

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA VEIGA

PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO PARA
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE
COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA VEIGA

PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO PARA
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE
COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Seigi Murakami

Co-orientador: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves

CURITIBA

2016

Veiga, Andressa

Padronização e validação do método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima de compostos antimicrobianos / Andressa Veiga – Curitiba, 2016.

96 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Fabio Seigi Murakami

Coorientador: Professor Dr. Alan Guilherme Gonçalves

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Validação. 2. Microdiluição. 3. Cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio (TTC). 4. Quantificação de micro-organismos. I. Murakami, Fabio Seigi. II. Gonçalves, Alan Guilherme. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.19

TERMO DE APROVAÇÃO

ANDRESSA VEIGA

Título: **"PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Fábio Seigi Murakami
Orientador


Prof. Dr. Itamar Francisco Andrezza
Universidade Federal do Paraná


Prof^a. Dra. Thais Martins Guimarães de Francisco
Centro Universitário Autônomo do Brasil - UniBrasil

Curitiba, 29 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho à minha família, por todo carinho, incentivo, compreensão e amor. Meus eternos agradecimentos a vocês: noivo Rafael, mãe Dirce, pai Nicanor, irmã Vanessa e irmão Andrio. Sem o apoio de cada um, eu não teria chegado até aqui. E também aos queridos orientadores Fabio Murakami e Alan Gonçalves, pois sem vocês este trabalho não teria sido desenvolvido.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e oportunidades e por me cercar de pessoas maravilhosas. Ao meu querido noivo Rafael por toda sua dedicação, compreensão e companheirismo nos momentos mais difíceis, por me apoiar, ajudar, e estar presente durante toda a trajetória de realização deste trabalho, e pela alegria constante que me impulsionou durante esta jornada.

Agradeço aos meus pais que são os principais responsáveis por minha formação, e em especial à minha querida mãe Dirce que esteve sempre ao meu lado. Agradeço também aos meus queridos irmãos, Vanessa e Andrio que foram meus primeiros amigos e sempre essenciais na formação do meu caráter, e a todos os familiares por todo o apoio e compreensão ao longo destes dois anos.

Às queridas amigas (Thalita, Aline Tavares, Aline Bonetti, Joelle, Alini, Marta, Evelyn, Patrícia, Mariana Ogg, Juliana e Camila), pela amizade sincera e por compreenderem minha ausência especialmente nos últimos meses. Aquelas que passaram a ser muito mais do que colegas durante essa jornada, e que tornaram os dias mais leves e alegres (Bruna, Paola, Laura, Mariana Fachi, Thais, e Marina). Um agradecimento especial a Mariana Fachi por toda a ajuda e disposição durante o desenvolvimento do trabalho. A Maria da Graça (Gracinha), pela amizade e por toda a ajuda na utilização dos equipamentos da Central Analítica.

Aos orientadores Fabio Seigi Murakami e Alan Guilherme Gonçalves, por todo apoio, dedicação e confiança. Um agradecimento especial ao professor Fabio que foi o mentor deste lindo trabalho e esteve sempre acompanhando todo o desenvolvimento e ajudando nos momentos de dúvida. Agradeço também a Luciane e Mariana Mengarda pela amizade e por toda a ajuda com os experimentos, pois sem vocês teria sido muito mais difícil.

Aos membros da banca examinadora, professora Thais Guimarães e professor Itamar Andreazza pela disponibilidade e atenção.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná por abrir as portas e disponibilizar toda a infraestrutura essencial para o desenvolvimento deste trabalho, e ao CNPQ, pela bolsa de estudos.

RESUMO

A crescente preocupação com o aparecimento de bactérias multirresistentes e a necessidade de se buscar novos compostos com atividade antimicrobiana, exigem, com fundamental importância, o desenvolvimento e o aprimoramento de técnicas capazes de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antimicrobianos. A determinação da CIM pode ser realizada por técnicas de diluição em caldo (macrodiluição e microdiluição), e atualmente, a técnica de microdiluição vem sendo amplamente utilizada por economizar meios de cultura, reagentes e, também, por utilizar pequenas quantidades dos compostos a serem testados. Outra vantagem do uso da microdiluição é a facilidade em adquirir, simultaneamente, grande quantidade de dados. No entanto, não existe uma padronização da técnica de microdiluição, principalmente com relação à utilização de indicadores de crescimento microbiano, ao tipo de leitura utilizado e às condições de incubação empregadas. Essa falta de harmonização da metodologia pode acarretar em diferenças na determinação da CIM dos compostos. Também não está descrito na literatura um método colorimétrico capaz de transformar valores de absorbância obtidos por leitura espectrofotométrica em concentração de micro-organismos viáveis (UFC/mL). Diante desse quadro, o objetivo do presente trabalho foi a padronização e validação de um método de microdiluição colorimétrico e quantitativo capaz de determinar a CIM de compostos antimicrobianos. Para tanto, após pesquisas na literatura, o cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) foi selecionado como indicador de crescimento ideal. Para definir a concentração a ser utilizada, foram realizados testes para verificar a toxicidade e a sensibilidade do TTC frente aos micro-organismos testados: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Após ensaios preliminares em tubos, as condições estabelecidas para o método foram: a utilização de solução de TTC 0,125% (p/v), adicionada após 22 horas de incubação à 35°C, seguida de mais 2 horas de incubação e subsequente leitura em espectrofotômetro. O método foi validado e demonstrou linearidade ($R^2 > 0,95$), precisão (DPR < 26 %), exatidão (75 % a 122 %) e robustez. Os parâmetros validados garantem a harmonização da metodologia para determinar não somente a CIM como também as concentrações inibitórias de 50 % (CI_{50%}) e 90 % (CI_{90%}) dos micro-organismos. Além disso, em razão da fácil inserção na rotina laboratorial e devido à economia de espaço, de tempo, e de meios de cultura, sugere-se a aplicação do método padronizado e validado para a investigação de compostos com potencial atividade antimicrobiana provenientes das mais diversas fontes.

Palavras-chave: Validação; Microdiluição; Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC); Quantificação de micro-organismos.

ABSTRACT

The growing concern with the emergence of multi-resistant bacteria and the investigation of new compounds with antimicrobial activity, the development of new methodologies to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of antibiotics is fundamental importance. The MIC assay can be performed using broth dilution techniques (macrodilution and microdilution), and currently, the microdilution has been widely used for saving culture media, reagents and using small amounts of compounds for testing. Another advantage is the easier way to acquire large amount of data simultaneously. In fact, there is no standardization of microdilution method, mainly regarding about growing indicators, the reading and the incubation conditions. This absence of methodology harmonization can lead in differences on MIC of the compounds. Furthermore, in the literature it is not described a colorimetric method able to transform absorbance values obtained by spectrophotometric reading to concentration of viable organisms (CFU / mL). In this context, the major purpose of this work was to develop and validate a microdilution colorimetric method able to determine the MIC of antimicrobial compounds. Therefore, after searching on the literature, 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) was selected as optimal growing indicator. In order to set the concentration, several tests were carried out, to verify the toxicity and the sensibility of the TTC against the following microorganisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) and *Candida albicans* (ATCC 10231). After preliminary tests on tubes, the conditions defined for the method were: using a TTC solution of 0,125% (w / v), added after 22 hours of incubation at 35 °C followed by further 2 hours of incubation and subsequent reading in spectrophotometer. The method was validated and showed linearity ($R^2 > 0.95$), precision (RSD <26 %), accuracy (75 % to 122 %) and robustness. The validated parameters have ensure the harmonization of the methodology to determine not only the MIC, but also the inhibitory concentration of 50 % (IC_{50%}) and of 90 % (IC_{90%}) of microorganisms. Moreover, due the easier insertion in the laboratory routine and because of the economy of space, time, and culture media, we suggest the implementation of standardized and validated method for the investigation of compounds with potential antimicrobial activity from the most diverse sources.

Keywords: Validation; Microdilution; 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC); Quantification of microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- BIOTRANSFORMAÇÃO DO TTC NA PRESENÇA DO METABOLISMO MICROBIANO	28
FIGURA 2- ESQUEMA DE EXPERIMENTO DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA.....	41
FIGURA 3- TESTE DE TOXICIDADE DO TTC 0,5 % ANTES E APÓS INCUBAÇÃO	47
FIGURA 4- TOXICIDADE DO TTC 0,5% FRENTE À <i>C. albicans</i> ANTES E APÓS INCUBAÇÃO	48
FIGURA 5- TOXICIDADE DO TTC 0,5% FRENTE À <i>S. aureus</i> ANTES E APÓS INCUBAÇÃO	48
FIGURA 6- VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO TTC.....	50
FIGURA 7- VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO TTC FRENTE À <i>C. albicans</i>	50
FIGURA 8- VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO TTC (TESTE 2)	51
FIGURA 9- VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO TTC FRENTE À <i>C. albicans</i> (TESTE 2)	51
FIGURA 10- CURVAS DE CRESCIMENTO EM TUBOS COM TTC 0,125%: A) <i>S. aureus</i> ; B) <i>E.coli</i> ; C) <i>P.aeruginosa</i> ; D) <i>C. albicans</i> (25°C); E) <i>C. albicans</i> (35°C); F) DETALHE DEPOSIÇÃO DO FORMAZANO AO FUNDO DOS TUBOS DE <i>C. albicans</i> (35°C).....	54
FIGURA 11- ESPECTROS DE ABSORÇÃO OBTIDOS POR VARREDURA EM ESPECROFOTÔMETRO NA FAIXA DO VISÍVEL (400-800nm) DE TUBOS CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MICRO-ORGANISMOS NA PRESENÇA DE TTC 0,125%: A) <i>S. aureus</i> ; B) <i>E. coli</i> ; C) <i>P. aeruginosa</i> ; D) <i>C. albicans</i>	56
FIGURA 12- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>S. aureus</i> COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%	57
FIGURA 13- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>E. coli</i> COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%	57
FIGURA 14- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>P. aeruginosa</i> COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%	58
FIGURA 15- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>C.albicans</i> COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%	58
FIGURA 16- CURVAS DE CRESCIMENTO EM PLACA COM TTC 0,125%: A) <i>S. aureus</i> ; B) <i>E. coli</i> ; C) <i>P. aeruginosa</i> ; D) <i>C. albicans</i>	60

FIGURA 17- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>S. aureus</i> COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%	64
FIGURA 18- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>E. coli</i> COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%	64
FIGURA 19- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>P. aeruginosa</i> COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%	65
FIGURA 20- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>C. albicans</i> COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%	65
FIGURA 21- VERIFICAÇÃO DA CIM DO CLORANFENICOL PARA <i>S. aureus</i>	81
FIGURA 22- VERIFICAÇÃO DA CIM DO CLORANFENICOL PARA <i>E.coli</i>	82
FIGURA 23- VERIFICAÇÃO DA CIM DO CLORANFENICOL PARA <i>P. aeruginosa</i> ...	82
FIGURA 24- VERIFICAÇÃO DA CIM DO CETOCONAZOL PARA <i>C. albicans</i>	83
FIGURA 25- CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE CLORANFENICOL E O LOG(UFC/mL) DE <i>S. aureus</i>	84
FIGURA 26- CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE CLORANFENICOL E O LOG(UFC/mL) DE <i>E. coli</i>	85
FIGURA 27- CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE CLORANFENICOL E O LOG(UFC/mL) DE <i>P. aeruginosa</i>	85
FIGURA 28- CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE CETOCONAZOL E O LOG(UFC/mL) DE <i>C. albicans</i>	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- FALTA DE PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MICRODILUIÇÃO	31
TABELA 2- MEIOS DE CULTURA E REAGENTES UTILIZADOS NOS ENSAIOS.....	35
TABELA 3- CONTAGENS MÍNIMAS E MÁXIMAS DOS INÓCULOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS	46
TABELA 4- MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE MICRO-ORGANISMOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS, OBTIDAS POR CONTAGENS EM PLACAS	62
TABELA 5- LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MICRO- ORGANISMOS <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , e <i>C. albicans</i>	66
TABELA 6- VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO PARA <i>S.aureus</i>	69
TABELA 7- VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO PARA <i>E.coli</i>	69
TABELA 8- VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO PARA <i>P. aeruginosa</i>	70
TABELA 9- VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO PARA <i>C. albicans</i>	70
TABELA 10- PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA <i>S. aureus</i>	71
TABELA 11- PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA <i>E.coli</i>	72
TABELA 12- PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA <i>P. aeruginosa</i>	73
TABELA 13- PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA <i>C. albicans</i>	74
TABELA 14- VALORES DE % DE RECUPERAÇÃO PARA <i>S. aureus</i>	75
TABELA 15- VALORES DE % DE RECUPERAÇÃO PARA <i>E. coli</i>	75
TABELA 16- VALORES DE % DE RECUPERAÇÃO PARA <i>P. aeruginosa</i>	75
TABELA 17- VALORES DE % DE RECUPERAÇÃO PARA <i>C. albicans</i>	75
TABELA 18- INTERVALO AO QUAL O MÉTODO É APLICÁVEL	76
TABELA 19- RESULTADOS DE VARIAÇÕES PROPOSITAIS PRÉ-DETERMINADAS NOS ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO PARA <i>S. aureus</i>	77
TABELA 20- RESULTADOS DE VARIAÇÕES PROPOSITAIS PRÉ-DETERMINADAS NOS ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO PARA <i>E.coli</i>	78
TABELA 21- RESULTADOS DE VARIAÇÕES PROPOSITAIS PRÉ-DETERMINADAS NOS ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO PARA <i>P.aeruginosa</i>	79
TABELA 22- RESULTADOS DE VARIAÇÕES PROPOSITAIS PRÉ-DETERMINADAS NOS ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO PARA <i>C. albicans</i>	79
TABELA 23- VALORES DE CIM DETERMINADOS POR LEITURAS VISUAIS E POR ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS OBTIDOS POR LEITURAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS.....	81
TABELA 24- DETERMINAÇÃO DA $CI_{50\%}$ E DA $CI_{90\%}$	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: American Type Culture Collection

BT: Azul de tetrazólio

C. albicans: *Candida albicans*

CIM: Concentração Mínima Inibitória

CI_{50%}: Concentração inibitória de 50% dos micro-organismos

CI_{90%}: Concentração inibitória de 90% dos micro-organismos

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CN: Controle negativo

CP: Controle positivo

DPR: Desvio Padrão Relativo

E. coli: *Escherichia coli*

ICH: International Conference on Harmonisation

INT: cloreto de 2-(*p*-iodofenil)-3(*p*-nitrofenil)-5-feniltetrazólio

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

MRSA: *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente

NT: cloreto de neotetrazólio

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

R²: Quadrado do coeficiente de correlação

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

Spp.: Espécies

T °C: Temperatura em graus celsius

TSA: Tryptic soy agar ou ágar triptona de soja

TSB: Tryptic soy broth ou caldo triptona de soja

TTC: Cloreto de 2,3,5 Trifeniltetrazólio

USP: United States Pharmacopea

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1	ANTIMICROBIANOS.....	17
3.1.1	Histórico	17
3.1.2	Mecanismos de ação	18
3.2	RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS	19
3.2.1	Epidemiologia: panorama no Brasil e no mundo.....	20
3.3	DESINFETANTES	21
3.4	CONSERVANTES	23
3.5	MÉTODOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS AOS ANTIMICROBIANOS	24
3.6	LEITURA EM ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO	26
3.6.1	Indicadores de crescimento microbiológico	26
3.6.1.1	Aplicações do TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio)	28
3.6.2	Métodos de leitura.....	29
3.7	APLICAÇÕES DO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO	30
3.8	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	MEIOS DE CULTURA E REAGENTES UTILIZADOS	35
4.2	MICRO-ORGANISMOS.....	35
4.2.1	Ativação, conservação e preparo do Inóculo	35
4.3	ANTIMICROBIANOS.....	36
4.3.1	Preparo e armazenamento das soluções de antimicrobianos	36
4.4	PREPARO DA SOLUÇÃO INDICADORA DE CRESCIMENTO (TTC)	37
4.5	ENSAIOS DE TOXICIDADE DO TTC	37
4.5.1	Toxicidade do TTC 0,5 % antes e após incubação	37
4.5.2	Toxicidade de diferentes concentrações do TTC após incubação.....	37

4.6 ESTUDO PRELIMINAR EM TUBOS (MACRODILUIÇÃO)	38
4.6.1 Curvas de crescimento em tubos	38
4.7 LEITURAS EM ESPECTROFOTÔMETRO	39
4.8 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO	39
4.8.1 Validação do método de microdiluição padronizado	41
4.9 DETERMINAÇÃO DA CIM DOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS	44
4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50 % (CI _{50%}) E DE 90 % (CI _{90%}) DOS MICRO-ORGANISMOS	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	46
5.2 TESTES DE TOXICIDADE DO TTC	47
5.3 ESTUDO PRELIMINAR EM TUBOS (MACRODILUIÇÃO)	52
5.3.1 Determinação do comprimento de onda a ser utilizado	54
5.3.2 Curvas de crescimento em tubos	57
5.4 ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO	59
5.4.1 Validação do Método	62
5.4.2 Determinação da CIM dos compostos Antimicrobianos.....	80
5.4.3 Determinação da Concentração Inibitória de 50% (CI _{50%}) e de 90% (CI _{90%}) dos micro-organismos	84
6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos, por mais de 60 anos, foram considerados como a cura de todos os males relacionados às infecções. No entanto, em 1945, ao receber o Prêmio Nobel, Alexander Fleming advertiu sobre o aparecimento de resistência dos micro-organismos a essas substâncias notáveis. Assim, o desenvolvimento de cada novo antibiótico foi seguido pelo aparecimento de micro-organismos resistentes (WHO, 2014).

A resistência microbiana, embora envolva uma ação natural na evolução dos micro-organismos, pode ser acelerada em decorrência da utilização generalizada e abusiva de antimicrobianos. É o que se percebe, por exemplo, com o consumo exagerado de tais medicamentos no tratamento de doenças, na ingestão de alimentos de origem animal tratados com antibióticos e, igualmente, na utilização de desinfetantes, antissépticos e demais produtos de higiene com ação antibacteriana. Soma-se a isso, ainda, o aumento nos movimentos migratórios de pessoas, os quais, associados à carência de prevenção ou de medidas de controle de infecções, facilitam a disseminação de clones de bactérias multirresistentes (AIELLO, LARSON, 2003; HAWKEY, JONES, 2009; CARLET, 2012; CHANTZIARAS et al., 2013; SALLES et al., 2013; HU, et al., 2014).

Em decorrência do seu constante aumento, a resistência microbiana tornou-se um problema global e uma grande ameaça à saúde pública. Portanto, devido à dificuldade de obtenção de novos compostos com atividade antimicrobiana, faz-se necessário o desenvolvimento e a otimização de métodos que auxiliem na identificação dessas substâncias a partir de fontes naturais (VALGAS et al., 2007; HAWKEY, JONES, 2009; SALLES et al., 2013; WHO, 2014).

Diversos métodos podem ser utilizados para avaliar a atividade de antimicrobianos frente aos micro-organismos *in vitro*. Dentre eles encontram-se os métodos de diluição, que abrangem a macrodiluição e a microdiluição, nas quais as substâncias a serem testadas são adicionadas a um meio de cultura líquido, onde é inoculado o micro-organismo teste. A determinação do crescimento, após período de incubação adequado, pode ser realizada de

forma direta por meio de leitura visual, ou utilizando espectrofotometria (CLSI, 2012; RIOS, RECIO, VILLAR, 1988).

As técnicas de macrodiluição e microdiluição são consideradas quantitativas por serem capazes de determinar a concentração inibitória mínima (CIM), ou “Minimum Inhibitory Concentration” (MIC), que é a menor concentração de agente antimicrobiano capaz de inibir visivelmente o crescimento dos micro-organismos (KUPER et al., 2009).

Existem diversas vantagens na utilização da microdiluição, dentre as quais se podem citar: a sensibilidade, a reprodutibilidade, a conveniência de ter placas comerciais preparadas com antibióticos, a economia de espaço e reagentes, e a possibilidade de utilizar sistemas de leitura automatizados para facilitar a geração de relatórios (ELOFF, 1998; JORGENSEN, FERRARO, 2009). Tais vantagens levam a ampla utilização dessa técnica na determinação da CIM de compostos com potencial atividade antimicrobiana (ELOFF, 1998; GABRIELSON et al., 2002; RAHMAN et al., 2004; AYRES et al., 2008; SILVA et al., 2011; DE BONA et al., 2014; MORJAN et al.; 2015).

Devido à existência de diversos fatores que podem afetar a sensibilidade dos métodos de diluição, é necessário que se conheçam as condições experimentais e que se faça padronização rigorosa na execução dos testes (OSTROSKY et al., 2008), pois a CIM pode sofrer variações de acordo com a concentração de inóculo utilizada, o meio de cultura, e as condições de incubação, além da leitura dos resultados (RIOS, RECIO, VILLAR, 1988; ELOFF, 1998; ALVES et al., 2008; BIDLAS, DU, LAMBERT, 2008; KUPER et al., 2009).

Dentre esses fatores o mais difícil de padronizar é a leitura dos resultados, pois a leitura visual da turbidez pode levar à subestimação do crescimento bacteriano. No entanto, este problema tem sido parcialmente solucionado com a utilização de indicadores de crescimento como os sais de tetrazólio, os quais são reduzidos na presença do metabolismo microbiano mudando de coloração e facilitando a leitura. Concomitantemente, a realização de leituras em espectrofotômetro também pode auxiliar nas leituras (TENGERDY et al., 1967; JOHNSON et al., 1985; RIOS, RECIO,

VILLAR, 1988; GABRIELSON et al., 2002; ARTHINGTON-SKAGGS et al., 2002).

É importante ressaltar que atualmente não há descrito na literatura um método colorimétrico capaz de converter valores de absorbância em concentração de micro-organismos viáveis (UFC/mL). Tais dados quantitativos podem auxiliar na determinação da potência de antimicrobianos.

Nessa perspectiva, considerando a necessidade de identificação de novos compostos com atividade antimicrobiana e a indispensabilidade de padronização rigorosa das metodologias analíticas para avaliação dos testes de sensibilidade, justifica-se a padronização e validação de um método de microdiluição efetivamente quantitativo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de compostos com potencial atividade antimicrobiana e capaz de fornecer a concentração de micro-organismos viáveis viabilizando a determinação da potência de antimicrobianos frente aos micro-organismos testados (*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231)).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar e validar um método de microdiluição para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de compostos antimicrobianos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar os inóculos de *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (ATCC 10231);
- Avaliar a toxicidade do indicador cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) frente os micro-organismos testados;
- Investigar através de espectrofotometria os comprimentos de onda de absorção dos inóculos com diferentes concentrações de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio;
- Determinar o comprimento de onda ideal, na região do visível, a ser utilizado para o estudo;
- Construir curvas de crescimento dos micro-organismos;
- Estabelecer a correlação entre a absorbância obtida e a quantidade de micro-organismos viáveis existentes;
- Validar o método desenvolvido;
- Determinar a concentração inibitória mínima de cada antimicrobiano utilizado;
- Determinar a $CI_{50\%}$ dos antimicrobianos utilizados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ANTIMICROBIANOS

Agentes antimicrobianos abrangem não somente os utilizados para tratar infecções, mas também os conservantes que são utilizados para a preservação de alimentos, cosméticos e medicamentos, e ainda os desinfetantes destinados à higienização de superfícies inanimadas de indústrias, hospitais e domicílios (BLOCK, 1991; BRASIL, 2010c; ANDRADE, ANGERAMI, PADOVANI, 2000).

Os antibióticos são produzidos por seres vivos (geralmente microorganismos), ao passo que os antibióticos semissintéticos são obtidos parcialmente através de biossíntese (sendo a finalização realizada por métodos de síntese química) e os quimioterápicos são obtidos por síntese total em laboratório (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008; ATLAS, 1997).

3.1.1 Histórico

Paul Ehrlich e Alexander Fleming tiveram papéis fundamentais na descoberta dos antimicrobianos. Ehrlich estava à procura de uma “bala mágica” que fosse capaz de destruir patógenos sem afetar o hospedeiro e, em 1910, encontrou um derivado de arsênico efetivo no combate à sífilis, o qual chamou de salvarsan. No final da década de 30, outros pesquisadores desenvolveram diferentes quimioterápicos, dentre os quais as sulfonamidas, derivadas da sulfa, e muitos derivados de corantes (ZANCA, CASTELLI, ROSSI, 1992; TORTORA, FUNKE, CASE, 2005).

Em 1928, Fleming observou a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* por colônias de um fungo que foi identificado como *Penicillium notatum*, o qual mais tarde deu origem ao nome do componente ativo isolado, a penicilina. No entanto, a penicilina só foi testada clinicamente e produzida em grande escala na década de 40. Durante este período outros antibióticos foram descobertos e, em 1939, René Dubos isolou uma substância produzida pela bactéria *Bacillus brevis* que era letal às bactérias gram positivas. Tal substância consistia em dois antibióticos que posteriormente

foram denominados de gramícidina e tirocíclina (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1997).

Desde as descobertas iniciais dos antimicrobianos, muitos outros foram desenvolvidos. No entanto, há diversos problemas na utilização destas substâncias, como a toxicidade ao hospedeiro, que impede a utilização de inúmeros compostos sintéticos ou naturais, e também o aparecimento e a dispersão da resistência microbiana em larga escala (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1997; TORTORA, FUNKE, CASE, 2005).

3.1.2 Mecanismos de ação

Os antimicrobianos podem atuar de duas maneiras: (a) matando o micro-organismo diretamente, ou seja, ter ação bactericida, ou (b) inibindo o crescimento dos micro-organismos, sendo então chamados de bacteriostáticos. No entanto, a toxicidade destes compostos deve ser seletiva, danificando somente os micro-organismos sem prejudicar as células do hospedeiro. (STROHL, ROUSE, FISCHER, 2004; ATLAS, 1997).

Ao generalizar os mecanismos de ação, estes podem ser divididos em grupos, como: a) os inibidores de biossíntese da parede celular (penicilinas, cefalosporinas, bacitracina, vancomicina, teicoplanina, e fosfomicina), b) os desestabilizadores da membrana celular (polimixinas), c) os inibidores da síntese de proteínas (aminoglicosídeos, cloranfenicol, eritromicina, lincomicina, tetraciclina e estreptomicina), d) os inibidores da replicação de ácidos nucleicos e da transcrição (quinolonas, fluorquinolonas e rifampicinas), e e) os inibidores da atividade enzimática e, portanto, da síntese de metabólitos essenciais, como as sulfanilamidas e trimetoprim (ANVISA, 2007; REYNOLDS, 1989; GAYNOR, MANKIN, 2003; WOLFSON, HOOPER, 1985).

Existem, ainda, alguns compostos, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Esses não possuem atividade antibacteriana mas se associam fortemente as β -lactamases, que são enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico, impedindo que os β -lactâmicos (como as penicilinas) sejam hidrolisados e percam a atividade. Desse modo, são amplamente utilizados associados aos antimicrobianos β -lactâmicos (BUSH, 1988).

3.2 RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS

O desenvolvimento de resistência microbiana ocorre em grande parte devido à capacidade desses organismos de responder rapidamente às pressões seletivas ambientais, tanto genotípicamente quanto fenotípicamente. De tal forma, os tratamentos antimicrobianos que atuam inibindo o crescimento celular (bacteriostáticos) ou que causam a morte celular (bactericida) acabam por impor pressão evolutiva e contribuem para o desenvolvimento de resistência ao desafiarem a sobrevivência das bactérias (ROY, ADAMS, BENTLEY, 2011).

Em resposta à presença de antibióticos, muitas bactérias ativam um estado de “competência”, o qual permite maior capacidade na aquisição de DNA exógeno contendo genes de resistência. A maneira como a competência é mediada parece depender do tipo de antibiótico utilizado (SLAGER et al., 2014; BURGESS, 2014).

Dentre as bactérias multirresistentes causadoras de doenças encontram-se os representantes gram positivos: a) *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), b) *S. aureus* resistentes ou com susceptibilidade intermediária à vancomicina (VRSA ou VISA) e c) *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (VRE). No caso das bactérias gram negativas, as mais conhecidas são: a) *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter Spp.*, resistentes aos carbapenens e b) *Escherichia coli*, *Klebsiella Spp.*, e *Enterobacter Spp.*, as quais podem ser resistentes a cefalosporinas e carbapenens (ARIAS, MURRAY, 2009).

Alguns mecanismos estão diretamente relacionados à virulência e à resistência das bactérias como, por exemplo, a formação de biofilmes (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009; ANDERSON et al., 2003), o metabolismo bacteriano (FABICH et al., 2008; FUCHS et al., 2012), e a aquisição de ilhas genômicas de resistência (JUHAS et al., 2009; BARTPHO et al., 2012).

Há dados publicados que demonstram existir correlação entre o consumo de antimicrobianos, utilizados para o tratamento de infecções e também ingeridos em alimentos contaminados, com o aparecimento de microorganismos resistentes. Este fato reforça ainda mais a ideia de que a

resistência é adquirida por pressão seletiva e que pode ser disseminada rapidamente (CHANTZIARAS, et al., 2013; CARLET, 2012; HU, et al., 2014).

3.2.1 Epidemiologia: panorama no Brasil e no mundo

O Brasil enfrenta grandes desafios no que diz respeito à detecção e ao controle da resistência antimicrobiana. Dados microbiológicos precisos e oportunos serão fundamentais para o sucesso dos esforços realizados em combater este problema. A multirresistência microbiana, combinada com a falta progressiva de novos compostos antimicrobianos, leva a uma situação preocupante. Este cenário exige ações locais, sem perder a visão global do problema, tendo em vista que inexitem limites para esta ameaça. Ações multidisciplinares, implementação de novas políticas de fiscalização e controle, além de engajamento político, são medidas necessárias e importantes para minimizar tal situação (ROSSI, 2011).

Em um estudo realizado com isolados de *Acinetobacter baumannii* de pacientes de 11 estados brasileiros, a maioria apresentou resistência a mais de 5 diferentes classes de antibióticos testados. Todos os isolados apresentaram genes de resistência originalmente intrínsecos a *A. baumannii*, havendo multirresistência em 99,4% dos isolados (CHAGAS et al., 2014).

Nos Estados Unidos, um levantamento realizado entre 2005 e 2011 demonstrou que aproximadamente 18% das infecções por *Campylobacter* foram associadas com viagens internacionais, e 60% dessas infecções possuíam isolados de *Campylobacter* com resistência a quinolonas (RICOTTA et al., 2014).

Em Shangai foram encontradas cepas isoladas de pacientes com resistência a diversos antimicrobianos comumente utilizados para tratamento. As principais espécies multirresistentes encontradas foram *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA), e duas espécies produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL): *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (TAN et al., 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as bactérias que comumente causam infecções em hospitais e na comunidade são: a) *E. coli*,

com resistência à cefalosporinas de terceira geração e ou fluoroquinolonas, b) *Klebsiella pneumoniae*, com resistência à cefalosporinas e ou carbapenens, e c) *S. aureus*, resistente à meticilina (MRSA). Os principais causadores de infecções na comunidade são: a) *Sreptococcus pneumoniae*, com resistência ou não susceptibilidade à penicilina, b) *Salmonella* não tifoide e *Shigella* spp., resistentes à fluoroquinolonas, e c) *Neisseria gonorrhoea*, com resistência à cefalosporinas de terceira geração (WHO, 2014).

Este panorama geral demonstra que há uma grande preocupação com o elevado número de micro-organismos resistentes e também em relação à fonte desses micro-organismos, os quais nem sempre são de origem hospitalar e vêm aparecendo com maior frequência na comunidade, demonstrando que a era pós-antibióticos pode se tornar uma triste realidade ainda no século XXI (WHO, 2014).

3.3 DESINFETANTES

Os desinfetantes são saneantes cujas formulações contêm substâncias microbidas que apresentam efeito letal para micro-organismos não esporulados. Destinam-se à aplicação em objetos inanimados ou ambientes com a finalidade de destruição dos micro-organismos de maneira seletiva ou indiscriminada (BRASIL, 2010c; BRASIL, 1976).

O primeiro desinfetante a ser reportado na literatura foi o enxofre, na forma de dióxido de enxofre. Sua citação ocorreu no livro “A Odisseia XXII”, do qual se extrai que Odisseu, logo após voltar da guerra, pediu para que lhe trouxessem desinfetante enxofre e fogo a fim de que pudesse fumigar a sua casa. O enxofre, ao sofrer a queima, transforma-se em dióxido de enxofre, e foi amplamente utilizado desta forma durante as grandes pestes na Idade Média (BLOCK, 1991).

Existem vários tipos de desinfetantes disponíveis, e estes são classificados de acordo com a sua finalidade. Esta classificação inclui os desinfetantes de uso geral, para indústrias alimentícias, para piscinas, para lactários, e desinfetantes de uso hospitalar para superfícies finas e para artigos semicríticos (BRASIL, 2010c).

A utilização de desinfetantes para a higienização de ambientes hospitalares é de relevante importância, tendo em vista que as superfícies inanimadas que cercam o paciente guardam íntima relação com as infecções hospitalares, podendo proporcionar focos de contato e transmissão. Portanto, há uma grande importância nos padrões de assepsia e higiene do ambiente hospitalar (ANDRADE, ANGERAMI, PADOVANI, 2000).

Em um estudo realizado sobre a carga microbiana presente em colchões, antes e após a higienização em um hospital do interior de São Paulo, concluiu-se que não havia diminuição da carga microbiana, mas somente o deslocamento dos micro-organismos para outros pontos do colchão (ANDRADE, ANGERAMI, PADOVANI, 2000).

Alguns estudos indicam que a susceptibilidade de micro-organismos à antimicrobianos, incluindo desinfetantes, em biofilmes de única espécie seria maior do que em biofilmes contendo mais de uma espécie (HOFFMAN et al. 2006; BISWAS et al. 2009; HARRIOTT, NOVERR, 2009; HARRIOTT, NOVERR, 2010; SIMOES et al. 2010). No entanto, Kart e colaboradores (2014) demonstraram que o efeito da presença de várias espécies na susceptibilidade à desinfetantes depende das espécies presentes e do desinfetante utilizado (KART et al., 2014).

A resistência aos antissépticos e desinfetantes pode ser uma propriedade natural (intrínseca) dos micro-organismos, ou adquirida por mutação ou aquisição de plasmídeos ou transposons. A resistência intrínseca é demonstrada por bactérias gram negativas, esporos bacterianos, microbactérias e, em algumas condições, por estafilococos. A aquisição de resistência mediada por plasmídeos foi associada com compostos contendo mercúrio e outros sais metálicos. Resistência adquirida a outros tipos de biocidas foi observada notadamente em estafilococos (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

Foram observados mecanismos de resistência bacteriana muito semelhantes para o triclosan e antibióticos, incluindo mutações no alvo, inativação e ou modificação enzimática e bombas de efluxo, o que pode indicar

que o uso indiscriminado deste desinfetante pode levar à resistência cruzada à antibióticos (SCHWEIZER, 2001).

De acordo com a RDC 17 de 2010, as atividades de sanitização e higiene de uma indústria de medicamentos devem abranger o pessoal, instalações, equipamentos e aparelhos, materiais de produção e recipientes, além dos produtos para limpeza e desinfecção. Ao utilizar desinfetantes para a sanitização, deve-se empregar mais de um tipo e realizar trocas frequentes, evitando-se o desenvolvimento de micro-organismos resistentes (BRASIL, 2010b). Portanto, existe a necessidade de se comprovar a ação antimicrobiana dos desinfetantes utilizados neste rodízio.

3.4 CONSERVANTES

Os conservantes são aditivos utilizados em alimentos com a finalidade de impedir ou retardar alterações provocadas por micro-organismos ou enzimas (BRASIL, 1965). Em cosméticos e produtos de higiene pessoal, os conservantes são empregados com a finalidade de inibir o crescimento de micro-organismos durante a sua fabricação ou estocagem e, também, evitar a possível contaminação durante o uso daqueles produtos (BRASIL, 2012).

A avaliação da eficácia dos conservantes é determinada através do ensaio desafio do sistema conservante (*Challenge test*). Neste tipo de teste, inoculam-se quantidades conhecidas de micro-organismos nos produtos a serem avaliados, verificando-se então, se o conservante utilizado é capaz de inibir o crescimento destes micro-organismos ou até mesmo de destruí-los. O referido teste busca mimetizar a real contaminação causada pelos usuários dos cosméticos e, portanto, verificar a eficácia do conservante (ANVISA, 2004).

Em um estudo comparativo entre o *Challenge test* e o real uso por consumidores, foi demonstrado que tal teste pode ser usado com precisão para prever o risco de contaminação de cosméticos. Os produtos classificados de acordo com os resultados do teste como pobremente conservados, ou pouco preservados, tiveram contaminação em 46 a 90% dos casos de uso real. Em comparação, os produtos que foram classificados como bem preservados não

apresentaram contaminação em 100% dos casos e, portanto, o conservante foi capaz de eliminar os micro-organismos (BRANNAN et al., 1987).

A busca por conservantes de origem natural vem aumentando nos últimos anos e as indústrias cosméticas estão em busca de novos conservantes, como óleos vegetais com potencial atividade antimicrobiana (PACKER, LUZ, 2007). Para a triagem tanto de conservantes com apelo natural, quanto de conservantes sintéticos, utiliza-se a determinação da CIM para verificar se os micro-organismos testados são susceptíveis aos conservantes aplicados. E após sua determinação, segue-se com o *Challenge test*, o qual tem a finalidade de verificar se há interação do conservante com a formulação do cosmético, ou interferência de componentes da formulação na susceptibilidade dos micro-organismos (PACKER, LUZ, 2007; LALITHA, RAO, 2014).

3.5 MÉTODOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS AOS ANTIMICROBIANOS

Diversos métodos podem ser utilizados para a realização de testes de determinação de sensibilidade e resistência de micro-organismos. Dentre eles, destacam-se: a) métodos de difusão em ágar; b) ensaios bioautográficos; e c) testes de diluição em caldo (RIOS, RECIO, VILLAR, 1988; OSTROSKY et al., 2008).

Os métodos de difusão consistem na adição de antimicrobianos ou outros compostos a serem testados, como extratos vegetais, sobre o ágar inoculado com micro-organismos teste. Os compostos podem ser adicionados à discos de papel, tiras com gradiente de concentração, ou à cilindros de aço inoxidável colocados sobre o ágar. Ou ainda podem ser adicionados em orifícios resultantes da perfuração em ágar (VALGAS et al., 2007; JORGENSEN, FERRARO, 2009).

Os ensaios bioautográficos, são muito semelhantes aos de difusão em ágar, no entanto, o composto a ser testado é previamente submetido à cromatografia em camada delgada ou em papel e as substâncias cromatografadas são difundidas para o ágar contendo o micro-organismo teste (RIOS, RECIO, VILLAR, 1988; CHOMA, GRZELAK, 2011).

Já os testes de diluição em caldo podem ser divididos em macrodiluição e microdiluição. A macrodiluição consiste na adição do antimicrobiano, ou substância a ser testada, com concentração conhecida, em um tubo contendo meio de cultura líquido. E após diluição seriada em uma série de tubos deve-se adicionar o micro-organismo teste. A determinação da inibição e ou crescimento dos micro-organismos após período de incubação adequado, pode ser realizada de forma direta por meio de leitura visual, ou utilizando espectrofotometria. Os volumes utilizados na macrodiluição podem variar de 1 a 10 mL. Já a microdiluição, é a miniaturização do método de macrodiluição, ao invés de tubos utilizam-se placas de 96 poços com fundo em “U” e os volumes utilizados são muito inferiores aos da macrodiluição e variam de 0,1 a 0,2 mL (OSTROSKY et al., 2008; JORGENSEN, FERRARO, 2009; CLSI, 2012).

Ambos os métodos de diluição em caldo permitem a determinação da CIM, a qual é considerada como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir visivelmente o crescimento dos micro-organismos. A CIM é determinada após período de incubação examinando-se a partir de qual concentração do antimicrobiano houve inibição do crescimento bacteriano, ou seja, a primeira concentração onde não houve turvação do meio de cultura (JORGENSEN, FERRARO, 2009; CLSI, 2012).

Alves e colaboradores (2008) realizaram um estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de espécies vegetais e de antimicrobianos padrão. A técnica de microdiluição em caldo, para determinação da CIM, demonstrou ser o melhor método quando comparado com as técnicas de difusão em ágar (disco, poço e *template*).

Na comparação entre os métodos de triagem de difusão em ágar (poço e disco), bioautografia (direta e indireta) e microdiluição, para determinação de atividade antimicrobiana de produtos naturais oriundos de plantas, fungos e líquens, constatou-se que as técnicas de difusão e bioautografia apresentaram sensibilidades similares. E o método da microdiluição, dependendo do objetivo do teste, triagem ou determinação da CIM, pode ser utilizado tanto como semi-quantitativo ou quantitativo (VALGAS et al., 2007).

O método de microdiluição foi considerado a melhor opção para determinar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais aquosos e etanólicos por apresentar resultados confiáveis, quantitativos e maior economia, quando comparado com os métodos de difusão em ágar pelas técnicas de disco e poço (DE BONA et al., 2014).

Trata-se de um método simplificado e mais barato quando comparado à macrodiluição e, por utilizar microplacas, permite a geração de grandes quantidades de dados de maneira rápida e simultânea. O crescimento microbiano pode ser avaliado visualmente ou por espectrofotometria. No entanto, apesar da leitura visual não ser tão objetiva e completamente precisa, a determinação da densidade ótica deve ser cuidadosa, pois pode sofrer interferência de aditivos ou compostos, como a agregação de bactérias ou a formação de pigmentos bacterianos, que afetam as características espectrais dos meios de crescimento (ELOFF, 1998; GRARE et al., 2008).

A microdiluição possui diversas vantagens, dentre elas destacam-se: método quantitativo; reprodutível; conveniência de utilização de placas comerciais preparadas com antibióticos; economia de espaço e reagentes; possibilidade de utilizar sistemas de leitura automatizados para facilitar a geração de relatórios. A principal desvantagem é a inflexibilidade na seleção de fármacos disponíveis em painéis comerciais padronizados (JORGENSEN, FERRARO, 2009).

3.6 LEITURA EM ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO

3.6.1 Indicadores de crescimento microbiológico

Diversos sais de tetrazólio são comumente utilizados em diversas áreas da microbiologia, dentre eles encontram-se: cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC); 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromida (MTT); cloreto de 5-ciano-2,3-ditoliltetrazólio (CTC); hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenilo)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-tetrazólio (XTT); 4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazólio]-1,3-benzeno dissulfonato (WST-1); cloreto de 2-(*p*-iodofenil)-3(*p*-nitrofenil)-5-feniltetrazólio (INT) ou 2,2'-dibenzothiazolil-5,5'-bis-[4-di(2-sulfoetil)-carbamoilfenil]-3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenileno) ditetrazólio, e o sal dissódico (WST-5) (KREGIEL et al., 2008).

A redução de vários desses sais de tetrazólio ocorre pela transferência de elétrons das desidrogenases de células metabolicamente ativas, que conduzem à formação de produtos finais altamente coloridos chamados de formazanos. Em decorrência do papel crucial que as desidrogenases desempenham no metabolismo celular, este tipo de reação é utilizado em vários ensaios biológicos, incluindo os de viabilidade celular (KUGLER, 1982; PEARSE, HESS, 1961; MATTSON, JENSEN, DUTCHER, 1947).

Em relação ao uso do INT, a quantidade de formazano produzida foi medida pela absorbância e demonstrou aumento exponencial em função do inóculo e do tempo de incubação (1 a 4 horas). Quanto maior o tamanho do inóculo e o tempo de incubação, maior a produção do composto colorido (GRARE et al., 2008). O TTC também demonstrou proporcionalidade em relação à quantidade de formazano produzido e à quantidade de enzimas presentes em tecido de pele (HERSHEY, CRUICKSHANK, MULLINS, 1958).

A comparação entre os indicadores XTT e MTT na determinação de resistência de *Mycobacterium Tuberculosis* à rifampicina, isoniazida, e estreptomicina demonstrou que ambos os métodos são rápidos, confiáveis e acessíveis. No entanto, a redução do XTT leva à geração de formazano solúvel em água que pode ser quantificado diretamente, sem a realização de lise e solubilização que é necessária no caso do MTT (LOGU, DE et al., 2001). A utilização do XTT também foi bastante satisfatória na triagem de extratos vegetais em relação à atividade antimicrobiana (AL-BAKRI, AFIFI, 2007).

Outro indicador utilizado é a Resazurina, também conhecida como Alamar Blue, é um corante azul que ao ser reduzido à resorufina, pelo metabolismo de células viáveis, torna-se vermelho. Além da alteração de cor, há uma alteração de fluorescência, de ligeiramente fluorescente (resazurina) para altamente fluorescente (resorufina). Portanto, esse corante pode ser utilizado tanto para testes colorimétricos quanto fluorimétricos (AHMED et al., 1994; O'BRIEN et al., 2000). Esse indicador vem sendo utilizado desde a década de 90 para verificar a sensibilidade e detectar a resistência de *Mycobacterium tuberculosis* aos diversos antimicrobianos (FRANZBLAU et al., 1998; PALOMINO et al., 2002; KHALIFA et al., 2013). Também foi empregado para verificar a sensibilidade de isolados de leveduras (PFALLER et al., 1994).

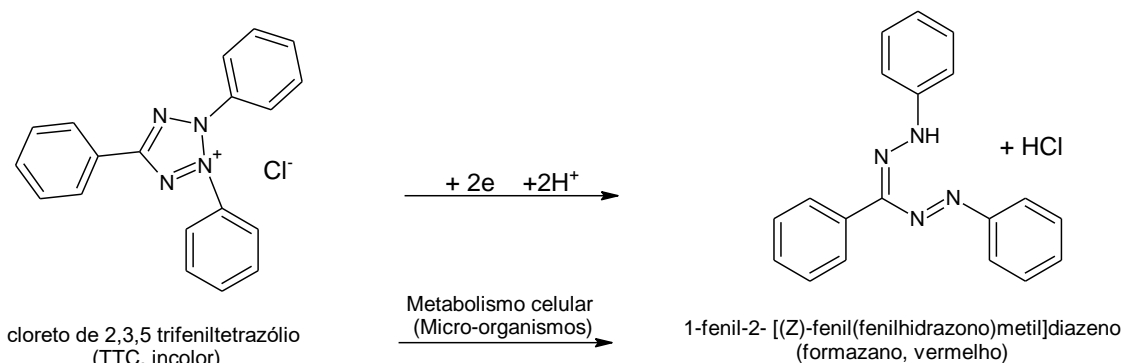
3.6.1.1 Aplicações do TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio)

O TTC é um composto amplamente utilizado, e uma das suas primeiras aplicações ocorreu quando foi empregado como indicador da germinação de sementes (COTTRELL, 1947).

Após a observação de que o TTC poderia ser útil para detectar não somente a viabilidade de sementes, mas também de outros tecidos vivos, os sais de tetrazólio passaram a ser amplamente utilizados (MATTSON, JENSEN, DUTCHER, 1947), como em 1948, quando se verificou a redução do TTC por sistemas enzimáticos de neoplasmas e tecidos vivos de mamíferos (STRAUS, CHERONIS, STRAUS, 1948), e em 1954, quando foi utilizado para verificar a presença de antibióticos em leite (NEAL, CALBERT, 1955). Além disso, um pouco antes da década de 90, Berderson e colaboradores o aplicaram para a detecção e quantificação de infarto cerebral em ratos (BEDERSON et al., 1986).

O mecanismo de reação do TTC baseia-se na dupla tetrazólio/formazano, a qual forma um sistema redox especial que atua como aceptor de prótons ou oxidante (Figura 1). Na presença de bactérias metabolicamente ativas, o TTC é reduzido a formazano vermelho, o qual é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. Portanto, o TTC é considerado como um método comparativamente rápido para avaliar a atividade antibacteriana de agentes antimicrobianos (MOUSSA et al., 2013).

FIGURA 1- BIOTRANSFORMAÇÃO DO TTC NA PRESENÇA DO METABOLISMO MICROBIANO



FONTE: Adaptado de MATTSON, JENSEN, DUTCHER (1947) e MOUSSA et al. (2013)

Kumar e colaboradores (2003) consideraram o TTC como um bom aceptor de elétrons para colônias de bactérias e fungos provindos do solo, cultivadas em placas. (KUMAR, TARAFDAR, 2003).

Em relação aos efeitos da luz sobre a redução de sais de tetrazólio, constatou-se que o TTC é mais fotossensível em relação ao cloreto de neotetrazólio (NT) e ao azul de tetrazólio (BT). Mesmo em água, as soluções de TTC tornaram-se vermelhas sob influência de luz enquanto as soluções de NT e BT foram estáveis (MUSTAKALLIO, AHOS, AUTIO, 1955).

Ao comparar o TTC a outros quatro indicadores colorimétricos de crescimento (MTT, XTT, INT e resazurina) com relação à toxicidade e às mudanças de cores durante a redução, o TTC apresenta vantagens, tendo em vista que o MTT e INT exibem uma maior toxicidade, e a resazurina e o XTT alteram sua coloração durante a redução. O TTC, além de possuir menor custo do que o XTT, sendo economicamente mais viável, e apresenta coloração apenas ao ser reduzido (RAHMAN et al., 2004).

Assim, atualmente o TTC vem sendo amplamente utilizado como auxiliar na determinação da atividade antimicrobiana de compostos (MOUSSA et al., 2013; MILENKOVIĆ et al., 2015; MORJAN et al., 2015;), tendo em vista que o desenvolvimento de coloração frente ao metabolismo microbiano auxilia a visualização do crescimento de micro-organismos, facilitando a leitura visual de ensaios de microdiluição (TENGERDY et al., 1967; RAHMAN et al., 2004).

3.6.2 Métodos de leitura

De acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), que é um órgão de padronização internacional das técnicas de pesquisa e análise para a determinação da sensibilidade de micro-organismos aos antimicrobianos, a leitura dos testes de microdiluição pode ser realizada visualmente a olho nú, ou podem ser utilizados dispositivos destinados a facilitar a leitura e o registro dos resultados, desde que não haja comprometimento da capacidade de discernir o crescimento nos poços (CLSI, 2012).

Dentre estes dispositivos encontra-se o scanner, o qual pode ser aplicado quando são utilizados indicadores de crescimento coloridos, como os sais de tetrazólio. Esta combinação foi usada por Rahman et al. (2004), no qual as microplacas foram digitalizadas com um scanner de mesa reflexivo (UMAX-Astra 6450) conectado a um computador contendo um *software* que, ao analisar as imagens, mede a intensidade da cor e o diâmetro de cada *pellet* formado, resultando em um valor numérico que representa a quantidade de formazano formado e, portanto, do crescimento microbiano (RAHMAN *et al.*, 2004).

Além das leituras com scanner, também é possível realizar leituras com espectrofotômetro. Gabrielson e colaboradores (2002) verificaram que há correlação entre as leituras realizadas com scanner e espectrofotômetro. E com relação às leituras em espectrofotômetro, apesar de afirmarem que, de acordo com a literatura, 490 nm seria o comprimento de onda ideal para o TTC, o comprimento de onda de 540 nm forneceu melhores resultados e foi selecionado para leituras (GABRIELSON *et al.*, 2002). Moussa e colaboradores (2013) realizaram leituras em espectrofotômetro a 480 nm e afirmaram que o TTC serve como um sistema indicador da determinação da viabilidade de células bacterianas.

3.7 APLICAÇÕES DO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO

Há diversas aplicações da microdiluição para a determinação da CIM. Dentre estas estão a determinação da sensibilidade de bactérias multirresistentes (ZHANEL, et al., 2014), de micro-organismos causadores de zoonoses (GEORGI, et al., 2012), e a triagem de extratos vegetais quanto à atividade antimicrobiana (AL-BAKRI, AFIFI, 2007; VALGAS et al., 2007; AYRES et al., 2008; ALVES et al., 2008; BUSSMANN et al., 2010; MOUSSA 2013).

É importante salientar também que a microdiluição pode ser utilizada em uma outra área, que são os testes de desinfetantes. Estes são importantes, tendo em vista que alguns micro-organismos podem desenvolver resistência a desinfetantes, como os cloretos de benzalconio (BACs), através da degradação desses compostos (OH et al., 2014; HE et al., 2014). Além disso, a desinfecção

de hospitais é um fator de grande influência para evitar a presença de micro-organismos patogênicos em superfícies inanimadas que possam levar pacientes debilitados a uma nova infecção (ANDRADE, ANGERAMI, PADOVANI, 2000).

Alguns dos métodos citados na literatura realizam a “quantificação” em porcentagem da inibição do crescimento dos micro-organismos, sendo o controle negativo considerado como 100% (GABRIELSON et al., 2002; MOUSSA et al., 2013). Moussa e colaboradores (2013) realizaram contagens em placas e demonstraram excelentes médias de porcentagens de correlação obtidas por meio das contagens com relação às adquiridas por meio de medidas espectrofotométricas, sendo as variações menores do que 5%. No entanto, não foi proposta a conversão dos valores de absorbância em valores de UFC/mL.

E embora o método de microdiluição esteja descrito pelo CLSI 2012, não tem sido observada a padronização da metodologia a partir de trabalhos científicos publicados como pode ser observado na Tabela 1.

TABELA 1- FALTA DE PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MICRODILUIÇÃO

Autor	Incubação prévia	Concentração de TTC (p/v)	Volume de TTC (% vol. total)	Incubação posterior	Leitura
SILVA et al., 2011	35°C/ 24h	0,50 %	20 µL (20 %)	1 hora	Visual
AYRES et al., 2008	35°C/ 18h	0,50 %	20 µL (20 %)	3 horas	Visual
ELOFF, 1998	37°C/ overnight	0,20 %	40 µL (40 %)	10-30 min	Visual
RAHMAN et al., 2004	-----	0,005 %	-----	37°C/ 16h	Scanner
GABRIELSON et al., 2002	-----	0,01 %	-----	28°C/ overnight	540 nm e Scanner
MOUSSA et al., 2013	37°C/ 3h	0,50 %	100 µL* (10 %)	20 min	480 nm
DE BONA et al., 2014	35°C/ 24h	0,50 %	20 µL (13 %)	36°C/ 3h	Visual
MORJAN et al., 2015	37°C/ 24h	0,50 %	20 µL (20 %)	Não informada	Visual

FONTE: A autora (2016).

NOTA: * Análise realizada com 1 mL e não em microplacas como as demais.

Os dados compilados na Tabela 1 demonstram somente alguns trabalhos que utilizaram o TTC como composto revelador e servem apenas para evidenciar a falta de padronização existente, principalmente com relação ao tempo de incubação, a concentração de TTC utilizada, o tempo de contato da solução de TTC com os micro-organismos e o método de leitura utilizado.

3.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

A validação é definida como um ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente e consistentemente conduz aos resultados esperados (BRASIL, 2010b). De tal maneira, o objetivo principal da validação de métodos microbiológicos alternativos é a demonstração de que não há inferioridade entre o método validado e o método tradicional (BRASIL, 2014).

De acordo com a Farmacopeia Americana (USP), para a validação de métodos microbiológicos alternativos quantitativos devem ser analisados os parâmetros de exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, faixa operacional, robustez, repetitividade e resistência (USP 37, 2014). Na Farmacopeia Brasileira não há dados sobre validação de métodos microbiológicos alternativos. No entanto, em consulta pública realizada em julho de 2014 para inserção do item de Métodos Microbiológicos Alternativos como um método geral da Farmacopeia Brasileira, recomendam-se para os testes quantitativos os seguintes parâmetros de validação: especificidade, limite de detecção, exatidão, precisão, limite de quantificação, linearidade, intervalo e robustez (BRASIL, 2014).

A especificidade representa a capacidade do método em responder positivamente aos diferentes micro-organismos presentes, e de não promover resultados falso positivos na presença de componentes adicionados ou contaminantes ou materiais estranhos (BRASIL, 2014; USP 37, 2014).

O limite de detecção é definido como o menor número de micro-organismos capaz de ser detectado sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação é o menor número de micro-organismos capaz de ser determinado com precisão e exatidão (BRASIL, 2014; USP 37, 2014).

A exatidão demonstra a proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação aos obtidos pelo método tradicional. E na maioria das vezes é expressa como a porcentagem de recuperação de micro-

organismos, a qual deve situar-se entre 70 e 130% (BRASIL, 2014; USP 37, 2014).

A precisão é o parâmetro que indica o grau de concordância entre os resultados de testes individuais ao aplicar o procedimento repetidamente, sendo o resultado geralmente expresso como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) dos resultados obtidos. Valores menores que 30% para o coeficiente de variação demonstram uma precisão aceitável para os métodos. Para avaliar a precisão intermediária o experimento deve ser repetido em outro dia de trabalho (BRASIL, 2014; USP 37, 2014).

A linearidade é conceituada como a capacidade do método em produzir resultados proporcionais à concentração de micro-organismos dentro de um intervalo, e pode ser avaliada pelo quadrado do coeficiente de correlação, R^2 , o qual não deve ser menor do que 0,95. O R^2 é calculado pela análise de regressão linear dos dados gerados e, apesar de não fornecer uma estimativa da linearidade, é geralmente aplicado para fornecer uma ideia de relação (BRASIL, 2014; USP 37, 2014).

O intervalo situa-se entre a menor e a maior concentração de micro-organismos que foram determinadas com precisão, exatidão e linearidade seguindo as condições pré-estabelecidas para o método. E deve ser determinado a partir dos estudos de precisão, exatidão e linearidade (BRASIL, 2014; USP 37, 2014).

A robustez é expressa como o grau de reprodutibilidade dos resultados obtidos por análise da mesma amostra com variações pré-estabelecidas das condições normais do teste (BRASIL, 2014; USP 37, 2014).

Na literatura, há grande variedade de artigos que validam métodos microbiológicos alternativos. São exemplos: a) a validação de ensaio microbiológico em ágar para a determinação de cefuroxima de sódio em preparações farmacêuticas (SCHMIDT et al., 2009), b) a validação de ensaio de microdiluição que determina a CIC_{50} (Concentração Inibitória do Crescimento de 50%) de compostos contra *Mycobacterium tuberculosis* (GRUPPO et al., 2006), c) a validação de métodos baseados na tecnologia de

substrato definido (BOUBETRA et al., 2011) e d) a validação de teste de triagem para a detecção de resíduos de antimicrobianos presentes no leite, utilizando placas com diferentes micro-organismos (GAUDIN et al, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTURA E REAGENTES UTILIZADOS

Na Tabela 2 estão descritos os meios de cultura e os reagentes utilizados para o desenvolvimento e validação do método.

TABELA 2- MEIOS DE CULTURA E REAGENTES UTILIZADOS NOS ENSAIOS

Meio de cultura/ Reagente	Marca	Lote
Caldo triptona de soja (TSB)	MERCK	1054590500
Ágar triptona de soja (TSA)	OXOID	1567310
Ágar Sabouraud	BD	7187426
Glicerol (Glicerina 87%)	MERCK	1040941000
Cloreto de Sódio	DINÂMICA	48974
Cloranfenicol	MERCK	1023660050
Cetoconazol	AARTI	11012045
Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC)	NEON	18680
Caldo Mueller Hinton (MH)	DIFCO- BD	8214673
Caldo Sabouraud	LABORCLIN	30822033
Álcool Etilico	NEON	18854
Álcool Metílico	VETEC	1207208

FONTE: A autora (2016).

4.2 MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos utilizados para este estudo são os indicados pela Farmacopeia Brasileira (5ª edição) para o teste de eficácia antimicrobiana. Foram utilizadas cepas padrão das bactérias *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e da levedura *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.2.1 Ativação, conservação e preparo do Inóculo

Para ativação dos micro-organismos, os discos liofilizados foram cultivados em caldo triptona de soja (TSB) e incubados em estufa por 24h a 35°C ± 0,5°C.

Para armazenamento dos micro-organismos após ativação, utilizou-se a técnica de congelamento em meio líquido com 20 % (v/v) de glicerol estéril em água. Adicionalmente, os micro-organismos também foram armazenados em tubos contendo caldo ou ágar inclinado TSB ou TSA para bactérias e Sabouraud para *C. albicans*, e mantidos sob refrigeração de 2 à 8°C.

As suspensões de cada micro-organismo foram obtidas a partir de colônias isoladas, com crescimento em ágar entre 20 e 23 horas, que foram transferidas para solução salina 0,9%. Em seguida, as suspensões foram padronizadas através da comparação visual da turbidez com tubo equivalente à escala 0,5 de Mc Farland. Então, foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento e contagem das diluições (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) para determinar a real concentração microbiana (UFC/mL) em cada suspensão.

Os inóculos foram utilizados por no máximo 3 dias após o preparo, e foram armazenados sob refrigeração de 2 à 8 °C. E a diluição e plaqueamento das suspensões para contagem dos micro-organismos sempre foi realizada no dia do uso da suspensão.

4.3 ANTIMICROBIANOS

Os compostos antimicrobianos utilizados para a realização das curvas de crescimento foram o cloranfenicol e o cetoconazol, para inibição de crescimento de bactérias e levedura, respectivamente.

4.3.1 Preparo e armazenamento das soluções de antimicrobianos

As soluções de cloranfenicol nas concentrações de 3000 µg/mL, 1000 µg/mL e 100 µg/mL foram preparadas em solução hidroalcoólica de etanol 5% em balão volumétrico. Tais soluções foram estocadas sob refrigeração de 2 a 8 °C (por no máximo 3 dias após o preparo).

Para o preparo das soluções de cetoconazol nas concentrações de 100 µg/mL e 1000 µg/mL, foram utilizadas soluções metanólicas à 2%. As soluções de cetoconazol não foram armazenadas, sendo sempre preparadas no dia do uso.

4.4 PREPARO DA SOLUÇÃO INDICADORA DE CRESCIMENTO (TTC)

As concentrações (p/v) de 0,75 %, 0,5 %, 0,25 % e 0,125 % foram preparadas com água destilada estéril. As soluções obtidas foram filtradas por membrana esterilizante (0,20 μm) e armazenadas em frascos estéreis recobertos com papel alumínio, sob-refrigeração (2 a 8°C). As soluções foram utilizadas por no máximo 7 dias após o preparo.

4.5 ENSAIOS DE TOXICIDADE DO TTC

4.5.1 Toxicidade do TTC 0,5 % antes e após incubação

Para cada micro-organismo teste foram utilizados 2 tubos estéreis, contendo, cada qual, 1,5 mL de caldo (Mueller Hinton para bactérias e Sabouraud para a levedura) + 1,5 mL de salina + 300 μL da suspensão de micro-organismos (0,5 Mc Farland). Em um dos tubos adicionou-se 600 μL da solução de TTC 0,5 % e ambos foram homogeneizados e incubados pelos períodos de 22 horas para as bactérias e 46 horas para a levedura. Em seguida, a solução reveladora foi adicionada ao tubo que não continha TTC e ambos foram incubados novamente por 2 horas.

Após o tempo total de incubação de 24 horas para as bactérias e 48 horas para a levedura, realizou-se a leitura visual dos tubos. Uma alíquota de 500 μL de cada tubo foi diluída em tubos contendo, cada um, 4,5 mL de salina (0,9 %) até a diluição 10^{-10} . Após essa diluição seriada, alíquotas de 1 mL de cada diluição foram plaqueadas em duplicata por semeadura em profundidade ("pour plate") com TSA para as bactérias e ágar sabouraud para *C. albicans*. Após serem incubadas à 35°C/24h e 25°C/48h, os resultados das contagens foram expressos em UFC/mL.

4.5.2 Toxicidade de diferentes concentrações do TTC após incubação

Para cada micro-organismo testado, foram utilizados 5 tubos estéreis. Ao primeiro tubo adicionou-se 4 mL de caldo + 4 mL de solução salina + 800 μL de inóculo e, em seguida, retirou-se uma alíquota de 500 μL para realização da diluição e contagem.

Após 22 horas de incubação para as bactérias e 46 horas para a levedura, o tubo foi homogeneizado e, alíquotas de 2 mL foram transferidas para os outros quatro tubos. Em três desses foram adicionados 400 µL de TTC nas concentrações de 0,5 %, 0,25 % e 0,75 %. Ao conteúdo do tubo restante, adicionou-se 400 µL de água estéril.

Os quatro tubos foram incubados por mais 2 horas e após este período de incubação foram retiradas alíquotas de 500 µL de cada tubo e foram diluídas até a diluição 10^{-9} . As diluições 10^{-4} a 10^{-9} foram plaqueadas em duplicata por semeadura em profundidade para contagem do número de UFC/mL presentes em cada tubo.

Posteriormente este mesmo ensaio foi realizado, no entanto comparando as seguintes concentrações de TTC: 0,5%, 0,25% e 0,125%. Para este último teste, os tubos contendo *C. albicans* também foram incubados a 35°C, por um período total de 24 horas, igual às bactérias.

4.6 ESTUDO PRELIMINAR EM TUBOS (MACRODILUIÇÃO)

4.6.1 Curvas de crescimento em tubos

Os ensaios para cada micro-organismo foram realizados utilizando-se 9 tubos identificados de A à I, aos quais foram adicionados 2 mL de caldo Mueller Hinton para o crescimento de bactérias e caldo Sabouraud para o crescimento da *C. albicans*. Em seguida, adicionou-se 2 mL da solução de 100 µg/mL de antimicrobiano (cloranfenicol para as bactérias e cetoconazol para a levedura) ao tubo A, e realizou-se diluição seriada para obter as seguintes concentrações de antimicrobiano em cada um dos tubos: 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, 1,56 µg/mL, 0,78 µg/mL e 0,39 µg/mL.

Após diluição seriada, descartou-se 2 mL do conteúdo do tubo I e, em seguida, adicionou-se em cada um dos tubos 200 µL da suspensão de inóculo padronizado. Os primeiros testes foram realizados utilizando-se a concentração inicial de 100 µg/mL para ambos os antimicrobianos. Também foram preparados um tubo branco, no qual adicionou-se 2 mL de caldo + 2 mL da solução de antimicrobiano (100 µg/mL) + 400 µL de salina. Para o tubo controle

negativo adicionou-se 2 mL de caldo + 2 mL da solução hidroalcoólica utilizada para dissolver os antimicrobianos (etanol 5% ou metanol 2%) + 400 µL da suspensão de micro-organismos.

Os tubos foram incubados em estufa a 35°C/22h e 25°C/46h e, após este período, foram adicionados 400 µL da solução reveladora aos tubos testes e 800 µL aos tubos controle negativo e branco. Após incubação por mais duas horas, foram realizadas leituras em espectrofotômetro seguidas de diluição e plaqueamento para posterior contagem dos micro-organismos presentes em cada tubo teste e no tubo controle.

Foram realizados testes com diferentes concentrações de revelador (0,5 %, 0,25 % e 0,125 %) para verificar visualmente a sensibilidade do TTC frente ao crescimento microbiano, e realizou-se varredura na faixa do visível (400 a 800nm) dos experimentos realizados em tubos.

Posteriormente, devido à falta de inibição da proliferação da *P. aeruginosa* frente à concentração testada (100 µg/mL), foram realizados testes utilizando-se a concentração inicial de 3000 µg/mL de cloranfenicol. Para os testes da *C. albicans*, devido à dificuldade de crescimento dos micro-organismos e ao não desenvolvimento de coloração rosa, a incubação passou a ser realizada à 35°C/22 horas e a concentração inicial de cetoconazol passou a ser 1000 µg/mL.

4.7 LEITURAS EM ESPECTROFOTÔMETRO

As leituras dos experimentos em tubos, foram realizadas em espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu, modelo 1800). E as leituras das microplacas de 96 poços foram realizadas em fotômetro de microplacas (Multiscan FC).

4.8 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE MICRოდILUIÇÃO

Os testes foram realizados em placas de plástico estéreis de 96 poços com fundo redondo (em “U”). Com auxílio de uma pipetadora multicanal adicionou-se em todos os orifícios 100 µL do caldo específico para cada micro-

organismo (caldo Mueller Hinton para bactérias e caldo Sabouraud para leveduras).

No primeiro poço de cada coluna foi então adicionado um volume de 100 µL das soluções de antimicrobianos. As concentrações inicialmente testadas foram as mesmas pré-determinadas pelos ensaios de macrodiluição (100 µg/mL de cloranfenicol para *S. aureus* e *E. coli*; 3000 µg/mL de cloranfenicol para *P. aeruginosa*; e 1000 µg/mL de cetoconazol para *C. albicans*). Foram utilizadas placas diferentes para cada micro-organismo.

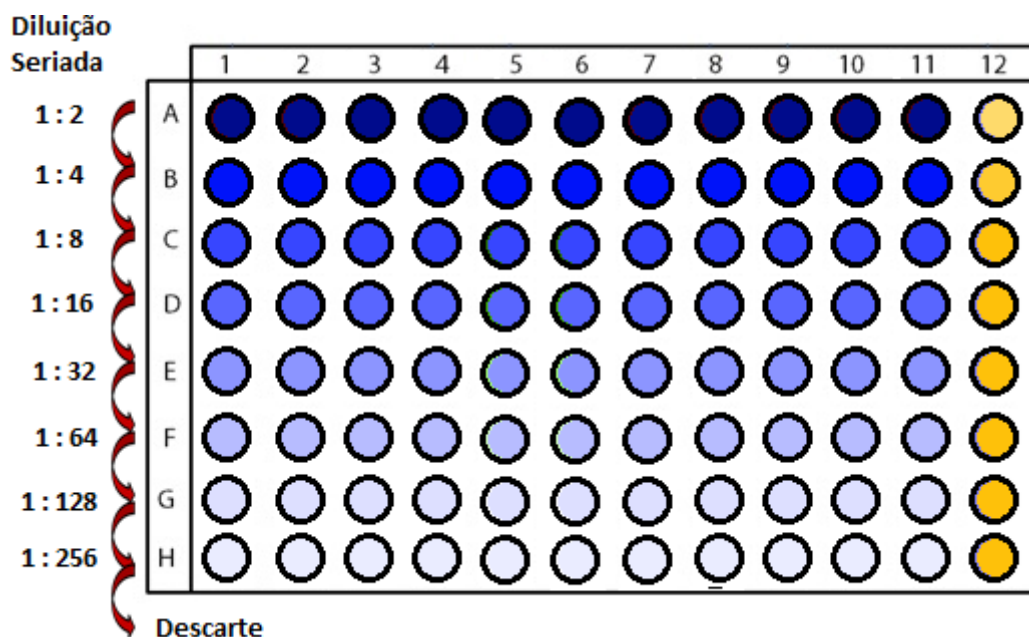
Em seguida, após homogeneização, uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício foi transferida para os orifícios subsequentes da coluna obtendo-se, assim, as diluições seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 nas seguintes concentrações decrescentes: 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL; 3,125 µg/mL; 1,56 µg/mL; 0,78 µg/mL; e 0,39 µg/mL no caso dos testes de *S. aureus* e *E. coli*.

Para *P. aeruginosa* as concentrações, após diluição seriada, foram: 1500 µg/mL; 750 µg/mL; 375 µg/mL; 187,5 µg/mL; 93,75 µg/mL; 46,88 µg/mL; 23,43 µg/mL; e 11,72 µg/mL. Posteriormente, a concentração inicial de cloranfenicol utilizada para *P. aeruginosa* passou a ser de 1000 µg/mL e, portanto, os valores de concentração do cloranfenicol passaram a ser iguais aos de cetoconazol: 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,6 µg/mL; 7,8 µg/mL; e 3,9 µg/mL.

Foram adicionados 10 µL de cada inóculo padronizado em todos os orifícios, exceto nos poços brancos, nos quais adicionou-se 10 µL de solução salina (0,9%). Para o controle negativo, utilizou-se somente o caldo, o mesmo volume de solução hidroalcoólica (veículo no qual o antimicrobiano foi diluído) e o inóculo.

Na Figura 2 pode ser observada a representação esquemática dos experimentos realizados para o método. No esquema, a cor azul presente nos testes (colunas 1 à 10) e na coluna branco (11) corresponde à concentração de antimicrobiano, e a coluna 12 corresponde ao controle negativo, no qual a solução hidroalcoólica sem a presença do antimicrobiano foi diluída:

FIGURA 2- ESQUEMA DE EXPERIMENTO DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA



FONTE: A autora (2016).

As placas foram incubadas a 35 °C por 22 horas. Decorrido esse intervalo de tempo, adicionou-se em cada orifício 20 µL da solução de TTC (cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio) a 0,125 %, e as microplacas foram novamente incubadas por mais duas horas. Após leitura visual e em espectrofotômetro a 540 nm, foram retiradas alíquotas de 5 replicatas de cada concentração para realizar a diluição seriada e posterior contagem do número de micro-organismos (UFC/mL) presente em cada orifício da placa.

4.8.1 Validação do método de microdiluição padronizado

Os ensaios realizados para validação do método seguiram exatamente o modelo do método padronizado e foram avaliados os parâmetros de acordo com as recomendações da Farmacopeia Americana (USP 37) e também da Consulta Pública n.45 de 2014 para validação de métodos microbiológicos alternativos.

4.8.1.1 Linearidade

A avaliação da linearidade foi realizada por meio do cálculo do quadrado do coeficiente de correlação, R^2 , obtido pela correlação gráfica entre a concentração de micro-organismos obtidos pelo método de contagem em placas, e os valores de absorbância obtidos pelas leituras em espectrofotômetro das placas contendo diferentes concentrações de micro-

organismos, cujo método foi aplicado como descrito no item 4.8. Foram utilizadas no mínimo 5 das 8 concentrações dos antimicrobianos testadas em 5 replicatas para cada micro-organismo.

4.8.1.2 Especificidade

A especificidade foi avaliada pelo desenvolvimento de coloração na presença de micro-organismos viáveis a partir da redução do TTC e da não redução do TTC na ausência de micro-organismos viáveis e presença dos componentes do meio de cultura, dos solventes utilizados para dissolução dos compostos antimicrobianos e dos próprios antimicrobianos. Foi observada a formação ou não de coloração rósea em todos os orifícios com diferentes concentrações de antimicrobiano, bem como nos poços de branco, controle negativo e controle positivo.

A verificação da redução ou não do TTC foi realizada com leituras visuais e em espectrofotômetro. Para tanto, o comprimento de onda utilizado deve ser específico para a absorção do formazano proveniente do TTC (540 nm).

4.8.1.3 Limite de detecção (LD)

Os limites de detecção foram determinados com no mínimo 5 concentrações de antimicrobianos dentro da faixa de trabalho para cada micro-organismo (50 a 100 µg/mL de cloranfenicol para *S. aureus* e *E.coli*, e 500 a 1000 µg/mL de cloranfenicol e cetoconazol para *P.aeruginosa* e *C. albicans* respectivamente), e em 5 replicatas para cada concentração. O cálculo foi determinado de acordo com o ICH (2005), com base na curva de crescimento, aplicando-se a seguinte equação:

$$LD = \frac{3.3 \sigma}{S}$$

Onde:

σ = desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas das replicatas

S = coeficiente linear da curva de crescimento final

4.8.1.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi determinado com 5 concentrações de antimicrobianos dentro da faixa de trabalho para cada micro-organismo (50 a 100 µg/mL de cloranfenicol para *S. aureus* e *E.coli*, e 500 a 1000 µg/mL de cloranfenicol e cetoconazol para *P.aeruginosa* e *C. albicans* respectivamente), e em 5 replicatas para cada concentração, de acordo com a equação do ICH (2005):

$$LQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

Onde:

σ = desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas das replicatas

S = coeficiente linear da curva de crescimento final

4.8.1.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada em duas concentrações com 10 replicatas. As concentrações avaliadas para *E. coli* e *S. aureus* foram 3,125 µg/mL e 0,78 µg/mL de cloranfenicol. Para *P. aeruginosa* as concentrações foram 31,25 µg/mL e 7,8 µg/mL de cloranfenicol, enquanto que para *C. albicans* foram 31,25 µg/mL e 7,8 µg/mL de cetoconazol.

O coeficiente de variação, foi calculado dividindo-se o desvio padrão dos dados pela média dos dados e o resultado multiplicado por 100. Os valores utilizados para este cálculo foram as concentrações de micro-organismos obtidas após aplicar os valores das absorvâncias nas respectivas equações da reta de cada micro-organismo.

4.8.1.6 Exatidão

Para avaliar a exatidão do método foram utilizadas 5 concentrações dentro da faixa de trabalho para cada micro-organismo com 5 replicatas para cada concentração. Após leitura em espectrofotômetro e contagem em placas de todas as concentrações e replicatas, foram realizados cálculos aplicando-se as equações das retas das curvas de crescimento de cada micro-organismo e substituindo-se os valores de y.

Os resultados dos cálculos foram então confrontados com os valores práticos obtidos por meio das contagens em placas e verificou-se a porcentagem de recuperação.

4.8.1.7 Intervalo

Foi determinado a partir dos estudos de precisão, exatidão e linearidade, respeitando-se o limite de quantificação. Sendo selecionado o intervalo no qual a concentração de micro-organismos pode ser determinada com precisão, exatidão e linearidade.

4.8.1.8 Robustez

As variações aplicadas para avaliação da robustez do método foram: a temperatura de incubação (30°C e 33°C); a diluição do inóculo padronizado (1:2 e 1:10); adição do TTC após 18 horas e 20 horas de incubação; e as leituras após 4 horas e 6 horas da adição do revelador.

Os experimentos foram realizados em 5 replicatas para o método padrão e também para cada variação pré-determinada. Após leituras em espectrofotômetro, os valores das absorvâncias de todos os ensaios foram convertidos em UFC/mL, aplicando-se os valores de absorvância nas equações da reta de cada micro-organismo. Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) no software Statistica® seguindo o modelo ONE-WAY ANOVA e teste de Tukey. Antes de realizar os testes estatísticos foram verificadas a homogeneidade das replicatas e também a normalidade dos dados.

4.9 DETERMINAÇÃO DA CIM DOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

A determinação da CIM foi realizada com base nas leituras visuais, sendo anotada a última concentração na qual não houve desenvolvimento de coloração rosa para cada um dos micro-organismos. E também com base nas leituras espectrofotométricas, sendo os valores das absorvâncias aplicados nas equações da reta, determinando-se a concentração de micro-organismos presentes em cada orifício das placas. Posteriormente, esses dados foram apresentados na forma de gráficos de barras com barras de erros (desvio

padrão). Esses mesmos dados foram ainda analisados estatisticamente seguindo o modelo ONE-WAY ANOVA e teste de Tukey. E foram então comparadas as CIM obtidas pelas leituras visuais, com as obtidas ao observar os gráficos, e também com as provenientes das análises estatísticas.

4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50 % ($CI_{50\%}$) E DE 90 % ($CI_{90\%}$) DOS MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizadas 5 replicatas de pelo menos 5 concentrações de cada micro-organismo. Após aplicar o método e realizar leitura em espectrofotômetro, os valores de absorvância obtidos foram aplicados nas equações das retas de cada micro-organismo (construídas para verificar a linearidade do método), em seguida, os valores de UFC/mL foram tratados com função logarítmica para construção de uma nova curva de crescimento, correlacionando o log de UFC/mL com as concentrações de antimicrobianos testadas.

Para determinar a $CI_{50\%}$ e a $CI_{90\%}$, os valores de UFC/mL dos poços de controle negativo foram multiplicados por 0,5 e 0,1, a fim de obter o número de micro-organismos correspondentes a 50 % e 10 % do crescimento total. Os valores foram então transformados por função logarítmica e aplicados como valor de x nas equações da reta construídas a partir da correlação entre a concentração de antimicrobiano e o log de UFC/mL dos micro-organismos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Na literatura existem diversos estudos que discutem sobre a padronização do inóculo e sua interferência com a sensibilidade dos micro-organismos a compostos antimicrobianos (ELOFF, 1998; ALVES et al., 2008; BIDLAS, DU, LAMBERT, 2008).

De acordo com Ostrosky e colaboradores (2008), a padronização do inóculo se faz necessária considerando que a susceptibilidade dos antimicrobianos é dependente da quantidade de inóculo, a qual deve ser estabelecida para cada método desenvolvido.

Dessa forma, a padronização do inóculo para cada micro-organismo foi realizada por contagem padrão em placas pelo método de “pour-plate”. Este procedimento foi necessário tendo em vista que o ajuste da turbidez do inóculo em relação ao tubo correspondente a 0,5 da escala Mc Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foi realizado visualmente, sem o auxílio de espectrofotômetro.

Na Tabela 3, podem ser observados os intervalos entre os menores e maiores valores de UFC/mL encontrados nos diferentes inóculos, utilizados em diferentes experimentos para cada micro-organismo.

TABELA 3- CONTAGENS MÍNIMAS E MÁXIMAS DOS INÓCULOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

Micro-organismo	Contagens (UFC/mL)	
	Mínima	Máxima
<i>S. aureus</i>	$7,4 \times 10^6$	$2,3 \times 10^7$
<i>E. coli</i>	$8,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i>	$4,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$
<i>C. albicans</i>	$3,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$

FONTE: A autora (2016).

As variações encontradas para as concentrações do inóculo são decorrentes da padronização da turbidez por leitura visual da escala de Mc Farland. No entanto, tais variações não interferiram nos resultados obtidos e, como o inóculo sempre foi contado antes do início dos experimentos, tratou-se de uma variação controlada e de menor intensidade.

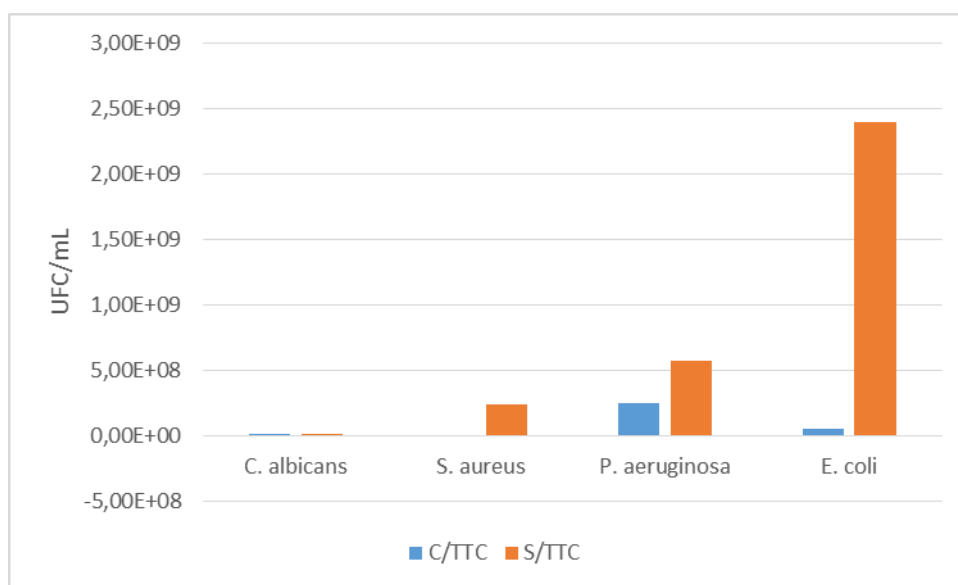
5.2 TESTES DE TOXICIDADE DO TTC

O emprego do TTC como indicador de crescimento microbiano é de grande importância para auxiliar as leituras visuais e possibilitar a leitura espectrofotométrica na região do visível tendo em vista que ao ser reduzido transforma-se em um composto colorido.

Levando em consideração que há grande variação nas concentrações de TTC utilizadas em ensaios de microdiluição para determinação da CIM (ver Tabela 1, p. 31), e também relatos de toxicidade deste composto (RAHMAN et al., 2004), foram realizados testes de toxicidade para definir qual deveria ser a concentração efetiva e com toxicidade irrelevante a ser utilizada no método.

Foram realizados dois diferentes ensaios de toxicidade. O primeiro foi executado para verificar se havia influência no crescimento dos microorganismos com a adição do TTC 0,5 % antes e após um período de 22 horas de incubação para bactérias e 48 horas para *C. albicans*, estando os resultados representados nas Figuras 3, 4 e 5. O segundo teste, cujos resultados são apresentados nas Figuras 6 e 7, foi realizado para verificar se variações na concentração 0,75%, 0,5% e 0,125%, interferem na toxicidade e também na coloração desenvolvida após a redução do TTC.

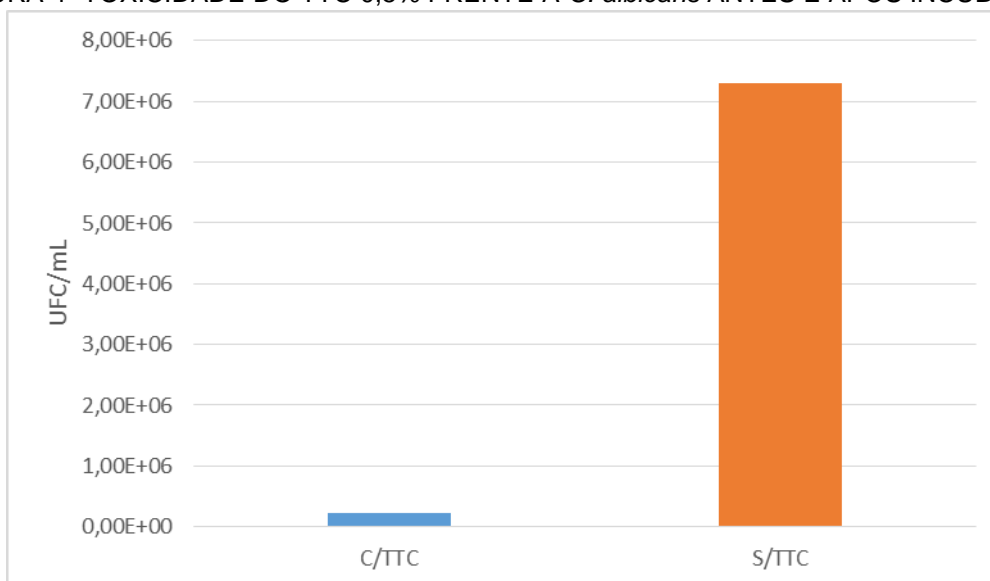
FIGURA 3- TESTE DE TOXICIDADE DO TTC 0,5 % ANTES E APÓS INCUBAÇÃO



FONTE: A autora (2016).

NOTA: C/TTC refere-se a adição do TTC prévia a incubação e S/TTC refere-se a adição do TTC posterior com incubação por mais 2 horas.

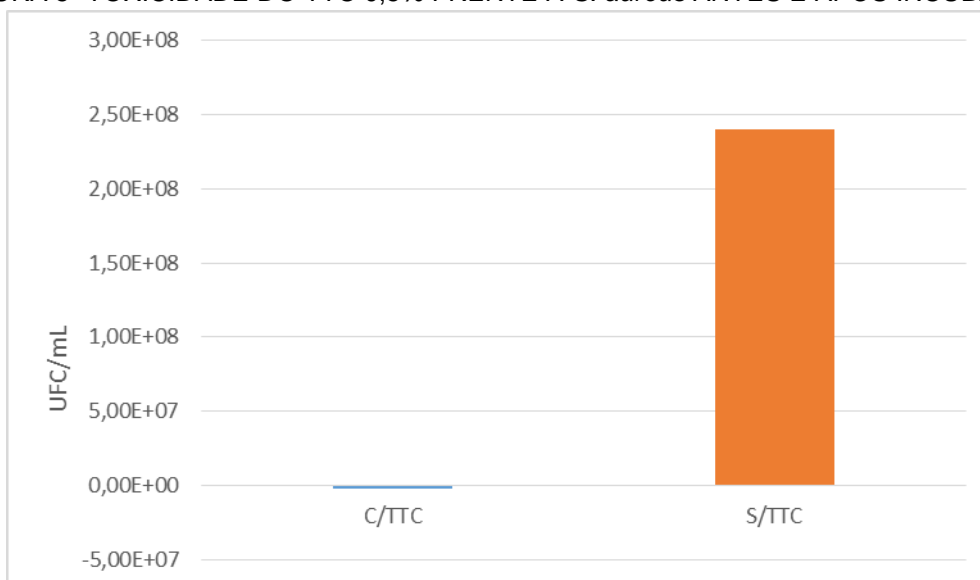
FIGURA 4- TOXICIDADE DO TTC 0,5% FRENTE À *C. albicans* ANTES E APÓS INCUBAÇÃO



FONTE: A autora (2016).

NOTA: C/TTC refere-se a adição do TTC prévia a incubação e S/TTC refere-se a adição do TTC posterior com incubação por mais 2 horas.

FIGURA 5- TOXICIDADE DO TTC 0,5% FRENTE À *S. aureus* ANTES E APÓS INCUBAÇÃO



FONTE: A autora (2016).

NOTA: C/TTC refere-se a adição do TTC prévia a incubação e S/TTC refere-se a adição do TTC posterior com incubação por mais 2 horas.

Ao observar as Figuras 3, 4 e 5, sugere-se que o TTC apresentou toxicidade ao ser adicionado antes do período total de incubação (24 horas para bactérias e 48 horas para a levedura) quando comparado com a adição após 22 horas de incubação e deixado em contato com os micro-organismos por apenas 2 horas.

Essa constatação é muito mais evidente ao comparar os resultados de crescimento do *S. aureus* (Figura 5), que é o micro-organismo que apresentou maior sensibilidade à toxicidade do TTC.

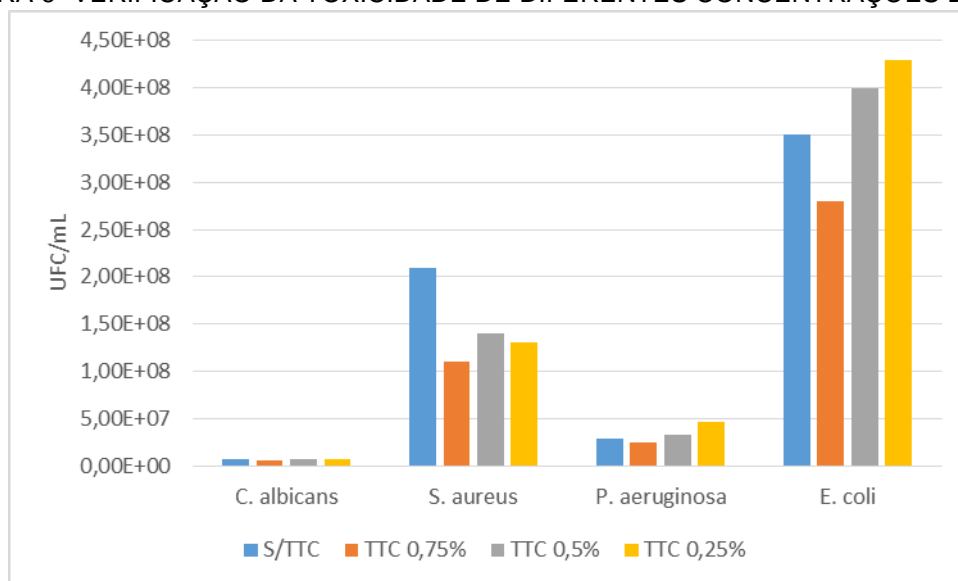
Houve a necessidade de apresentar os dados de *C. albicans* e *S.aureus* separadamente (Figuras 4 e 5) devido à escala da Figura 3, que não permite a visualização da diferença de crescimento para *C. albicans* com a adição prévia e posterior do TTC e não permite visualizar a barra que demonstra morte celular do *S. aureus* ao ficar em contato com a solução de TTC 0,5% por 24 horas. Esses dados de crescimento e/ou morte celular foram calculados como a diferença do número de UFC/mL presentes previamente à incubação dos tubos e após o período total de incubação.

O resultado apresentado demonstrou que a adição do TTC deveria ser realizada somente após o período prévio de incubação de 22 horas. O contato do TTC com os micro-organismos por um tempo de 2 horas, foi suficiente para o desenvolvimento de coloração rosa perceptível a olho nú.

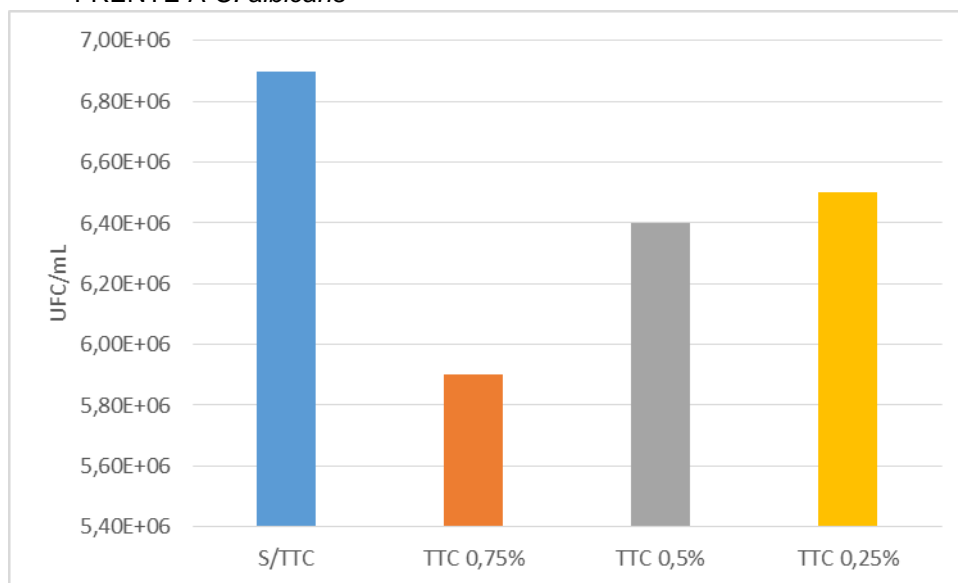
Foram então testadas diferentes concentrações do TTC (0,75%, 0,5% e 0,25%) adicionadas após 22 horas de incubação para as bactérias e 46 horas de incubação para a levedura e, após, comparadas com o crescimento dos micro-organismos sem a adição do TTC. Os resultados deste segundo experimento apresentam-se nas Figuras 6 e 7.

Ao observar as Figuras 6 e 7 é possível perceber que a concentração de TTC 0,75 % foi a mais tóxica para todos os micro-organismos. Os dados de *C. albicans* são apresentados isolados na Figura 7 devido ao impedimento da visualização das diferenças no crescimento entre as concentrações de TTC utilizadas e a não utilização do TTC, decorrentes do tamanho da escala da Figura 6.

FIGURA 6- VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO TTC



FONTE: A autora (2016).

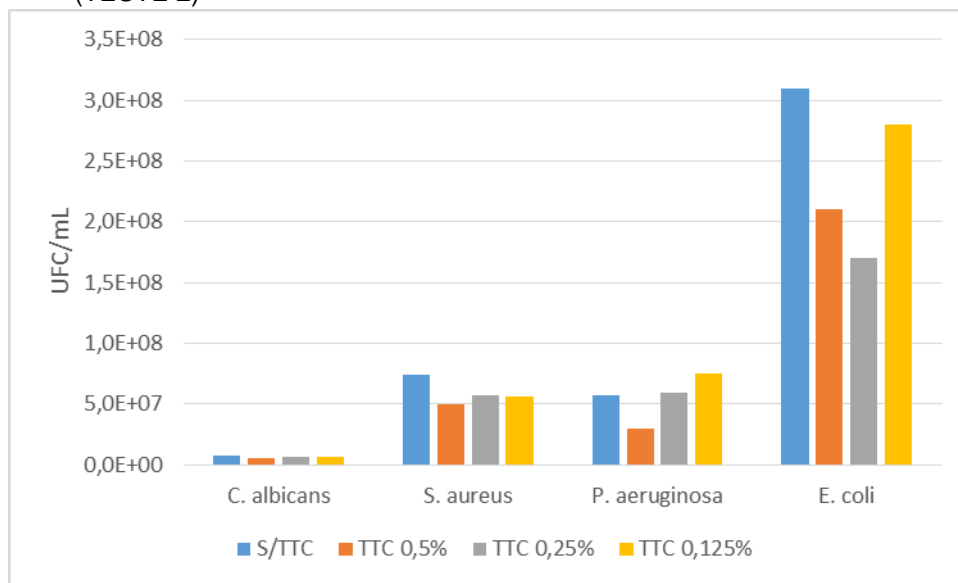
FIGURA 7- VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO TTC FRENTE À *C. albicans*

FONTE: A autora (2016).

Após verificar que uma maior concentração do TTC (0,75%) provocou maior toxicidade, testou-se uma concentração ainda menor de TTC (0,125%). Nas Figuras 8 e 9 apresentam-se os resultados da adição de diferentes concentrações do TTC (0,5%, 0,25% e 0,125%) após 22 horas de incubação à 35°C.

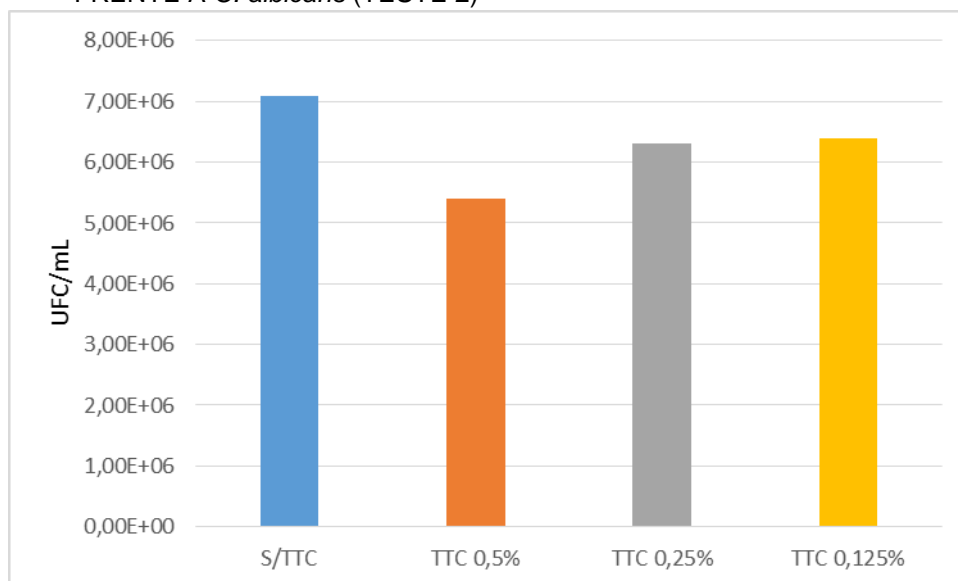
Novamente os dados de *C. albicans* foram apresentados isoladamente na Figura 9 para facilitar a visualização das diferenças de crescimento.

FIGURA 8- VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO TTC (TESTE 2)



FONTE: A autora (2016).

FIGURA 9- VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO TTC FRENTE À *C. albicans* (TESTE 2)



FONTE: A autora (2016).

Observando as Figuras 8 e 9 é possível verificar que a concentração menos tóxica para os micro-organismos foi a menor concentração testada (0,125%).

A concentração menos tóxica se aproxima da concentração utilizada por Eloff (1998), que determinou que a menor concentração efetiva para o TTC foi de 2 mg/mL (0,2%). Rahman e colaboradores (2004) definiram que a concentração a ser usada em seus ensaios deveria ser de 0,005 %. Contudo, o

TTC era adicionado previamente à placa e, após a evaporação da água, adicionava-se o meio de cultura que já continha o inóculo diluído.

Gabrielson e colaboradores (2002) afirmaram que é desejável minimizar a concentração do indicador, pois ele pode interferir no crescimento bacteriano e, igualmente, interagir com outros componentes adicionados ao meio de crescimento, como os compostos a serem testados. Porém, também afirmam que um pequeno excesso é necessário para que o indicador não se torne um fator limitante para o desenvolvimento da coloração.

No presente método adicionamos o TTC após incubação dos micro-organismos e demonstra-se nas Figuras 3, 4 e 5 (p.47 e 48) que a adição do TTC, após incubação, tem um efeito menos tóxico para os micro-organismos. Com isso, e também levando em consideração que a coloração vermelha é dependente de três variáveis (o número de micro-organismos metabolicamente ativos, a concentração de TTC utilizada e o tempo de contato entre o TTC e os micro-organismos), justifica-se, em comparação à concentração utilizada por Rahman et. al (2004) que foi de 0,005%, a utilização, no presente método, de uma maior concentração de TTC (0,125%), quando este é adicionado após 22 horas de incubação, ficando em contato com os micro-organismos somente por duas horas antes das leituras.

5.3 ESTUDO PRELIMINAR EM TUBOS (MACRODILUIÇÃO)

A fim de delinear com clareza os experimentos a serem realizados nas microplacas de 96 poços, realizou-se um pré-desenvolvimento do método em tubos, levando em consideração a facilidade de trabalhar e visualizar a redução do TTC e também a turbidez decorrente do crescimento microbiano em maiores volumes. Foram realizadas curvas de crescimento por meio da diluição seriada dos antimicrobianos cloranfenicol e cetoconazol e foi testada a adição de soluções de TTC com diferentes concentrações (0,5%, 0,25% e 0,125%) a fim de verificar a sensibilidade do TTC frente aos micro-organismos.

Com as leituras visuais percebeu-se que a coloração do TTC é proporcional ao número de micro-organismos metabolicamente ativos, ao tempo de incubação na presença do TTC e também à concentração do TTC.

No entanto, esses dois últimos aspectos são limitados pela toxicidade do TTC principalmente para *S. aureus* e *C. albicans*.

Na Figura 10 apresentam-se as fotos das curvas de crescimento dos quatro micro-organismos onde é possível visualizar o gradiente de coloração demonstrando a proporcionalidade entre o número de células viáveis e a quantidade de formazano desenvolvido.

Na Figura 10 (D) apresenta-se uma curva de crescimento de *Candida albicans*, cuja incubação foi realizada à 25°C/46 horas. Após esse período adicionou-se a solução de TTC e os tubos foram re-incubados por mais duas horas. No entanto, não foi possível visualizar o aparecimento de coloração rosa proveniente da redução do TTC, mas somente uma turvação nos tubos com crescimento, até mesmo no tubo controle negativo.

Em decorrência dessa falta de redução do TTC realizou-se outro experimento incubando-se os tubos a 35°C, da mesma maneira que as bactérias, a fim de acelerar o metabolismo das leveduras. E o resultado apresenta-se na Figura 10 (E), cujo detalhe apresentado na Figura 10 (F) demonstra que ao incubar a 35°C o desenvolvimento de coloração rosa proveniente do formazano ocorre. Por esse motivo os demais experimentos com *C. albicans* foram realizados com incubação a 35°C/ 22 horas, seguido da adição do TTC e re-incubação por mais 2 horas, da mesma maneira que foram incubadas as bactérias.

Devido ao aumento da temperatura de incubação e, portanto, do metabolismo das leveduras, foi necessário aumentar também a concentração do cetoconazol utilizado para fazer a curva, de 100 µg/mL para 1000 µg/mL, pois ao utilizar a concentração de 100 µg/mL não havia inibição do crescimento das leveduras em nenhum dos tubos.

FIGURA 10- CURVAS DE CRESCIMENTO EM TUBOS COM TTC 0,125%: A) *S. aureus*; B) *E.coli*; C) *P.aeruginosa*; D) *C. albicans* (25°C); E) *C. albicans* (35°C); F) DETALHE DEPOSIÇÃO DO FORMAZANO AO FUNDO DOS TUBOS DE *C. albicans* (35°C)



FONTE: A autora (2016).

Verificou-se que a utilização de TTC 0,125 % não causa prejuízo na sensibilidade do método, sendo possível determinar a CIM dos antimicrobianos independentemente da concentração de TTC utilizada. E em decorrência desta associação de baixa toxicidade e boa sensibilidade, esta foi a concentração de revelador escolhida para a realização dos ensaios e validação do método.

5.3.1 Determinação do comprimento de onda a ser utilizado

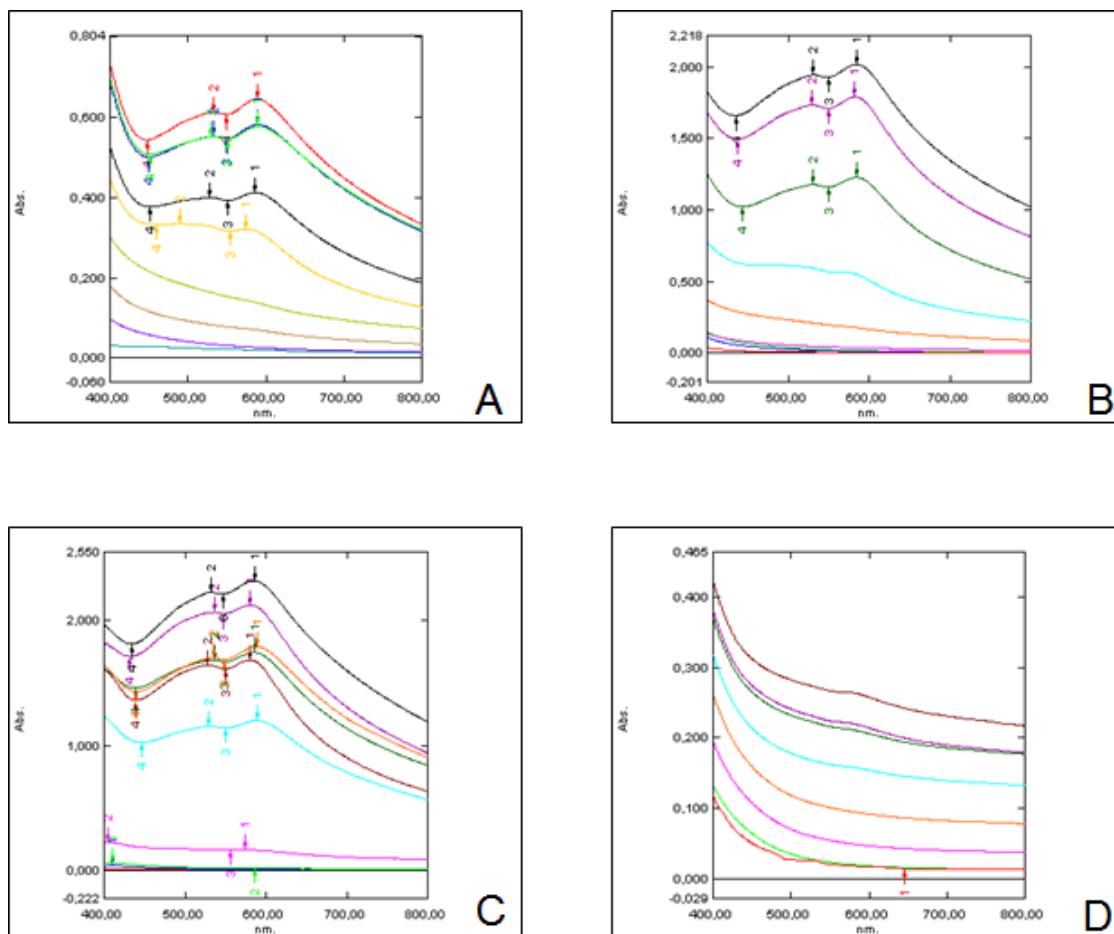
A região de espectro visível situa-se entre aproximadamente 400 e 750 nm e a radiação eletromagnética com comprimentos de onda entre esses

limites é visualizada de forma colorida ao olho humano. Portanto, se uma substância absorve luz na região do visível ela terá cor ao ser visualizada por olhos humanos. No entanto, a cor visualizada será o resultado da luz refletida pelo objeto, ou seja, será o complemento da luz absorvida (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ, 1996).

Levando em consideração que o TTC é reduzido à formazano, de coloração vermelho à púrpura, na presença de micro-organismos viáveis, varreduras em espectrofotômetro foram realizadas na faixa do visível (400 a 800 nm) com o intuito de verificar qual seria o comprimento de onda com absorção adequada para as leituras dos tubos contendo TTC na presença de diferentes concentrações de micro-organismos viáveis. O comprimento de onda de 540 nm foi escolhido em função dos resultados apresentados na Figura 11 concordando com os resultados apresentados na literatura de leituras neste comprimento de onda (RAHMAN et al., 2004; GABRIELSON et al., 2002).

Ao observar a Figura 11, pode-se perceber que os espectros de absorção foram muito parecidos para os três tipos de bactérias (11 A, B e C). Percebe-se também uma grande influência do formazano do TTC na absorção, pois as linhas que ficaram mais próximas da linha de base, ou seja, com baixa absorção, são correspondentes aos tubos com maior concentração de antimicrobiano que não permitiu a proliferação dos micro-organismos e, conseqüentemente, impediu a redução do TTC.

FIGURA 11- ESPECTROS DE ABSORÇÃO OBTIDOS POR VARREDURA EM ESPECROFOTÔMETRO NA FAIXA DO VISÍVEL (400-800nm) DE TUBOS CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MICRO-ORGANISMOS NA PRESENÇA DE TTC 0,125%: A) *S. aureus*; B) *E. coli*; C) *P. aeruginosa*; D) *C. albicans*



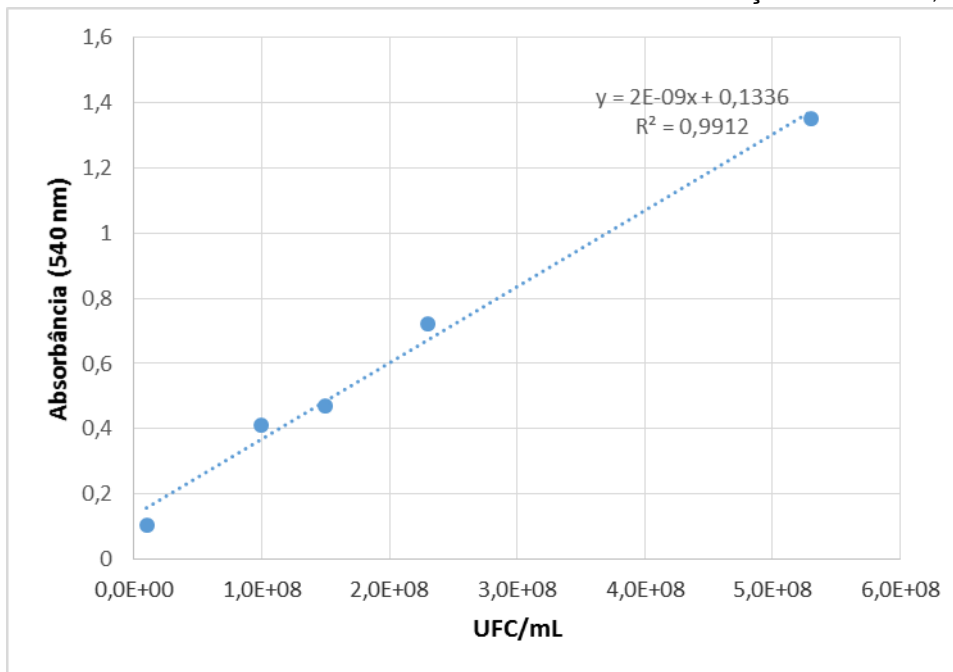
FONTE: A autora (2016).

Com relação aos experimentos realizados com *C. albicans* (Figura 11 D), não foi possível visualizar um espectro semelhante ao das bactérias tendo em vista que o TTC não sofreu tanta redução. Apesar de haver crescimento microbiano com formação de biomassa de coloração rosa depositada no fundo dos tubos (Figura 10 F), ao agitar os tubos em que houve crescimento formou-se coloração rosa muito fraca, praticamente imperceptível visualmente. Portanto, devido à ausência da coloração rósea à púrpura que leva a maior absorção em comprimentos de onda mais elevados (500 – 600 nm), não foi possível obter um espectro como os das bactérias. Isso demonstra a grande importância do TTC na seletividade do método, tendo em vista que nestes comprimentos de onda mais próximos do ultravioleta há uma maior absorção das substâncias incolores e, portanto, menor seletividade.

5.3.2 Curvas de crescimento em tubos

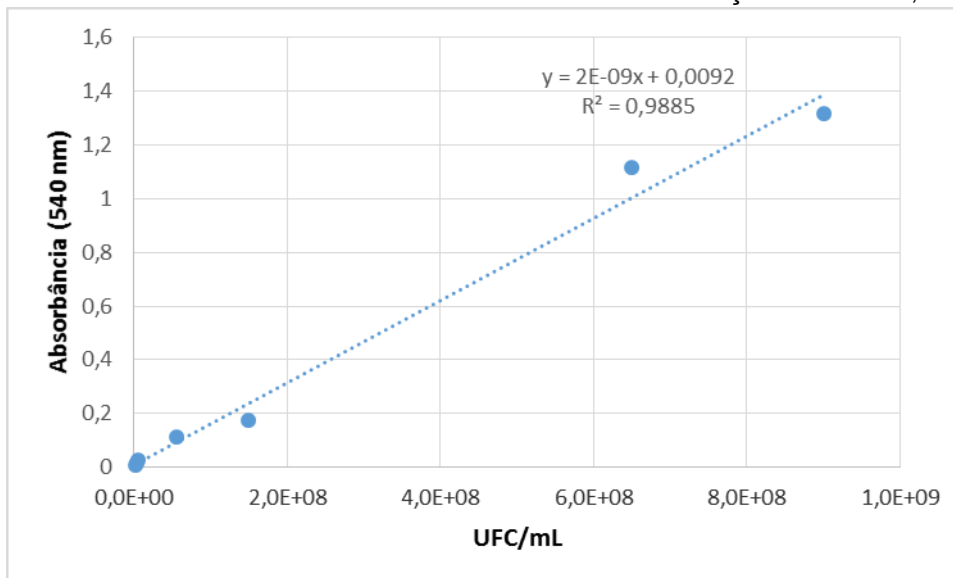
As curvas de crescimento que correlacionam a absorbância com o número de micro-organismos (UFC/mL) apresentam-se nas Figuras 12 à 15.

FIGURA 12- CURVA DE CRESCIMENTO DE *S. aureus* COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%

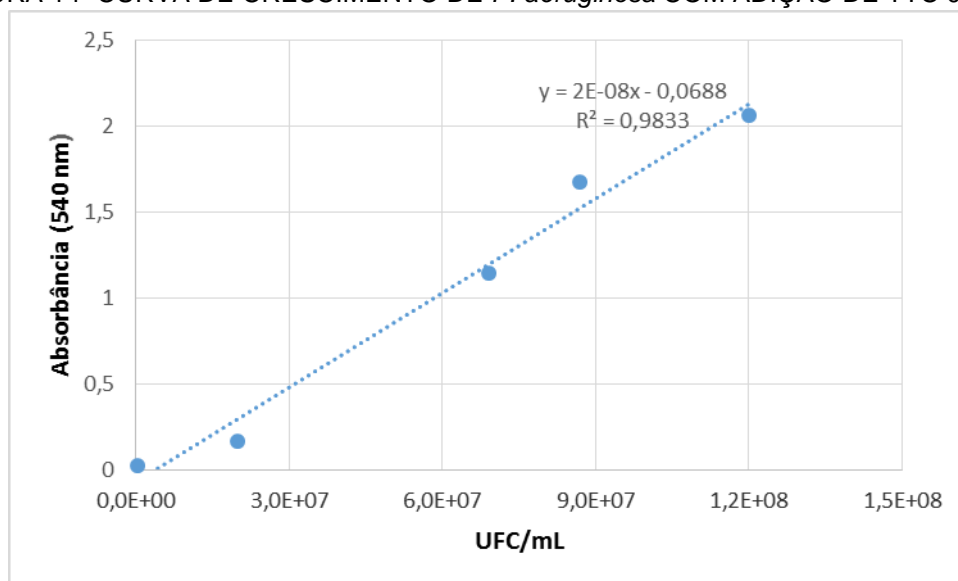


FONTE: A autora (2016).

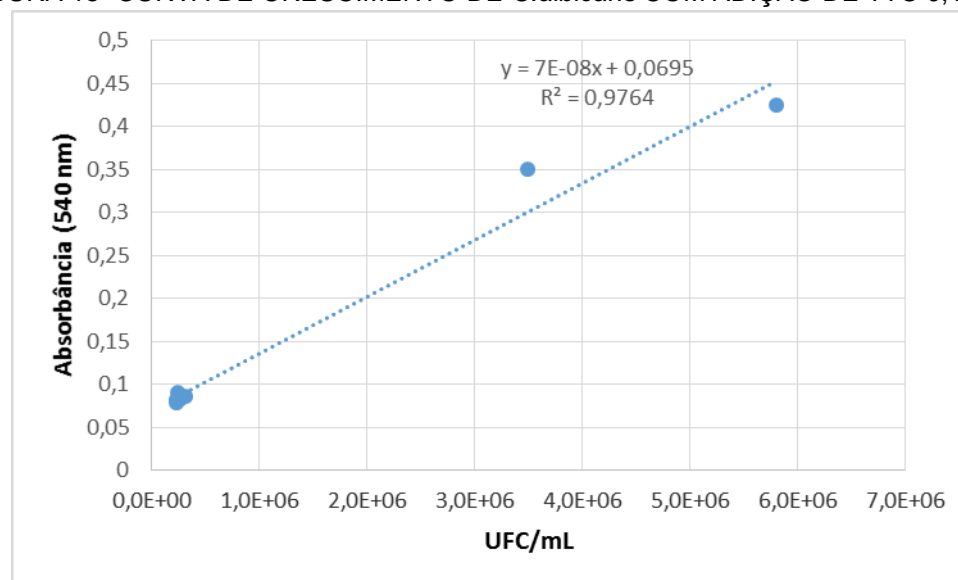
FIGURA 13- CURVA DE CRESCIMENTO DE *E. coli* COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%



FONTE: A autora (2016).

FIGURA 14- CURVA DE CRESCIMENTO DE *P. aeruginosa* COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%

FONTE: A autora (2016).

FIGURA 15- CURVA DE CRESCIMENTO DE *C.albicans* COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%

FONTE: A autora (2016).

Ao observar os gráficos apresentados nas Figuras 12 à 15 percebe-se que há uma correlação linear entre o número de micro-organismos e a absorbância em 540 nm para as quatro espécies. O quadrado do coeficiente de correlação R^2 atende ao especificado pela Farmacopeia Americana (USP 37) e também preconizado na consulta pública nº45, de 02 de julho de 2014, que já está em fase de ser implementada na Farmacopeia Brasileira.

De acordo com a USP 37 e a consulta pública nº 45, o valor de R^2 para Métodos Microbiológicos deve ser $\geq 0,95$. Tal linearidade demonstra também que as leituras em 540 nm são ideais para o método.

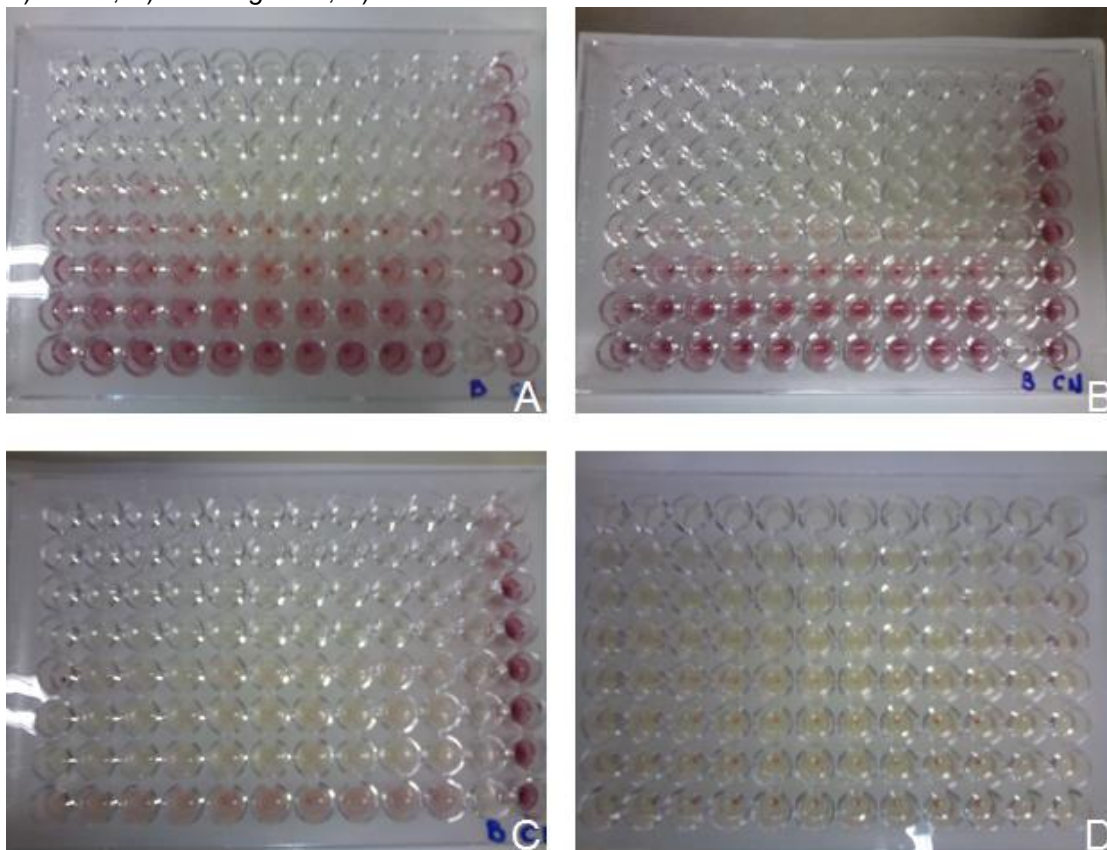
De acordo com Moussa et al. (2013), ao ser reduzido na presença de bactérias, o TTC forma um composto de coloração vermelha que é diretamente proporcional à quantidade de células ativas. Este fato foi confirmado tendo em vista que o aumento na absorção foi proporcional ao número de micro-organismos viáveis e à intensidade na coloração rosa.

A intensidade da coloração pôde ser percebida tanto visualmente quanto no formato do espectro obtido, pois os tubos que não desenvolveram coloração rosa devido à atividade bacteriostática do cloranfenicol apresentaram um espectro praticamente linear e próximo à linha de base, como pode ser visualizado nos três espectros da Figura 11 A, B e C (p. 56). Os tubos nos quais houve crescimento da população bacteriana e, portanto, redução do TTC, apresentaram um espectro com duas bandas de absorção características que também podem ser observadas nos três espectros da Figura 11 A, B e C (p.56). Para *C. albicans* não foi possível visualizar as bandas de absorção características na Figura 11 (D). Contudo, é possível visualizar uma elevação na intensidade da coloração decorrente do aumento da absorção dos espectros conforme a concentração de cetoconazol diminui.

5.4 ENSAIOS DE MICRოდILUIÇÃO

Os ensaios de microdiluição foram padronizados e realizados a fim de que o método pudesse ser validado. Na Figura 16 apresentam-se os experimentos realizados que também foram utilizados para a validação do método. Foram utilizadas: uma placa por micro-organismo com 10 replicatas para cada concentração de antimicrobiano; 8 replicatas de branco (penúltima coluna), utilizado para “zerar” a absorbância; e 8 replicatas de controle negativo (última coluna), onde deve haver o crescimento dos micro-organismos, como pode ser visualizado nas 4 placas da Figura 16. Os resultados das médias das contagens em placas dos micro-organismos após diluição seriada apresentam-se na Tabela 4.

FIGURA 16- CURVAS DE CRESCIMENTO EM PLACA COM TTC 0,125%: A) *S. aureus*; B) *E. coli*; C) *P. aeruginosa*; D) *C. albicans*



FONTE: A autora (2016).

É possível observar na Figura 16 (A, B e C) que o desenvolvimento de coloração é mais intenso para as bactérias quando comparado à levedura *C. albicans* (Figura 16 D). E mesmo entre as bactérias foi possível observar que a intensidade da redução do TTC é diferente. E é por esse motivo que foram construídas curvas individuais de correlação entre a absorbância e a concentração (UFC/mL), para cada micro-organismo testado.

Após as leituras visuais foram realizadas também leituras espectrofotométricas. E apesar de Eloff (1998) ter argumentado que tentativas de determinação da turbidez de microculturas com leitor de microplacas falharam, tendo em vista que alguns micro-organismos se aglomeraram no fundo do poço da placa e outros permaneceram em suspensão (ELOFF, 1998). Estudos mais recentes realizados com leituras em espectrofotômetro e em scanner apresentaram bons resultados (GABRIELSON et al., 2002; RAHMAN et al., 2004).

Atualmente existem leitores de microplacas que realizam a agitação da placa imediatamente antes da leitura, o que permite certa dispersão dos micro-organismos que se depositam no fundo dos poços. E embora esse depósito possa ocorrer, ainda haverá passagem de luz inversamente proporcional à espessura da camada de micro-organismos presentes, permitindo, assim, uma correlação da absorbância com o número de UFC/mL.

De acordo com Gabrielson e colaboradores (2002), o formato e a coloração do "*pellet*" podem variar de acordo com o micro-organismo e com o revelador utilizados. Por esta razão é importante que se padronize o revelador a ser usado e que se analise separadamente cada um dos micro-organismos.

Também foi reportado por Eloff (1998) que a precipitação de componentes presentes nos extratos de determinadas plantas e até mesmo a forte coloração verde de alguns extratos em altas concentrações causaram problemas (ELOFF, 1998). Esta efetivamente é uma limitação do método, tendo em vista que compostos que precipitem ou formem emulsão, como por exemplo, óleos que levam à turvação do meio, podem causar uma interpretação errônea de um falso crescimento pelo aumento da absorbância. No entanto, deve-se analisar cada caso, pois a utilização de poços de controle como "branco" pode resolver estes problemas em algumas situações.

Nos casos descritos anteriormente, em que nem mesmo com o ajuste do branco a leitura espectrofotométrica não é confiável, ainda é possível determinar a CIM dos compostos frente aos micro-organismos testados através da leitura visual, sendo comprometida somente a correlação entre a absorbância e o número de UFC/mL presentes em cada poço. Neste caso de leitura visual, somente não poderá efetivamente ser determinada a CIM de compostos que apresentem coloração semelhante à do formazano resultante da redução do TTC.

TABELA 4- MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE MICRO-ORGANISMOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS, OBTIDAS POR CONTAGENS EM PLACAS

Antimicrobianos* ($\mu\text{g/mL}$)	<i>S.aureus</i> (UFC/mL)	<i>E.coli</i> (UFC/mL)	<i>P.aeruginosa*</i> (UFC/mL)	<i>C. albicans*</i> (UFC/mL)
50	$2,1 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$2,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$
25	$4,4 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6$	$3,1 \times 10^3$	$7,8 \times 10^2$
12,5	$6,1 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$	$3,9 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$
6,25	$2,8 \times 10^7$	$5,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10^5$
3,12	$1,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$3,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$
1,56	$1,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$
0,78	$1,8 \times 10^8$	$7,6 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$
0,39	$2,5 \times 10^8$	$8,5 \times 10^8$	$6,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$

FONTE: A autora(2016).

NOTA: * As concentrações para *P. aeruginosa* e *C.albicans* são 10 vezes maior.

Os valores obtidos pelas contagens em placas cujas médias são apresentadas na Tabela 4, foram utilizados para a construção das curvas de crescimento utilizadas para verificar a linearidade do método, que também resultaram em equações da reta que permitiram a transformação de valores de absorbância (Y) em concentração de micro-organismos viáveis (X). E ainda, esses valores provenientes das contagens em placas foram necessários para verificar a exatidão do método em converter absorbâncias em UFC/mL.

5.4.1 Validação do Método

Após todo o delineamento do método por ensaios em tubos, foram realizados os ensaios em microplacas. Para a *P. aeruginosa* a grande alteração na escala de trabalho levou à modificação de um parâmetro específico, que foi a concentração do cloranfenicol utilizada para a inibição do

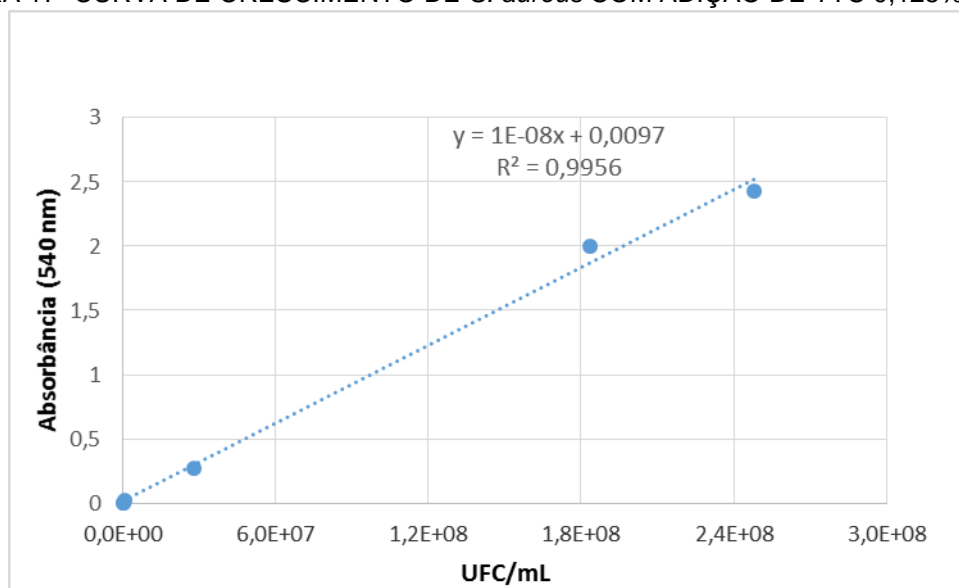
seu crescimento, pois para o ensaio de microdiluição a utilização de 3000 µg/mL de cloranfenicol era muito elevada e inibia demasiadamente a proliferação microbiana, não permitindo a realização da curva de crescimento. Por essa razão, a concentração utilizada nos ensaios de microdiluição para *P. aeruginosa* passou a ser de 1000 µg/mL.

Essa “resistência” apresentada nos ensaios de macrodiluição pode ser explicada tendo em vista que as espécies de *P. aeruginosa* são conhecidamente formadoras de biofilmes, que são mediados por uma comunicação (quórum sensing) entre as bactérias, e que pode levar a um aumento da resistência desses micro-organismos. Quanto maior a quantidade de células, maiores a comunicação e o biofilme e, conseqüentemente, a resistência também aumenta (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009; ROY, ADAMS, BENTLEY, 2011).

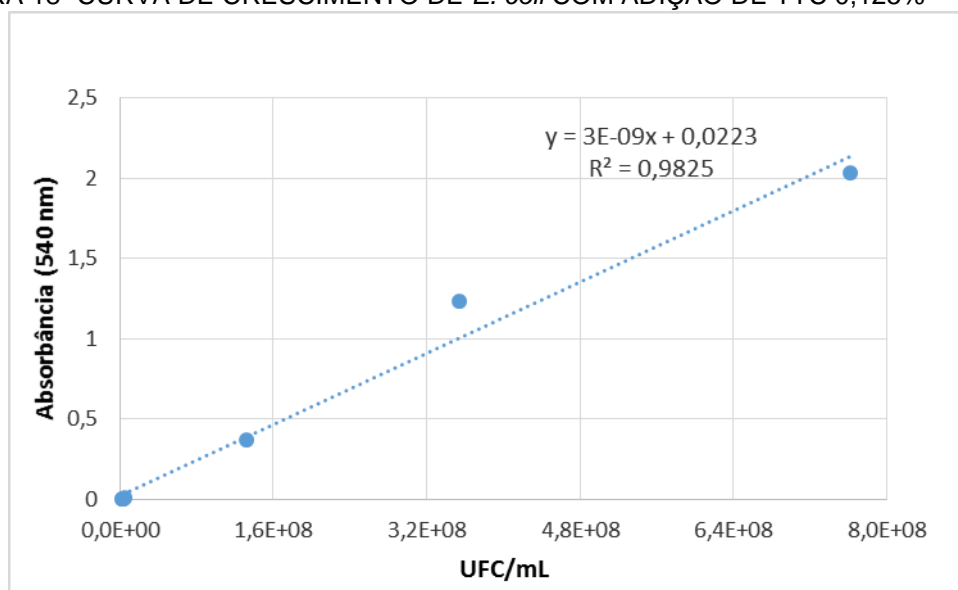
Para os demais micro-organismos, exceto a variação do volume para uma escala menor, não houve outras alterações e, portanto, seguiu-se o que foi delineado nos ensaios de macrodiluição. Na Figura 16 apresentam-se os experimentos realizados para a validação do método, para os quais foram utilizadas: uma placa por micro-organismo com 10 replicatas para cada concentração de antimicrobiano; 8 replicatas de branco (penúltima coluna), utilizado para “zerar” a absorbância; e 8 replicatas de controle negativo (última coluna), onde deve haver o crescimento dos micro-organismos.

5.4.1.1 Linearidade

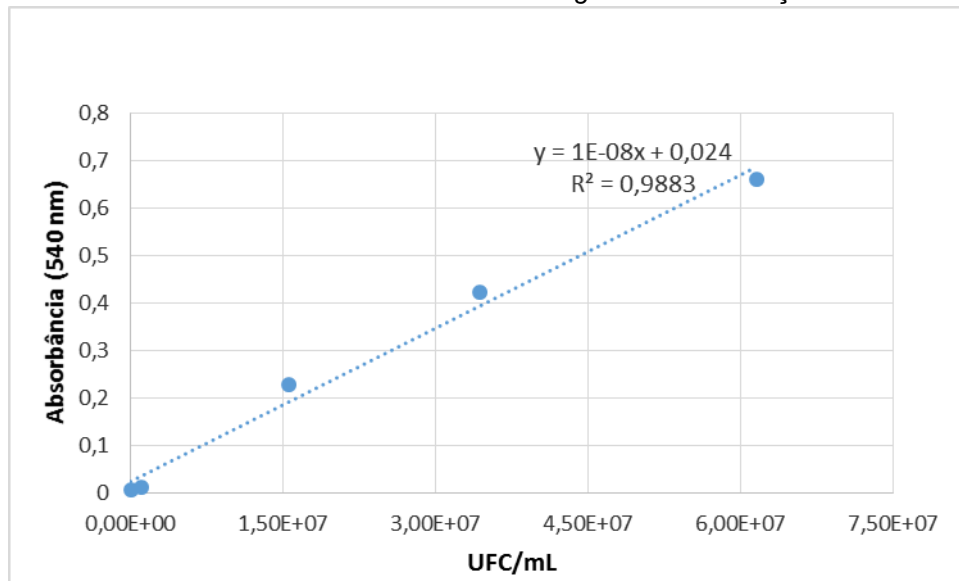
De acordo com a Farmacopeia Americana (USP 37), o valor do quadrado do coeficiente de correlação, R^2 , deve ser maior ou igual a 0,95. Este valor mínimo também é exigido pela Consulta Pública n.45 de 2014. E de acordo com as Figuras 17, 18, 19 e 20, é possível visualizar que todos os micro-organismos apresentam uma ótima linearidade, com valores de R^2 acima do preconizado. Nas figuras onde não é possível visualizar 5 pontos separadamente, ocorre sobreposição de pontos sobre o primeiro, pois apesar de serem valores diferentes a escala é muito grande e não permitiu a diferenciação, em alguns casos, entre os primeiros valores que são de contagens bem inferiores.

FIGURA 17- CURVA DE CRESCIMENTO DE *S. aureus* COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%

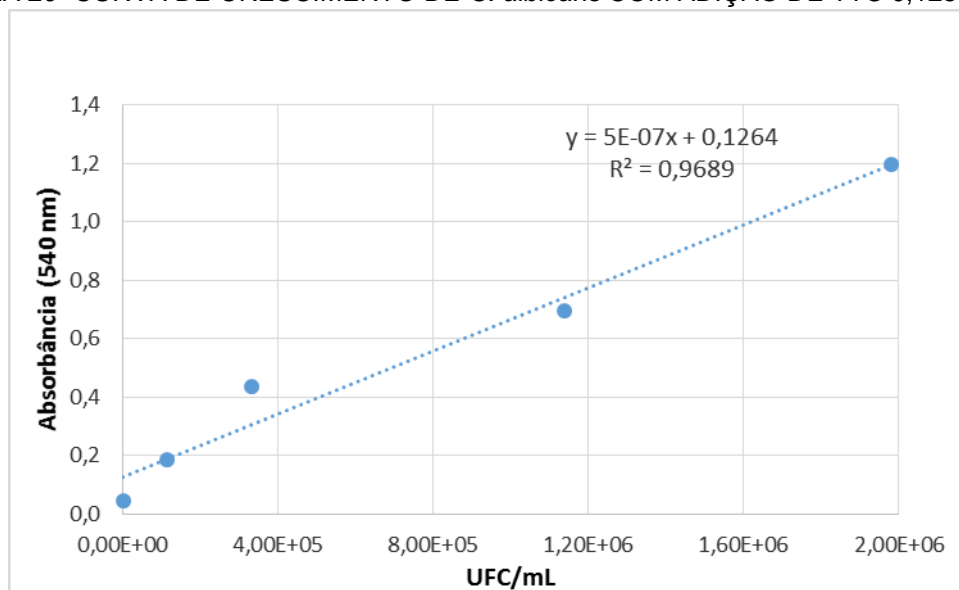
FONTE: A autora (2016).

FIGURA 18- CURVA DE CRESCIMENTO DE *E. coli* COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%

FONTE: A autora (2016).

FIGURA 19- CURVA DE CRESCIMENTO DE *P. aeruginosa* COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%

FONTE: A autora (2016).

FIGURA 20- CURVA DE CRESCIMENTO DE *C. albicans* COM ADIÇÃO DE TTC 0,125%

FONTE: A autora (2016).

As equações da reta apresentadas nas Figuras 17 à 20, são de fundamental importância para a transformação dos valores de absorbância em UFC/mL e, portanto, são utilizadas para a avaliação dos demais parâmetros de validação do método e, também, para a determinação da CIM e da $CI_{50\%}$ e $CI_{90\%}$.

5.4.1.2 Especificidade

A especificidade do método pode ser demonstrada tanto por meio das leituras visuais, observando-se o desenvolvimento de coloração decorrente da

redução do TTC na presença de micro-organismos viáveis quanto por meio de leituras espectrofotométricas, como nos espectros presentes na Figura 11 (p.56), onde é possível perceber que, quanto maior a concentração de formazano, maior a absorção a 540 nm.

Conforme já discutido, nos ensaios realizados em tubos (macrodiluição), percebe-se que há micro-organismos como a *C. albicans* que reduzem o TTC com menor intensidade e ainda existem micro-organismos que não são capazes de reduzir o TTC (BELOTI et al, 1999). Portanto, a especificidade do método está baseada na redução do TTC a formazano vermelho e na absorção da coloração vermelha em 540nm.

Percebe-se, ainda, que o método apresenta uma boa especificidade ao observar desenvolvimento de coloração somente na presença de micro-organismos redutores de TTC com atividade metabólica ativa. Pois, nos poços onde há inibição do crescimento dos micro-organismos decorrente da ação dos antimicrobianos, como nos poços de controle positivo e poços teste com maior concentração de antimicrobianos, não há desenvolvimento de coloração. Bem como nos poços de branco, onde não há micro-organismos presentes e portanto pode-se afirmar não haver redução do TTC em decorrência dos demais componentes presentes.

5.4.1.3 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base nas curvas de crescimento utilizando-se as equações recomendadas pelo ICH (2005), as quais foram apresentadas na seção material e métodos. Os resultados apresentam-se na Tabela 5:

TABELA 5- LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, e *C. albicans*

Micro-organismos	Limite de Detecção (UFC/mL)	Limite de Quantificação (UFC/mL)
<i>S. aureus</i>	$1,7 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$
<i>E. coli</i>	$2,9 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$
<i>P. aeruginosa</i>	$2,0 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$
<i>C. albicans</i>	$2,4 \times 10^5$	$7,2 \times 10^5$

FONTE: A autora (2016).

Os limites de detecção e quantificação são próximos entre si para cada micro-organismo, porém, são elevados quando comparados à técnica de contagem em placas. Entretanto, isso não é uma falha do método e ocorre tendo em vista que, no presente método, adiciona-se uma concentração inicial de micro-organismos notadamente alta (Tabela 3, p.46) e, portanto, a concentração de micro-organismos detectados deve ser próxima à do número de micro-organismos que foram inoculados. É importante ressaltar que o inóculo acaba sendo diluído aproximadamente 10 vezes ao ser adicionado aos poços contendo meio de cultura e o composto a ser testado, pois o volume do inóculo corresponde a 10 % do volume total.

Ao considerar que a técnica utilizada para determinar a CIM de compostos bactericidas e bacteriostáticos baseia-se em leituras espectrofotométricas, deve-se levar em consideração que, por mais que os micro-organismos inoculados possam ter sido mortos pela ação do antimicrobiano que está sendo testado, ainda assim haverá impedimento da passagem de luz pelas células mortas presentes e, portanto, o limite de quantificação deve ser próximo do número de micro-organismos adicionados inicialmente.

Ao observar as contagens iniciais dos inóculos utilizados para os experimentos de validação, a concentração inicial aproximada de micro-organismos presentes em cada um dos orifícios da placa, exceto nos poços branco, foi de: $1,5 \times 10^6$ UFC/mL para *S. aureus*; $8,5 \times 10^6$ UFC/mL para *E. coli*; $4,0 \times 10^6$ UFC/mL para *P. aeruginosa*; e $1,0 \times 10^5$ UFC/mL para *C. albicans*. Percebe-se que os valores dos limites de detecção e de quantificação estão próximos aos das concentrações dos respectivos micro-organismos presentes nos poços onde houve inibição do crescimento.

Os valores do limite de quantificação só não são mais próximos da quantidade inicial de micro-organismos porque o comprimento de onda utilizado para leitura (540 nm) é específico para absorção de compostos coloridos. No mais, nos poços onde não há crescimento microbiano suficiente para promover a redução do TTC não há desenvolvimento de coloração rosa e, portanto, a absorção é demasiadamente menor quando comparada com os poços onde há formação do formazano colorido.

Essa ampla diferença leva à inexatidão na determinação do número de micro-organismos presentes nos poços onde não há desenvolvimento de coloração (UFC/mL), elevando o limite de quantificação.

5.4.1.4 Precisão

Este parâmetro indica o grau de concordância entre os resultados de testes individuais ao aplicar o procedimento repetidamente. Geralmente o resultado é expresso como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) dos resultados obtidos. Valores menores que 30% para o coeficiente de variação demonstram uma precisão aceitável para os métodos (BRASIL, 2014).

Os coeficientes de variação obtidos para *S. aureus* foram menores do que 11 %, conforme pode ser observado na Tabela 6. Para *E.coli* os resultados são apresentados na Tabela 7 e os coeficientes de variação foram 10 e 13 %, enquanto que ao analisar os resultados provenientes dos experimentos com *P. aeruginosa* os valores foram aproximadamente 25 %, como pode ser observado na Tabela 8. Para *C. albicans* os resultados obtidos encontram-se na Tabela 9 e ficaram entre 10 e 12 %. Diante desses resultados, pode-se afirmar que o método demonstrou uma boa precisão para os quatro micro-organismos.

Os valores mais elevados de variação ocorreram para *P. aeruginosa* e este fato pode estar correlacionado à característica desta espécie em formar biofilmes. A adesão destes agregados bacterianos às bordas ou à superfície podem causar interferências nas leituras por espectrofotômetro e levar a uma maior variabilidade dos resultados.

No entanto, de acordo com a Farmacopéia Americana (USP 37), valores de desvio padrão relativo até 35 % podem ser considerados aceitáveis. Portanto, apesar de uma maior variação nos experimentos realizados com *P. aeruginosa*, a precisão é boa, pois foi menor do que os limites estabelecidos.

TABELA 6- VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO PARA *S. aureus*

Replicatas	Concentração de Cloranfenicol	
	3,125 µg/mL	0,78 µg/mL
1	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	2,0 x 10 ⁸ UFC/mL
2	1,3 x 10 ⁸ UFC/mL	1,9 x 10 ⁸ UFC/mL
3	1,3 x 10 ⁸ UFC/mL	1,9 x 10 ⁸ UFC/mL
4	1,4 x 10 ⁸ UFC/mL	2,0 x 10 ⁸ UFC/mL
5	1,3 x 10 ⁸ UFC/mL	2,1 x 10 ⁸ UFC/mL
6	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	1,8 x 10 ⁸ UFC/mL
7	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	1,8 x 10 ⁸ UFC/mL
8	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	1,9 x 10 ⁸ UFC/mL
9	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	2,0 x 10 ⁸ UFC/mL
10	1,2 x 10 ⁸ UFC/mL	1,8 x 10 ⁸ UFC/mL
Média	1,2 x 10 ⁸ UFC/mL	1,9 x 10 ⁸ UFC/mL
DPR %	10,4 %	5,9 %

FONTE: A autora (2016).

TABELA 7- VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO PARA *E. coli*

Replicatas	Concentração de Cloranfenicol	
	3,125 µg/mL	0,78 µg/mL
1	1,4 x 10 ⁸ UFC/mL	7,6 x 10 ⁸ UFC/mL
2	1,5 x 10 ⁸ UFC/mL	7,9 x 10 ⁸ UFC/mL
3	1,2 x 10 ⁸ UFC/mL	6,7 x 10 ⁸ UFC/mL
4	1,2 x 10 ⁸ UFC/mL	6,6 x 10 ⁸ UFC/mL
5	1,3 x 10 ⁸ UFC/mL	6,1 x 10 ⁸ UFC/mL
6	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	6,4 x 10 ⁸ UFC/mL
7	1,3 x 10 ⁸ UFC/mL	6,4 x 10 ⁸ UFC/mL
8	1,2 x 10 ⁸ UFC/mL	6,9 x 10 ⁸ UFC/mL
9	1,0 x 10 ⁸ UFC/mL	6,6 x 10 ⁸ UFC/mL
10	1,0 x 10 ⁸ UFC/mL	5,6 x 10 ⁸ UFC/mL
Média	1,2 x 10 ⁸ UFC/mL	6,7 x 10 ⁸ UFC/mL
DPR %	13,0 %	10,1 %

FONTE: A autora (2016).

TABELA 8- VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO PARA *P. aeruginosa*

Replicatas	Concentração de Cloranfenicol	
	31,25 µg/mL	7,8 µg/mL
1	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL	2,9 x 10 ⁷ UFC/mL
2	5,1 x 10 ⁷ UFC/mL	2,2 x 10 ⁷ UFC/mL
3	3,9 x 10 ⁷ UFC/mL	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL
4	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL	4,7 x 10 ⁷ UFC/mL
5	4,4 x 10 ⁷ UFC/mL	3,0 x 10 ⁷ UFC/mL
6	3,0 x 10 ⁷ UFC/mL	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL
7	2,5 x 10 ⁷ UFC/mL	4,7 x 10 ⁷ UFC/mL
8	2,2 x 10 ⁷ UFC/mL	2,9 x 10 ⁷ UFC/mL
9	3,5 x 10 ⁷ UFC/mL	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL
10	3,0 x 10 ⁷ UFC/mL	2,5 x 10 ⁷ UFC/mL
Média	3,4 x 10 ⁷ UFC/mL	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL
DPR %	25,1 %	25,3 %

FONTE: A autora (2016).

TABELA 9- VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO PARA *C. albicans*

Replicatas	Concentração de Cetoconazol	
	31,25 µg/mL	7,8 µg/mL
1	1,1 x 10 ⁶ UFC/mL	1,7 x 10 ⁶ UFC/mL
2	1,3 x 10 ⁶ UFC/mL	1,9 x 10 ⁶ UFC/mL
3	1,3 x 10 ⁶ UFC/mL	2,0 x 10 ⁶ UFC/mL
4	1,4 x 10 ⁶ UFC/mL	2,1 x 10 ⁶ UFC/mL
5	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	2,2 x 10 ⁶ UFC/mL
6	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	2,1 x 10 ⁶ UFC/mL
7	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	1,7 x 10 ⁶ UFC/mL
8	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	2,0 x 10 ⁶ UFC/mL
9	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	2,0 x 10 ⁶ UFC/mL
10	9,5 x 10 ⁶ UFC/mL	1,5 x 10 ⁶ UFC/mL
Média	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	1,9 x 10 ⁶ UFC/mL
DPR %	10,8 %	12,2 %

FONTE: A autora (2016).

Nas Tabelas 10 à 13 são apresentados os dados utilizados para avaliar a precisão intermediária do método. E novamente os coeficientes de variação obtidos para os quatro micro-organismos foram menores do que 30%, indicando que o método também apresenta boa precisão intermediária. As primeiras 10 replicatas são as mesmas utilizadas para o restante da validação e sob as quais avaliou-se a precisão do método. E as 10 últimas replicatas são provenientes da aplicação do método em outro dia.

TABELA 10- PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA *S. aureus*

Replicatas	Concentração de Cloranfenicol	
	3,125 µg/mL	0,78 µg/mL
1	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	2,0 x 10 ⁸ UFC/mL
2	1,3 x 10 ⁸ UFC/mL	1,9 x 10 ⁸ UFC/mL
3	1,3 x 10 ⁸ UFC/mL	1,9 x 10 ⁸ UFC/mL
4	1,4 x 10 ⁸ UFC/mL	2,0 x 10 ⁸ UFC/mL
5	1,3 x 10 ⁸ UFC/mL	2,1 x 10 ⁸ UFC/mL
6	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	1,8 x 10 ⁸ UFC/mL
7	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	1,8 x 10 ⁸ UFC/mL
8	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	1,9 x 10 ⁸ UFC/mL
9	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	2,0 x 10 ⁸ UFC/mL
10	1,2 x 10 ⁸ UFC/mL	1,8 x 10 ⁸ UFC/mL
1	8,3 x 10 ⁷ UFC/mL	1,6 x 10 ⁸ UFC/mL
2	8,4 x 10 ⁷ UFC/mL	1,7 x 10 ⁸ UFC/mL
3	9,0 x 10 ⁷ UFC/mL	1,4 x 10 ⁸ UFC/mL
4	9,4 x 10 ⁷ UFC/mL	1,4 x 10 ⁸ UFC/mL
5	8,8 x 10 ⁷ UFC/mL	1,2 x 10 ⁸ UFC/mL
6	8,2 x 10 ⁷ UFC/mL	1,5 x 10 ⁸ UFC/mL
7	7,3 x 10 ⁷ UFC/mL	1,4 x 10 ⁸ UFC/mL
8	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	1,6 x 10 ⁸ UFC/mL
9	8,1 x 10 ⁷ UFC/mL	2,1 x 10 ⁸ UFC/mL
10	7,6 x 10 ⁷ UFC/mL	1,4 x 10 ⁸ UFC/mL
Média	1,0 x 10 ⁸ UFC/mL	1,7 x 10 ⁸ UFC/mL
DPR %	20,3 %	15,9 %

FONTE: A autora (2016).

TABELA 11- PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA *E. coli*

Replicatas	Concentração de Cloranfenicol	
	3,125 µg/mL	0,78 µg/mL
1	1,4 x 10 ⁸ UFC/mL	7,6 x 10 ⁸ UFC/mL
2	1,5 x 10 ⁸ UFC/mL	7,9 x 10 ⁸ UFC/mL
3	1,2 x 10 ⁸ UFC/mL	6,7 x 10 ⁸ UFC/mL
4	1,2 x 10 ⁸ UFC/mL	6,6 x 10 ⁸ UFC/mL
5	1,3 x 10 ⁸ UFC/mL	6,1 x 10 ⁸ UFC/mL
6	1,1 x 10 ⁸ UFC/mL	6,4 x 10 ⁸ UFC/mL
7	1,3 x 10 ⁸ UFC/mL	6,4 x 10 ⁸ UFC/mL
8	1,2 x 10 ⁸ UFC/mL	6,9 x 10 ⁸ UFC/mL
9	1,0 x 10 ⁸ UFC/mL	6,6 x 10 ⁸ UFC/mL
10	1,0 x 10 ⁸ UFC/mL	5,6 x 10 ⁸ UFC/mL
1	1,8 x 10 ⁸ UFC/mL	8,1 x 10 ⁸ UFC/mL
2	1,6 x 10 ⁸ UFC/mL	8,6 x 10 ⁸ UFC/mL
3	1,5 x 10 ⁸ UFC/mL	8,8 x 10 ⁸ UFC/mL
4	1,6 x 10 ⁸ UFC/mL	9,0 x 10 ⁸ UFC/mL
5	1,6 x 10 ⁸ UFC/mL	8,8 x 10 ⁸ UFC/mL
6	1,5 x 10 ⁸ UFC/mL	7,5 x 10 ⁸ UFC/mL
7	1,8 x 10 ⁸ UFC/mL	8,1 x 10 ⁸ UFC/mL
8	1,9 x 10 ⁸ UFC/mL	8,7 x 10 ⁸ UFC/mL
9	2,2 x 10 ⁸ UFC/mL	9,5 x 10 ⁸ UFC/mL
10	2,1 x 10 ⁸ UFC/mL	7,2 x 10 ⁸ UFC/mL
Média	1,5 x 10 ⁸ UFC/mL	7,6 x 10 ⁸ UFC/mL
DPR %	22,5 %	14,7%

FONTE: A autora (2016).

TABELA 12- PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA *P. aeruginosa*

Replicatas	Concentração de Cloranfenicol	
	31,25 µg/mL	7,8 µg/mL
1	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL	2,9 x 10 ⁷ UFC/mL
2	5,1 x 10 ⁷ UFC/mL	2,2 x 10 ⁷ UFC/mL
3	3,9 x 10 ⁷ UFC/mL	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL
4	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL	4,7 x 10 ⁷ UFC/mL
5	4,4 x 10 ⁷ UFC/mL	3,0 x 10 ⁷ UFC/mL
6	3,0 x 10 ⁷ UFC/mL	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL
7	2,5 x 10 ⁷ UFC/mL	4,7 x 10 ⁷ UFC/mL
8	2,2 x 10 ⁷ UFC/mL	2,9 x 10 ⁷ UFC/mL
9	3,5 x 10 ⁷ UFC/mL	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL
10	3,0 x 10 ⁷ UFC/mL	2,5 x 10 ⁷ UFC/mL
1	2,9 x 10 ⁷ UFC/mL	4,2 x 10 ⁷ UFC/mL
2	2,8 x 10 ⁷ UFC/mL	4,1 x 10 ⁷ UFC/mL
3	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL	5,1 x 10 ⁷ UFC/mL
4	2,0 x 10 ⁷ UFC/mL	4,9 x 10 ⁷ UFC/mL
5	3,0 x 10 ⁷ UFC/mL	3,9 x 10 ⁷ UFC/mL
6	4,5 x 10 ⁷ UFC/mL	3,2 x 10 ⁷ UFC/mL
7	3,5 x 10 ⁷ UFC/mL	4,8 x 10 ⁷ UFC/mL
8	4,0 x 10 ⁷ UFC/mL	3,7 x 10 ⁷ UFC/mL
9	4,1 x 10 ⁷ UFC/mL	4,1 x 10 ⁷ UFC/mL
10	3,7 x 10 ⁷ UFC/mL	3,9 x 10 ⁷ UFC/mL
Média	3,4 x 10 ⁷ UFC/mL	3,7 x 10 ⁷ UFC/mL
DPR %	23,1 %	22,4 %

FONTE: A autora (2016).

TABELA 13- PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA *C. albicans*

Replicatas	Concentração de Cetoconazol	
	31,25 µg/mL	7,8 µg/mL
1	1,1 x 10 ⁶ UFC/mL	1,7 x 10 ⁶ UFC/mL
2	1,3 x 10 ⁶ UFC/mL	1,9 x 10 ⁶ UFC/mL
3	1,3 x 10 ⁶ UFC/mL	2,0 x 10 ⁶ UFC/mL
4	1,4 x 10 ⁶ UFC/mL	2,1 x 10 ⁶ UFC/mL
5	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	2,2 x 10 ⁶ UFC/mL
6	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	2,1 x 10 ⁶ UFC/mL
7	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	1,7 x 10 ⁶ UFC/mL
8	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	2,0 x 10 ⁶ UFC/mL
9	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	2,0 x 10 ⁶ UFC/mL
10	9,5 x 10 ⁵ UFC/mL	1,5 x 10 ⁶ UFC/mL
1	1,1 x 10 ⁶ UFC/mL	1,9 x 10 ⁶ UFC/mL
2	9,2 x 10 ⁵ UFC/mL	1,9 x 10 ⁶ UFC/mL
3	1,1 x 10 ⁶ UFC/mL	2,1 x 10 ⁶ UFC/mL
4	1,3 x 10 ⁶ UFC/mL	2,0 x 10 ⁶ UFC/mL
5	1,4 x 10 ⁶ UFC/mL	2,1 x 10 ⁶ UFC/mL
6	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	1,4 x 10 ⁶ UFC/mL
7	1,3 x 10 ⁶ UFC/mL	1,6 x 10 ⁶ UFC/mL
8	1,3 x 10 ⁶ UFC/mL	1,9 x 10 ⁶ UFC/mL
9	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	1,8 x 10 ⁶ UFC/mL
10	1,1 x 10 ⁶ UFC/mL	1,8 x 10 ⁶ UFC/mL
Média	1,2 x 10 ⁶ UFC/mL	1,9 x 10 ⁶ UFC/mL
DPR %	11,0%	12,1 %

FONTE: A autora (2016).

5.4.1.5 Exatidão

A exatidão geralmente é expressa como a porcentagem de recuperação dos micro-organismos, e representa a proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação aos resultados obtidos pelo método tradicional (contagem em placas). A porcentagem de recuperação do método alternativo deve se situar em $100 \pm 30\%$ (USP 37, 2014; BRASIL, 2014).

O presente método propõe a conversão de valores de absorbância em concentração de micro-organismos (UFC/mL). Para tanto, após a obtenção das equações da reta (Figuras 17 a 20, p.64 e 65), os valores de absorbância foram substituídos no lugar de y nas equações da reta e foi então possível obter a

concentração de micro-organismos viáveis presentes em cada orifício da placa. Tais valores obtidos foram então comparados com as concentrações de micro-organismos obtidas por meio de contagens em placas e os resultados apresentam-se nas Tabelas 14,15,16 e 17.

TABELA 14- VALORES DE % DE RECUPERAÇÃO PARA *S. aureus*

Concentração de cloranfenicol	Contagem em placas (UFC/mL)	Leituras absorvância (UFC/mL)	% de recuperação
12,5 µg/mL	6,1 x 10 ⁵	6,9 x 10 ⁵	113 %
6,25 µg/mL	2,8 x 10 ⁷	2,6 x 10 ⁷	92 %
3,125 µg/mL	1,7 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁸	75 %
0,78 µg/mL	1,8 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸	111 %
0,39 µg/mL	2,5 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁸	97 %

FONTE: A autora (2016).

TABELA 15- VALORES DE % DE RECUPERAÇÃO PARA *E. coli*

Concentração de cloranfenicol	Contagem em placas (UFC/mL)	Leituras absorvância (UFC/mL)	% de recuperação
6,25 µg/mL	5,3 x 10 ⁶	5,4 x 10 ⁶	101%
3,125 µg/mL	1,3 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸	95 %
1,56 µg/mL	3,5 x 10 ⁸	4,0 x 10 ⁸	114 %
0,78 µg/mL	7,6 x 10 ⁸	7,0 x 10 ⁸	92 %
0,39 µg/mL	1,0 x 10 ⁹	8,5 x 10 ⁸	85 %

FONTE: A autora (2016).

TABELA 16- VALORES DE % DE RECUPERAÇÃO PARA *P. aeruginosa*

Concentração de cloranfenicol	Contagem em placas (UFC/mL)	Leituras absorvância (UFC/mL)	% de recuperação
62,5 µg/mL	1,0 x 10 ⁶	9,2 x 10 ⁵	91 %
31,25 µg/mL	3,4 x 10 ⁷	4,2 x 10 ⁷	122 %
15,6 µg/mL	2,6 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁷	90 %
7,8 µg/mL	3,5 x 10 ⁷	3,2 x 10 ⁷	91 %
3,9 µg/mL	6,2 x 10 ⁷	6,6 x 10 ⁷	107 %

FONTE: A autora (2016).

TABELA 17- VALORES DE % DE RECUPERAÇÃO PARA *C. albicans*

Concentração de cetoconazol	Contagem em placas (UFC/mL)	Leituras absorvância (UFC/mL)	% de recuperação
125 µg/mL	1,1 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	101 %
62,5 µg/mL	5,3 x 10 ⁵	6,2 x 10 ⁵	116 %
31,25 µg/mL	8,5 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁶	121 %
15,6 µg/mL	1,1 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	100 %
3,9 µg/mL	2,0 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶	108 %

FONTE: A autora (2016).

A porcentagem de recuperação para *S. aureus* variou de 75 à 113%, como é demonstrado na Tabela 14. Ao observar a Tabela 15 é possível visualizar que os valores obtidos para *E. coli* foram de 85 à 114%. Ao avaliar os experimentos realizados com *P. aeruginosa*, os resultados apresentados na Tabela 16 situaram-se entre 90 e 122% e a variação encontrada para *C. albicans* foi de 100 a 121%, como demonstra a Tabela 17.

Portanto, os resultados entre as comparações dos resultados calculados com os resultados das contagens padrão demonstraram uma boa exatidão para o método, tendo em vista que os quatro micro-organismos apresentaram porcentagens de recuperação entre $100 \pm 30\%$.

5.4.1.6 Intervalo

Este parâmetro representa a faixa entre a menor e a maior concentração de micro-organismos, as quais foram determinadas com precisão, exatidão e linearidade, baseadas nos parâmetros anteriormente citados e respeitando-se as condições pré-estabelecidas para o método e os resultados são apresentados na Tabela 18.

TABELA 18- INTERVALO AO QUAL O MÉTODO É APLICÁVEL

Micro-organismos	Limite inferior (UFC/mL)	Limite superior (UFC/mL)
<i>S. aureus</i>	$5,3 \times 10^7$	$2,5 \times 10^8$
<i>E. coli</i>	$8,8 \times 10^7$	$7,6 \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i>	$6,1 \times 10^6$	$6,2 \times 10^7$
<i>C. albicans</i>	$7,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$

FONTE: A autora (2016).

5.4.1.7 Robustez

A robustez foi avaliada de acordo com o grau de reprodutibilidade dos resultados obtidos com variações pré-determinadas das condições normais do teste. A avaliação deste parâmetro realizou-se conforme descrito no tópico 4.8.1.8 de Material e Métodos.

As variações utilizadas para avaliar este parâmetro foram a temperatura de incubação, a diluição do inóculo utilizado, e diferentes tempos de incubação antes da adição da solução de TTC e diferentes tempos de leitura após adição

do TTC. Tais variações foram avaliadas individualmente em 5 replicatas para cada variação e para o método padrão.

Os resultados das variações realizadas para avaliar a robustez do método foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey e encontram-se nas Tabelas 19, 20, 21 e 22. Podem existir dois valores diferentes de padrão em cada tabela, tendo em vista que as análises da variação de temperatura (33°C) e da diluição do inóculo (1:2) foram realizadas em dia diferente das demais e, portanto, com suspensões microbianas diferentes e com soluções de antimicrobianos preparadas em dias diferentes. A temperatura de 33°C precisou ser avaliada em outro dia devido à necessidade de alteração da temperatura da estufa de incubação. Já a análise da diluição do inóculo (1:2) foi realizada após a realização da ANOVA dos dados obtidos utilizando o inóculo diluído (1:10) e ter sido verificada a diferença estatística significativa em relação ao método padrão.

TABELA 19- RESULTADOS DE VARIAÇÕES PROPOSITAIS PRÉ-DETERMINADAS NOS ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO PARA *S. aureus*

	Variações Realizadas	Resultado obtido (UFC/mL)	Resultado do método padrão (UFC/mL)	Valor de p
1	T°C de incubação: 30°C	9,6 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁸	0,000142*
2	T°C de incubação: 33°C	1,6 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	0,820828
3	Diluição do inóculo: 1:2	1,7 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	0,449547
4	Diluição do inóculo: 1:10	1,1 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	0,000657*
5	Incubação prévia a adição do TTC: 18 horas	1,1 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	0,000241*
6	Incubação prévia a adição do TTC: 20 horas	1,4 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	0,981406
7	Leitura após 4 horas da adição do TTC (5)	1,1 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	0,000825*
8	Leitura após 4 horas da adição do TTC (6)	1,5 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	1,000000
9	Leitura após 6 horas da adição do TTC (5)	1,2 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	0,038658*

FONTE: A autora (2016).

NOTA: * Valores de p<0,05 demonstram diferença estatística significativa.

Ao observar os resultados das tabelas, os valores de p menores do que 0,05 indicam que há diferença estatística significativa. Portanto, para *S. aureus* (Tabela 19), o método demonstrou-se robusto ao ser incubado a 33°C, por suportar a diluição do inóculo desde que seja branda (1:2), pelo fato de o

adiantamento de 2 horas na adição do TTC não ter demonstrado diferença estatística significativa, e em razão do atraso em duas horas na leitura após a adição do TTC também não alterar os resultados obtidos significativamente.

Ou seja, a ocorrência de pequenas variações na temperatura de incubação (33 - 35°C) e na concentração do inóculo, bem como o adiantamento no tempo da adição do TTC (2 horas) ou o atraso no tempo da leitura após adição do TTC (mais duas horas, totalizando 4 horas de contato com o TTC), não resultaram em diferença estatística significativa entre os resultados obtidos. No entanto, vale ressaltar que essas alterações não devem ser acentuadas, pois, do contrário, podem gerar diferenças estatísticas significativas, tal como se percebe na Tabela 19 com as variações de temperatura de incubação (30°C), da concentração do inóculo (diluição 1:10) e do adiantamento da adição do TTC (4 horas).

TABELA 20- RESULTADOS DE VARIAÇÕES PROPOSITAIS PRÉ-DETERMINADAS NOS ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO PARA *E. coli*

Variações Realizadas		Resultado obtido (UFC/mL)	Resultado do método Padrão (UFC/mL)	Valor de p
1	T°C de incubação: 30°C	1,8 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸	0,331557
2	T°C de incubação: 33°C	1,9 x 10 ⁷	1,9 x 10 ⁷	0,971823
3	Diluição do inóculo: 1:2	1,6 x 10 ⁷	1,9 x 10 ⁷	0,320429
4	Diluição do inóculo: 1:10	6,4 x 10 ⁷	2,2 x 10 ⁸	0,000142*
5	Incubação prévia a adição do TTC: 18 horas	1,6 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸	0,038541*
6	Incubação prévia a adição do TTC: 20 horas	1,9 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸	0,380264
7	Leitura após 4 horas da adição do TTC (5)	1,9 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸	0,571446
8	Leitura após 4 horas da adição do TTC (6)	2,4 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸	0,486054
9	Leitura após 6 horas da adição do TTC (5)	2,4 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸	0,941957

FONTE: A autora (2016).

NOTA: * Valores de p<0,05 demonstram diferença estatística significativa.

No caso dos ensaios realizados com *E.coli* (Tabela 20), houve diferença estatística significativa somente ao adicionar o TTC 4 horas antes do tempo padronizado e ao diluir o inóculo 1:10. As demais variações foram suportadas pelo método.

TABELA 21- RESULTADOS DE VARIAÇÕES PROPOSITAIS PRÉ-DETERMINADAS NOS ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO PARA *P. aeruginosa*

	Variações Realizadas	Resultado obtido (UFC/mL)	Resultado do método Padrão (UFC/mL)	Valor de p
1	T°C de incubação: 30°C	5,0 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁷	0,996026
2	T°C de incubação: 33°C	3,6 x 10 ⁷	2,9 x 10 ⁷	0,856457
3	Diluição do inóculo: 1:2	2,7 x 10 ⁷	2,9 x 10 ⁷	0,353119
4	Diluição do inóculo: 1:10	7,6 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁷	0,000207*
5	Incubação prévia a adição do TTC: 18 horas	6,4 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁷	0,073841
6	Incubação prévia a adição do TTC: 20 horas	4,6 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁷	0,999999
7	Leitura após 4 horas da adição do TTC (5)	6,6 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁷	0,022754*
8	Leitura após 4 horas da adição do TTC (6)	5,2 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁷	0,967295
9	Leitura após 6 horas da adição do TTC (5)	6,9 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁷	0,005557*

FONTE: A autora (2016).

NOTA: * Valores de p<0,05 demonstram diferença estatística significativa.

Para a *P. aeruginosa* (Tabela 21) novamente a diluição do inóculo 1:10 demonstrou afetar os resultados obtidos pelo método. Porém, com relação ao adiantamento da adição do TTC em quatro horas, não houve diferença estatística significativa, mas o valor de p é bem próximo de 0,05 (0,073841), indicando não ser recomendável o adiantamento na adição do TTC.

TABELA 22- RESULTADOS DE VARIAÇÕES PROPOSITAIS PRÉ-DETERMINADAS NOS ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO PARA *C. albicans*

	Variações Realizadas	Resultado obtido (UFC/mL)	Resultado do método Padrão (UFC/mL)	Valor de p
1	T°C de incubação: 30°C	1,6 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	0,137579
2	T°C de incubação: 33°C	1,1 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	0,248811
3	Diluição do inóculo: 1:2	7,0 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁶	0,001219*
4	Diluição do inóculo: 1:10	6,0 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁶	0,000141*
5	Incubação prévia a adição do TTC: 18 horas	1,5 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	0,036095*
6	Incubação prévia a adição do TTC: 20 horas	1,9 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	0,996181
7	2ª Leitura após 4 horas da adição do TTC (5)	1,7 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	0,409712
8	2ª Leitura após 4 horas da adição do TTC (6)	2,1 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	0,998954
9	3ª Leitura após 6 horas da adição do TTC (5)	1,8 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	0,821352

FONTE: A autora (2016).

NOTA: * Valores de p<0,05 demonstram diferença estatística significativa.

A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos para *C. albicans*. Novamente, a diluição do inóculo 1:10 e o adiantamento em 4 horas na adição do TTC não são suportados pelo método. Ainda, a diluição mais branda do inóculo (1:2) também levou a resultados divergentes do método padrão. Portanto, para *C. albicans*, a concentração do inóculo é um fator crítico.

Ao observar de um modo geral o método aplicado aos quatro micro-organismos, pode-se generalizar que o método é robusto e suporta alterações não acentuadas na temperatura de incubação, que pode variar de 30 a 35°C (exceto para *S. aureus*, cuja variação pode ocorrer entre 33 e 35°C). Pequenas variações na concentração do inóculo também foram bem toleradas, exceto para *C. albicans*. E variações no adiantamento do tempo de adição do TTC em 2 horas foram suportadas para os quatro micro-organismos, tal como o atraso também em duas horas na leitura.

Com relação às variações na concentração do inóculo, de acordo com Eloff (1998), o tamanho do inóculo tem um grande efeito sobre os valores de CIM de compostos. Devido a outros relatos na literatura sobre a influência da concentração do inóculo na determinação da CIM (ALVES et al., 2008; BIDLAS, DU, LAMBERT, 2008), definiu-se a importância de avaliar a variação da concentração do inóculo na robustez do método. Com isso, tem-se que os resultados apresentados realmente afirmam que se a variação na concentração do inóculo for ampla há diferenças que podem levar inclusive à modificação da CIM.

5.4.2 Determinação da CIM dos compostos Antimicrobianos

As CIMs foram determinadas por leituras visuais, sendo consideradas as últimas concentrações onde não houve desenvolvimento de coloração rosa, decorrente da redução do TTC pelo metabolismo microbiano. Os resultados das leituras visuais foram confrontados com os resultados obtidos pelas leituras espectrofotométricas.

Os resultados das leituras em espectrofotômetro foram interpretados após conversão das absorbâncias em UFC/mL e as análises estatísticas (ONE-WAY ANOVA e teste de Tukey). Após verificar a concentração que apresentou

crescimento com diferença estatística significativa em relação aos orifícios onde houve inibição total do crescimento microbiano, foi definida CIM. Os resultados apresentam-se na Tabela 23 e nas Figuras 21, 22, 23 e 24 na forma de gráficos de barra com desvio padrão.

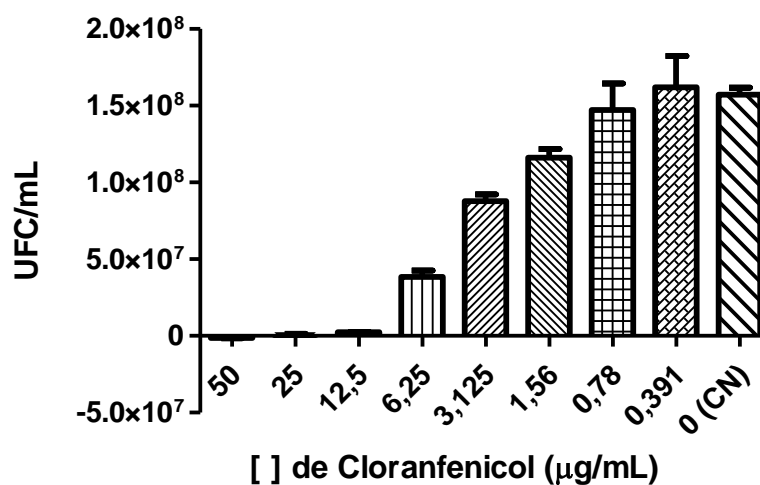
TABELA 23- VALORES DE CIM DETERMINADOS POR LEITURAS VISUAIS E POR ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS OBTIDOS POR LEITURAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Micro-organismo	CIM - LEITURA VISUAL	CIM - ANOVA	VALOR DE p*
<i>S. aureus</i>	12,5 µg/mL	12,5 µg/mL	0,000204**
<i>E. coli</i>	6,25 µg/mL	6,25 µg/mL	0,000147**
<i>P. aeruginosa</i>	125 µg/mL	125 µg/mL	0,024426**
<i>C. albicans</i>	250 µg/mL	250 µg/mL	0,000149**

FONTE: A autora (2016).

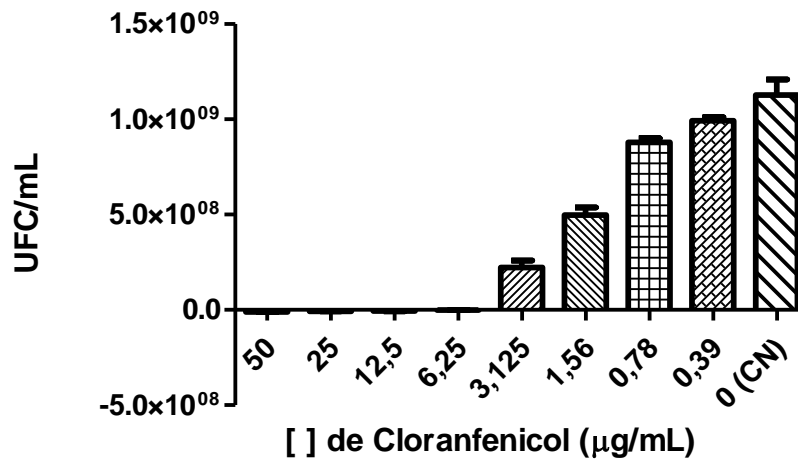
NOTA: * Valor de p correspondente à concentração seguinte à CIM, onde há diferença significativa em relação aos poços onde não houve crescimento microbiano. ** Valores de $p < 0,05$ demonstram diferença estatística significativa.

FIGURA 21- VERIFICAÇÃO DA CIM DO CLORANFENICOL PARA *S. aureus*



FONTE: A autora (2016).

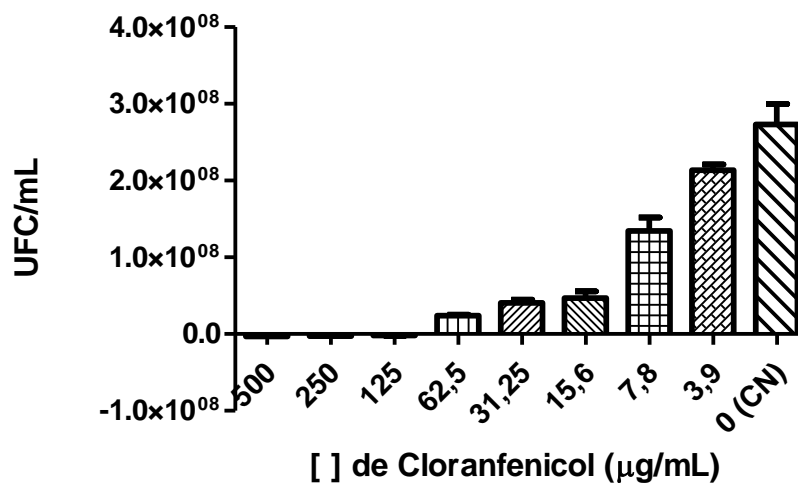
NOTA: CN= controle negativo.

FIGURA 22- VERIFICAÇÃO DA CIM DO CLORANFENICOL PARA *E.coli*

FONTE: A autora (2016).

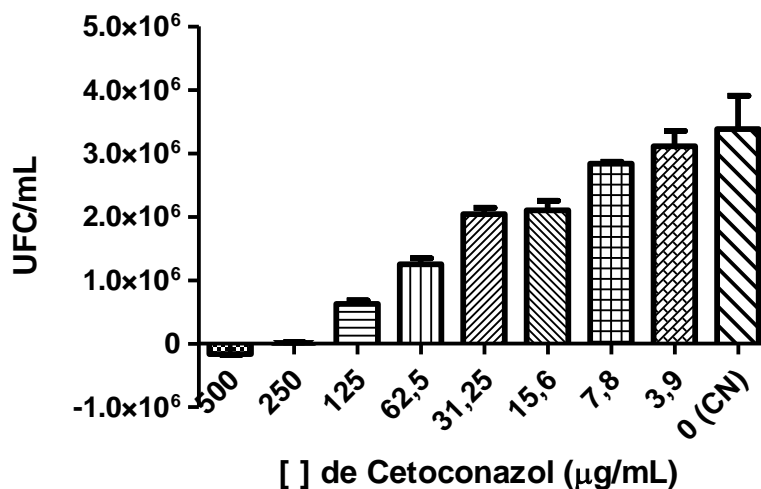
NOTA: CN= controle negativo.

Ao observar a Tabela 23, percebe-se que a CIM para *S.aureus* foi de 12,5 µg/mL e, na Figura 21, onde os valores são apresentados na forma de gráficos de barras, nota-se visualmente que o crescimento microbiano ocorre a partir da concentração 6,25 µg/mL (poços D da placa), confirmando os resultados da leitura visual e das análises de variância.

FIGURA 23- VERIFICAÇÃO DA CIM DO CLORANFENICOL PARA *P. aeruginosa*

FONTE: A autora (2016).

NOTA: CN= controle negativo.

FIGURA 24- VERIFICAÇÃO DA CIM DO CETOCONAZOL PARA *C. albicans*

FONTE: A autora (2016).

NOTA: CN= controle negativo.

Para *E. coli* a CIM do cloranfenicol foi de 6,25 µg/mL, sendo determinada por leitura visual e novamente confirmada por análise estatística (Tabela 23, p.81), podendo também ser evidenciada pelo gráfico apresentado na Figura 22.

A CIM do cloranfenicol para *P. aeruginosa* é de 125 µg/mL, e foi confirmada tanto visualmente com a observação de coloração rosa a partir dos poços D, como também estatisticamente, sendo ainda evidenciada no gráfico de barras apresentado na Figura 23.

No caso da *C. albicans* a CIM de cetoconazol foi de 250 µg/mL, e foi comprovada por leituras visuais cuidadosas, tendo em vista que o desenvolvimento de coloração para essa levedura ocorre de maneira suave. Os resultados obtidos por leitura visual são concordantes com os de ANOVA e também com os dados apresentados na Figura 24.

Observando os resultados apresentados, verificou-se a concordância das leituras visuais com as análises estatísticas e com a apresentação gráfica dos dados, demonstrando que, com o auxílio do TTC, a leitura visual torna-se confiável, porém, demanda cuidado na sua realização. Ainda, é importante ressaltar que a leitura visual permite somente a determinação da CIM, sendo importante realizar a análise dos dados, tendo em vista que, a olho nú, a

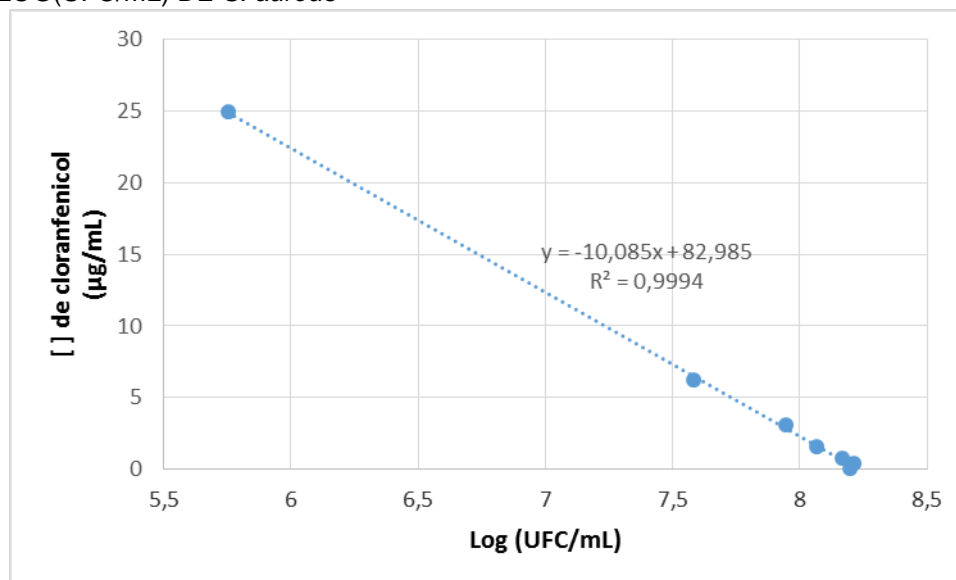
coloração rosa pode não se apresentar intensa e ser de difícil visualização, embora, por espectrofotometria seja facilmente detectável.

Deve-se considerar, ainda, que a quantificação dos micro-organismos só é possível a partir das leituras espectrofotométricas. Portanto, se o objetivo ao utilizar o método é determinar a quantidade de micro-organismos inibida pelo composto a ser testado ou determinar a $CI_{50\%}$ e $CI_{90\%}$, deve-se realizar a leitura espectrofotométrica.

5.4.3 Determinação da Concentração Inibitória de 50% ($CI_{50\%}$) e de 90% ($CI_{90\%}$) dos micro-organismos

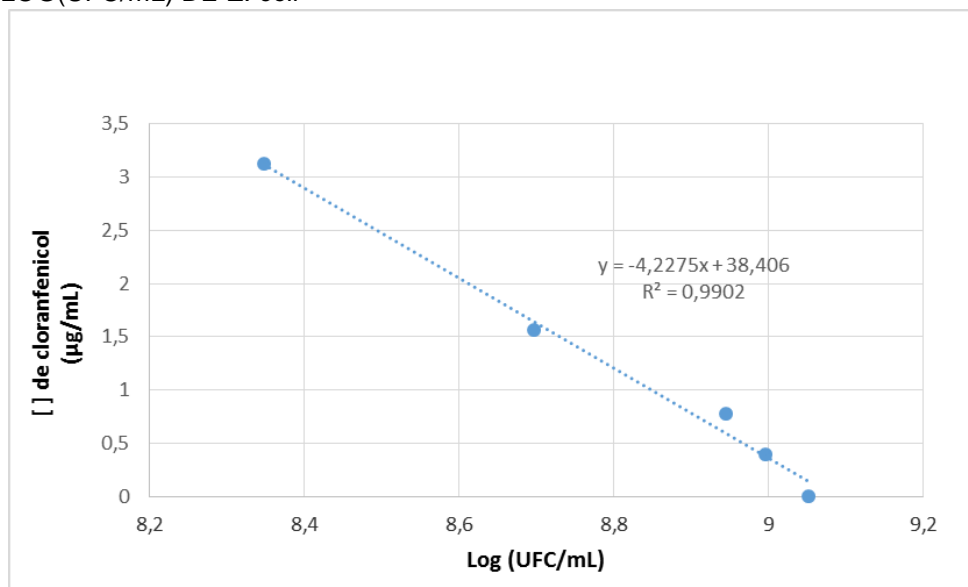
Para determinar a $CI_{50\%}$ e a $CI_{90\%}$ foi necessário construir curvas de correlação entre a concentração de micro-organismos (UFC/mL) e a concentração de antimicrobiano utilizada. No entanto, ao correlacionar diretamente os valores de UFC/mL, o gráfico não forneceu uma reta e sim uma curva. Portanto, foi necessário aplicar função logarítmica aos dados para possibilitar a aquisição de uma equação da reta. Os resultados e as respectivas equações encontram-se nas Figuras 25, 26, 27 e 28.

FIGURA 25- CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE CLORANFENICOL E O LOG(UFC/mL) DE *S. aureus*



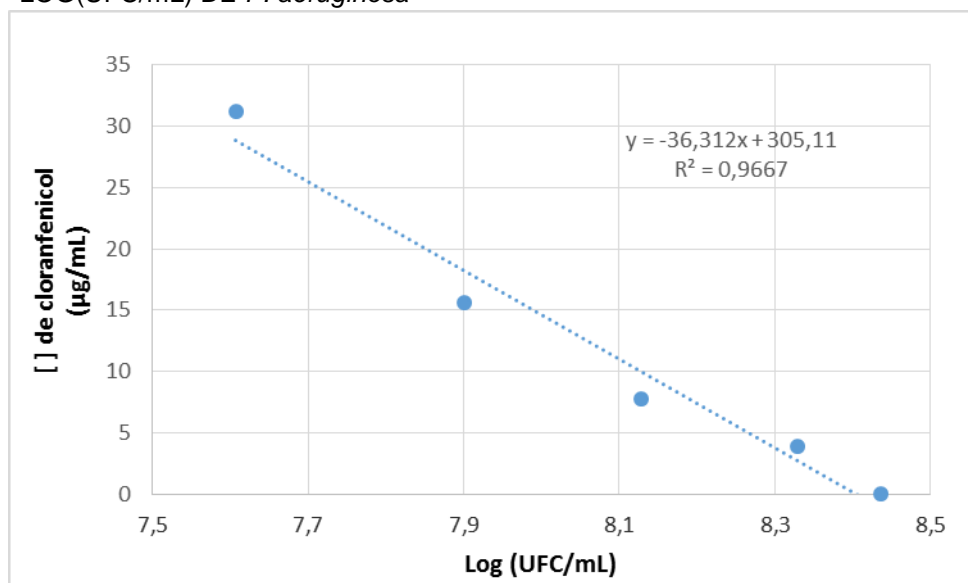
FONTE: A autora (2016).

FIGURA 26- CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE CLORANFENICOL E O LOG(UFC/mL) DE *E. coli*



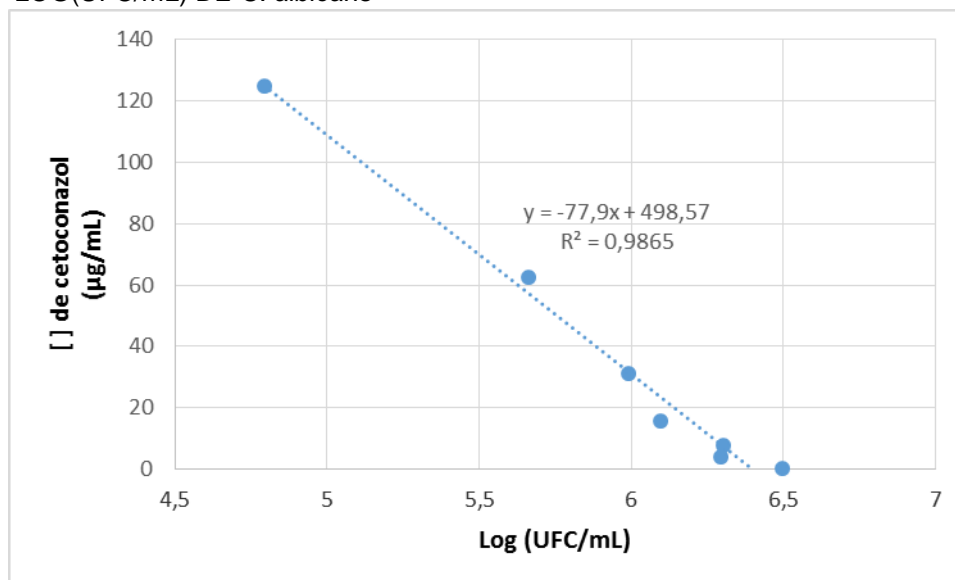
FONTE: A autora (2016).

FIGURA 27- CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE CLORANFENICOL E O LOG(UFC/mL) DE *P. aeruginosa*



FONTE: A autora (2016).

FIGURA 28- CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE CETOCONAZOL E O LOG(UFC/mL) DE *C. albicans*



FONTE: A autora (2016).

Após a obtenção das equações da reta (Figuras 25, 26, 27 e 28) os valores de UFC/mL obtidos pela conversão dos valores de absorbância dos poços de controle negativo foram multiplicados por 0,5 e 0,1 para obter o número de micro-organismos correspondente à 50% e 10% do crescimento total. Em seguida, estes valores foram tratados com função logarítmica e aplicados às equações da reta, apresentadas nas Figuras 25 à 28, determinando-se as $CI_{50\%}$ e $CI_{90\%}$, as quais apresentam-se na Tabela 24.

TABELA 24- DETERMINAÇÃO DA $CI_{50\%}$ E DA $CI_{90\%}$

Micro-organismo	CN (UFC/mL)	Log (CN x 0,5)	Log (CN x 0,1)	$CI_{50\%}$ µg/mL*	$CI_{90\%}$ µg/mL*
<i>S. aureus</i>	$1,6 \times 10^8$	7,89	7,2	3,36	10,41
<i>E. coli</i>	$1,1 \times 10^9$	8,75	8,05	1,41	4,36
<i>P. aeruginosa</i>	$2,7 \times 10^8$	8,13	7,44	9,7	35,1
<i>C. albicans</i>	$3,1 \times 10^6$	6,19	5,5	16	70,45

FONTE: A autora (2016).

NOTA: *Para as bactérias às concentrações referem-se ao cloranfenicol e para a *C. albicans* referem-se ao cetoconazol. CN = controle negativo.

6 CONCLUSÃO

A validação do presente método colorimétrico é de relevante importância e, traz uma nova contribuição além da padronização, pois atualmente, nenhum método colorimétrico descrito na literatura propõe a conversão de valores de absorvância em UFC/mL, sendo essa, portanto, uma inovação proposta neste trabalho.

Com relação à utilização do TTC, esse demonstrou eficácia ao melhorar a sensibilidade do método e a especificidade. A concentração de 0,125% não demonstrou toxicidade significativa frente aos micro-organismos testados. Também não existiram problemas com relação à sensibilidade do TTC à luz.

As leituras em fotômetro de microplacas são de fácil execução e fornecem uma grande quantidade de dados quase simultâneos em razão da agilidade na leitura.

Com relação à validação, conclui-se que o método padronizado e validado é linear, específico, preciso, exato e robusto.

Trata-se de um método de fácil execução e que fornece, simultaneamente, ampla quantidade de dados, configurando-se, ainda, como econômico em virtude da utilização de pequenas quantidades do meio de cultura e do composto a ser testado.

Somado a isso, tem-se que o método pode ser aplicável para testar os mais diversos tipos de compostos com atividade antimicrobiana, desde que a coloração do composto não seja semelhante à coloração do formazano proveniente da redução do TTC.

Por fim, para trabalhos futuros, sugere-se a aplicação da técnica para verificar a CIM e a $CI_{50\%}$ e a $CI_{90\%}$ dos mais variados tipos de compostos com atividade antimicrobiana, podendo-se, também, realizar a validação do método padronizado utilizando diferentes micro-organismos redutores do TTC.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. A; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224, 1994.
- AIELLO, A. E; LARSON, E. Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. **Lancet Infect Dis**, v. 3, p. 501–506, 2003.
- AL-BAKRI, A.G.; AFIFI, F.U. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. **Journal of Microbiological Methods**, v.68, p. 19-25, 2007.
- ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N. A. J.C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v.31, n.5, p. 1224-1229, 2008.
- ANDERSON, G. G.; PALERMO, J. J.; SCHILLING, J. D.; et al. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. **Science**, v. 301, p. 105–107, 2003.
- ANDRADE, D. de.; ANGERAMI, E.L.S.; PADOVANI, C.R. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. **Rev Saúde Pública**, v. 34, n. 2, p.163-169, 2000.
- ANVISA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1. ed. 52 p. Brasília: ANVISA, 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>>. Acesso em: 12/06/2014.
- ANVISA. **Antimicrobianos - Bases Teóricas e Uso Clínico**; 2007. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_control_e/opas_web/modulo1/lactamicos.htm#>. Acesso em: 15/05/2014.
- ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century - A Clinical Super-Challenge. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n.5, p. 439-443, 2009.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; et al. Comparison of Visual and Spectrophotometric Methods of Broth Microdilution MIC End Point Determination and Evaluation of a Sterol Quantitation Method for In Vitro Susceptibility Testing of Fluconazole and Itraconazole against Trailing and Nontrailing Candida Isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2477–2481, 2002.
- ATLAS, R. M. **Principles of Microbiology**. 2. Ed. Dubuque, IA: Wm. C. Brown Publishers, 1997.
- AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de

plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BARTPHO, T.; WONGSURAWAT, T.; WONGRATANACHEEWIN, S.; et al. Genomic islands as a marker to differentiate between clinical and environmental *Burkholderia pseudomallei*. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e37762, 2012.

BEDERSON, J.B.; PITTS, L. H.; GERMANO, S. M.; NISHIMURA, M. C.; DAVIS, R. L.; BARTKOWSKI H. M. Evaluation of 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium Chloride as a Stain for Detection and Quantification of Experimental Cerebral Infarction in Rats. **Stroke**, v.17, n. 6, p. 1304-1308, 1986.

BELOTI. V.; BARROS. M. A. F.; FREITAS, J. C. et al. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non reducing bacteria in pasteurized milk. **Rec. Bras. Microbiol.**, v. 30, n.2, p.137-140, 1999.

BIDLAS, E.; DU, T.; LAMBERT, R. J. W. An explanation for the effect of inoculum size on MIC and the growth/no growth interface. **International Journal of Food Microbiology**. v. 126, p.140–152, 2008.

BISWAS L, BISWAS R, SCHLAG M, BERTRAM R, GOTZ F. Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Environ Microbiol**, v.75, n. 21, p. 6910–6912, 2009.

BLOCK, S.S. **Disinfection, Sterilization, and Preservation**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991.

BOUBETRA, A.; NESTOUR, F. LE; ALLAERT, C.; FEINBERG, M. Validation of alternative methods for the analysis of drinking water and their application to *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3360–7, 2011.

BRANNAN, D. K.; DILLE, J. C.; KAUFMAN, D. J. Correlation of In Vitro Challenge Testing with Consumer Use Testing for Cosmetic Products. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 8, p. 1827–1832, 1987.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Consulta Pública n. 45, de 02 de julho de 2014**, publicada no D.O.U de 04 de julho de 2014. 10 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/59a9320044a467c39479d5fd936af04e/Consulta+p%C3%BAblica+n+45+COFAR.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10/07/2014.

BRASIL. Resolução - RDC n. 29, de 1º de Junho de 2012. **Diário Oficial da União (DOU) de 04 de Junho de 2012**, p. 81, Seção 1. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/37577013/dou-secao-1-04-06-2012-pg-81>>. Acesso em: 14/07/2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopéia Brasileira - Volume I**. 5ª edição. Brasília, DF, Novembro, 2010a.

BRASIL. Resolução - RDC n. 17, de 16 de abril de 2010b. **D.O.U. - Diário Oficial da União.** Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html>. Acesso em: 5/6/2014.

BRASIL. Resolução - RDC n. 35, de 16 de agosto de 2010c. **D.O.U. - Diário Oficial da União.** Disponível em: < http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/U_RDC-ANVISA-35_160810.pdf>. Acesso em: 10/07/2014.

BRASIL. Lei n. 6.360, de 23 de setembro de 1976. **D.O.U. - Diário Oficial da União,** Brasília, 24 de setembro de 1976. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6360.htm >. Acesso em: 10/07/2014.

BRASIL. Decreto n. 55871, de 26 de março de 1965. **D.O.U. - Diário Oficial da União,** Poder Executivo, de 09 de abril de 1965.

BURGESS, D. J. Microbial genetics: Amplified origins of antibiotic resistance. **Nature reviews. Genetics,** v. 15, n. 6, p. 362, 2014. Nature Publishing Group.

BUSH, K. β -Lactamase Inhibitors from Laboratory to Clinic. **Clinical Microbiology Reviews,** v.1, n.1, p. 109-123, jan. 1988.

BUSSMANN, R. W.; MALCA-GARCÍA, G.; GLENN, A.; et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of ethnopharmacology,** v. 132, n. 1, p. 101–108, 2010.

CARLET, J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. **Antimicrobial Resistance & Infection Control,** v.1, n.39, p. 1-7, 2012.

CHAGAS, T. P. G.; CARVALHO, K. R.; SANTOS, I. C. de O.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; ASENSI, M. D. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): countrywide spread of OXA-23–producing clones (CC15 and CC79). **Diagn Microbiol Infect Dis.,** p. 1-5, 2014.

CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 69, n.3, p. 827-834, 2013.

CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A,** v.1218, p. 2684–2691, 2011.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition.** CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COTTREL, H. J. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. **Nature,** v.159, p.748, 1947.

DE BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. da S.; FRUET, T. K.; JORGE, T.C.M.; MOURA, A. C. de. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol.,** São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FABICH, A. J.; JONES, S. A.; CHOWDHURY, F. Z.; et al. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. **Infection and immunity**, v. 76, n. 3, p. 1143–52, 2008.

FRANZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; MCLAUGHLIN, J. C.; et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 2, p. 362–6, 1998.

FUCHS, T. M.; EISENREICH, W.; HEESEMANN, J.; GOEBEL, W. Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 435–62, 2012.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELO, A.; KÜHN, I; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**. v. 50, p. 63– 73, 2002.

GAUDIN, V.; MARIS, P.; FUSELIER, R.; RIBOUCHON, J. L.; CADIEU, N.; RAULT, A. Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk. **Food Additives & Contaminants**, v. 21, n. 5, p. 422-433, 2004.

GAYNOR, M.; MANKIN, A.S. Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 9, p. 949-960, 2003.

GEORGI E.; SCHACHT, E.; SCHOLZ, H.C; SPLETTSTOESSER W. D. Standardized broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of Francisella tularensis subsp. holarctica strains from Europe and rare Francisella species. **J Antimicrob Chemother.**, v. 67, p.2429–2433, 2012.

GRARE, M.; FONTANAY, S.; CORNIL, C.; FINANCE, C.; DUVAL, R. E. Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: why? Which salt to select? How? **Journal of microbiological methods**, v. 75, n. 1, p. 156–9, 2008.

GRUPPO, V.; JOHNSON, C. M.; MARIETTA, K. S.; et al. Rapid Microbiologic and Pharmacologic Evaluation of Experimental Compounds against Mycobacterium tuberculosis. , v. 50, n. 4, p. 1245–1250, 2006.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1034–43, 2009.

HARRIOTT, M.M.; NOVERR, M.C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.53, p.3914–3922, 2009.

HARRIOTT, M.M.; NOVERR, M.C. Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.54, p.3746–3755, 2010.

HAWKEY, P.M.; JONES, A.M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, Suppl. 1, p. i3–i10, 2009.

HE, G.; LANDRY, M.; CHEN, H.; THORPE, C.; WALSH, D.; VARELA, M. F.; PAN, H. Detection of benzalkonium chloride resistance in community environmental isolates of staphylococci. **J Med Microbiol**, v. 63, p. 735-741, 2014.

HERSHEY, F.B.; CRUICKSHANK, C.N.D.; MULLINS, L. I. The quantitative reduction of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride by skin in vitro. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, p.191-196,1958.

HOFFMAN, L.R.; DEZIEL, E.; D'ARGENIO, D.A.; LEPINE, F.; EMERSON, J.; MCNAMARA, S.; GIBSON, R.L.; RAMSEY, B.W.; MILLER, S.I. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.103, n. 52, p.19890-19895, 2006.

HU, Y.; YANG, X.; LU, N.; ZHU, B. The abundance of antibiotic resistance genes in human guts has correlation to the consumption of antibiotics in animal. **Gut Microbes**, v.5, n. 2, p.245-249, 2014.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. 2005.

JOHNSON, T. L.; FORBES, B. A.; O'CONNOR-SCARLET, M.; MACHINSKI, A.; MCCLATCHEY, K. D. Rapid method of MIC determinations utilizing tetrazolium reduction. **Am. J. Clin. Pathol**, v.83, p.374–378, 1985.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 11, p. 1749–55, 2009.

JUHAS, M.; MEER, J. R. VAN DER; GAILLARD, M.; et al. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. **FEMS microbiology reviews**, v. 33, n. 2, p. 376–93, 2009.

KART, D.; TAVERNIER, S.; ACKER, H.V.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofouling**, v. 30, n. 3, p. 377-383, 2014.

KHALIFA, R. A.; NASSER, M. S.; GOMAA, A. A.; OSMAN, N. M.; SALEM, H. M. Resazurin Microtiter Assay Plate method for detection of susceptibility of multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis to second-line anti-tuberculous drugs. **Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis**, v. 62, n. 2, p. 241–247, 2013.

KREGIEL, D.; BERLOWSKA, J.; AMBROZIAK, W. Succinate Dehydrogenase Activity Assay in situ with Blue Tetrazolium Salt in Crabtree-Positive *Saccharomyces cerevisiae* Strain. **Food technol. Biotechnol.**, v. 46, n. 4, p. 376–380, 2008.

KUGLER, P. Quantitative Dehydrogenase Histochemistry with Exogenous Electron Carriers (PMS, MPMS, MB). **Histochemistry**, v. 75, p. 99-112, 1982.

KUMAR, P., TARAFDAR, J.C. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. **Biol Fertil Soils**, v. 38, p. 186-189, 2003.

KUPER, K. M.; BOLES, D. M.; MOHR, J. F.; WANGER, A. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Primer for Clinicians. **Pharmacotherapy**, v. 29, n. 11, p. 1326–1343, 2009.

LALITHA, C.; RAO, P. V. V. P. ANTIMICROBIAL EFFICACY OF LOW LEVEL COSMETIC PRESERVATIVES. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 1685–1696, 2014.

LEPE, J. A.; DOMÍNGUEZ-HERRERA, J.; PACHÓN, J.; AZNAR, J. Determining accurate vancomycin MIC values for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by the microdilution method. **J Antimicrob Chemother.** v.69, p. 136–138, 2014.

LOGU, A. DE; UDA, P.; PELLERANO, M. L.; et al. Comparison of two rapid colorimetric methods for determining resistance of mycobacterium tuberculosis to rifampin, isoniazid, and streptomycin in liquid medium. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 33–9, 2001.

MATTSON, A.M.; JENSEN, C.O.; DUTCHER, R.A. Triphenyltetrazolium Chloride as a Dye for Vital Tissues. **Science**, v. 26, p. 294-295, 1947.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 147–79, 1999.

MILENKOVIĆ, M.; PEVEC, A.; TUREL, I.; MILENKOVIĆ, M.; ČOBELJIĆ, B.; SLADIĆ, D.; KRSTIĆ, N.; ANĐELKOVIĆ, K. Synthesis, crystal structures, and antimicrobial activity of square-planar chloride and isocyanate Ni(II) complexes with the condensation product of 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde and Girard's T reagent. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 68, n. 16, 2015.

MORJAN, R.Y. e al. Synthesis, antibacterial and QSAR evaluation of 5-oxo and 5-thio derivatives of 1,4-disubstituted tetrazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 25, p. 4024–4028, 2015.

MOUSSA, S. H.; TAYEL, A. A.; AL-HASSAN, A. A.; FAROUK A. Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. **Journal of Mycology**, 7p. 2013.

MUSTAKALLIO, K. K.; AHOS, E. O.; AUTIO, E. O. Tetrazolium-Reduction Test for Milk. **Science**, v. 122, p. 971-972, 1955.

NEAL, C.E.; CALBERT, H.E. The use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 38, n.6, p. 629-633, 1955.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 267, n. 17, p. 5421–6, 2000.

OH, S.; KURT, Z.; TSEMENTZI, D.; et al. Microbial community degradation of widely used quaternary ammonium disinfectants. **Applied and environmental microbiology**, n. June, 2014.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102–107, 2007.

PALOMINO, J.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. , v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to Spectroscopy**. 2. ed. Florida: Saunders College Publishing, 1996.

PEARSE, A.G.E.; HESS, R. Substantivity and other Factors Responsible for Formazan Patterns in Dehydrogenase Histochemistry. **Experientia**, v.17, p. 136-141, 1961.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S; KRIEG, N.R. **Microbiologia Conceitos e aplicações**. V.2, 2.ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1997.

PFALLER, M. A; VU, Q.; LANCASTER, M.; et al. Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1625–8, 1994.

RAHMAN, M.; KU, I.; RAHMAN, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; MO, R. Evaluation of a Scanner-Assisted Colorimetric MIC Method for Susceptibility Testing of Gram-Negative Fermentative Bacteria. , v. 70, n. 4, p. 2398–2403, 2004.

REYNOLDS, P.E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 943-950, nov. 1989.

RICOTTA, E.R.; PALMER, A.; WYMORE, K.; CLOGHER, P.; OOSMNALLY, N.; ROBINSON, T.; LATHROP, S.; KARR, J.; HATCH, J.; DUNN, J.; RYAN, P.; BLYTHE, D. Epidemiology and Antimicrobial Resistance of International Travel-Associated Campylobacter Infections in the United States, 2005-2011. **American Journal of Public Health**, v. 104, n. 7, p. e108-e114, jul. 2014.

- RIOS, J.L.; RECIO M.C.; VILLAR A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **J. Ethnopharmacol**, v. 23, p. 127-149, 1988.
- ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Antimicrobial Resistance**, v. 52, p. 1138-1143, 2011.
- ROY, V.; ADAMS, B.L.; BENTLEY, W. E. Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49 p. 113-123, 2011.
- SALLES, M.J.C.; ZURITA, J.; MEJÍA, C.; VILLEGAS, M.V. Resistant Gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. **Epidemiol. Infect**, v.141, p. 2459–2472, 2013.
- SCHMIDT, C. A; AGARRAYUA, D. A; LAPORTA, L. V; et al. Development and validation of a microbiological agar assay for determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical preparations. **Journal of microbiological methods**, v. 77, n. 3, p. 308–315, 2009.
- SCHWEIZER, H. P. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. **FEMS microbiology letters**, v. 202, n. 1, p. 1–7, 2001.
- SILVA, S. M. ; ABE, S. Y.; MURAKAMI, F.S.; FRENSCH, G.; MARQUES, F.A.; NAKASHIMA, T. Essential Oils from Different Plant Parts of *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a Source of 1,8-Cineole and Their Bioactivities. **Pharmaceuticals**. v.4, p. 1535-1550, 2011.
- SIMOES, L.C.; SIMOES, M.; VIEIRA, M.J. Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. **Appl Environ Microbiol.**, v.76, p.6673–6679, 2010.
- SLAGER, J.; KJOS, M.; ATTAIECH, L.; VEENING, J.-W. Antibiotic-induced replication stress triggers bacterial competence by increasing gene dosage near the origin. **Cell**, v. 157, n. 2, p. 395–406, 2014. Elsevier Inc.
- STRAUS, F.H.; CHERONIS, N.D.; STRAUS, E. Demonstration of Reducing Enzyme Systems in Neoplasms and Living Mammalian Tissues by Triphenyltetrazolium Chloride. **Science**, v. 108, p. 113-115, 1948.
- STROHL, W.A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TAN, R.; LIU, J.; LI, M.; HUANG, J.; SUN, J.; QU, H. Epidemiology and antimicrobial resistance among commonly encountered bacteria associated with infections and colonization in intensive care units in a university affiliated hospital in Shanghai. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v. 47, p. 87-94, 2014.
- TENGERDY, R. P.; NAGY, J. G.; MARTIN, B. Quantitative Measurement of Bacterial Growth by the Reduction of Tetrazolium Salts. **Applied Microbiology**. v. 15, n. 4, p. 954-955, 1967.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (**USP 37 - NF 32**), v. 1, p. 1152-1155. Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Referências**. Curitiba: Editora UFPR, 2007.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M. de.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JUNIOR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

WHO. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. World Health Organization. France: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 232p., 2014.

WOLFSON, J.S.; HOOPER, D.C. The Fluoroquinolones: Structures, Mechanisms of Action and Resistance, and Spectra of Activity In Vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.28, n.4, p.581-586, 1985.

ZANCA, A.; CASTELLI, M.; ROSSI, T. **Pharmacy throught the ages: new frontier**. Parma: Farmitalia Carlo Erba, 1992.

ZHANEL, G.G.; DENISUIK, A.; VASHISHT S.; YACHISON, C.; ADAM, H.J.; HOBAN, D.J. Pharmacodynamic activity of ertapenem versus genotypically characterized extended-spectrum b-lactamase (ESBL)-, KPC- or NDM-producing *Escherichia coli* with reduced susceptibility or resistance to ertapenem using an in vitro model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. dku149, 5p. 2014.