

Slide 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO  
PRETO

## Determinação da potência de antibióticos - Ensaio de difusão em Agar

Profa. Márcia E. S. Ferreira  
mesfe@fcrp.usp.br

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

**Definição:**

Os antibióticos são substâncias do metabolismo secundário de fungos e bactérias com capacidade de impedir o crescimento ou levar à morte outros microrganismos, podendo ser sintéticos ou naturais.

**Caracterização:** identidade, pureza, potência e estabilidade (métodos químicos, físicos e biológicos)

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Os antibióticos podem ser definidos como substâncias do metabolismo secundário de fungos e bactérias com capacidade de impedir o crescimento ou levar à morte outros microrganismos, podendo ser sintéticos ou naturais.

Com a descoberta dos antibióticos no início do século XX, a saúde e bem-estar da população sofreram grandes transformações positivas. A síntese química permitiu o desenvolvimento das primeiras substâncias antibacterianas, mas o efeito dessas drogas se mostraram baixos quando comparados aos antibióticos produzidos por biotecnologia. Com o avanço da biotecnologia, foi possível o desenvolvimento de antibióticos cada vez mais complexos e eficientes, porém, controlar a qualidade dos mesmos tornou-se mais difícil, tendo-se que lançar mão de métodos, ou associação de métodos, cada vez mais sofisticados e sensíveis.

Em geral, os procedimentos de controle de qualidade para produtos obtidos por biotecnologia são similares aos empregados comumente em produtos farmacêuticos tradicionais, requerendo análise de matérias-primas, do processo de fabricação, do controle de processos e do produto final. A diferença fundamental é que o controle de qualidade para produtos obtidos por biotecnologia exige uma caracterização rigorosa da substância ativa, a qual envolve o estabelecimento da identidade, pureza, potência e estabilidade desse produto. A caracterização da substância ativa, que pode envolver métodos químicos, físicos e biológicos, é tipicamente realizada na fase de desenvolvimento para determinar as propriedades físico-químicas, atividade biológica, propriedades imunoquímicas, pureza e impurezas do produto; após significativa mudança do processo; ou para monitoramento periódico, para confirmar a qualidade do produto.

Na presente aula, iremos focar os métodos microbiológicos para avaliar a potência dos antibióticos.



Como podemos quantificar a substância ativa de um medicamento? Vamos supor que o medicamento não consista de substância definida que possa ser completamente caracterizada por suas propriedades químicas ou físico-químicas. Além disso, existem antibióticos em que a margem entre a dose terapêutica e a dose tóxica é relativamente pequena. Mesmo que não se atinja o limiar da dose tóxica, há que se considerar o aspecto econômico, assim como o de falsificações com moléculas estruturalmente semelhantes. Uma redução na atividade antimicrobiana pode revelar alterações sutis, não demonstráveis por métodos químicos.

A quantificação da substância ativa de um medicamento demanda sempre no emprego de uma avaliação comparativa, frente a um padrão biológico de referência. Essa avaliação pode se dar diretamente, através de um ensaio microbiológico (ex. ensaio de insulina em coelhos), ou indiretamente, através do ensaio microbiológico. Deve ser lembrado que esse tipo de ensaio não mede quantidades da substância, e sim respostas que podem ser convertidas em quantidade de substância ativa, com o auxílio de uma curva padrão.

O ensaio microbiológico pode ser dividido em Ensaio de Difusão em Agar e Turbidimétrico. O ensaio de Difusão em Agar, ou em placas, relaciona o tamanho da zona de exibição (fatores de crescimento) ou inibição (antibiótico) de crescimento com a dose da substância ensaiada. Esse método é mais empregado para a determinação de antibióticos. O método turbidimétrico, ou em tubos, considera a relação entre a proporção de crescimento da população microbiana no meio líquido e a concentração da substância ensaiada, sendo mais empregado no doseamento de vitaminas e aminoácidos. O método turbidimétrico depende da inibição do crescimento de uma cultura microbiana em uma solução uniforme de antibiótico em um meio líquido, que é favorável ao rápido crescimento na ausência do antibiótico.

## Ensaio de Difusão em Agar

- Método físico
- Microrganismo é usado como revelador
- Primeiros métodos microbiológicos: 1948 - Farmacopeia Britânica
  - difusão em Agar (monocamada)
  - diluição em meio líquido
- 1955 – Farmacopeia Americana
  - difusão em Agar
  - turbidimetria
- 1958 - Farmacopeia Britânica – 10 novos antibióticos (difusão em Agar – pré-difusão)

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

O ensaio de difusão em Agar é fundamentalmente um método físico, no qual o microrganismo é utilizado como revelador.

Embora a penicilina tenha sido descoberta em 1928, por Fleming, e tenha sido usada como antibiótico a partir de 1941, os primeiros métodos microbiológicos para a sua dosagem foi descrito somente em 1948, na Farmacopeia Britânica. Nesse compendio, o ensaio de difusão em Agar consistia em inocular o meio (monocamada) e distribuir em placas, sobre as quais as soluções teste do padrão, com concentrações conhecidas, eram comparadas com as soluções-amostra, com concentrações teoricamente estimadas, transferidas através de cilindros de diferentes materiais ou furos no gel. O meio de cultura de composição simples, contendo tampão fosfato, inoculado com *S. aureus*, de procedência desconhecida, era empregado.

O ensaio de diluição em meio líquido empregava-se o mesmo microrganismo (*S. aureus*) e as soluções-teste, preparadas em tampão fosfato pH7, eram misturadas em volumes iguais com o meio inoculado e os tubos de ensaio, incubados a 37°C, durante 15 a 18h. O ponto final era considerado a concentração em que ocorria crescimento microbiano na série de tubos e, pela comparação deste dado com a série do padrão, calculava-se a potência da amostra.

O ensaio microbiológico para antibióticos constou pela primeira vez na Farmacopeia Americana somente em 1955, com procedimentos gerais tanto para a técnica de difusão em Agar como para a turbidimetria.

Em 1958, foram adicionados 10 novos antibióticos, além da penicilina, e, conseqüentemente, novos meios de cultura e novas cepas de microrganismos foram utilizados. Nesta edição somente a técnica de difusão em Agar foi descrita. Ainda, nesta edição, foi introduzido o procedimento de pré-difusão das soluções, através da permanência das placas, por 2h, em refrigerador. Nas edições posteriores, o tempo permaneceu o mesmo, porém, em temperatura ambiente.

### Ensaio Microbiológico - Princípio do Método

**DIFUSÃO EM ÁGAR**

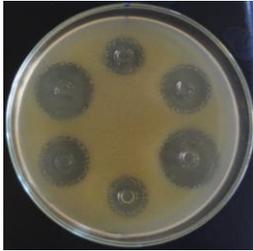
Difusão do antibiótico

↓

Camada de Agar sólido

↓

Formação do halo  
(ausência de crescimento microbiano)



Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Como dito anteriormente, o ensaio microbiológico para determinação da potência dos antibióticos é indicado para substâncias ou preparações em que seu teor não pode ser definido por métodos físico-químicos.

O ensaio de difusão em Agar depende da difusão do antibiótico de seu local de administração, seja ele um disco de papel, um cilindro ou um furo no gel, através da camada de Agar solidificado, de modo que o crescimento do microrganismo adicionado seja prevenido na área ao redor do local contendo a solução de antibiótico, formando um halo.

## Formação do halo de inibição de crescimento

Difusão da substância de uma região para outra

- Difusão linear
- Difusão radial

**Quadrado da distância de difusão é diretamente proporcional ao Log da concentração**

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Para que ocorra a formação do halo de inibição, a substância em questão deve difundir-se no meio e a combinação de diferentes condições permitirá evidenciar esse fenômeno de difusão da substância de uma região para a outra.

A transferência da substância pelo mecanismo da difusão pode ocorrer de forma linear ou radial. Nos dois casos, a zona de inibição de crescimento significa que o microrganismo teve seu crescimento inibido em função da concentração do antimicrobiano difundido ser suficientemente capaz de impedir o seu desenvolvimento, em oposição ao restante do meio de cultura.

Independente do direcionamento da difusão, o quadrado da distância de difusão será diretamente proporcional ao logaritmo da concentração, desde que se considere constante a concentração da solução, de determinada substância no reservatório, durante o decorrer da difusão.

**Aspectos Importantes:**

- Concentração do antibiótico no reservatório
- População microbiana
- Concentração do antibiótico na posição limítrofe (concentração crítica) entre crescimento e inibição
- População microbiana inibida pela concentração crítica do antibiótico (tempo e capacidade de difusão do antibiótico no Agar)
- Período de tempo de crescimento do microrganismo (depende da temperatura e do tamanho do inóculo)

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

A seguir, vamos considerar alguns aspectos que são importantes para o ensaio de difusão em Agar:

- Concentração do antibiótico no reservatório, que se for constante durante o decorrer da difusão, o quadrado da distância de difusão será diretamente proporcional ao logaritmo da concentração;
- População microbiana, que deve ser homogênea devido à necessidade do dimensionamento das zonas de inibição de crescimento, proporcionando população crítica constante, definida e sem tendência à aquisição de resistência. O microrganismo escolhido é aquele considerado ideal para exercer o papel de revelador.
- Concentração do antibiótico na posição limítrofe (concentração crítica) entre crescimento e inibição é uma medida da sensibilidade do organismo-teste e representa a concentração mínima capaz de inibir o crescimento da população microbiana.
- População microbiana inibida pela concentração crítica do antibiótico vai depender do tempo e da capacidade de difusão do antibiótico no Agar.
- Período de tempo de crescimento do microrganismo vai depender da temperatura de incubação e do tamanho do inóculo.

**Padronização das Condições**

- Fenômenos físicos (capacidade de difusão do antibiótico)
- Biológicos (sensibilidade do microrganismo, constituição do meio de cultura, condições de incubação, tamanho do inóculo)

**CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO INIBIDO**

↓

**CONCENTRAÇÃO DO ANTIMICROBIANO DIFUNDIDO**

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

A avaliação da potência dos antibióticos exige padronização das condições, pois há que se conciliar os fenômenos físicos (capacidade de difusão do antibiótico) e biológicos (sensibilidade do microrganismo, constituição do meio de cultura, condições de incubação, tamanho do inóculo) a fim de que a distância de difusão seja medida experimentalmente, após a revelação sob a forma de halo de inibição de crescimento. Sendo assim, o microrganismo terá seu crescimento inibido em função da concentração do antimicrobiano difundido.

**Ensaio: Preparo do inóculo**

Preparo do inóculo: exigências químicas e físicas para o crescimento

- ❖ fontes de C, N, pH, temperatura
- ❖ microrganismos liofilizados – recuperação
- ❖ formadores de esporos ou não

**Inóculo → Padronizado**

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Para a realização do ensaio, será necessário o preparo do inóculo, contendo o microrganismo teste. Cada microrganismo possui exigências próprias para seu cultivo. Enquanto para alguns microrganismos, um meio de cultura simples é suficiente, outros exigem suplementos. Geralmente, os meios de cultura são adquiridos na forma desidratada, o que facilita o seu preparo.

Os microrganismos, utilizados nos ensaios, são obtidos de bancos certificados, como o *American Type Culture Collection* (ATCC), geralmente na forma liofilizada, em ampolas seladas, exigindo recuperação em meio líquido rico e algumas subculturas para retornar às características fisiológicas normais. As condições ideais para recuperação dos microrganismos, antes de sua utilização nos ensaios, são disponibilizadas pelo fornecedor das mesmas.

Os microrganismos podem ser formadores de esporos ou não. No caso de formadores de esporos, podemos preparar suspensões, que são estáveis a 4°C por longos períodos, e que podem ser usadas de imediato (não necessitando de preparo de cultura no dia anterior).

Espécies não esporulantes necessitam de culturas no dia anterior e lavagem da superfície, após incubação, para preparar a suspensão a ser empregada no teste. Dependendo da espécie, essa suspensão pode ser mantida, sob refrigeração, por alguns dias.

O inóculo deve ser padronizado antes do uso, ou seja, deve ser feito teste prévio com distintas concentrações de inóculo e diferentes concentrações do antibiótico a ser ensaiado. Se o crescimento microbiano foi muito denso e/ou a zona de inibição obtida em dimensão não ideal, o inóculo e/ou a concentração do antibiótico devem ser ajustados. Os parâmetros adequados devem ser registrados para referência futura.

A concentração do inóculo bacteriano, que tenha apresentado resultados adequados, pode ser determinada por contagem microscópica direta, contagem de viáveis em placas, medida de turbidez (escala de McFarland) ou método espectrofotométrico.

A quantidade de inóculo utilizada deve ser a de menor valor, porém suficiente para apresentar crescimento uniforme, que propicie contraste com a zona de inibição do crescimento, sem se apresentar como colônias isoladas.

**Meio de cultura: Monocamada ou Bicamada**

**Monocamada:** camada simples de Agar – espessura reduzida favorece a formação de halos de inibição maiores, para substâncias de pequena difusibilidade

**Bicamada:** camada basal - correção falhas (busca a uniformização). Superfície contém o inóculo – facilita a visualização pelo contraste entre as zonas

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

A determinação da potência dos antibióticos por difusão em Agar pode ser feita pelo emprego de meio de cultura inoculado em monocamada ou bicamada.

Na monocamada, o inóculo é feito no meio de cultura sólido (~21 mL), fundido e resfriado (temperatura de 45 a 50°C), homogeneizado e invertido em placas (~20x100mm) para solidificar (superfície nivelada para assegurar espessura uniforme). A espessura reduzida favorece a formação de halos de inibição maiores, o que ajuda quando o antibiótico possui baixa difusibilidade no meio de cultura.

Na bicamada, cerca de 21mL de meio sólido são invertidos em placa e deixado solidificar (superfície nivelada). Essa camada basal visa a correção de falhas, para que a segunda camada possa ser adicionada. O meio de superfície (meio sólido, fundido e resfriado a 45-50°C) é, então, inoculado e cerca de 4 a 6 mL são transferidos para a superfície da camada basal e espalhados (para garantir uniformidade), antes da solidificação. A dupla camada facilita a visualização do contraste entre as zonas de crescimento e não crescimento, porém, tende a reduzir o diâmetro dos halos, em função do aumento da espessura da camada de Agar.

**Ensaio de difusão em Agar - FB (2019)**

**Tabela 1 – Ensaio microbiológico por difusão em agar.**

Antibiótico	Micro-organismo	Meio de cultura		Volume (mL) do meio aplicado nas camadas		Volume do inóculo mL/100 mL	Temperatura de incubação (°C)
		Base	Superfície	Base	Superfície		
Amoxicilina	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	0,5	32 a 35
Ampicilina	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	0,5	32 a 35
Anfomicina	<i>Micrococcus luteus</i> resistente a neomicina (ATCC 14452)	2	1	21	4	0,5	36 a 38
Anfotericina B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)	–	19	–	8	1,0	29 a 31
Bacitracina	<i>Micrococcus yunnanensis</i> (ATCC 7468)	2	1	21	4	0,3	32 a 35
Bacitracina	<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	2	1	21	4	0,3	32 a 35
Benzilpenicilina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	1,0	32 a 35
Bleomicina	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (ATCC 607)	15	15	10	6	1,0	32 a 35
Clasomicina	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	5	5	21	4	0	36 a 38
Carbenicilina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)	9	10	21	4	0	36 a 38
Cefacetila	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,5	32 a 35
Cefadroxila	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,05	36 a 38
Cefalexina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,05	32 a 35
Cefaloplicina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,2	32 a 35
Cefalordina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,1	32 a 35
Cefalotina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,1	32 a 35
Cefapina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,08	32 a 35
Cefazolina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,05	32 a 35
Cefoxitina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	5	0,1	32 a 35
Cefradina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,05	32 a 35
Ciclicilina	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	0,5	36 a 38
Cicloserina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	10	4	0,04	29 a 31
Clindamicina	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	1,5	36 a 38
Cloranfenicol	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	1	1	21	4	2,0	32 a 35

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Nessa tabela, retirada da Farmacopeia Brasileira (2019), temos as condições necessárias para a realização do ensaio de difusão em Agar para alguns antibióticos. Ela inclui o microrganismo adequado, meio de cultura (monocamada ou bicamada), volume do inóculo e temperatura de incubação.

### Solução do antibiótico

- ✓ cilindros de vidro ou de aço inoxidável
- ✓ templates de aço
- ✓ discos de papel de filtro
- ✓ cavidade perfurada no Agar

❖ Solventes, diluentes, preparo da amostra e faixas de concentração devem seguir orientação da monografia específica.

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Quantidades definidas da solução do antibiótico são dispensadas em reservatórios que podem ser cilindros de vidro ou de aço inoxidável, templates de aço ou discos de papel de filtro depositados sobre a camada de Agar nutriente ou podem se constituir em cavidade perfurada no próprio Agar nutriente, sendo o cilindro cortado, removido sob vácuo. A utilização de um modo ou outro vai depender de fatores como praticidade e sensibilidade necessária. A utilização dos discos de papel facilitam a manipulação das placas, além de reduzir o trabalho e o tempo envolvido no teste; porém, é menos sensível que os demais para baixas concentrações da solução-teste (ex. detecção de contaminação cruzada), pois abriga pequena quantidade de solução teste.

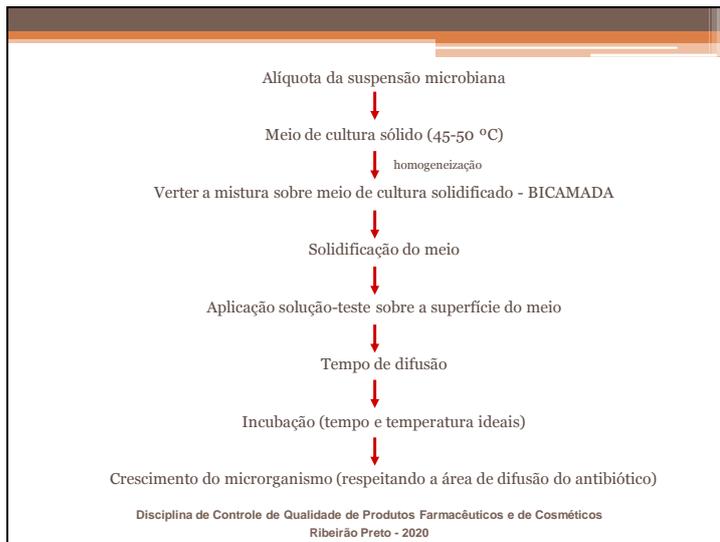
Os solventes, diluentes, preparo da amostra e faixas de concentração devem seguir orientação da monografia específica para antibiótico oficialmente consagrado; caso contrário, há que se testar e padronizar todas as condições.

Ensaio de difusão em Agar - FB (2019)							
Tabela 2 – Preparação da solução padrão de trabalho e da curva padrão.							
Antibiótico	a. Condição de dessecção (5.5.3.3)	b. Solvente inicial	c. Solução para diluição (5.5.3.3)	d. Concentração da solução de trabalho (mL)	e. Prazo de validade da solução sob refrigeração	f. Solução para diluição (5.5.3.3)	g. Faixa de concentração (mL)
Amoxicilina	8	–	Água estéril	1 mg	7 dias	2	0,05 a 0,2 µg <sup>g</sup>
Ampicilina	8	–	Água estéril	0,1 mg	7 dias	2	0,05 a 0,2 µg <sup>g</sup>
Aufomicina <sup>h</sup>	1	–	2	0,1 mg	14 dias	2	5 a 20 µg
Aufotercina B	1	–	Dimetilsulfóxido	1 mg <sup>i</sup>	Usar no mesmo dia	5	0,5 a 2 µg <sup>g</sup>
Bacitracina	1	–	HCl 0,01 M	100 U.I.	Usar no mesmo dia	1	1 a 4 U.I.
Benzilpenicilina	8	–	1	1000 U.I.	4 dias	1	0,2 a 2 U.I.
Bleomicina	7	–	8	2 U.I.	14 dias	8	0,01 a 0,2 U.I.
Canamicina B	8	–	2	1 mg	30 dias	2	0,5 a 2 µg
Carbencilina	8	–	1	1 mg	14 dias	1	10 a 40 µg
Cefacetila	8	–	1	1 mg	7 dias	1	5 a 20 µg
Cefadroxila	8	–	1	1 mg	Usar no mesmo dia	1	10 a 40 µg
Cefalexina	8	–	1	1 mg	7 dias	1	10 a 40 µg
Cefalordina	1	–	1	1 mg	5 dias	1	0,5 a 2 µg
Cefaloglicina	8	–	Água estéril	100 µg	7 dias	3	5 a 20 µg
Cefalotina	1	–	1	1 mg	5 dias	1	0,5 a 2 µg
Cefapirina	8	–	1	1 mg	3 dias	1	0,5 a 2 µg
Cefazolina	8	10 000 µg por mL na solução <sup>h</sup>	1	1 mg	5 dias	1	0,5 a 2 µg
Cefoxitina	8	–	1	1 mg	Usar no mesmo dia	1	10 a 40 µg
Ciclacilina	8	–	Água estéril	1 mg	1 dia	2	0,5 a 2 µg <sup>g</sup>
Ceftidina	8	–	1	1 mg	5 dias	1	5 a 20 µg
Ciclooxerina	1	–	Água estéril	1 mg	30 dias	1	20 a 80 µg
Cindamicina	8	–	Água estéril	1 mg	30 dias	2	0,5 a 2 µg

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Nessa tabela, retirada da Farmacopeia Brasileira (2019), temos as condições necessárias para a realização do ensaio de difusão em Agar para alguns antibióticos. Ela inclui os diluentes utilizados para o preparo das soluções padrão e teste, bem como a faixa de concentração utilizada para os ensaios de cada antibiótico.

Slide 14



Esse esquema mostra, resumidamente, os passos realizados no ensaio para a determinação da potência dos antibióticos, utilizando-se bicamada. Uma alíquota de suspensão fresca de microrganismos é adicionada ao meio de cultura sólido (fundido e resfriado a 45-50°C), homogeneizados e invertidos sobre a camada basal de meio de cultura solidificado (no caso da bicamada). Após solidificação, aplica-se a solução teste de antibióticos, tendo-se o cuidado com respeito à randomização das placas, na distribuição de soluções-padrão e de amostras, dentro do menor tempo possível, para que a difusão se inicie ao mesmo tempo.

Zonas de inibição maiores podem ser obtidas refrigerando-se as placas ou mantendo-as em temperatura ambiente após a distribuição das soluções padrão e teste. Após isso, as placas são incubadas em temperatura adequada, até que ocorra o crescimento dos microrganismos, respeitando a área de difusão do antibiótico.

**Fatores que influenciam a determinação da potência de antibióticos**

- ❖ pH – compatível com o crescimento microbiano, atividade e estabilidade do antibiótico  
Exemplo: pH ácido do meio → atividade antimicrobiana  
substâncias básicas ↓ (estreptomicina) e ácidas ↑ (penicilina)
- ❖ Condições de incubação (tempo e temperatura)
- ❖ Composição do meio
- ❖ Espessura e uniformidade do Agar
- ❖ Velocidade de difusão da substância no Agar
- ❖ Distribuição do inóculo em placas de Petri (nitidez do halo de inibição)
- ❖ Características da amostra

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Existem vários fatores que podem influenciar na determinação da potência dos antibióticos. Dentre eles podemos citar:

. pH, que deve ser compatível com o crescimento microbiano, além de não interferir com a atividade e estabilidade do antibiótico. Vale a pena lembrar que os antibióticos são ativos principalmente na forma não ionizada, onde antibióticos de natureza básica (ex. estreptomicina) tem sua atividade aumentada em pH alcalino e antibióticos de natureza ácida (ex. penicilina) tem sua atividade aumentada em pH ácido. É recomendada a utilização de diluente tampão, com pH próximo àquele de crescimento ótimo do microrganismo, levando em consideração a difusão dos antibióticos no meio de cultura, visto que essa pode ser alterada de acordo com o pH.

. As condições de incubação, como temperatura e tempo, irão depender do microrganismo utilizado como revelador.

. A espessura e uniformidade do Agar são conseguidas utilizando-se placas com fundo plano, tamanho uniforme e com controle rigoroso do volume do meio de cultura transferido para cada uma.

. A velocidade de difusão do antibiótico no Agar é determinante para o tamanho da zona de inibição de crescimento. Considera-se que somente após a difusão da substância, antes da multiplicação microbiana, ocorre a definição do tamanho do halo de inibição de crescimento, posteriormente revelado biologicamente. Assim zonas de inibição maiores podem ser obtidas aumentando a fase lag do microrganismo através da refrigeração das placas ou mantendo-as em temperatura ambiente, após a adição das soluções teste e padrão. A fase lag é uma fase de latência do microrganismo, que ocorre após a sua inoculação. Nesse período os microrganismos começam a se ajustar às condições físicas e nutrientes disponíveis e não há divisão celular.

. Quanto à distribuição do inóculo, comparou-se espalhamento da suspensão microbiana sobre o Agar, seguido da remoção do excesso; inoculação prévia do meio de cultura e posterior distribuição em placas (monocamada) e transferência do meio inoculado sobre uma camada de meio basal (bicamada), concluindo-se que as duas últimas técnicas proporcionam uniformidade de carga, sendo que a última (bicamada) resultou em zonas de inibição mais nítidas, porém envolveu maior dispêndio de tempo.

. Características da amostra como natureza inibitória (antibióticos) ou estimulante (fatores de crescimento) dos componentes da amostra sobre o microrganismo-teste, além da hidrossolubilidade e difusibilidade no meio de cultura.

**Fatores que influenciam o tamanho do halo de inibição**

- ❖ Escolha do microrganismo e sua sensibilidade
- ❖ Condições do microrganismo teste (forma vegetativa ou esporulada)
- ❖ Formulação e condição do meio
- ❖ Densidade da sementeira
- ❖ Volume da solução-teste
- ❖ Espessura do agar
- ❖ Tempo de aplicação da solução teste
- ❖ Temperatura de incubação

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Os principais fatores que influenciam o tamanho do halo de inibição no ensaio para determinar a potência do antibiótico são:

- Escolha do microrganismo e sua sensibilidade, onde microrganismos mais sensíveis exibirão halos de inibição maiores.

- Condições do microrganismo teste. Se o microrganismo for inoculado na forma de esporos (forma latente), a sua multiplicação demorará mais para ocorrer, favorecendo, assim, a maior difusão do antibiótico pelo Agar e, conseqüentemente, maior halo de inibição. Por outro lado, a inoculação de microrganismos na forma vegetativa (forma ativa), favorece a rápida multiplicação dos microrganismos, o que resulta na formação de halos de inibição menores.

- Formulação e condição do meio, como nutrientes, pH e conteúdo de água.

- Densidade da sementeira, onde a zona de inibição será inversa ao tamanho do inóculo.

- Volume da solução-teste, que deve ser grande o bastante para ser considerado constante.

- Espessura do Agar, que será inversamente proporcional ao tamanho do halo de inibição.

- Tempo de aplicação da solução teste, que não deve diferir do tempo de aplicação da solução padrão. Ambas soluções devem ter o mesmo tempo de difusão, antes da incubação.

- Temperatura de incubação, que dependerá do microrganismo utilizado como revelador, e que deve ser uniforme ao longo do tempo de incubação.

**Problema: Halo duplo**

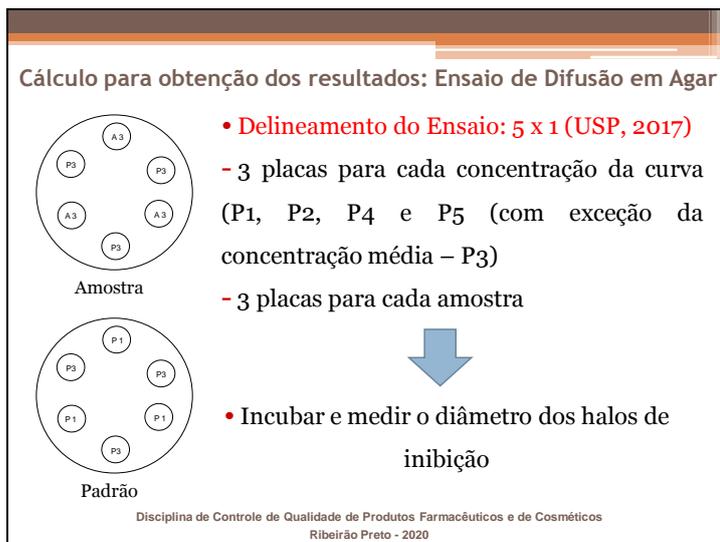
- Cepas mistas
- Pequeno volume de solução no reservatório (crescimento do microrganismo em função da baixa concentração)
- Aparecimento em todas as concentrações: resistência do microrganismo



Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Existem algumas situações em que aparecem halos duplos após a incubação. O aparecimento desses pode ocorrer quando tivermos cepas mistas, onde cada microrganismo irá responder diferentemente ao antibiótico testado. Outro motivo pode ser o pequeno volume da solução de antibiótico no reservatório, fazendo com que a concentração do antibiótico caia rapidamente a valor abaixo do original, o que possibilita aparecimento de crescimento do organismo teste em função da baixa concentração que se difunde posteriormente. Quando o aparecimento do duplo halo ocorre em todas as concentrações significa que o microrganismo adquiriu resistência, de modo que parte desta população irá manifestar crescimento, em densidade inferior, numa concentração maior de antibiótico (mais próximo ao reservatório).

Em todos os casos, o aparecimento do halo duplo não invalida o ensaio, desde que a leitura seja padronizada para a medida da distância de difusão, considerando a zona limítrofe externa ou interna do halo duplo.



Segundo recomendações da Farmacopeia Americana (2017), o delineamento do ensaio para determinar a potência dos antibióticos é o 5 x 1. Este delineamento utiliza uma curva padrão com 5 concentrações e uma única concentração de cada amostra. Para o ensaio de difusão em Agar, cada placa incluirá somente dois tratamentos, o tratamento referência (corresponde à concentração média do padrão → P3) e qualquer uma das demais concentrações do padrão (P1, P2, P4 ou P5) ou a amostra (A3). A amostra é diluída até uma concentração nominal estimada (A3) que corresponde à concentração média do padrão (P3). Essa diluição tem o propósito de garantir que a concentração da amostra estará na porção linear da curva padrão. O teste determina a potência relativa de A3 com relação à curva.

A determinação da potência dos antibióticos está sujeita a variações inter-ensaios, assim como, intra-ensaio. Sendo assim, três ou mais experimentos independentes (réplicas biológicas) são necessários para estimar a potência de uma dada amostra. O número de ensaios necessários irá depender da variabilidade do ensaio, de modo que os resultados encontrados sejam confiáveis. Esses ensaios incluem o preparo de diferentes soluções padrão e teste, a partir do mesmo padrão e amostra; e a realização da análise em diferentes dias. A média da potência deve incluir os resultados de todos os ensaios independentes. Os resultados combinados de uma série de pequenos e independentes ensaios, obtidos ao longo de diferentes dias, levará a resultados mais confiáveis que aqueles obtidos por apenas um único ensaio, com o mesmo número total de placas ou tubos.

*Procedimento para delineamento 5 x 1:* para a curva padrão, utilizar um total de 12 placas, três para cada uma das soluções do padrão (P1, P2, P4, P5), exceto para a concentração média da curva (P3) que é incluída em todas as placas. Em cada conjunto de três placas, utilizar três cilindros para a concentração média (P3) e alternar três cilindros para a concentração baixa (P1) e assim sucessivamente com as demais soluções do padrão. Dessa maneira, obtém-se 36 halos de inibição para a concentração (P3) e nove halos de inibição para cada uma das outras quatro concentrações da curva. Para cada amostra, empregar três placas, onde serão colocados três cilindros para a

concentração média do padrão (P3) e três com a solução da amostra preparada na mesma concentração do padrão (A3).

Aplicar 0,2 mL das soluções nos cilindros ou nos moldes de aço inoxidável por meio de pipeta ou outro instrumento calibrado, caso não especificado na monografia individual. Após realizar os procedimentos adequados para o delineamento escolhido, incubar as placas na temperatura indicada, cuja variação não deverá exceder  $\pm 0,5$  °C, durante um período de 16 a 18 horas. Em seguida, medir o diâmetro dos halos de inibição empregando dispositivo adequado para medida, como paquímetro, ou projetor óptico que tenha precisão de 0,1 mm ou menos.

*Cálculo para delineamento 5 x 1* : Procedimento para construção da curva dose-resposta:

No método por difusão em Agar, medir os halos de inibição para cada uma das concentrações do padrão (P1, P2, P3, P4, e P5) nos quatro conjuntos de placas. A média das 36 leituras da concentração intermediária do padrão (P3) é utilizada para corrigir as médias de cada uma das outras concentrações do padrão P1, P2, P4, P5. A correção se efetua da seguinte maneira: medir as 36 leituras de P3 em todas as placas e calcular a média. Medir as nove leituras de P3 no conjunto de placas (3) para as outras concentrações (P1, P2, P4 e P5) e calcular a média. Calcular a diferença entre a média total e a média nas três placas de cada concentração, a qual deve ser somada às medidas das outras concentrações.

Slide 19

Padrão	[U/mL]	Replica	Referência (P3)						Amostra						
			Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Média	DP	DFR	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Média	DP	DFR	Média corrigida
P1	3,2	1	16,1	15,6	15,8	15,867	0,200	1,3	14,6	14,1	13,5	14,167	0,324	2,3	14,022
		2	16,0	15,9	16,2				14,5	14,1	14,4				
		3	15,7	15,7	15,8				14,0	14,2	14,1				
P2	4,0	1	15,8	15,6	15,5	15,667	0,158	1,0	14,7	15,1	14,8	14,833	0,265	1,8	14,989
		2	15,7	15,5	15,6				14,7	14,9	15,2				
		3	15,7	15,4	15,3				14,8	15,0	14,3				
P4	6,25	1	15,6	15,8	16,0	15,789	0,169	1,1	16,6	16,8	16,3	16,578	0,233	1,4	16,511
		2	15,8	15,6	15,7				16,6	16,5	16,2				
		3	16,1	15,7	15,8				16,9	16,5	16,8				
P5	7,8125	1	15,6	15,6	15,5	15,667	0,141	0,9	17,3	17,0	17,9	17,167	0,224	1,3	17,222
		2	15,6	15,7	15,5				17,3	17,4	17,2				
		3	15,9	15,8	15,8				17,3	17,3	16,7				
						15,722 <sup>a</sup>									
P3 na amostra		1	15,7	15,8	15,7	15,678	0,179	1,1	15,3	15,8	15,7	15,478	0,307	2,0	15,522
		2	15,9	15,7	15,7				15,8	15,8	15,5				
		3	15,5	15,8	15,3				15,2	15,1	15,1				

<sup>a</sup> Corresponde à média dos 36 valores de P3  
 DP: Desvio Padrão                      DPR: Desvio Padrão Relativo                      Cálculo da concentração da amostra:  
 $x = (y - 9,978) / 3,551 \rightarrow x = (15,522 - 9,978) / 3,551 \rightarrow x = 1,561$   
 $C_{amostra} = e^{1,561} \rightarrow C = 4,765 \rightarrow 95,3\%$   
 Equação da reta para a curva padrão:  $y = ax + b \rightarrow y = (3,551 \cdot x) + 9,978$   
 onde  $y =$  tamanho do halo e  $x =$  log da concentração

**Exemplo:**

Valor médio de P3 nas 36 leituras: 15,722 mm

Valor médio de P3 nas placas com P1: 15,867 mm

Valor médio de P1 nas placas com P1: 14,167 mm

DP: Desvio padrão

DPR: Desvio padrão relativo

Cálculo para correção dos valores:

Média corrigida (mm) = média do padrão original (P1) - (média da referência (P3) para essa concentração – média da referência (P3) de todas as concentrações)

Exemplo para as três placas do padrão P1 da tabela

Média corrigida (mm) = 14,167 – (15,867 – 15,722)

Média corrigida (mm) = 14,167 – 0,145

Média corrigida (mm) = 14,022 mm

Essa correção deve ser feita para todos os demais pontos da curva (P2, P4 e P5).

Após a correção, é possível fazer um gráfico e determinar a equação da reta com os valores obtidos:

Padrão	Média dos halos corrigidas (mm)	Concentração (U/mL)
P1	14,022	3,2
P2	14,989	4,0
P3 (referência)	15,722	5,0
P4	16,511	6,25
P5	17,222	7,8125

Equação da reta:  $y = ax + b \rightarrow y = (3,551 \cdot x) + 9,978$        $x = (y - 9,978) / 3,551$   
 $x = (15,522 - 9,978) / 3,551 \rightarrow x = 1,561$

Onde  $y =$  tamanho do halo (mm)

$x =$  Log da concentração do antibiótico

$a =$  coeficiente angular (inclinação da reta)

$b =$  coeficiente linear (local de interceptação do eixo  $y$ )

Conc. Amostra =  $e^{1,561} = 4,765$

**Resultado = (4,765/5000) x 100 = 95,3%**

### Ensaio Microbiológico - Princípio do Método

**TURBIDIMÉTRICO**

**Inibição crescimento microbiano**

↓

**Meio cultura líquido**

↓

**Meio límpido  
(ausência de crescimento microbiano)**



Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Já o método turbidimétrico depende da inibição do crescimento de um microrganismo em meio de cultura líquido, contendo solução uniforme de antibiótico, o qual é favorável ao rápido crescimento do microrganismo, na ausência do antibiótico.

*Procedimento para delineamento curva 5 x 1:* para o delineamento 5 x 1, preparar diluições que representem cinco concentrações do padrão (P1, P2, P3, P4 e P5) e uma concentração da amostra (A3). A solução da amostra deve corresponder à mesma diluição do padrão que corresponde à concentração média da curva (P3). Empregar pelo menos três tubos para cada concentração do padrão e da amostra. Dessa forma, pelo menos 18 tubos são necessários no ensaio. Após realizar os procedimentos adequados para o delineamento escolhido, inocular o meio de cultura recomendado com quantidade conhecida de suspensão do microrganismo sensível ao antibiótico, de modo que, após incubação de aproximadamente quatro horas, a turbidez bacteriana no meio seja de fácil medida e mantenha correlação entre a dose e a resposta da substância em análise. Durante a incubação é necessário tomar a precaução de assegurar temperatura adequada e uniforme para todos os tubos. O tempo adequado deve ser verificado pela observação do crescimento no tubo contendo a concentração média (P3) utilizada no ensaio. Após o período de incubação, interromper a multiplicação dos microrganismos pela adição de 0,5 mL de solução de formaldeído a 12%, em cada tubo. Determinar a absorvância para cada tubo em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm ou 580nm. Padronizar o aparelho em absorvância por meio do branco contendo a mesma quantidade de caldo nutriente e formaldeído, a 12%.

## Ensaio fotométrico - Turbidimetria

**Princípio:** adição da substância-teste à suspensão do organismo em meio nutriente → incubação → leitura da turbidez

**Emprego:** produção, isolamento, purificação e estudos de atividade farmacológica

- Suspensão do microrganismo
- Meio de cultura
- pH
- Temperatura de incubação (condução térmica desigual)
- Agitação dos tubos
- Tempo de incubação (3 a 5 horas)

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Embora se possa dimensionar a resposta como peso seco, número total de microrganismos, número de microrganismos viáveis, nitrogênio total, pH, acidez titulável, liberação de CO<sub>2</sub> e consumo de oxigênio, a leitura da turbidez da suspensão, após a incubação, é o parâmetro mais amplamente empregado.

Esse método tem sido empregado desde o início do uso das penicilinas, tendo sido adotado nas etapas de produção, isolamento, purificação e estudos de atividade farmacológica.

- A suspensão de microrganismos pode ser feita diretamente a partir de culturas mantidas em tampão-glicerol, conservadas a -40°C, ou pela lavagem de culturas de 24 h com tampão fosfato ou com o próprio meio utilizado no ensaio.

- A velocidade de crescimento do microrganismo é afetada pela composição do meio de cultura, pH, temperatura de incubação e aeração.

- A composição dos meios de cultura para dosagem de antibióticos deve ser completa, para não interferir na resposta gradual do microrganismo em função das diferenças na concentração do antibiótico.

- O pH influencia a atividade da maioria dos antibióticos, que se constituem de substâncias ácidas ou básicas. Este fenômeno pode ser usado para alterar consideravelmente a resposta média dos testes. Além disto, o pH deve favorecer a estabilidade da substância em análise.

- A temperatura de incubação é de 36 a 38°C na maioria dos procedimentos. A redução da temperatura faz diminuir a velocidade de crescimento dos microrganismos e aumenta o tempo de incubação. Um problema prático durante a incubação diz respeito à condução térmica desigual nos múltiplos tubos do ensaio, prejudicando, principalmente, os tubos mais internos da estante, quando se utiliza estufas. Este problema é menos marcante quando se utiliza banho de água com circulação.

- A agitação dos tubos pode constituir em exigência indispensável para certos microrganismos, além de reduzir o período de incubação. A incubação estática pode criar um gradiente no crescimento dos microrganismos, que encontram condições de microaerofilia ou anaerobiose no fundo dos tubos.

- O tempo de incubação geralmente varia entre 3 a 5 horas. O tempo é determinado no momento em que o tubo zero (onde o inóculo é feito apenas em meio de cultura líquido) atinge DO de 0,7 a 0,8 (em comprimento de onda de 530 ou 580nm). Este tempo é em função de variáveis como composição do meio e pH do mesmo, temperatura de incubação, tamanho do inóculo, aeração e cepa do organismo teste. Não é importante um tempo exato de incubação, mas sim a obediência do mesmo tempo para todos os tubos do ensaio.

### Ensaio por Turbidimetria - FB (2019)

**Tabela 1 – Ensaio microbiológico por turbidimetria.**

<i>Antibiótico</i>	<i>Micro-organismo</i>	<i>Caldo nutriente</i>	<i>Volume do inóculo mL/100 mL</i>	<i>Temperatura de incubação (°C)</i>
Amicacina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,1	37
Canamicina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,2	37
Candídicina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)	13	0,2	28
Capreomicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	3	0,05	37
Ciclosserina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,4	37
Cloranfenicol	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	3	0,7	37
Clortetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,1	36
Demeclociclina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,1	37
Diidroestreptomicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	3	0,1	37

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Nessa tabela, retirada da Farmacopeia Brasileira (2019), temos as condições necessárias para a realização do ensaio microbiológico por turbidimetria para alguns antibióticos. Ela inclui o microrganismo adequado, meio de cultura (líquido), volume do inóculo e temperatura de incubação.

## Ensaio por Turbidimetria - FB (2019)

Tabela 2 – Preparação da solução padrão e da curva padrão – Método turbidimétrico.

Antibiótico	a. Condição de dessecção (5.5.3.3)	b. Solvente inicial	c. Solução para diluição (5.5.3.3)	d. Concentração da solução de trabalho (mL)	e. Prazo de validade da solução sob refrigeração	f. Solução para diluição (5.5.3.3)	g. Faixa de concentração (mL)
Amoxicilina	8	-	Água estéril	1 mg	14 dias	Água estéril	6 a 14 µg
Cefamandolol	8	-	Água estéril	1 mg	30 dias	Água estéril	6 a 14 µg
Ceftriaxona	6	-	Dimetilsulfóxido	1 mg	Usar no mesmo dia	Água estéril	0,02 a 0,14 µg <sup>1</sup>
Capromicina	5	-	Água estéril	1 mg	7 dias	Água estéril	60 a 180 µg
Cicloserina	1	-	Água estéril	1 mg	30 dias	Água estéril	20 a 80 µg
Cloxacilina	8	10 000 µg por mL em álcool etílico	1	1 mg	30 dias	1	1 a 4 µg
Clotetraciclina	8	-	HCl 0,01 M	1 mg	4 dias	Água estéril	0,03 a 0,09 µg
Demeclociclina	1	-	HCl 0,1 M	1 mg	4 dias	Água estéril	0,06 a 0,14 µg
Didroestreptomicina	5	-	Água estéril	1 mg	30 dias	Água estéril	20 a 60 µg
Doxiciclina	8	-	HCl 0,1 M	1 mg	5 dias	Água estéril	0,06 a 0,14 µg
Espectinomicina	8	-	Água estéril	1 mg	30 dias	Água estéril	20 a 60 µg
Estreptomicina	1	-	Água estéril	1 mg	30 dias	Água estéril	20 a 60 µg
Gramicidina	1	-	Alcool etílico 95%	1 mg	30 dias	Alcool etílico 95%	0,02 a 0,08 µg
Lincomicina	8	-	Água estéril	1 mg	30 dias	Água estéril	0,3 a 0,8 µg
Minciclina	8	-	HCl 0,1 M	1 mg	2 dias	Água estéril	0,06 a 0,12 µg
Oxitetraciclina	8	-	HCl 0,1 M	1 mg	4 dias	Água estéril	0,16 a 0,32 µg
Rolitetraciclina	1	-	Água estéril	1 mg	1 dia	Água estéril	0,16 a 0,32 µg
Tetraciclina	8	-	HCl 0,1 M	1 mg	1 dia	Água estéril	0,16 a 0,32 µg
Tiotricina <sup>2</sup>	1	-	Alcool etílico 95%	1 mg	30 dias	Alcool etílico 95%	0,02 a 0,08 µg
Tobramicina	8	-	Água estéril	1 mg	14 dias	Água estéril	1 a 4 µg

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

Nessa tabela, retirada da Farmacopeia Brasileira (2019), temos as condições necessárias para a realização do ensaio microbiológico por turbidimetria para alguns antibióticos. Ela inclui os diluentes utilizados para o preparo das soluções padrão e teste, bem como a faixa de concentração utilizada para os ensaios de cada antibiótico.

Importância: garantir o efeito terapêutico e evitar efeitos adversos

**Método Microbiológico**

X

**Método Físico-Químico**



Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos  
Ribeirão Preto - 2020

A determinação da potência de um antibiótico é importante para garantir que este alcance o efeito terapêutico, evitando os efeitos adversos. Há situações em que a margem entre a dose terapêutica é muito próxima da dose tóxica; e uma pequena alteração na potência desse antibiótico pode ser suficiente para atingir essa dose tóxica, causando, no paciente, efeitos indesejáveis. Além disso, existem falsificações com moléculas estruturalmente similares (indetectáveis por métodos físico-químicos), porém com potência reduzida ou nula.

Sendo assim, quando o método microbiológico deve ser utilizado? Ele é indicado para substâncias ou preparações em que a potência/teor dos antibióticos não pode ser analisada por métodos físico-químicos. O método microbiológico é mais específico que o físico-químico; pois pequenas mudanças na estrutura de um antibiótico podem não ser detectadas pelos métodos físico-químicos e serem detectadas no microbiológico. Além disto, podem existir situações em que o medicamento não consiste de substância definida que possa ser completamente caracterizada por suas propriedades físico-químicas.

## Referências Bibliográficas

- Farmacopéia Brasileira, 6<sup>a</sup> Ed., ANVISA, 2019.
- Pinto, T.J.A.; Kaneko, T.M.; Pinto, A.F. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 3<sup>a</sup> Ed. Ateneu Editora, São Paulo, 2010.
- United States Pharmacopoeia. 40<sup>th</sup> Ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2017.