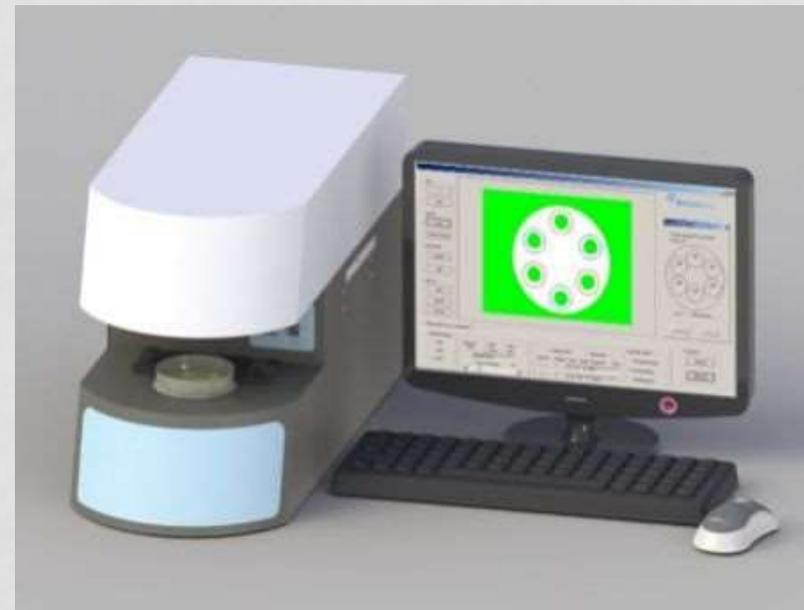
FATORES DE INFLUÊNCIA

- Pré-difusão / Pré-incubação



FATORES DE INFLUÊNCIA

- Incubação: Tempo e temperatura
- Leitura dos halos de inibição



DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

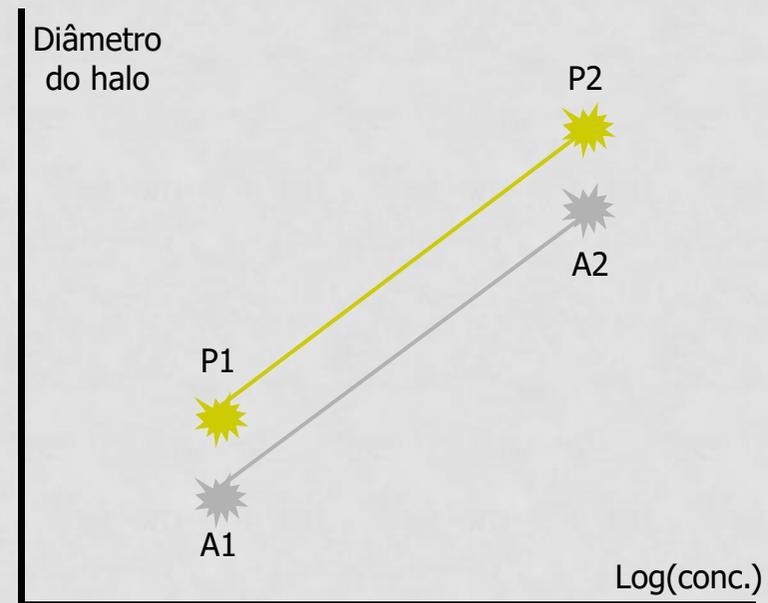
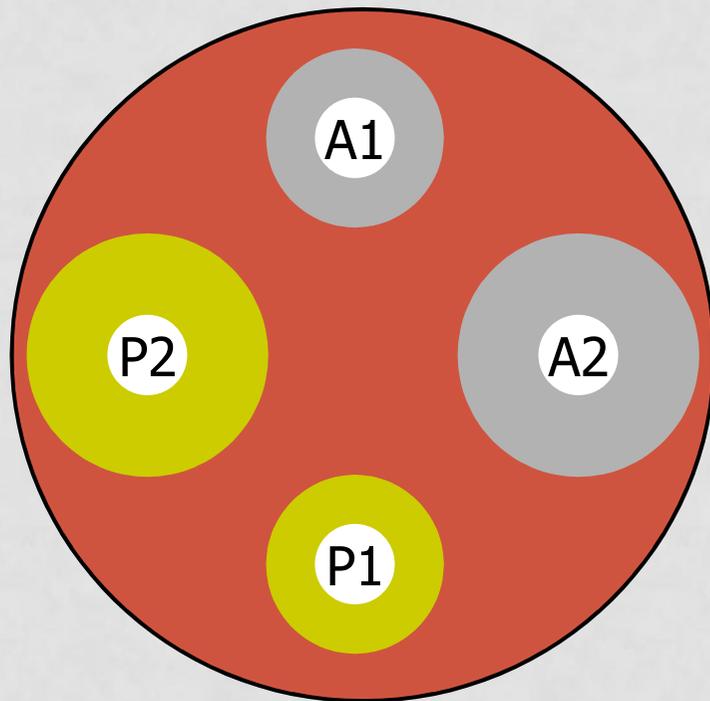
- Variabilidade:
 - Emprego de SQR
 - Reduzir variabilidade (dentre e entre placas)
- Validade do Ensaio:
 - Regressão
 - Linearidade
 - Paralelismo

TIPOS DE DELINEAMENTOS

- Simétrico ou Balanceado
- Interpolação em Curva Padrão

SIMÉTRICO OU BALANCEADO

- Ensaio 2x2



SIMÉTRICO OU BALANCEADO

Ensaio 2x2			
A1	A2	P1	P2
15,7	20,1	15,3	19,8
16,5	20,9	15,9	20,7
16,4	20,9	16,6	20,4
16,7	20,8	16,3	21,0
16,8	20,6	16,4	20,2
16,5	19,9	15,8	20,3
16,4	20,5	16,1	20,4

$$\text{Potência} = 100 \times \text{Antilog} \left(\frac{(\overline{A2} + \overline{A1} - \overline{P2} - \overline{P1})}{(\overline{A2} - \overline{A1} + \overline{P2} - \overline{P1})} \times \log(R) \right)$$



$$\text{Potência} = 100 \times \text{Antilog} \left(\frac{(20,5 + 16,4 - 20,4 - 16,1)}{(20,5 - 16,4 + 20,4 - 16,1)} \times \log(4) \right)$$



$$\text{Potência} = \text{Antilog} \left(\frac{0,4}{8,4} \times 0,6021 \right) = 106,8\%$$

SIMÉTRICO OU BALANCEADO

- Ensaio 2x2 (Validade do Ensaio)

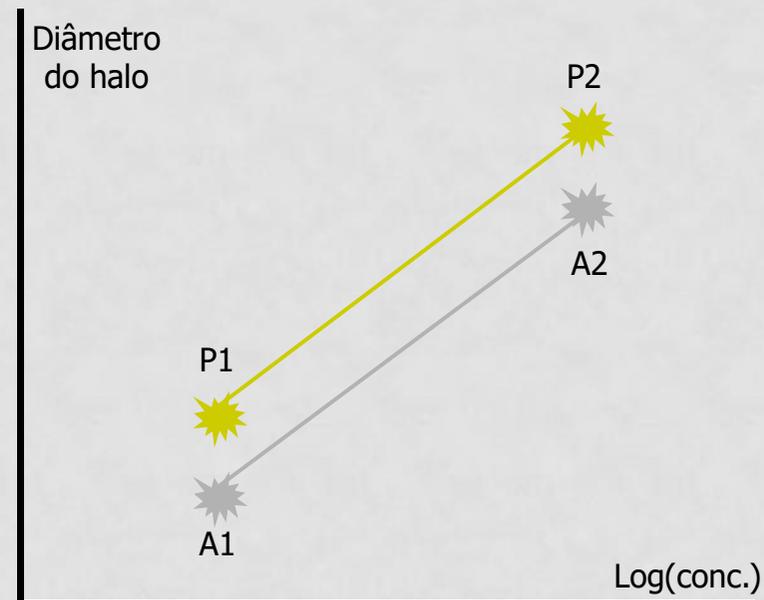


• Regressão

• Linearidade



• Paralelismo



SIMÉTRICO OU BALANCEADO

Ensaio 2x2		
Fonte	GL	F
Preparações	1	
Regressão	1	$F_{\text{Regressão}}$
Paralelismo	1	$F_{\text{Paralelismo}}$
Tratamentos	3	
Placas	5	
Erro	15	
Total	23	

Análise de Variância (ANOVA)

$F_{\text{Regressão}}$

$< 0,05$

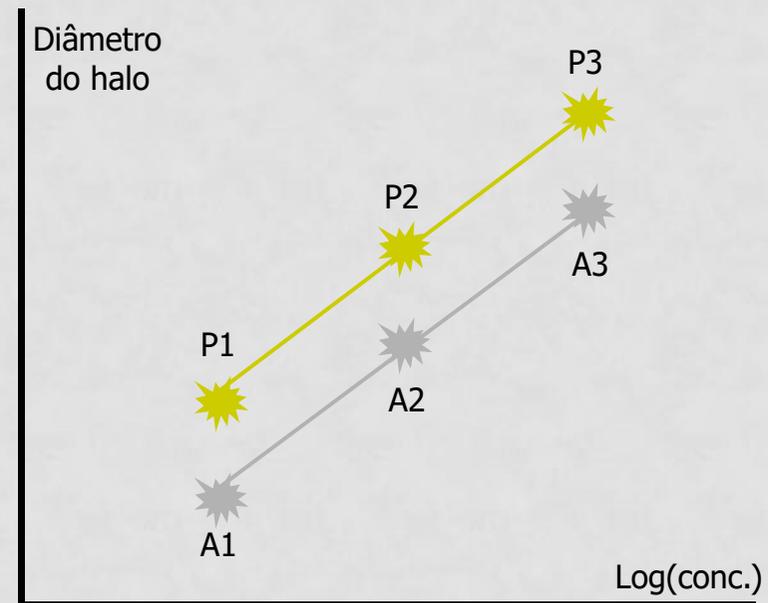
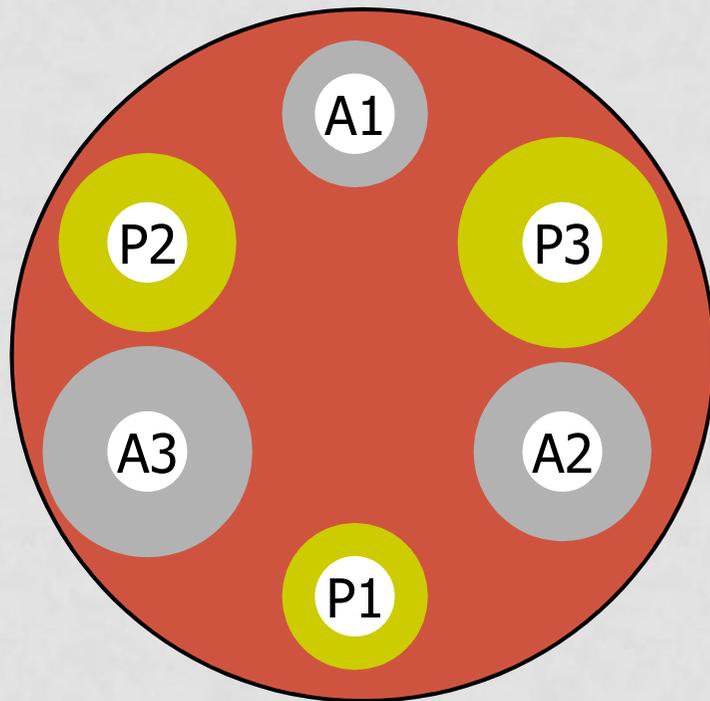
$F_{\text{Paralelismo}}$

$> 0,05$

Intervalo de confiança

SIMÉTRICO OU BALANCEADO

- Ensaio 3x3



SIMÉTRICO OU BALANCEADO

Ensaio 3x3					
A1	P3	A2	P1	A3	P2
17,4	24,0	20,7	17,0	24,4	20,4
14,9	22,7	19,3	14,9	22,2	19,7
15,0	22,0	18,0	15,0	22,3	18,6
14,8	22,4	19,0	14,6	22,2	18,3
14,4	22,3	17,8	14,7	22,6	18,0
14,5	23,3	19,3	14,4	23,0	19,1
15,0	22,5	19,4	14,9	22,4	19,0
15,1	22,7	19,1	15,1	22,7	19,0

$$\text{Potência} = 100 \times \text{Antilog} \left(\frac{4x(\overline{A3} + \overline{A2} + \overline{A1} - \overline{P3} - \overline{P2} - \overline{P1})}{3x(\overline{A3} - \overline{A1} + \overline{P3} - \overline{P1})} \times \log(R) \right)$$



$$\text{Potência} = 100 \times \text{Antilog} \left(\frac{4x(22,7 + 19,1 + 15,1 - 22,7 - 19,0 - 15,1)}{3x(22,7 - 15,1 + 22,7 + 15,1)} \times \log(2) \right)$$



$$\text{Potência} = \text{Antilog} \left(\frac{4 \times 0,1}{3 \times 15,2} \times 0,301 \right) = 100,6\%$$

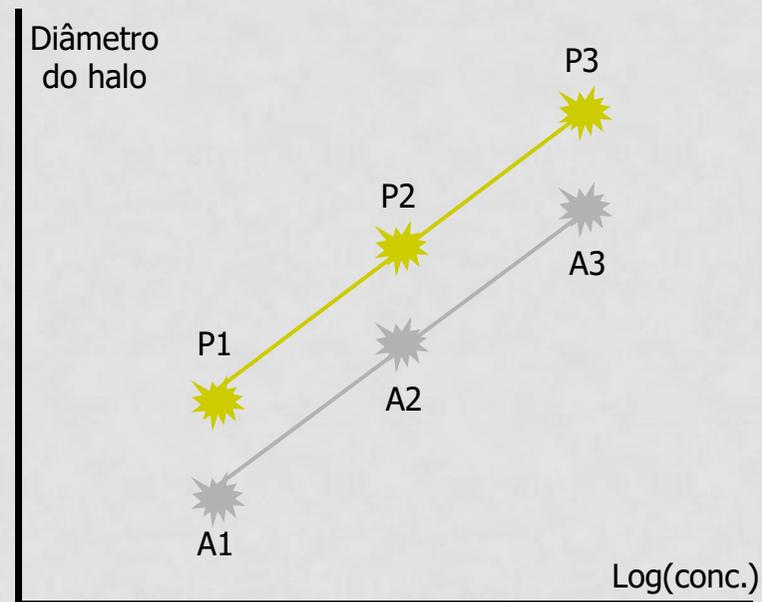
SIMÉTRICO OU BALANCEADO

- Ensaio 3x3 (Validade do Ensaio)

• Regressão

• Linearidade

• Paralelismo



SIMÉTRICO OU BALANCEADO

Ensaio 3x3		
Fonte	GL	F
Preparações	1	
Regressão	1	$F_{\text{Regressão}}$
Paralelismo	1	$F_{\text{Paralelismo}}$
Linearidade	2	$F_{\text{Linearidade}}$
Tratamentos	5	
Placas	6	
Erro	30	
Total	41	

Análise de Variância (ANOVA)

$F_{\text{Regressão}} < 0,05$

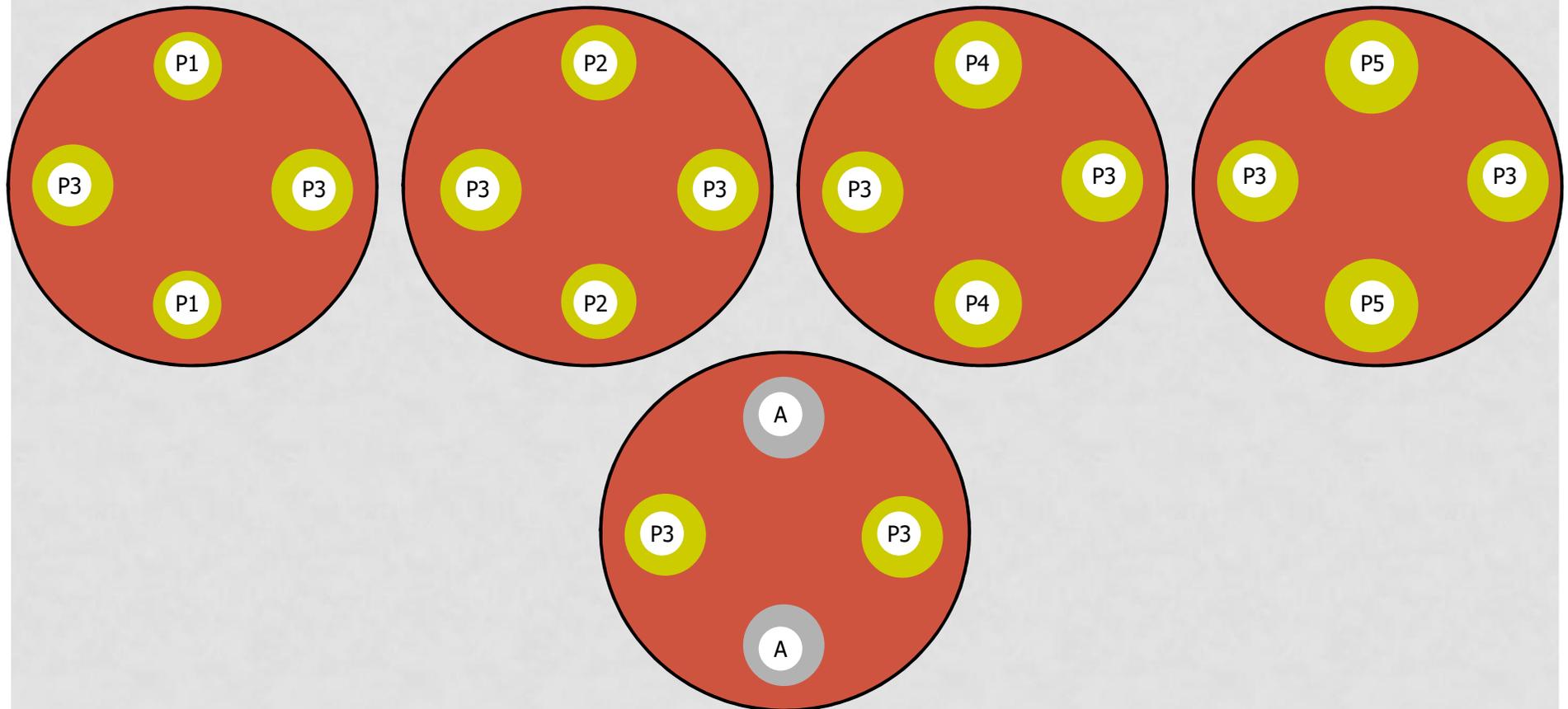
$F_{\text{Paralelismo}} > 0,05$

$F_{\text{Linearidade}} > 0,05$

Intervalo de confiança

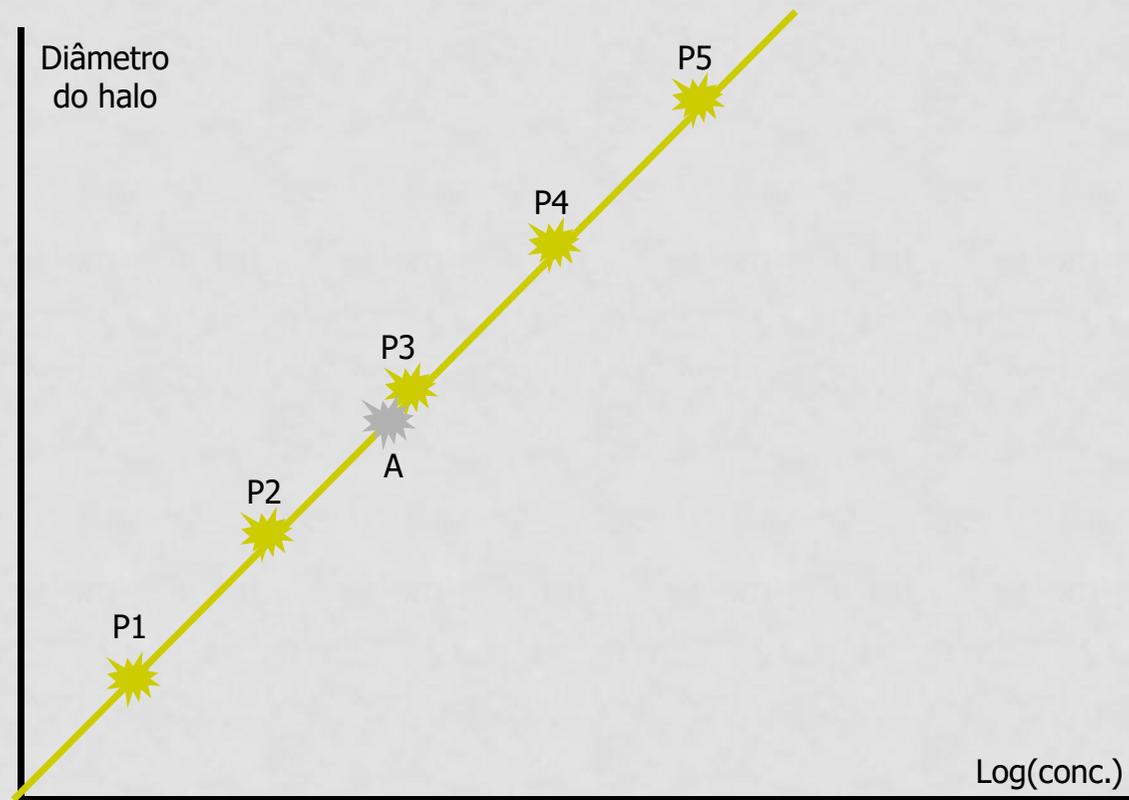
INTERPOLAÇÃO EM CURVA PADRÃO

- Ensaio 5x1



INTERPOLAÇÃO EM CURVA PADRÃO

- Ensaio 5x1



INTERPOLAÇÃO EM CURVA PADRÃO

Ensaio 5x1									
P1	P3/P1	P2	P3/P2	P4	P3/P4	P5	P3/P5	A	P3/A
14,6	16,1	14,7	15,8	16,6	15,6	17,3	15,6	15,3	15,7
14,1	15,6	15,1	15,6	16,8	15,8	17,0	15,6	15,8	15,8
13,8	15,8	14,8	15,5	16,3	16,0	17,0	15,5	15,7	15,7
14,5	16,0	14,7	15,5	16,6	15,8	17,3	15,6	15,8	15,9
14,1	15,9	14,9	15,6	16,5	15,6	17,4	15,7	15,8	15,7
14,4	16,2	15,2	15,7	16,2	15,7	17,2	15,5	15,5	15,7
14,0	15,7	14,8	15,4	16,9	16,1	17,3	15,9	15,2	15,5
14,2	15,7	15,0	15,3	16,5	15,7	17,3	15,8	15,1	15,8
14,2	15,9	14,9	15,6	16,6	15,8	17,2	15,7	15,5	15,7

INTERPOLAÇÃO EM CURVA PADRÃO

$$P1_C = \overline{P1} + \overline{P3}_P - \overline{P3}_{P1}$$

$$P2_C = \overline{P2} + \overline{P3}_P - \overline{P3}_{P2}$$

$$P4_C = \overline{P4} + \overline{P3}_P - \overline{P3}_{P4}$$

$$P5_C = \overline{P5} + \overline{P3}_P - \overline{P3}_{P5}$$



$$P1_C = 14,2 + 15,7 - 15,9 = 14,1$$

$$P2_C = 14,9 + 15,7 - 15,6 = 15,0$$

$$P4_C = 16,6 + 15,7 - 15,8 = 16,5$$

$$P5_C = 17,2 + 15,7 - 15,7 = 17,2$$

$$\text{Potência} = 100 \times \text{Antilog} \left(\frac{10 \times (\overline{A} - \overline{P3}_A)}{(2 \times \overline{P5}_C + \overline{P4}_C - \overline{P2}_C - 2 \times \overline{P1}_C)} \times \log(R) \right)$$



$$\text{Potência} = 100 \times \text{Antilog} \left(\frac{10 \times (15,5 - 15,7)}{(2 \times 17,2 + 16,5 - 15,0 - 2 \times 14,1)} \times \log(1,25) \right)$$



$$\text{Potência} = 100 \times \text{Antilog} \left(\frac{10 \times (-0,2)}{7,7} \times \log(1,25) \right) = 94,4\%$$

INTERPOLAÇÃO EM CURVA PADRÃO

- Ensaio 5x1 (Validade do Ensaio)

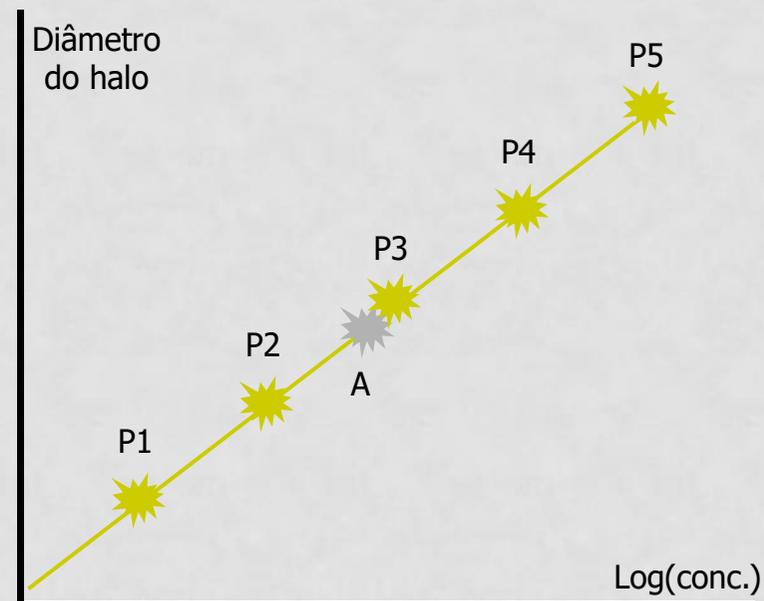


- Regressão



- Linearidade

- Paralelismo



INTERPOLAÇÃO EM CURVA PADRÃO

Ensaio 5x1		
Fonte	GL	F
Preparações	1	
Regressão	1	$F_{\text{Regressão}}$
Linearidade	3	$F_{\text{Linearidade}}$
Tratamentos	5	
Placas	3	
Erro	32	
Total	40	

Análise de Variância
(ANOVA)

$F_{\text{Regressão}}$

$< 0,05$

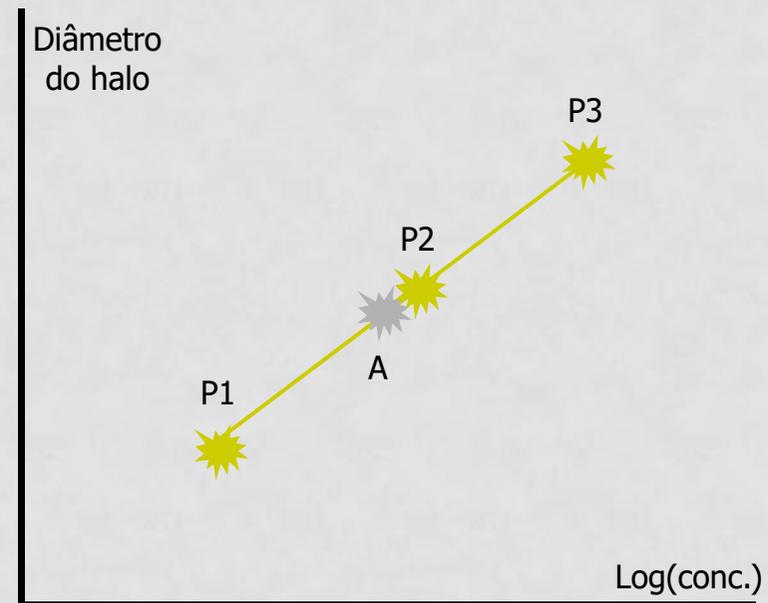
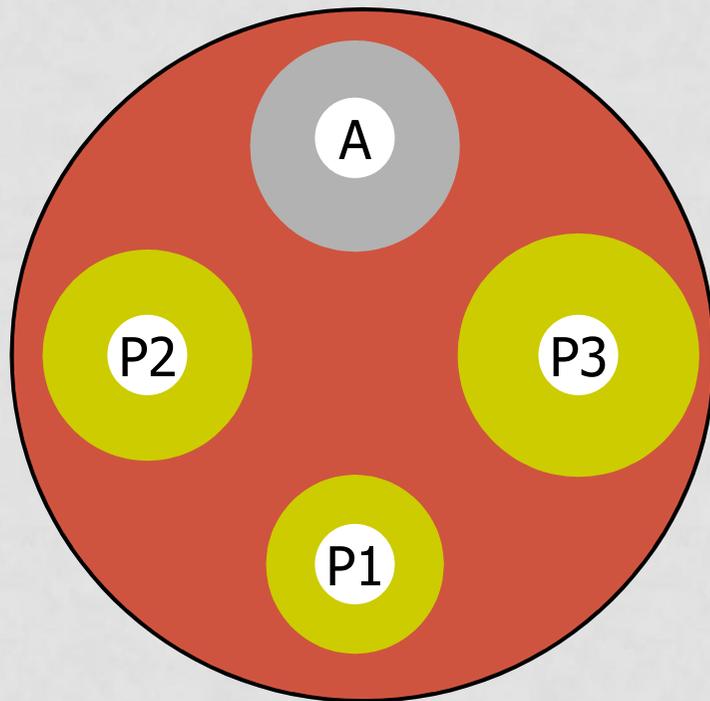
$F_{\text{Linearidade}}$

$> 0,05$

Intervalo de confiança

INTERPOLAÇÃO EM CURVA PADRÃO

- Ensaio 3x1



INTERPOLAÇÃO EM CURVA PADRÃO

Ensaio 3x1			
A	P3	P1	P2
16,6	19,6	14,9	16,8
16,7	19,8	15,0	16,9
17,1	20,0	15,4	17,3
16,9	19,9	15,3	17,2
17,2	20,1	15,5	17,4
16,7	19,9	15,0	16,9
16,9	19,9	15,1	17,1
16,9	19,9	15,2	17,1

$$\text{Potência} = 100 \times \text{Antilog} \left(\frac{2 \times (\bar{A} - \bar{P}_2)}{(\bar{P}_3 - \bar{P}_1)} \times \log(R) \right)$$



$$\text{Potência} = 100 \times \text{Antilog} \left(\frac{2 \times (16,9 - 17,1)}{(19,9 - 15,2)} \times \log(2) \right)$$



$$\text{Potência} = \text{Antilog} \left(\frac{2 \times (-0,2)}{4,7} \times 0,301 \right) = 93,9\%$$

Lourenço, Kaneko & Pinto (2007)

INTERPOLAÇÃO EM CURVA PADRÃO

- Ensaio 3x1 (Validade do Ensaio)

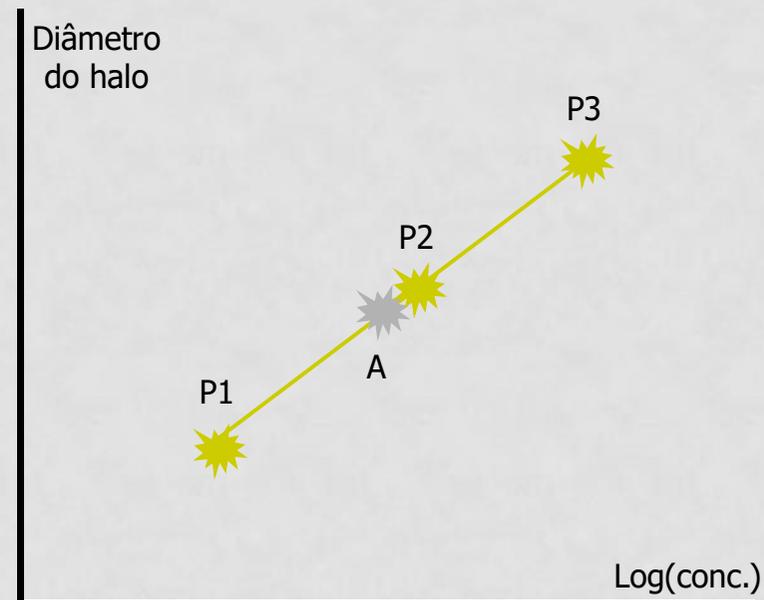


- Regressão



- Linearidade

- Paralelismo



INTERPOLAÇÃO EM CURVA PADRÃO

Ensaio 3x1		
Fonte	GL	F
Preparações	1	
Regressão	1	$F_{\text{Regressão}}$
Linearidade	1	$F_{\text{Paralelismo}}$
Tratamentos	3	
Placas	6	
Erro	18	
Total	27	

Análise de Variância (ANOVA)

$F_{\text{Regressão}} < 0,05$

$F_{\text{Paralelismo}} > 0,05$

Intervalo de confiança

DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

COMPARAÇÃO	2x2	3x3	5x1	3x1
Doses de padrão	2	3	5	3
Doses de amostra	2	3	1	1
Razão entre doses	2:1 ou 4:1	2:1	1,25:1	2:1
Preparações por placas	Todas	Todas	Padrão ou amostras + referências	Todas
Validade: Regressão	SIM	SIM	SIM	SIM
Validade: Linearidade	NÃO	SIM	SIM	SIM
Validade: Paralelismo	SIM	SIM	NÃO	NÃO

Simétrico ou Balanceado

Interpolação em Curva Padrão

CÁLCULO DA POTÊNCIA

- Cálculo da Potência

$$\text{Potência} = 100 \times \text{Antilog} \left[\frac{\text{Diferenças entre Amostra e Padrão}}{\text{Diferenças entre Doses}} \times \text{Log (Razão entre Doses)} \right]$$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA-ANTUNES, LOURENÇO & PINTO (2011) *Braz. J. Pharm. Sci.*
- BOTELHO, LOURENÇO & PINTO (2013) *Cur. Pharm. Anal.*
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010)
- FOGLESONG, KAVANAGH & DIETZ (1978) *J. Pharm. Sci.*
- FRANCISCO, SAVIANO & LOURENÇO (2014) *Lat. Am. J. Pharm.*
- HEWITT (1977) *Microbiological assay*
- KAVANAGH (1973) *Analytical Microbiology*
- KNUDSEN & RANDALL (1945) *J. Bacteriol.*
- LOURENÇO (2013) *Lat. Am. J. Pharm.*
- LOURENÇO, BARBOSA & PINTO (2011) *Lat. Am. J. Pharm.*
- LOURENÇO, KANEKO & PINTO (2007) *J. AOAC Int.*
- LOURENÇO, KANEKO & PINTO (2007) *J. AOAC Int.*
- LOURENÇO & PINTO (2009) *Braz. J. Pharm. Sci.*
- LOURENÇO & PINTO (2012) *Lat. Am. J. Pharm.*
- LOURENÇO, TRAPLE, OKAMOTO & PINTO (2013) *Cur. Pharm. Anal.*
- PINTO, KANEKO & OHARA (2010) *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*
- PINTO, FRANCISCO & LOURENÇO (2013) *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*
- SAVIANO, FRANCISCO & LOURENÇO (2014) *Talanta*
- TARCZA & RANDALL (1978) *J. Pharm. Sci.*
- UNITED STATES PHARMACOPEIA (2012)

OBRIGADO!!!

FELIPE R. LOURENÇO
FELIPERL@USP.BR

