

Doseamento da potência da ciprofloxacina em comprimidos orais*

Ciprofloxacin's potency dosage in tablets

Luís Antônio Esmerino¹; Airton Vicente Pereira² & Meri Elen Schelesky³

RESUMO – As farmacopéias preconizam métodos microbiológicos para o doseamento da potência de antimicrobianos em preparações farmacêuticas. O objetivo desse trabalho foi padronizar o método microbiológico de cilindros em placas para o doseamento da ciprofloxacina em comprimidos orais. Utilizou-se o microrganismo *Escherichia coli* ATCC 25922 como indicador. As concentrações do padrão foram de 0,15; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 e 5,0 µg/mL e 100 µL dessas soluções foram adicionados nos cilindros. Os diâmetros médios dos halos de inibição nas placas, após incubação por 16-18 horas a 35°C, foram de 17,70; 21,70; 25,0; 28,25; 30,10; 32,25 e 35,45 mm para as respectivas soluções. Comprimidos de ciprofloxacina com potência declarada de 500mg de três laboratórios apresentaram halos de inibição com médias de 28,0; 27,83 e 27,92mm. As concentrações determinadas foram de 507,07; 489,90 e 498,92mg, o que corresponde a 101%; 98% e 100% da potência declarada, respectivamente. Os comprimidos apresentaram potência dentro dos limites estabelecidos pela legislação que é de 90 a 110% da potência declarada. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que o método microbiológico de cilindros em placas é válido para o doseamento da potência da ciprofloxacina em preparações farmacêuticas.

PALAVRAS-CHAVE – Ciprofloxacina, cilindro em placas, método microbiológico, potência, validação.

SUMMARY – The pharmacopeias presents microbiological methods for antibiotics dosage. As for as we know, there is no official method for ciprofloxacin described in the Brazilian Pharmacopeia. The aim of this study is to develop a microbiological cylinder-plate method for ciprofloxacin dosage in tablets. The microorganism *Escherichia coli* ATCC 25922 was used in a Mueller-Hinton culture medium. The ciprofloxacin solutions concentrations were 0.15, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, and 5.0 µg/mL and the cylinders filled with 100 microliters. Then the plates were incubated for 16-18 hours at 35°C. The diameters obtained were 17.70, 21.70, 25.0, 28.25, 30.10, 32.25 and 35.45 millimeters, respectively. The solution prepared with 500mg of ciprofloxacin tablets presented inhibition haloes with averages 28.0, 27.83 and 27.92 millimeters. The average determination were 507.07, 489.90 and 498.92 micrograms, which corresponds to 101%, 98% and 100% to declared potency, respectively. The tablets potencies were the according with the limits established by the legislation with 90% minimum and 110% maximum of the declared potency. The results obtained led us to conclude that the microbiological cylinder-plate method is valid to determine the ciprofloxacin dosing in tablets.

KEYWORDS – Ciprofloxacin, cylinder-plate method, microbiology assay, potency determination.

INTRODUÇÃO

Um aspecto importante das apresentações farmacêuticas de antimicrobianos, na atualidade, e a bioequivalência, pois existem diferentes apresentações do mesmo medicamento comercializado por diversos laboratórios farmacêuticos.

O termo bioequivalente é utilizado para designar que duas apresentações farmacêuticas de um determinado fármaco proporcionam a mesma biodisponibilidade, ou seja, a mesma concentração plasmática. A bioequivalência é fundamental quando se pretende mudar o medicamento prescrito por substância igual de outro laboratório, de tal forma que seja garantida a mesma qualidade do medicamento prescrito¹¹.

No estudo dos antimicrobianos e no tratamento das doenças infecciosas, os conceitos de sensibilidade e resistência bacteriana se fundamentam na correlação entre a concentração inibitória mínima (MIC) e os níveis plasmáticos alcançados com o antimicrobiano administrado. De certa forma, o MIC é correlacionado com as concentrações plasmáticas obtidas após a administração do antimicrobiano, afirmando-se que há sensibilidade quando o MIC for inferior a essas concentrações⁶.

Para se obter concentrações sanguíneas e/ou teciduais com a capacidade de matar ou inibir o crescimento bacteriano, no foco infeccioso, é necessário que a concentração do antimicrobiano esteja adequada nas preparações farmacêuticas que serão administradas ao pa-

Recebido em 31/1/2005

*Trabalho realizado nos laboratórios de química farmacêutica e microbiologia clínica da Univ. Est. de Ponta Grossa – UEPG. Setor de Ciências Biológicas e da Saúde.

¹Professor do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas; ²Professor do Departamento de Ciências Farmacêuticas;

³Aluna do Curso de Farmácia-Bioquímica – bolsista PIBIC/CNPq

ciente, cujo processo infeccioso se deseja combater. Neste aspecto, é fundamental que a potência do antimicrobiano esteja correta no comprimido administrado.

Embora a biodisponibilidade de um fármaco possa ser estudada por diferentes vias de administração, habitualmente é referida para os medicamentos administrados por via oral que têm um efeito sistêmico. A biodisponibilidade oral é uma característica dos diferentes fármacos variando de acordo com a composição química da substância, a quantidade do fármaco absorvida, sua velocidade de absorção e a quantidade presente no plasma disponível para um efeito biológico¹¹.

No caso dos antimicrobianos administrados por via oral, ou qualquer outra via, o efeito biológico esperado é a morte do microrganismo (efeito bactericida) ou a diminuição do seu crescimento (efeito bacteriostático). É importante que após a administração do antimicrobiano, a CIM seja atingida rapidamente, se mantenha no intervalo entre as doses e seja, ainda, mantida durante toda a duração do tratamento.

Os métodos microbiológicos, geralmente utilizam um padrão de referência para resolver dúvidas com respeito a uma possível perda da atividade antimicrobiana. A Farmacopéia Americana¹³ recomenda a utilização de procedimentos microbiológicos para se determinar a potência dos antimicrobianos nas apresentações farmacêuticas.

Geralmente são empregados dois métodos, o cilindro em placa ou de "placa" e o turbidimétrico ou de "tubo". O primeiro se baseia na difusão do antibiótico contido em um cilindro vertical através de uma camada de ágar solidificado em uma placa de Petri, em uma extensão tal, que o crescimento do microrganismo agregado se detenha em uma área circular ou "zona" ao redor do cilindro que contém a solução do antibiótico. O método turbidimétrico se baseia na inibição do crescimento de um cultivo microbiano em uma solução uniforme do antibiótico, em um caldo que favorece o seu rápido crescimento na ausência deste fármaco.

A determinação da potência nos antimicrobianos é importante no controle de qualidade das preparações farmacêuticas e faz-se necessário o desenvolvimento de procedimentos práticos e econômicos que possam ser validados e aplicados no doseamento desses fármacos.

O amplo espectro de atividade antimicrobiana e o excelente comportamento farmacológico; tem feito das quinolonas, especialmente das fluoroquinolonas (norfloxacin, pefloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina) agentes muito atrativos para o tratamento de enfermidades infecciosas severas, tanto no homem como em animais⁹.

A ciprofloxacina está indicada para o tratamento de infecções por enterobactérias, estafilococos (exceto os metilino-resistentes), hemófilos, neisserias e pseudomonas; e seu uso clínico revela alta eficácia no tratamento de infecções por esses agentes. Exerce ação bactericida sobre os microrganismos sensíveis por interferir na síntese do ADN-cromossômico, inibindo a ação da topoisomerase II (ADN-girase) nas bactérias gram-negativas, e na topoisomerase IV nos estafilococos¹¹.

As Farmacopéias preconizam métodos microbiológicos para o doseamento da potência de antimicrobianos em preparações farmacêuticas¹³, entretanto, ainda não

há um método oficial para a ciprofloxacina na Farmacopéia Brasileira⁴. O objetivo desse trabalho foi padronizar o método microbiológico de cilindros em placas para o doseamento desse fármaco em comprimidos orais.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, baseando-se na literatura existente^{1,3,5,12,13}, testou-se o método microbiológico de cilindro em placas para a determinação da potência da ciprofloxacina em comprimidos orais.

Diferentes concentrações de um padrão de ciprofloxacina foram utilizadas com o objetivo de traçar uma curva que demonstre a relação entre o diâmetro dos halos de inibição e a potência do antimicrobiano.

Para determinação da potência da ciprofloxacina o meio de cultura empregado foi o ágar de Mueller-Hinton (MH) e o microrganismo-teste foi *Escherichia coli* ATCC 25922.

Curva padrão

Pesaram-se 50mg de ciprofloxacina e dissolveu-se em 10mL de NaOH 0,1M sob agitação. A seguir, o volume foi completado com tampão fosfato pH 8,0, em balão volumétrico de 50mL para se obter uma solução com concentração de 1,0mg/mL. A partir dessa solução, realizou-se diluições, com tampão fosfato pH 8,0, até se obter as concentrações de 0,15; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 e 5,0µg/mL.

Análise dos comprimidos

Foram analisados comprimidos de ciprofloxacina com potência declarada de 500mg de três laboratórios diferentes, designados como A, B, e C. Na análise foram incluídos o medicamento original, um similar e o genérico.

As soluções das amostras foram preparadas pesando-se dois comprimidos para se determinar a massa total. Em seguida os comprimidos foram macerados e pulverizados. Pesou-se o pó equivalente a 50mg de ciprofloxacina e dissolveu-se em 10mL de NaOH 0,1M sob agitação. A seguir, o volume foi completado com tampão fosfato pH 8,0, em balão volumétrico de 50mL para se obter uma solução com concentração de 1,0mg/mL. A partir dessa solução, foram realizadas diluições, com tampão fosfato pH 8,0, até se obter a concentração de 1,0µg/mL.

Determinação da potência

Inicialmente, a suspensão do microrganismo-teste foi preparada a partir de uma cultura recente, onde o microrganismo foi repicado em uma placa contendo o meio MH e incubado em estufa a 35°C por 24h. A concentração do inóculo foi preparada em salina. Para a padronização desse inóculo a turvação foi comparada com uma suspensão de BaSO₄, escala 0,5 de MacFarland^{7,10}, em espectrofotômetro (580nm). A suspensão foi padronizada com absorbância entre 0,08 e 0,1.

A partir do preparo do microrganismo teste, foi preparado o ágar-inóculo numa proporção de 1,0mL da suspensão bacteriana para 100mL de meio de MH ainda no estado líquido, porém, numa temperatura suportável à palma da mão humana (45-50°C) em que os microrganismos permanecem vivos ao serem adicionados e homogeneizados com o meio.

Antes de verter o meio de cultura sobre as placas, foram colocados papéis de filtro nas tampas das placas para que a água resultante do metabolismo bacteriano seja absorvida durante o processo de incubação. Isso deve ser feito para se evitar que a água que se evapora fique retida na tampa da placa e caia sobre o meio diluindo os antibióticos adicionados nos cilindros o que poderia alterar os diâmetros dos halos de inibição.

Para preparar as placas foram pipetados 14mL do meio de MH sobre as placas de 100mm. Homogeneizou-se e esperou-se solidificar. Sobre esta camada de meio foram adicionados 6mL do ágar-inóculo, homogeneizou-se e esperou-se a solidificação.

Com as duas camadas de meio uniformemente sobrepostas e já solidificadas, foram colocados, sobre a superfície do meio, os cilindros de aço inoxidável (10mm de altura; diâmetros interno e externo de 6 e 8mm, respectivamente)¹³. Para as concentrações maiores utilizou-se 1 cilindro por placa e para as menores dois ou três cilindros por placa. Os cilindros foram previamente lavados com ácido nítrico 2N e esterilizados em autoclave 120°C por 15 minutos.

Foram utilizadas 10 repetições para cada ponto da curva e 6 para cada uma das amostras. Os cilindros foram preenchidos com 100µL das soluções. Em seguida, as placas foram incubadas por 16-18 horas a 35°C.

É conveniente aguardar alguns minutos após a colocação dos antimicrobianos no interior dos cilindros sobre o meio para que ocorra a difusão do antimicrobiano. Então, cuidadosamente, colocou-se as placas na estufa 35°C, com as tampas para cima e de preferência sem empilhá-las.

Caso a estufa seja bastante utilizada e isto implique em sua abertura várias vezes ao dia, o fundo da estufa deve ser o local mais recomendado para a incubação das placas, onde não há tanta perda de calor e alteração de temperatura.

A leitura dos halos de inibição do crescimento bacteriano foi feita após a incubação com auxílio de uma régua.

RESULTADOS

Após o período de incubação os halos de inibição foram medidos em milímetros (mm). Em seguida, calculou-se o diâmetro médio, desvio-padrão e coeficiente de variação (%) para cada concentração dos padrões de ciprofloxacina. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela I.

Após a determinação do diâmetro dos halos, refe-

TABELA I
Resultado da leitura dos halos de inibição obtidos com os diferentes padrões de ciprofloxacina

MICROORGANISMO	CIPROFLOXACINA (µg/mL)						
	0,15	0,25	0,5	1,0	1,5	2,5	5,0
<i>Escherichia coli</i>							
Diâmetro dos halos (mm) n=10	17,70	21,70	25,00	28,25	30,10	32,25	35,45
Desvio-padrão	0,42	0,42	0,97	0,42	0,74	0,49	0,64
Coeficiente de variação (%)	2,37	1,93	3,88	1,49	2,46	1,52	1,8

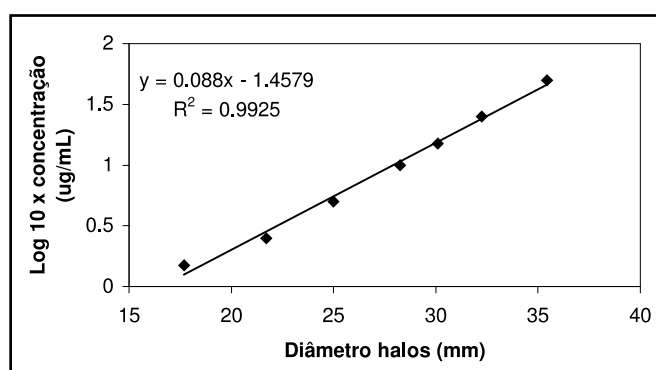


FIG. 1 - Curva de calibração com os padrões de ciprofloxacina e o microorganismo-teste *Escherichia coli* ATCC 25922.

TABELA II
Resultado da determinação da potência dos comprimidos de ciprofloxacina de 500mg analisados

Microorganismo	Ciprofloxacina		
	A	B	C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			
Diâmetro dos halos (mm) n=6	28,00	27,83	27,92
Desvio-padrão	1,22	1,29	0,49
Coeficiente de variação (%)	4,36	4,63	1,75
Potência média determinada (mg)	507,07	489,90	498,92
Percentual em relação a potência declarada (%)	101	99	100

rentes aos padrões utilizados, a curva foi traçada e a equação de reta obtida pode ser observada na Fig. 1.

Os resultados da análise dos comprimidos de 500mg de ciprofloxacina podem ser observados na Tabela II.

DISCUSSÃO

A eficiência de um medicamento é geralmente avaliada pela sua resposta clínica ou terapêutica. Essa resposta está diretamente relacionada a biodisponibilidade do fármaco, a qual pode ser interpretada como uma medida de seu desempenho². Além disso, a perda da potência antimicrobiana podem influenciar no resultado terapêutico.

A potência dos antibióticos geralmente é determinada comparando a dose com a qual se inibe o crescimento de um microorganismo adequado e susceptível com a dose da preparação do antibiótico de referência nas mesmas condições de trabalho. Uma redução na atividade microbiana pode revelar mudanças não demonstráveis por métodos químicos¹³.

O método microbiológico de difusão em ágar, utilizando cilindros em placa, preconizado pela Farmacopéia Americana, é semelhante ao teste de difusão em ágar com discos de papel de filtro (antibiograma)^{7,10} e testa a capacidade de um determinado microorganismo se multiplicar na presença de concentrações presumíveis de um antimicrobiano, aplicado no interior de um cilindro sobre uma camada do ágar em uma placa de Petri. A partir do cilindro, o antimicrobiano se difunde no ágar, em concentrações decrescentes. A cepa bacteriana semeada cresce até encontrar a CIM e a partir do ponto de aplicação se forma um halo de inibição ao redor do cilindro. Esse halo é determinado em milíme-

tros e é diretamente proporcional a concentração do antimicrobiano. Assim, à medida que se aumenta a concentração do antimicrobiano são obtidos halos maiores até que se esgote a capacidade de difusão do antimicrobiano no ágar. Nesse ponto, o aumento na concentração do antimicrobiano não mais aumenta o halo de inibição.

Esse método tem sido utilizado também para determinação de antimicrobianos em fluidos biológicos e em alimentos. López Aldama *et al.* (1997) utilizaram o método para determinação de antimicrobianos em queijos comercializados na cidade de Oaxaca, México.

As fluorquinolonas são antibióticos sintéticos, recentemente introduzidos na prática clínica. A ciprofloxacina é uma das fluorquinolonas mais comumente utilizada e foi escolhida devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana. É uma das mais potentes fluorquinolonas contra bactérias gram-negativas, mostrando-se mais ativa que a norfloxacin contra enterobactérias e pseudomonas¹¹.

Todavia, tem-se observado uma alarmante taxa de resistência bacteriana em isolados clínicos humanos, e há evidências que indicam o aumento de bactérias resistentes também em animais tratados. A alta incidência de bactérias resistentes as fluoroquinolonas em pessoas não expostas a estes agentes poderia ser o resultado do uso extensivo destes antimicrobianos na medicina veterinária¹⁴.

A ciprofloxacina quando administrada por via oral são absorvidos cerca de 70% da dose administrada e a concentração sérica máxima, de 2µg/mL, é atingida em um hora após a ingestão de um comprimido de 500mg¹¹. Como regra geral, consideram-se, sensíveis as bactérias com CIM igual ou inferior a 1µg/mL; parcialmente sensíveis as com CIM entre 1 e 4µg/mL; e resistentes, *in vitro*, com concentração superior a 4µg/mL¹¹. A ciprofloxacina no antibiograma por disco difusão é testada na concentração de 5µg¹⁰.

A cepa *Escherichia coli* ATCC (*American Type Culture Collection*) foi utilizada como microrganismo-teste por apresentar sensibilidade para a ciprofloxacina e é recomendada pelo NCCLS para ser usada como controle de qualidade em testes de susceptibilidade antimicrobiana para enterobactérias¹⁰.

Na adaptação do método farmacopéico utilizou-se algumas condições recomendadas pelo NCCLS¹⁰ para a realização do antibiograma, ou seja: 1) utilização do ágar Mueller-Hinton; 2) preparo do inóculo por suspensão direta em salina equivalente a 0,5 da escala de MacFarland; e 3) incubação a 35°C, em aerobiose por 16-18 horas.

Para o doseamento microbiológico da ciprofloxacina uma curva de sete pontos foi traçada utilizando diferentes concentrações de ciprofloxacina (**Tabela I**). A curva foi traçada e o coeficiente de correlação apresentou-se próximo da unidade, sendo $r^2 = 0,9925$, o que demonstra a linearidade do método (**Fig. 1**). Os coeficientes de variação obtidos (**Tabela I**), com os diâmetros dos halos de inibição para as diferentes concentrações do padrão, ficaram abaixo de 5% demonstrando a reprodutividade do método empregado.

Foram analisados comprimidos de ciprofloxacina de

500mg de três laboratórios, sendo um de referência, um similar e o outro genérico. As soluções de 1,0µg/mL preparadas com os comprimidos apresentaram halos de inibição com as seguintes médias 28; 27,83 e 27,92mm. As potências determinadas nos comprimidos analisados foram de 507,07; 489,90 e 498,92mg, o que corresponde a 101%; 98% e 99% da potência declarada. Os coeficientes de variação para todas as amostras ficaram abaixo dos 5% (**Tabela II**).

A partir dos resultados obtidos observou-se que o método microbiológico de difusão em ágar, utilizando cilindros em placas, é válido para o doseamento da ciprofloxacina. Os comprimidos analisados apresentaram potência dentro dos limites estabelecidos pela legislação que é de 90 a 120% da potência declarada. Esse resultado já era esperado visto que os comprimidos analisados foram adquiridos em farmácias e são aprovados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para serem comercializados.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o método microbiológico de difusão em ágar, utilizando cilindros em placas, para o doseamento de antimicrobianos, apresentou linearidade e precisão adequada, sendo um método econômico e de fácil execução. Dessa forma o método foi validado e constitui-se, assim, em um método alternativo para a determinação da ciprofloxacina em comprimidos orais.

REFERÊNCIAS

1. Breier, A.R.; Garcia, C.V.; Oppe, T.P.; Stepp, M.; Schapoval, E.E.S. Microbiological assay for azithromycin in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. n. 29, n.5, p. 957-961, 2002.
2. Consigliere, V.O.; Storpirtis, S.; Ferraz, H.G. Aspectos farmacotécnicos relacionados à biodisponibilidade de medicamentos. *Rev. Ciênc. Farm.* v.21, n.1, p.23-41, 2000. 1215p.
3. Esmerino, L.A.; Pereira, A.V. Adamowicz, T.; Borges, D.M.; Talacimon, E.A.; Schelisky, M.E. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. *Publi. UEPG Ci. Biol. Saúde*. v. 10, n. 1, p.53-60, 2004.
4. Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
5. Föhlich, P.E.; Schapoval E. E. S. Doseamento microbiológico do norfloxacin, método de difusão em ágar (cilindro em placas). *Rev. Ciênc. farm.* v. 12, p.161-65, 1990.
6. Fuchs, F.D.; Wannmacher, L. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional, 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 678 p.
7. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.A.; Schreckenberger, P.C.; Wirtz, W.C. Jr. *Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.
8. López Aldama, P.; Martínez Maya, J.J.; Sanches Del Angel, L.S. Determinación de penicilina y otros inhibidores en quesos de la ciudad de Oaxaca, México. *Vet. Mex.* v. 28, n. 3, p. 185-8, 1997.
9. Martindale – *The Extra Pharmacopoeia*. 29 ed. London: The Pharmaceutical Press, 1989. 1896 p.
10. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne: NCCLS, 2002. 133p.
11. Tavares, W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos*. 3ª ed. São Paulo. Atheneu, 2001. 1216p.
12. Turcinov, T.; Pepeljnjak, S. Azithromycin potency determination: optimal conditions for microbiological diffusion method assay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 17, p. 903-10, 1998.
13. United States Pharmacopoeia Convention. *The united states pharmacopoeia: the national formulary*. 22ª ed. Easton: USP, 1990. 2067p.
14. WHO (Who Health Organization). *Use of quinolones in food animal and potential impact on human health*. Geneva, 1998. www.who.int/emc.

Endereço para correspondência

Luís Antônio Esmerino

Universidade Estadual de Ponta Grossa

Campus de Uvaranas – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Av. Carlos Cavalcante, 47-48 sala 92

Ponta Grossa, PR – 80030.000

e-mail: esmerino@uepg.br