



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO
DE DIFUSÃO EM ÁGAR PARA QUANTIFICAÇÃO DE
FLUCONAZOL CÁPSULAS E APLICAÇÃO
EM ESTUDOS DE ESTABILIDADE**

Camila Reichmann

ARARAQUARA

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM
ÁGAR PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLUCONAZOL CÁPSULAS E
APLICAÇÃO EM ESTUDOS DE ESTABILIDADE**

Camila Reichmann

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Co-orientadora: Josilene Chaves Ruela Corrêa

ARARAQUARA

2012

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar e acima de tudo. Muito obrigada pelas bênçãos e proteções concedidas, hoje e sempre.

Aos meus pais, por tornar esse sonho possível. À minha irmã e demais familiares, por todo o apoio.

Ao meu namorado, Ariel, por estar sempre ao meu lado, independente de tudo.

À professora Hérica, muito obrigada pela orientação, pelos ensinamentos e a contribuição com a minha formação.

À co-orientadora Josilene, muito obrigada pela orientação, pelo apoio e paciência.

Aos colegas de laboratório, muito obrigada pela convivência e por tornar melhor a rotina de trabalho. Agradeço também por todas as dúvidas esclarecidas, sugestões e ajuda durante este trabalho.

Aos amigos, por todo o apoio, confiança, carinho e pela amizade imprescindível de todos vocês.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. DESENVOLVIMENTO	12
2.1. MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR	12
2.1.1. Material e método	12
2.1.1.1. Preparo do inóculo	13
2.1.1.2. Preparo da solução de fluconazol padrão	13
2.1.1.3. Preparo da solução de fluconazol amostra	14
2.1.2. Curva analítica	14
2.1.3. Validação	17
2.1.4. Determinação da potência do fluconazol	17
2.1.5. Teste de recuperação	19
2.1.6. Aplicação do método desenvolvido e validado por difusão em ágar	20
2.1.7. Discussão	21
2.2. MÉTODO TURBIDIMÉTRICO	23
2.2.1. Material e método	23
2.2.1.1. Preparo do inóculo	24
2.2.1.2. Preparo da solução de fluconazol padrão	24
2.2.1.3. Preparo da solução de fluconazol amostra	25
2.2.1.4. Ensaio	25
2.2.2. Resultados	26
2.2.3. Discussão	31
3. CONCLUSÃO	33
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

Resumo

O fluconazol é um antifúngico de amplo espectro indicado para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e superficiais. A determinação da potência dos antimicrobianos é importante no controle e na garantia da 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. Dentre os ensaios microbiológicos, os mais comumente empregados são o de difusão em ágar e o turbidimétrico. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos microbiológicos para determinação da potência do fluconazol cápsulas. O método de difusão em ágar foi desenvolvido empregando ágar Sabouraud e *Candida albicans* ATCC 64548 como micro-organismo teste. Foi utilizado o delineamento 3 x 3, segundo preconiza a Farmacopeia Brasileira (2010). A validação do método demonstrou linearidade entre o diâmetro dos halos de inibição e o logaritmo da concentração numa faixa de 25,0 a 100,0 µg/mL. Os resultados foram precisos, com desvio padrão relativo igual a 6,15%, e exatos, com intervalo de tolerância de 97,30%, dentro dos limites permitidos. O método foi aplicado ainda em estudos de estabilidade, nas condições de estresse calor úmido, em câmara climática a 40 °C e 75% de umidade relativa por 90 dias; calor seco, em estufa a 60 °C por 66 dias e fotodegradação, em câmara espelhada com luz UVC por 66 e 180 dias. Os valores de teor médio calculados foram de 30,27% para calor úmido; 27,72% para calor seco; 33,29% para fotodegradação durante 66 dias e 25,00% para fotodegradação durante 180 dias.

Palavras-chave: controle de qualidade, difusão em ágar, estudos de estabilidade, fluconazol, validação

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura química do fluconazol (CAS 86386-73-4)	8
Figura 2 – Esquema do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções-padrão (P) e amostra (A) na placa de Petri, sendo P1 (25 µg/mL); P2 (50 µg/mL); P3 (100 µg/mL) e A1 (25 µg/mL); A2 (50 µg/mL) e A3 (100 µg/mL)	15
Figura 3 – Representação gráfica da curva analítica de fluconazol padrão e amostra, no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar	16
Figura 4 - Representação gráfica da curva analítica de fluconazol padrão e amostra, no ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	31

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros testados para a avaliação de fluconazol por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar.....	13
Tabela 2 – Valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento obtidos com a solução de fluconazol, no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.....	16
Tabela 3 – Valores experimentais obtidos para o doseamento de solução padrão de fluconazol, pelo método de difusão em ágar.....	18
Tabela 4 – Análise da variância dos dados obtidos no ensaio microbiológico de fluconazol pelo método de difusão em ágar.....	18
Tabela 5 – Valores experimentais obtidos no teste de recuperação do fluconazol padrão, no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.....	19
Tabela 6 – Valores experimentais obtidos para o doseamento das amostras submetidas a estudo de estabilidade preliminar pelo ensaio microbiológico por difusão em ágar.....	21
Tabela 7 – Parâmetros testados para a avaliação de fluconazol por ensaio microbiológico – método turbidimétrico.....	24
Tabela 8 – Valores de absorvância obtidos no teste a 25°C, inóculo a 20% e adição de 200 µL de solução padrão de fluconazol, dia 1.....	26
Tabela 9 – Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 25°C, inóculo a 20% e adição de 200 µL de solução padrão de fluconazol, dia 2.....	27
Tabela 10 – Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 25°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL de solução padrão e amostra de fluconazol ...	27
Tabela 11 – Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 35°C, inóculo a 20% e adição de 200 µL de solução padrão e amostra de fluconazol ...	28
Tabela 12 – Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 35°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL de solução padrão e amostra de fluconazol, dia 1.....	29

Tabela 13 – Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 35°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL de solução padrão e amostra de fluconazol, dia 2	29
Tabela 14 – Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 35°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL de solução padrão e amostra de fluconazol, dia 3	29
Tabela 15 – Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 35°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL de solução padrão e amostra de fluconazol, dia 4	30
Tabela 16 – Análise comparativa dos resultados obtidos nos 4 dias de testes a 35°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL das soluções de padrão e amostra de fluconazol	30

1. INTRODUÇÃO

A frequência de infecções fúngicas sistêmicas tem aumentado nos últimos anos principalmente em pacientes imunodeprimidos, como portadores da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida – SIDA, e pacientes transplantados ou em terapia com quimioterápicos. Essas infecções seriam inofensivas em indivíduos saudáveis, mas têm ocorrência de 90% em pacientes HIV (Human Immunodeficiency Virus) positivos, além de representar uma das principais causas de morbidade e mortalidade (BERGOLD & GEORGIADIS, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2009).

Dentre os antifúngicos mais recomendados para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas estão os azóis, como o fluconazol, da 1ª geração da classe dos triazólicos, devido ao amplo espectro de ação, biodisponibilidade e baixa toxicidade (MARTIN, 1999). É de extrema importância que os antifúngicos utilizados sejam seguros e eficazes e, para isso, devem ser realizados testes que avaliem a sua potência.

O fluconazol, α -(2,4-difluorfenil)- α -(1H-triazol-1-metil)-1H-1,2,4-triazol-1-etanol, também é ativo contra infecções superficiais, além das sistêmicas, e é indicado no tratamento de candidíase orofaríngea, esofágica, vaginal e profunda, meningite criptocócica ou por coccidioides e tem atividade contra histoplasmose, blastomicose, esporotricose e dermatófitos (GILMAN; GOODMAN & GILMAN, 2006).

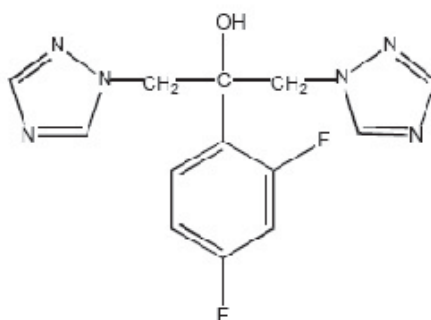


Figura 1: Estrutura química do fluconazol (CAS 86386-73-4)

Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição do sistema enzimático esterol-14-alfa-desmetilase, dependente do citocromo P450, que prejudica a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e leva ao acúmulo de 14-alfa-metilesteróis. Esses metilesteróis levam à desagregação de arranjos das cadeias de fosfolipídeos. Em consequência, a função de determinados sistemas enzimáticos como ATPase e enzimas de transporte de elétrons fica comprometida, inibindo o crescimento dos fungos (PARK *et al.*, 2007; TELLES FILHO, 2007).

O fluconazol é ativo tanto pela via oral quanto intravenosa e possui alta biodisponibilidade e meia-vida, o que possibilita a administração de uma ou duas doses diárias do medicamento. É altamente absorvido no trato gastrointestinal e sua excreção é realizada pelos rins. Entre as reações adversas estão: náuseas, vômitos, cefaleia, erupções cutâneas, dor abdominal, diarreia e alopecia em pacientes submetidos a tratamento prolongado com dose de 400 mg/dia (GILMAN; GOODMAN & GILMAN, 2006).

O controle de qualidade é imprescindível para o desempenho adequado de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos, em relação à sua segurança, eficácia e aceitabilidade. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige a implementação de boas práticas de fabricação, conforme as normas técnicas oficialmente estabelecidas. Além disso, preconiza também a realização de ensaios de controle de qualidade em todos os processos de fabricação (PINTO; KANEKO & PINTO, 2010; YAMAMOTO *et al.*, 2004).

Um ensaio microbiológico é um procedimento no qual a potência desconhecida de um material é estimada por comparação de seus efeitos em um

sistema biológico, a cultura de micro-organismos, com aqueles do padrão de referência, cuja potência é conhecida (HEWITT, 2007).

Dentre os ensaios microbiológicos, os mais comumente empregados na determinação da potência de antimicrobianos são o método de difusão em ágar e o método turbidimétrico, ambos descritos na Farmacopeia Brasileira (2010) para outros fármacos.

O método de difusão em ágar se baseia na difusão do antifúngico contido em um cilindro de aço inoxidável, através de uma camada de ágar uniformemente inoculada. O crescimento do micro-organismo agregado se detém em uma área circular ou “zona” ao redor do cilindro que contém a solução do antibiótico, dessa forma, o micro-organismo funciona como indicador que permite identificar baixas concentrações do antimicrobiano que limita o seu crescimento. Além dos cilindros, é possível ainda o uso de “templates”, orifícios ou discos de papel (HEWITT, 1989).

O método turbidimétrico se baseia na inibição do crescimento de um cultivo microbiano em uma solução uniforme do princípio ativo, em um caldo que favorece o seu rápido crescimento na ausência desse fármaco. A potência do antifúngico é avaliada através da turbidez (absorvância) da suspensão fúngica contida no meio (YAMAMOTO *et al.*, 2004).

Estes métodos, devidamente padronizados e validados, são fundamentais para se determinar a suscetibilidade aos antifúngicos. Existe uma deficiência de métodos analíticos e especificações farmacopeicas para diversos fármacos, incluindo o fluconazol, para que a qualidade requerida dos medicamentos, tanto de sua produção quanto de sua eficácia, atenda às necessidades brasileiras (ALMEIDA *et al.*, 2009).

A determinação da potência dos antimicrobianos é importante no controle e na garantia da 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 (ESMERINO *et al.*, 2004).

Neste trabalho, foi desenvolvido o ensaio microbiológico de difusão em ágar e aplicado em estudos de estabilidade, além de ser estudado o método turbidimétrico para fluconazol cápsulas, sendo o método de difusão em ágar devidamente validado conforme a Resolução RE nº 899 da ANVISA (Brasil, 2003).

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

2.1.1. Material e Método

O fluconazol padrão utilizado no ensaio é identificado pelo lote 190508 e foi doado gentilmente pela empresa EMS S/A (Campinas, Brasil). O produto, referido como amostra, consistiu em cápsulas com 150 mg de fluconazol rotulado manipuladas pela farmácia magistral da Farmácia Escola da UNESP de Araraquara. Foi realizada a determinação do peso médio, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), em que foram pesadas 20 cápsulas individualmente. Elas foram pesadas cheias e após esvaziadas, pesadas novamente. O valor do peso médio foi 444,81 mg e todas as cápsulas estavam de acordo com as recomendações da literatura.

Para manutenção das cepas fúngicas foi utilizado o meio ágar Sabouraud, inclinado, em tubos de ensaio. No ensaio foi utilizado o mesmo meio como camada base e, como camada de superfície, o meio ágar Sabouraud acrescido de solução salina 0,85% inoculada com o micro-organismo.

Os meios de cultura, água deionizada e ponteiras foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Foram empregadas placas de Petri com 20,0 mm de altura x 100,0 mm de diâmetro, sendo que nas tampas foi colocado papel de filtro para impedir que gotículas de condensação invalidassem ou dificultassem a leitura dos halos de inibição. Estes materiais e vidraria não volumétrica foram esterilizados em estufa a 180 °C por 1 hora.

As placas foram incubadas em estufa ECB 1.2 digital (Odontobrás®). Para as leituras, utilizou-se paquímetro digital Mitutoyo® IP 65.

Os parâmetros testados no ensaio constam na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros testados para a avaliação de fluconazol por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Candida albicans</i> ATCC 64548
Meio de Cultura	ágar Sabouraud
Solução Diluente	água deionizada
Concentração do inóculo	0,5%; 1,0% e 2,0%
Concentração das soluções	25,0; 50,0 e 100,0 µg/mL
Temperatura de incubação	25°C e 35°C
Tempo de incubação	24h e 48h

A concentração de inóculo utilizada foi de 2,0%, a duração de incubação foi 24h e a temperatura foi 25°C, pois demonstraram melhores condições para o crescimento das cepas fúngicas.

2.1.1.1. Preparo do Inóculo

O inóculo foi preparado com solução salina 0,85% estéril. Em 5,0 mL desta solução foi suspensa uma alçada de cepas de *Candida albicans* ATCC 64548 e foi padronizada em espectrofotômetro a 580 nm e $25 \pm 2\%$ de transmitância, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010). Uma alíquota de 1,0 mL do inóculo foi adicionada a 5,0 mL do meio de cultura ágar Sabouraud. O meio de cultura foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante, presentes no rótulo do produto.

2.1.1.2. Preparo da solução de fluconazol padrão

As soluções de fluconazol foram preparadas a partir da diluição de uma solução primária, preparada pesando-se exatamente cerca de 6,25 mg do fármaco,

colocados em balão volumétrico de 25,0 mL. O volume foi completado com água deionizada e foram retiradas alíquotas de 1,0; 2,0 e 4,0 mL para preparar as soluções nas concentrações: 25,0; 50,0 e 100,0 µg/mL, respectivamente.

2.1.1.3. Preparo da solução de fluconazol amostra

Estas soluções foram preparadas de forma similar a solução-padrão, sendo que foram pesados exatamente cerca de 18,53 mg da substância amostra, transferidos para balão volumétrico de 25,0 mL. Foram retiradas alíquotas de mesmo volume e preparadas soluções com as mesmas concentrações finais das soluções de padrão, conforme item 2.1.1.2.

2.1.2. Curva Analítica

Para realização do ensaio foram adicionados cerca de 20,0 mL de meio de cultura ágar Sabouraud nas placas de Petri, compondo a camada base e, após a sua solidificação, foram adicionados 5,0 mL da mistura contendo meio de cultura e inóculo, que compõem a camada de superfície. Após a solidificação, os cilindros previamente esterilizados foram posicionados cuidadosamente e então as soluções de fluconazol foram pipetadas conforme o esquema apresentado na Figura 2. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

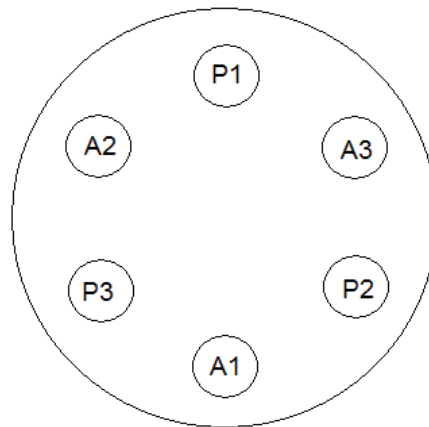


Figura 2: Esquema do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções-padrão (P) e amostra (A) na placa de Petri, sendo P1 (25 µg/mL); P2 (50 µg/mL); P3 (100 µg/mL) e A1 (25 µg/mL); A2 (50 µg/mL) e A3 (100 µg/mL).

As placas foram incubadas a 8°C durante 2 horas para que ocorresse a devida difusão do fármaco no meio. Posteriormente, foram incubadas a 25°C e após 24 h mediu-se os diâmetros dos halos de inibição.

A partir da média dos diâmetros dos halos de inibição obtidos e do logaritmo das concentrações utilizadas, foi construída a curva analítica. Foi utilizado o delineamento 3 x 3, conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (2010). Os resultados obtidos podem ser verificados na Tabela 2 e a curva analítica, na Figura 3.

Tabela 2: Valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento obtidos com a solução de fluconazol, no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Diâmetro dos halos de inibição (mm)		Média		Desvio Padrão		DPR (%)	
	P	A	P	A	P	A	P	A
25	15,13	14,74						
	15,62	15,21	15,00	14,58	0,70	0,72	4,66	4,95
	14,25	13,79						
50	19,29	18,87						
	19,20	18,28	18,79	18,03	0,80	0,98	4,25	5,46
	17,87	16,95						
100	22,86	22,46						
	21,93	21,27	22,08	21,48	0,71	0,89	3,24	4,13
	21,45	20,72						

Cada valor do halo de inibição corresponde à média de 7 determinações; DPR% - desvio padrão relativo percentual

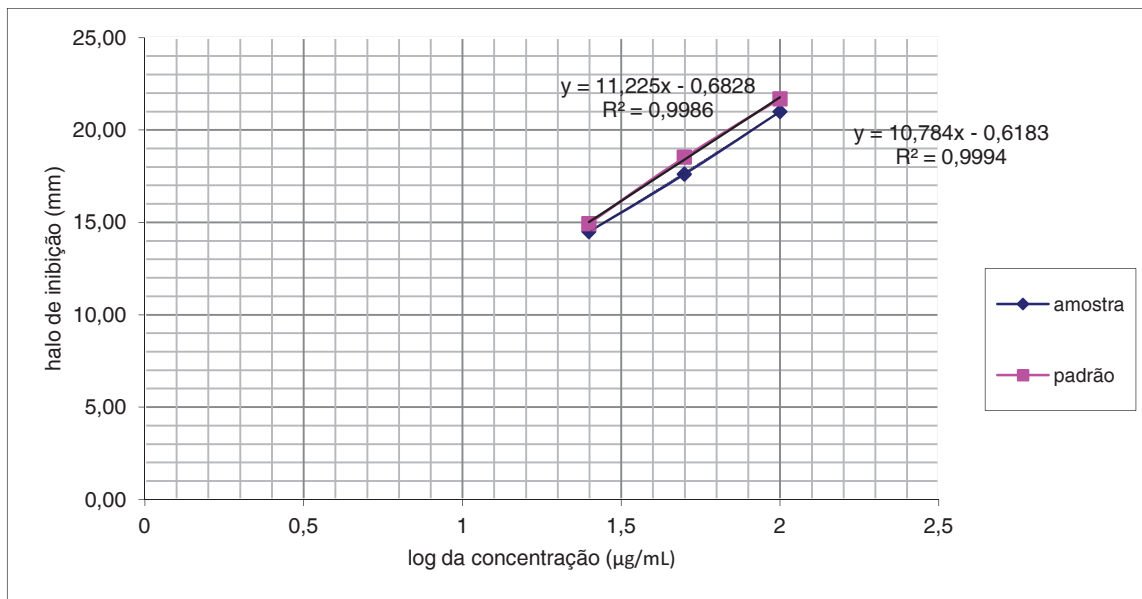


Figura 3: Representação gráfica da curva analítica de fluconazol padrão e amostra, no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar

Através do método dos mínimos quadrados e da regressão linear determinou-se a equação da reta para a representação gráfica.

2.1.3. Validação

O método foi validado de acordo com a Resolução RE nº 899 da ANVISA (Brasil, 2003) para a realização de testes com parâmetros de linearidade, exatidão e precisão.

- *Linearidade*: para validação do método, três concentrações (25,0, 50,0 e 100,0 µg/mL) do padrão e da amostra foram utilizadas. O cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foram constatados pela ANOVA.

- *Precisão*: a repetibilidade e a precisão intermediária do ensaio foram avaliadas através da realização do ensaio durante três dias e a determinação da atividade percentual do fluconazol e cálculo dos desvios padrão relativo da potência de cada ensaio.

- *Exatidão*: foi determinada pelo ensaio de recuperação.

2.1.4. Determinação da Potência do Fluconazol

O cálculo da potência foi realizado através da equação de HEWITT (HEWITT, 1977), sendo que os ensaios foram realizados em 3 dias diferentes e cada ensaio representa a média de seis determinações.

Equação de Hewitt:

$$\text{Potência (\%)} = \text{Antilog } M \times 100$$

Na qual:

$$M = F/b$$

$$b = E/l$$

$$E = \frac{1}{4} \times [(\bar{A}_3 + \bar{P}_3) - (\bar{A}_1 + \bar{P}_1)]$$

$$F = \frac{1}{4} \times [(\bar{A}_1 + \bar{A}_2 + \bar{A}_3) - (\bar{P}_1 + \bar{P}_2 + \bar{P}_3)]$$

l = logaritmo da razão das doses

Tabela 3: Valores experimentais obtidos para o doseamento de solução padrão de fluconazol, pelo método de difusão em ágar

Dia	Potência (%)*	Média	DPR (%)
1	87,16		
2	86,13	88,79	4,23
3	93,09		

*Cada valor corresponde à média de seis determinações

A validação do método foi realizada pela análise da variância (ANOVA), segundo tratamento estatístico preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010) para ensaio 3 x 3 utilizando cilindros de aço e está representada na Tabela 4.

Tabela 4: Análise da variância dos dados obtidos no ensaio microbiológico de fluconazol pelo método de difusão em ágar

ANÁLISE DE VARIÂNCIA	GL	SQ	MQ	Fcal	Ftab
Preparações	1	3,657017	3,657017	1,968561	4,17
Regressão	1	342,0906	342,0906	184,1463*	7,56
Desvio de Paralelismo	1	0,0564	0,0564	0,03036	4,17
Quadrático	1	0,142245	0,148845	0,07657	4,17
Diferença de Quadrático	1	0,138972	0,138972	0,074808	4,17
Entre doses	5	346,0852	69,21705	---	---
Entre placas	6	0,59845	0,99742	---	---
Dentro (erro)	30	1,85771	0,061924	---	---
Total	42	348,5414		---	---

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; MQ: variância

* significativo $p < 0,05$

Dentre as variáveis avaliadas no ensaio, para validar o método proposto, a regressão linear deve ser significativa para $p < 0,05$. Além disso, o desvio de

paralelismo e o desvio de linearidade devem ser não-significativos. Em todos os ensaios estas condições foram cumpridas.

2.1.5. Teste de Recuperação

O teste de recuperação foi realizado com o objetivo de determinar a exatidão do método proposto. O método utilizado foi de fortificação do placebo.

No desenvolvimento do teste de recuperação foram adicionados valores de 50, 100 e 150% de substância padrão de fluconazol ao placebo, formando o placebo fortificado. Da mesma forma, foi realizado também o teste de recuperação da amostra. O placebo está com concentração de 100%.

Tabela 5: Valores experimentais obtidos no teste de recuperação do fluconazol padrão, no ensaio microbiológico pelo método difusão em ágar

Concentração de fluconazol nos placebos fortificados (µg/mL)	Recuperação (%)[*]	Recuperação média (%)	DPR (%)
	102,36		
25,0	88,58	96,95	6,66
	99,91		
	99,03		
50,0	89,63	96,96	6,13
	102,23		
	101,17		
100,0	91,56	97,98	5,15
	101,19		

*Cada valor de recuperação corresponde a média de 3 halos de inibição.

2.1.6. Aplicação do método desenvolvido e validado por difusão em ágar

Ensaio do método de difusão em ágar desenvolvido e validado foram realizados para analisar amostras de fluconazol sob estudo de estabilidade.

A estabilidade é uma qualidade requerida a todos os fármacos e medicamentos e consiste no período a partir da data de fabricação e empacotamento da formulação até que a sua atividade química e biológica não seja menor que um nível pré-determinado de potência rotulada e suas propriedades físicas não tenham mudado apreciavelmente e de forma deletéria (VADAS, 2000).

A estabilidade aumenta a segurança dos fármacos quanto à manutenção de suas propriedades até o momento de sua utilização. Os testes de degradação forçada, ou teste de estresse, são testes de estabilidade da substância de referência e de medicamentos amplamente utilizados para prever problemas relacionados à estabilidade, desenvolvimento de métodos analíticos e identificação de produtos e comportamentos de degradação. Estes testes são aplicados aos estudos de pré-formulação, no desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade e também para selecionar a melhor formulação (KLICK *et al.*, 2005).

Para avaliar a estabilidade foi utilizado fluconazol amostra, correspondente a cápsulas com 150 mg de fluconazol rotulado, manipuladas pela farmácia magistral da Farmácia Escola da UNESP de Araraquara. As condições empregadas foram empregados calor úmido, calor seco e luz UV.

No estudo de degradação por calor úmido foi utilizada câmara climática (Marconi, MA 835/UR) a 40°C e 75% de umidade relativa (UR). Três cápsulas de fluconazol foram abertas e seu conteúdo homogeneizado em uma placa de Petri destampada que foi colocada na câmara. Quantidades equivalentes a 50 mg de fluconazol foram retiradas após 90 dias para sua análise.

No estudo de degradação térmica por calor seco foi utilizada estufa (Fabbe Ltda, Brasil) a 60°C. Três cápsulas de fluconazol foram abertas e seu conteúdo homogeneizado em uma placa de Petri e colocado na estufa. Quantidades equivalentes a 50 mg de fluconazol foram retiradas após 60 dias para sua análise.

No estudo de fotodegradação foi utilizada câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) 20W (45 cm de comprimento), sendo a temperatura não foi superior a 25°C. Três cápsulas de fluconazol foram abertas e seu conteúdo homogeneizado em uma placa de Petri. A placa foi exposta destampada à distância de 10 cm da lâmpada. Quantidades equivalentes a 50 mg de fluconazol foram retiradas após 66 e 180 dias para sua análise.

Os ensaios de difusão em ágar foram realizados em três dias diferentes, sendo que cada ensaio corresponde à média de seis determinações. A potência para cada amostra sob condições de estresse também foi calculada conforme a equação de HEWITT do item 2.1.4 (HEWITT, 1977). Os resultados constam na Tabela 6.

Tabela 6: Valores experimentais obtidos para o doseamento das amostras submetidas a estudo de estabilidade preliminar pelo ensaio microbiológico por difusão em ágar

Condição de estresse	Teor médio (%)*	DPR (%)
90 dias sob 40°C e 75% de UR	30,27	1,32
60 dias sob 60°C	27,72	6,62
66 dias sob luz UVC	33,39	3,91
180 dias sob luz UVC	25,00	5,84

DPR: desvio padrão relativo; UR: umidade relativa

*Cada valor corresponde à média de seis determinações

2.1.7. Discussão

O ensaio microbiológico é um método físico em que um micro-organismo é utilizado como revelador. Emprega-se meio de cultura sólido inoculado, distribuído

em placas, em sistema de bicamada, onde a substância teste se difunde (PINTO; KANEKO & PINTO, 2010).

A fim de assegurar a validade deste ensaio na determinação da potência de fluconazol, foram utilizadas três concentrações diferentes para a amostra, idênticas às da solução padrão, em delineamento 3 x 3. Como o sistema utilizado possui relação linear entre o logaritmo da concentração da substância testada e o diâmetro dos halos de inibição, as doses utilizadas estão em progressão geométrica, com razão 2. As concentrações 25,0; 50,0 e 100,0µg/mL apresentaram melhores resultados, de acordo com o tamanho do halo e a distância entre eles, sem que houvesse sobreposição.

A cepa escolhida foi a *C. albicans* ATCC 64548 devido à sua disponibilidade no laboratório, facilidade de seu crescimento e manutenção. A concentração do inóculo utilizada foi 2%, porque apresentou crescimento de micro-organismos homogêneo. Para que o inóculo permaneça homogêneo, é imprescindível a sua padronização prévia, que foi realizada em espectrofotômetro a 580 nm, com $25 \pm 2\%$ de transmitância.

Com os resultados obtidos foi construída a curva analítica das soluções de fluconazol com concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, apresentando coeficiente de correlação para o padrão igual a 0,9986, sendo que a equação da reta foi $y = 11,25x - 0,6828$. A amostra apresentou coeficiente de correlação igual a 0,9994, sendo que a equação da reta foi $y = 10,784x - 0,6183$. O valor obtido com os coeficientes de correlação demonstra que o método é linear.

A precisão do método foi obtida empregando-se seis determinações de fluconazol em solução aquosa. O desvio padrão relativo foi 6,15% e a potência de

fluconazol determinada nas soluções foi calculado pela equação de HEWITT obtendo teor médio de 88,96%.

A exatidão do método foi comprovada pelo teste de recuperação, no qual quantidades conhecidas da substância padrão foram adicionadas ao placebo para sua quantificação. A média obtida de 97,30% demonstrou a exatidão do método proposto, que é outro requisito obrigatório dos métodos analíticos (Brasil, 2003).

O método foi aplicado para testar a estabilidade do fluconazol, através dos testes de condições de estresse. Os resultados demonstraram perda de atividade da amostra a menos da metade em relação ao produto inicial, sob condições de calor úmido, calor seco e luz UV. Os valores de teor médio calculado foi de 30,27% a 40°C e 75% de umidade relativa durante 90 dias; 27,72% a 60°C durante 60 dias; 33,39% sob luz UVC durante 66 dias e 25,00% sob luz UVC durante 180 dias.

Dessa forma, o método de difusão em ágar demonstrou ser uma técnica linear, precisa e exata, além de ser de extrema importância para avaliação da atividade de antimicrobianos.

2.2. MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

2.2.1. Material e Método

Na realização do estudo do método turbidimétrico foi utilizado o mesmo fluconazol padrão e amostra, conforme item 2.1.1.

Para manutenção das cepas fúngicas foi utilizado o meio ágar Sabouraud, inclinado, em tubos de ensaio. No ensaio foi utilizado o caldo Sabouraud. Foram empregados tubos de ensaio com 20,0 cm de altura e 4,0 cm de diâmetro.

Os meios de cultura, água deionizada e ponteiras foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Para a incubação dos micro-organismos utilizou-se aparelho incubador Shaker Marconi® modelo MA420 e estufa ECB 1.2 digital (Odontobrás®). Para as leituras, utilizou-se espectrofotômetro Beckman modelo DU® 530.

Os parâmetros testados no ensaio constam na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros testados para a avaliação de fluconazol por ensaio microbiológico – método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Candida albicans</i> ATCC 64548
Meio de Cultura	caldo Sabouraud
Solução Diluente	água deionizada
Concentração do inóculo	10 e 20%
Concentração das soluções	50 a 600 µg/mL
Volume das soluções	200 e 500 µL
Temperatura de incubação do ensaio	25 e 35°C

2.2.1.1. Preparo do Inóculo

A cepa fúngica utilizada foi mantida em tubo com ágar Sabouraud inclinado, a 8°C. Para preparo do inóculo transferiu-se uma alçada da colônia em caldo Sabouraud. Foram realizadas incubações nas temperaturas 25 ± 2°C ou 35 ± 2°C, com duração entre 20 e 24h. O inóculo foi então padronizado em espectrofotômetro a 530 nm com transmitância de 25 ± 2%, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010).

2.2.1.2. Preparo da solução fluconazol padrão

Para preparar a solução de fluconazol padrão foram pesados exatamente cerca de 50,0 mg do antifúngico. Esta quantidade foi transferida para balão

volumétrico de 50,0 mL e seu volume foi completado com água deionizada. A partir desta solução foram tomadas alíquotas de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mL e transferidas para balões de 10,0 mL para o preparo das soluções padrões nas concentrações 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0; 500,0 e 600,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

2.2.1.3. Preparo da solução de fluconazol amostra

As soluções de fluconazol amostra foram preparadas de forma similar à solução-padrão. Foram pesados exatamente 148,27 mg da substância amostra e transferidos para balão volumétrico de 25,0 mL. Foram retiradas alíquotas de mesmo volume e preparadas soluções com as mesmas concentrações finais das soluções de padrão, conforme item 2.2.1.2.

2.2.1.4. Ensaio

Para o desenvolvimento deste método foram utilizados tubos de ensaio contendo 10,0 mL de caldo, soluções de padrão e amostra em suas respectivas concentrações e o inóculo, de acordo com o especificado nos parâmetros analíticos. O ensaio foi realizado em triplicata e também foi avaliado o controle positivo, que continha somente caldo e inóculo, e o controle negativo, com apenas o caldo. Os tubos foram incubados em banho, sob agitação, nas temperaturas $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 4 horas. Após este período, o crescimento dos micro-organismos foi interrompido com a adição de 500 μL de formaldeído 12% em cada tubo. Em seguida foi determinada a absorvância de cada tubo em espectrofotômetro a 530 nm, sendo que o controle negativo, contendo caldo e formaldeído, foi utilizado para zerar o aparelho.

2.2.2. Resultados

Primeiramente foram realizados ensaios na temperatura de 25°C e, posteriormente, a 35°C.

Temperatura: 25°C

As Tabelas 8 a 10 demonstram os resultados dos testes realizados a 25°C com 10 e 20% de inóculo e adição de 200 e 500 µL de solução de fluconazol. Primeiramente, foram utilizadas apenas as soluções de padrão, para determinar a faixa de concentração a ser empregada no método.

Tabela 8: Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 25°C, inóculo a 20% e adição de 200 µL de solução padrão de fluconazol, dia 1

Concentração		Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
(µg/mL)					
100		0,297	0,287	0,009	3,10
		0,284			
		0,280			
200		0,271	0,257	0,014	5,46
		0,243			
		0,256			
300		0,275	0,266	0,012	4,34
		0,253			
		0,270			
400		0,287	0,274	0,011	4,15
		0,269			
		0,266			
500		0,255	0,250	0,014	5,53
		0,229			
		0,250			
600		0,270	0,280	0,012	4,27
		0,276			
		0,293			

Tabela 9: Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 25°C, inóculo a 20% e adição de 200 µL de solução de padrão de fluconazol, dia 2

Concentração (µg/mL)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
100	0,295	0,293	0,00	0,59
	0,292			
	0,292			
200	0,298	0,303	0,01	3,15
	0,314			
	0,297			
300	0,297	0,290	0,01	2,82
	0,292			
	0,281			
400	0,306	0,310	0,00	1,29
	0,310			
	0,314			
500	0,295	0,294	0,00	0,79
	0,295			
	0,291			
600	0,290	0,288	0,00	1,00
	0,290			
	0,285			

Tabela 10: Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 25°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL das soluções padrão e amostra de fluconazol

Concentração (µg/mL)	Absorvância		Média		DP		DPR (%)	
	P	A	P	A	P	A	P	A
100	0,230	0,232	0,235	0,233	0,01	0,00	2,74	0,89
	0,242	0,231						
	0,232	0,235						
200	0,217	0,221	0,214	0,223	0,00	0,00	1,95	1,13
	0,215	0,223						
	0,209	0,226						
300	0,215	0,222	0,222	0,220	0,01	0,00	2,64	0,79
	0,226	0,219						
	0,224	0,219						
400	0,224	0,197	0,224	0,209	0,00	0,01	0,68	5,00
	0,226	0,214						
	0,223	0,216						

A partir dos resultados obtidos, determinou-se a utilização da razão 2 e as concentrações 100,0; 200,0 e 400,0 $\mu\text{g/mL}$ para o desenvolvimento do método. A temperatura empregada teve de ser alterada para 35°C, devido a oscilações na temperatura ambiente que influenciaram na temperatura da incubadora Shaker.

Temperatura: 35°C

Após definida a temperatura de trabalho e também as concentrações, foram realizados testes para avaliar qual a concentração de inóculo a ser empregada e o volume das soluções de fluconazol padrão e amostra.

Tabela 11: Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 35°C, inóculo a 20% e adição de 200 μL das soluções de padrão e amostra de fluconazol

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância		Média		Desvio Padrão		DPR (%)	
	P	A	P	A	P	A	P	A
100	0,317	0,312	0,32	0,31	0,01	0,01	0,03	1,96
	0,308	0,300						
	0,330	0,306						
200	0,277	0,300	0,28	0,30	0,00	0,00	0,01	0,01
	0,272	0,296						
	0,278	0,299						
400	0,265	0,284	0,26	0,27	0,00	0,01	0,01	0,04
	0,259	0,265						
	0,265	0,262						

As Tabelas 12 a 15 contêm resultados obtidos com inóculo a 10% e adição de 200 μL de solução de padrão e amostra de fluconazol para diferentes dias de análise.

Tabela 12: Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 35°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL das soluções de padrão e amostra de fluconazol, dia 1

Concentração (µg/mL)	Absorvância		Média		DP		DPR (%)	
	P	A	P	A	P	A	P	A
100	0,313	0,299	0,320	0,297	0,011	0,009	3,44	2,90
	0,315	0,288						
	0,333	0,305						
200	0,271	0,259	0,274	0,262	0,005	0,003	1,80	1,15
	0,272	0,262						
	0,280	0,265						
400	0,262	0,257	0,268	0,255	0,009	0,005	3,25	1,94
	0,278	0,258						
	0,264	0,249						

Tabela 13: Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 35°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL das soluções de padrão e amostra de fluconazol, dia 2

Concentração (µg/mL)	Absorvância		Média		Desvio Padrão		DPR (%)	
	P	A	P	A	P	A	P	A
100	0,420	0,430	0,413	0,433	0,01	0,01	0,03	0,03
	0,423	0,447						
	0,397	0,422						
200	0,360	0,354	0,363	0,364	0,00	0,02	0,01	0,06
	0,366	0,349						
	0,363	0,388						
400	0,330	0,331	0,337	0,326	0,01	0,00	0,03	0,01
	0,331	0,326						
	0,350	0,322						

Tabela 14: Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 35°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL das soluções de padrão e amostra de fluconazol, dia 3

Concentração (µg/mL)	Absorvância		Média		Desvio Padrão		DPR (%)	
	P	A	P	A	P	A	P	A
100	0,266	0,275	0,260	0,266	0,01	0,01	0,03	0,05
	0,250	0,276						
	0,264	0,264						
200	0,272	0,250	0,263	0,254	0,01	0,01	0,03	0,03
	0,257	0,258						
	0,260	0,260						
400	0,235	0,244	0,241	0,244	0,01	0,01	0,05	0,05
	0,254	0,252						
	0,234	0,236						

Tabela 15: Valores de absorvância obtidos no método turbidimétrico a 35°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL das soluções de padrão e amostra de fluconazol, dia 4

Concentração (µg/mL)	Absorvância		Média		Desvio Padrão		DPR (%)	
	P	A	P	A	P	A	P	A
100	0,233	0,242						
	0,234	0,258	0,233	0,244	0,00	0,01	0,00	0,04
	0,232	0,239						
200	0,495	0,238						
	0,225	0,236	0,313	0,232	0,16	0,01	0,51	0,06
	0,218	0,243						
400	0,221	0,217						
	0,215	0,160	0,219	0,188	0,00	0,04	0,02	0,21
	0,222	0,215						

A Tabela 16 reúne os resultados obtidos nos diferentes dias de ensaio e a Figura 4 representa a curva analítica construída a partir da média das absorvâncias e do logaritmo das concentrações utilizadas. O fluconazol padrão não apresentou a linearidade requerida para a validação do método, que consiste no valor de $r > 0,995$ segundo a Resolução 899 (2003).

Tabela 16: Análise comparativa dos resultados obtidos nos 4 dias de testes a 35°C, inóculo a 10% e adição de 200 µL das soluções de padrão e amostra de fluconazol

Concentração (µg/mL)	Absorvância		Média		Desvio Padrão		DPR (%)	
	P	A	P	A	P	A	P	A
100	0,413	0,433						
	0,320	0,297	0,307	0,310	0,08	0,08	26,07	27,31
	0,260	0,266						
	0,233	0,244						
200	0,363	0,364						
	0,274	0,262	0,303	0,278	0,05	0,06	14,89	21,07
	0,263	0,254						
	0,313	0,232						
400	0,337	0,326						
	0,268	0,255	0,266	0,253	0,05	0,06	19,20	22,52
	0,241	0,244						
	0,219	0,188						

Cada absorvância corresponde a média de 3 leituras

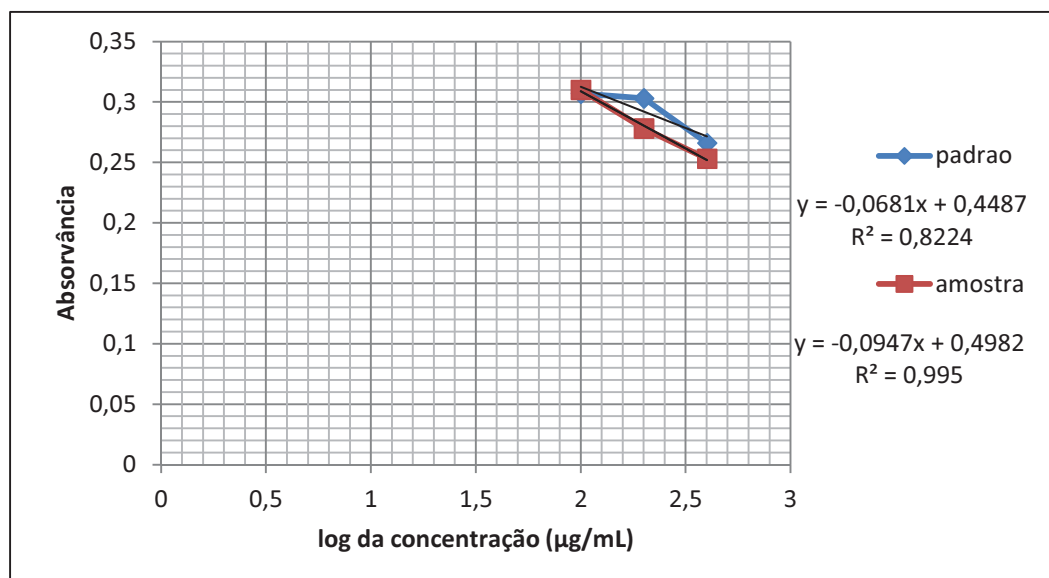


Figura 4: Representação gráfica da curva analítica de fluconazol padrão e amostra, no ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico

2.2.3. Discussão

O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico permite a determinação da potência do fármaco, através da medida da turbidez (absorvância), causada pela inibição do micro-organismo pelo antimicrobiano.

A cepa fúngica de trabalho foi a *C. albicans* ATCC 64548 devido a sua disponibilidade no laboratório e facilidade de manutenção e crescimento. O meio de cultura utilizado foi o caldo Sabouraud e as concentrações de inóculo testadas foram 20% e 10%. Para que o inóculo permaneça homogêneo é imprescindível a sua padronização, realizada em espectrofotômetro a 530 nm, com $25\% \pm 2\%$ de transmitância.

Inicialmente foram testadas concentrações na faixa de 50,0 a 600,0 µg/mL, e então foi determinada a utilização da razão 2 e as concentrações 100,0; 200,0 e 400,0 µg/mL. O volume de solução padrão de fluconazol e amostra utilizado foi de 200 µL. A princípio, a temperatura de trabalho utilizada foi 25°C, por ser a mais

adequada para crescimento de cepas fúngicas. Durante o teste, porém, ela não permaneceu estável na faixa permitida, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, pois a temperatura ambiente estava mais elevada nesse período dos testes. Em consequência, os ensaios passaram a ser realizados a 35°C , após ser verificado que essas condições também proporcionavam crescimento homogêneo e boa resposta do micro-organismo.

Os resultados obtidos não apresentaram a linearidade necessária para concluir o desenvolvimento do método e posterior validação.

3. CONCLUSÃO

Hoje a atenção é voltada para métodos analíticos físico-químicos, devido, entre outros fatores, a alta precisão que apresentam. No entanto eles não fornecem verdadeira indicação sobre a atividade biológica e, ao se tratar de fármacos com atividade antimicrobiana o doseamento através de métodos microbiológicos ganha importância, já que algumas alterações na molécula do fármaco podem alterar sua atividade e não serem detectáveis por métodos físico-químicos (ADAMS *et al.*, 1998; SALGADO; LOPES & LUCCHESI, 2006).

Uma vantagem dos métodos microbiológicos é não requerer equipamentos especializados e dispendiosos, além de não utilizar solventes potencialmente tóxicos para o analista e para o meio ambiente. Embora demonstrem um desempenho relativamente simples, muitos aspectos devem ser considerados no seu desenvolvimento, para assegurar que eles sejam suficientemente seguros e exatos, tais como: temperatura de incubação, micro-organismo utilizado, espessura do ágar, entre outras características.

Além disso, os ensaios biológicos podem sofrer adequações para determinações específicas, como em preparações farmacêuticas, em que frequentemente se recorre ao uso de soluções diluentes tamponadas, e são capazes de indicar a atividade biológica de produtos de degradação possivelmente originados (THOMPSON, 2000). Desta forma, os ensaios biológicos continuam sendo essenciais para o desenvolvimento e controle de qualidade de substâncias antimicrobianas.

O ensaio microbiológico de difusão em ágar tem por finalidade a avaliação da potência de antimicrobianos por meio das dimensões dos halos de inibição formados pela difusão da solução do fármaco no meio adequado inoculado com o micro-

organismo teste. Este método é amplamente empregado, pois além da análise quantitativa através da determinação dos halos de inibição, é possível realizar ainda análise qualitativa, através da suscetibilidade de determinadas espécies frente ao antimicrobiano testado. Além disso, consiste de um método simples e barato, que dispensa complexa infra-estrutura de laboratório e requer mínimo treinamento dos analistas (COLOMBO *et al.*, 2002; ESPINEL-INGROFF, 2007).

Diante dos resultados encontrados, o método de difusão permite indicar a potência do produto uma vez que apresenta sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão adequadas, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010) e ANVISA (Brasil, 2003).

O método turbidimétrico é mais rápido e, ao utilizar aparelho espectrofotômetro na leitura dos resultados, proporciona resultados mais objetivos e sem influência do analista. Apesar disso, demonstrou desenvolvimento mais complexo e trabalhoso e não apresentou a linearidade necessária para validá-lo. Este método possui a desvantagem de não poder ser aplicado a soluções turvas e coloridas e formulações com substâncias ativadoras ou inibidoras de crescimento microbiano, pois elas interferem na leitura dos resultados. Além disso, as soluções utilizadas devem ser estéreis, devido ao curto período de análises. (GAVIN, 1957).

Ao realizar o presente trabalho foi possível aplicar conhecimentos teóricos e práticos adquiridos em aula e aprofundá-los de acordo com os temas abordados e os ensaios realizados. Este trabalho proporcionou acréscimo de conhecimento através da realização de pesquisas em bancos de dados e criterioso levantamento bibliográfico, além de contribuir também para o desenvolvimento do pensamento científico e crítico-reflexivo, principalmente ao lidar com as dificuldades e imprevistos

durante a realização do projeto e a necessidade da tomada de decisões quando havia resultados inesperados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.; LIU, L.; DIERICK, K.; GUYOMARD, S.; NABET, P.; RICO, S.; LOUIS, P.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Neomycin: microbiological assay or liquid chromatography? *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 17, p. 757-766, 1998.

ALMEIDA, L. M. M.; SOUSA, E. A. F.; BIANCHIN, D. B.; SVIDZINSKY, T. I. E. Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. *An. Bras. Dermatol.*, v. 3, p. 249-53, 2009.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 17th ed. Gaithersburg: AOAC, 2002. v.1, p.xx.

BARRY, A. L.; BROWN, S. D. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* v. 34, p. 2154–2157, 1996.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 2, p.159-172, 2004.

BRASIL. ANVISA Resolução nº 899 de 29 maio de 2003. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2 jun. 2003.

COLOMBO, A. L.; MATTA, D.; ALMEIDA, L. P.; ROSAS, R. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by disk diffusion method. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 6, n. 3, p. 118-123, 2002.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D. M.; TALACIMON, E. A.; SCELESKY, M. E.; Método Microbiológico para determinação para a potência de antimicrobianos. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde*, v. 10, n. 1, p. 53-60, 2004.

ESPINEL-INGROFF, A. Standardized Disk Diffusion Method for Yeasts. *Clin. Microbio. Newslett.*, v. 29, n. 13, p. 97-100, 2007.

FARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. 5. ed. Brasília, ANVISA, 2010

GAVIN, J. J. Analytical microbiology III. Turbidimetric methods. *Appl. Microbiol.*, v. 5, p. 235-243, 1957.

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11º ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. p.1003-1010.

HEWITT, W. Microbiological Assay. New York: Academic Press, 1977. p.41-42.

HEWITT, W. Theory and application of microbiological assay. California: Academic Press, Inc. 1989. 323p.

HEWITT, W. *Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: A Rational Approach*. New York: Interpharm, 2007. 260p.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P. G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; SANGER-VAN DE GRIEND, C.; VAN DEN BELD, C.; SOMSEN, G. W.; DE JONG, G. J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. *Pharm. Tech.*, February, 2005.

MARTIN, M. V. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans*: a review. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 44, p. 429-437, 1999.

PARK, J. S.; YU, H. A.; KANG, T. H.; KIM, S.; SUH, Y. G. Discovery of novel indazole-linked triazoles as antifungal agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 17, p. 3486-3490, 2007.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.O.; LUCCHESI, M.B.B. Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 40, p. 443-446, 2006.

TELLES FILHO, F. Q. Posoconazol: um novo triazólico de segunda geração. *Prática Hospitalar*, v. 52, p. 58-60, 2007.

THOMPSON, C. Microbiological assay of antibiotics in pharmaceutical preparations. In: BAIRD, R.M.; HODGES, N.A.; DENYER, S.P. *Handbook of Microbiological Quality Control: pharmaceuticals and medical devices*. London: Taylor & Francis, p. 190-204, 2000.

VADAS, E. B. Estabilidade de produtos farmacêuticos. In: GENARO, A. R. Ed. Remington. *A Ciência e a prática em farmácia*. 20. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 1022-1031.

YAMAMOTO, C.H.; PINTO, T.J.A.; MEURER, V.M.; CARVALHO, V.M.; REZENDE, P. Controle de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos produzidos na zona da mata, MG. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária*. Belo Horizonte: UFMG, 2004.