UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêutico

Doseamento microbiológico de Nistatina:
Desenvolvimento e validação de método empregando leitura cinética em microplaca

CARMEN ROSA JAMIL PEDROSO

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Prof^a Dr^a Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

SÃO PAULO
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêutico

Doseamento microbiológico de Nistatina:
Desenvolvimento e validação de método empregando leitura cinética em microplaca

CARMEN ROSA JAMIL PEDROSO

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Prof^{fa} Dr^a Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

SÃO PAULO
2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Pedroso, Carmen Rosa Jamil

P372d Doseamento microbiológico de nistatina : desenvolvimento e
validação de método empregando leitura cinética em microplaca /
Carmen Rosa Jamil Pedroso. -- São Paulo, 2014.
92p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Droga : Controle biológico de qualidade I. T. II. Pinto,
Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

615.19015 CDD

CARMEN ROSA JAMIL PEDROSO

Doseamento microbiológico de nistatina: Desenvolvimento e validação de método
empregando leitura de método empregando leitura cinética em microplaca

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Profª Drª Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientadora / Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2014

A Deus, sobre todas as coisas, pois sem fé eu não chegaria onde estou.

Aos meus pais *Fábio* e *Carmen*, que mesmo de longe estiveram ao meu lado, me apoiando e me aconselhando para que eu pudesse tomar as decisões corretas. A vocês devo minha vida e sou grata por tudo aquilo que vocês me proporcionaram para a minha formação pessoal e profissional. Aos meus irmãos *Jorge* e *Fábio*, à minha cunhada *Daniela* e aos meus sobrinhos *João* e *Laura*, pelo amor, carinho, apoio e compreensão.

Ao meu marido *Cesar* que, com seu amor, esteve ao meu lado sem me deixar fraquejar nos momentos difíceis.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À *Profª Drª Terezinha de Jesus Andreoli Pinto* oportunidade, dedicação, paciência, orientação e, principalmente, por contribuir na minha formação profissional.

Ao *Profº Drº Felipe* e à *Drª Daniela*, pela dedicação, amizade, paciência e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de aprimoramento.

Aos funcionários e amigos do CONFAR, *Cleide, Diane, Josiane, Marly, Rogério, Gisele, Erica, Rosa, Luana, Elizabeth*, pela amizade e apoio.

Às funcionárias da FURP *Maria e Margarida* pelo envio das amostras e dos padrões todas as vezes que à solicitei.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a finalização deste trabalho.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

Resumo

PEDROSO, C.R.J. **Doseamento microbiológico de Nistatina: Desenvolvimento e validação de método empregando leitura cinética em microplaca.** 2014. 92 p. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A *FDA* tem incentivado a indústria farmacêutica a implantar no seu sistema de controle de qualidade métodos rápidos para avaliação do produto durante seu processo de produção e/ou na sua forma final para comercialização. Na indústria farmacêutica, o doseamento microbiológico é amplamente utilizado pelo setor de Controle de Qualidade com objetivo de avaliar a eficácia e segurança do medicamento produzido, principalmente no que diz respeito a produção de antibióticos. No caso desses, a aplicabilidade de métodos rápidos é de suma importância a fim de se obter uma avaliação rápida e confiável do produto, garantindo assim a comercialização de medicamentos com a qualidade e segurança necessárias para o sucesso do tratamento terapêutico. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar método para doseamento microbiológico de nistatina, com leitura cinética em microplaca, perfeitamente intercambiável com o método tradicional de difusão em ágar, porém com redução do tempo de execução e de liberação do resultado final. Os parâmetros definidos para este ensaio foram: utilização de inóculo com 5% de *Candida albicans* (ATCC 10231), meio de cultura líquido, tempos de 48 horas para crescimento do micro-organismo e 8 horas para leitura das micro-placas, , temperatura de análise de 30 °C e absorvância de 630 nM. Os parâmetros avaliados no processo de validação, de acordo com os códigos oficiais vigentes, demonstraram que o método é sensível, robusto, linear ($r = 0,97332$), precisão (repetibilidade: 96 %, DPR= 6 % / precisão intermediária: 97 %; DPR = 7 %) e exato (97 %, DPR = 7 %). Em comparação ao método de difusão em ágar tradicional, o método desenvolvido demonstrou a mesma eficiência do método já utilizado, contemplando todos os parâmetros do processo de validação, com a vantagem de ser realizado em menor tempo e com o uso reduzido de material de análise, como meio de cultura, padrão e amostra. Em função disso, pode-se concluir que o método desenvolvido e validado além de representar uma tendência mundial, por ser efetuado de modo rápido, eficaz e econômico, é perfeitamente aplicável a rotina laboratorial.

Palavras chave: Doseamento microbiológico; leitura cinética; microplaca; Nistatina, Desenvolvimento e validação.

Abstract

PEDROSO, C.R.J. **Microbiological assay of nistatin: development and validation of a method employing kinetic micro-plate reading.** 2014. 92 p. (Master's Dissertation). Faculty of Pharmaceutical Sciences of University of São Paulo.

The *FDA* have been encouraging the pharmaceutical industry to deploy in their system of quality control a rapid method for assessment of the product during its production process and/or in their final form for sale. In the pharmaceutical industry, the microbiological assay is widely used by the Quality Control sector to evaluate the efficacy and safety of the product produced, especially as regards the production of antibiotics. In such case, the applicability of rapid methods is very important in order to obtain a rapid and reliable evaluation of the product, thus ensuring the marketing of medicinal products with the quality and security necessary for the success of therapeutic treatment. The aim of this study was to develop and validate an method for the microbiological assay of Nystatin with kinetic micro-plate reading, perfectly interchangeable with the traditional method of agar diffusion, but with reduced time for implementation and release of the final result. The parameters set for this assay were using 5 % inoculum of *Candida albicans* (ATCC 10231), liquid culture medium, time of 48 hours for growth of micro-organisms and 8 hours for reading the micro-plate temperature analysis of 30 °C and absorbance of 630 nM. The parameters evaluated in the validation process, according to the current official codes, shows that the method is sensitive, robust, linear ($r = 0,97332$), precision (repeatability: 96 %, RDS = 6 % / inter-day precision = 97 %, RSD = 7%) and accurate (97 %, RDS = 7%). Compared to the traditional method of diffusion in agar, the developed method demonstrated the same efficiency of the method already used, covering all parameters of the validation process, with the advantage of being performed in less time and with reduced use of material for analysis, as the culture medium and standard sample. As a result, it can be concluded that the method developed and validated besides representing a global trend, being made fast, effective and economical way, is perfectly applicable to routine clinical practice.

Keywords: Microbiological assay; kinectic reading; microplate; nystatin; development and validation.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE QUADROS.....	i
LISTA DE GRÁFICOS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE SIGLAS	iii
LISTA DE SÍMBOLOS	iv

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Doseamento microbiológico	5
2.2. Difusão em ágar	9
2.3. Dosagem microbiológica em tubos	10
2.3.1. Diluição seriada	10
2.3.2. Método turbidimétrico	11
2.4. Métodos rápidos	18
2.5. Ensaio em microplaca	23
2.6. Delineamento experimental	26
2.7. Antifúngicos	29
2.7.1. Antifúngicos poliênicos macrolídeos	29
2.7.2. Nistatina	30
2.8. Validação de métodos	33
2.8.1. Especificidade e seletividade	36
2.8.2. Linearidade	37
2.8.3. Intervalo, faixa de trabalho e faixa linear	38
2.8.4. Precisão	39
2.8.5. Limite de quantificação e limite de detecção	41
2.8.6. Exatidão	41
2.8.7. Robustez	42
3. OBJETIVO	44
3.1. Geral	45
3.2. Específico	45

4. MATERIAL E MÉTODO.....	46
4.1. Material	47
4.1.1. Meios de cultura	47
4.1.2. Tampão 6	48
4.1.3. Materiais	48
4.2. Método	48
4.2.1. Preparo do meio de cultura	48
4.2.2. Preparo do inóculo	49
4.2.3. Preparo da solução padrão	50
4.2.4. Preparo amostra	51
4.2.5. Preparo da solução placebo	52
4.2.6. Preparo da amostra simulada	52
4.2.7. Montagem da microplaca	52
4.3. Condições de leitura e incubação	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Desenvolvimento	56
5.2. Validação	60
5.3. Comparação entre o método em microplaca com o método de difusão em ágar	64
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Forma geral de apresentação da curva de dose-resposta de antibióticos	17
Figura 2 – Esquema de um experimento em quadrado latino	27
Figura 3 – Estrutura química da Nistatina	31
Figura 4 – Mecanismo de ação dos antifúngicos poliênicos	31
Figura 5 – Exemplo de inoculação do meio de cultura	49
Figura 6 – Preparo da Solução padrão	50
Figura 7 – Preparo da amostra	51
Figura 8 – Esquema demonstrativo para montagem da microplaca para ensaio 2x2	52
Figura 9 – Preparo da amostra simulada	53
Figura 10 – Aparelho Celer Polaris – Leitor de Elisa	54
Figura 11 – Aparelho BioShake IQ – Incubação	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio	35
Quadro 2 – Classificação de teste segundo sua finalidade	35
Quadro 3 – Ensaio necessários para validação do método analítico de acordo com o Instituto Nacional de Metrologia	36
Quadro 4 – Repetibilidade, Precisão intermediária e Reprodutibilidade	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico de definição de inóculo	57
Gráfico 2 – Gráfico de Absorbância (A) vs Log Conc. (UI/mL), empregando 5% de inóculo de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) obtido através da leitura da microplaca no tempo de 480 min	58
Gráfico 3 - Gráfico Absorbância vs Log Concentração (UI/mL), empregando 5 % de inóculo de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231), obtido através de leitura de ponto final no tempo 480 min.....	60
Gráfico 4 - Gráfico de Log Concentração (UI/mL) vs Crescimento (%), empregando 5 % de inóculo de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231), com leitura em tempo final de 480 min, obtido com as	

concentrações 0,4 e 0,8 UI/mL de padrão e amostra simulada..	61
Gráfico 5 – Gráfico de Crescimento (%) vs Log Conc (UI/mL), empregando 5 % de inóculo de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) com leitura de ponto final de 480 min, utilizando creme vaginal de nistatina como amostra	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos Microbiológicos Rápidos	21
Tabela 2 – Concentrações de padrão	51
Tabela 3 – Condições de incubação e análise	53
Tabela 4 – Condições nominais	59
Tabela 5 – Valores de precisão utilizando a amostra simulada com padrão e placebo.....	62
Tabela 6 – Valores de precisão utilizando creme vaginal de nistatina 25.000 UI/mL como amostra	63
Tabela 7 – Valores de exatidão utilizando creme vaginal de nistatina 25.000 UI/mL como amostra	63
Tabela 8 – Comparação entre o método inovador e o método convencional	64

LISTA SIGLAS

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BD™	<i>Becton, Dickinson and Company</i>
BPFM	Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
CPB	Comitê de Padronização Biológica
CV	Coeficiente de Variação
DMF	Dimetilformamida
DPR	Desvio Padrão Relativo
EPA	Efeito Pós-Antibiótico
ETB	<i>Ethambutol</i>
INH	Isoniazida
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
IR	Infra Vermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MABA	<i>Microplate Alamar Blue Assay</i>
MMR	Métodos Microbiológicos Rápidos
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMP	Rifampicina
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SDB	<i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
STR	Estreptomicina
TAP	Tecnologia do Processo Analítico
TEMA	<i>Tetrazolium Microplate Assay</i>
UV	Ultra Violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
UI	Unidade Internacional
μ	micro
L	Litro
m	Mili
g	Grama
%	Porcentagem
n	Nano
M	metro

1. INTRODUÇÃO

A agência reguladora americana FDA (*Food and Drug Administration*), tem incentivado as indústrias farmacêuticas a aprimorarem seu método de trabalho no setor de Garantia da Qualidade ocasionando, por conseguinte, o aprimoramento no setor de Controle de Qualidade.

O medicamento, como produto acabado, só deve ser disponibilizado ao consumidor quando estiver com a sua qualidade garantida ao final do processo de produção. Por este motivo é importante testar a qualidade em um item de cada lote produzido.

Na constata busca pela eficiência do tratamento realizado por pacientes, é importante o estudo sobre o medicamento, principalmente, quando se trata da investigação de concentrações de fármacos, como é o caso dos antibióticos e antifúngicos. A terapêutica, realizada contra infecções, só será bem sucedida quando o fármaco atingir o nível de concentração plasmática necessária e, para isso, os medicamentos existentes no mercado devem conter o valor real da concentração de fármaco como descrito pelo fornecedor na embalagem.

Para confirmar a dosagem de cada medicamento são necessários realizar ensaios que determinem a potência e a concentração do princípio ativo, neste caso o antifúngico, presente na forma farmacêutica estudada. Atualmente, nos laboratórios de controle de qualidade que estão presentes na indústria farmacêutica são realizados os métodos de doseamento microbiológico preconizados pela *U.S. Pharmacopeia*, como o de difusão em ágar e os turbidimétricos. Contudo, para execução destes são necessárias mais de 72 horas o que retarda a liberação do produto para o mercado.

Os métodos oficiais disponíveis para a quantificação da nistatina em seus produtos acabados são, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a Espectrofotometria por UV-visível, como exemplos de métodos físico-químicos, e a Difusão em ágar como ensaio microbiológico. Este último, por sua vez, utiliza a *Saccharomyces cerevisiae* como micro-organismo revelador. Os métodos microbiológicos são mais sensíveis e aplicáveis a uma

grande variedade de materiais sem ser necessária uma extensão de preparação de amostras e/ou o uso de equipamentos sofisticados.

A técnica de difusão em ágar requer um meio de cultura sólido inoculado e a ele é adicionado o antibiótico através de discos de papel, cilindros de aço inox ou de poços feitos na superfície do ágar. Após a incubação das placas ocorre a formação de halos, ou seja, a inibição do crescimento do micro-organismo pelo antibiótico. A leitura desses se faz medindo o diâmetro de cada halo e, com essas medições, constrói-se um gráfico padrão gerando uma equação que permite o cálculo da potência dos antibióticos presentes na formulação.

A técnica turbidimétrica, em contrapartida, utiliza-se de um meio de cultura líquido favorável e a este é adicionado o inóculo teste, bem como o antibiótico. Após incubação em tempo e temperatura ideais são realizadas leituras em espectrofotômetro. A técnica se baseia na alteração da turbidez do meio de cultura devido ao crescimento do micro-organismo e, por consequência, mede-se a absorbância ou transmitância.

Com a necessidade de otimizar e dinamizar os procedimentos realizados pelo setor de Controle de Qualidade, as técnicas rápidas para realização do doseamento microbiológico, com leitura cinética em microplaca, são desenvolvidas.

O método de doseamento com leitura cinética em microplaca é economicamente necessário e de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, pois este necessita de pouco tempo para realização e de pequena quantidade de material, reduzindo o valor agregado à análise e o tempo de liberação do produto final.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Doseamento Microbiológico

Apesar da resistência bacteriana ser um problema real e crescente, a prescrição dos antibióticos vem aumentando gradativamente. O uso exacerbado desta classe de medicamentos se dá, também, pelo aumento na prescrição de genéricos, ou seja, mais da metade das prescrições incluem pelo menos um medicamento genérico, possibilitando, desta forma, o acesso a antibióticos mais baratos (ZULUAGA et al., 2009).

Em decorrência do aumento no consumo de medicamentos genéricos a necessidade da criação de um padrão na produção de medicamentos tem afetado a população de várias maneiras. Esta padronização se faz mais importante em locais de produção de substâncias de uso medicinal, principalmente porque nestes locais é de suma importância a avaliação da dose ineficaz e da dose tóxica, uma vez que estas podem apresentar margens de segurança estreita (HEWITT, 1977; PINTO et al., 2010).

Na década de 70 houve o surgimento da Garantia da Qualidade, que tem por objetivo assegurar que a função qualidade esteja se cumprindo, ou seja, a gerência deve adotar como ferramenta de trabalho todas as atividades planejadas e sistematizadas que buscam assegurar que o projeto irá satisfazer os padrões relevantes da qualidade. Este conjunto de funções compõe o conceito de Controle Total da Qualidade (PINTO et al., 2010). De acordo com o Ministério da Saúde, o ano de 1998 foi o período em que houve um aumento nas notificações de medicamentos falsificados no Brasil. Desde então, o setor de Garantia da Qualidade vem adotando medidas que permitam e garantam a rastreabilidade dos medicamentos comercializados. No ano de 2002 foram recolhidas 2.044 amostras de medicamentos, 441 destas (29 % das amostras analisadas) foram consideradas insatisfatórias e 223 destas amostras (50,56 % das amostras insatisfatórias) possuíam problemas relativos a impurezas e a fatores microbiológicos (CARANDANG et al., 2005). Na indústria farmacêutica existe a necessidade do estabelecimento de padrões ou níveis de qualidade idealizados para cada produto, estes são definidos por órgãos reguladores governamentais e normas internas (PINTO et al., 2010).

A eficácia dos tratamentos, principalmente aqueles realizados com os antimicrobianos, depende da concentração plasmática que o medicamento atinge após sua administração, a dose do fármaco deve ser o suficiente para produzir o efeito farmacológico esperado (FARAGO et al., 2006). Para poder avaliar esta situação a indústria farmacêutica vem acompanhando a evolução tecnológica desde o início da produção até a liberação do produto final e, para isso, a confirmação da eficácia terapêutica de produtos medicamentosos deve ser realizada (PINTO et al., 2010).

No estudo dos antimicrobianos os conceitos de sensibilidade e resistência bacteriana fundamenta-se na correlação entre a concentração inibitória mínima (CIM) e os níveis plasmáticos alcançados com o antibiótico administrado. Para se obter uma concentração plasmática com atividade biocida ou bioestática é necessário que nas formulações farmacêuticas a potência do antimicrobiano esteja adequada, para tal se faz necessária a quantificação da substância ativa através da avaliação comparativa entre a dose do fármaco e a substância de referência (ESMERINO et al., 2006; PINTO et al., 2010).

Atualmente, existem dois métodos que são comumente usados, o de difusão em ágar e o de tubos. Esses dois métodos se baseiam na comparação quantitativa do efeito de duas substâncias no crescimento de micro-organismos suscetíveis em um meio nutriente (HEWITT, 1977).

A determinação da potência ou da atividade de um produto contendo antibiótico pode ser demonstrada sob condições adequadas através do seu efeito inibitório sobre o crescimento dos micro-organismo em relação à dose de uma substância padrão. Neste caso, a resposta fornecida pelo micro-organismo na presença de diferentes concentrações do antibiótico a ser doseado, avaliado após o período de incubação, pode variar com a específica medida da função metabólica (U.S.PHARMACOPEIA, 2010; PINTO et al., 2010; GAVIN, 1958). Esta pode ser determinada através de uma análise microbiológica *in vitro*, sendo essencial na avaliação da qualidade de medicamentos antimicrobianos produzidos na indústria farmacêutica (VITAL et al., 2004), pois o sucesso terapêutico depende da potência do antimicrobiano

que está sendo apresentado na embalagem final (FARAGO et al., 2006). Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de processos práticos e econômicos que possam ser validados e aplicados ao doseamento de fármacos (ESMERINO et al., 2006; FARAGO et al., 2006).

Jerne & Wood (1949) descreveram o princípio do doseamento de antibióticos com condições de similaridade, ou seja, a substância padrão responsável por uma resposta característica obtida no ensaio, é descrito como constituinte ativo e, portanto, a resposta dada pela amostra deve ser igual ou similar ao padrão e não ser modificada por outro constituinte que possa estar presente na formulação (HEWITT, 1977).

De acordo com Gavin (1956) os métodos disponíveis para a análise de antibióticos são classificados como qualitativo ou semi-quantitativos. São conhecidos quatro métodos para o doseamento de antibióticos: método de difusão em ágar, método turbidimétrico, método de resposta metabólica e o método gravimétrico. De acordo com Vital e colaboradores (2004) o método de difusão em ágar figura dentre os mais utilizados em laboratórios de controle de qualidade microbiológico, sendo também recomendado, pela *U.S.Pharmacopeia*, o método turbidimétrico. O método de doseamento por difusão em ágar vem sendo utilizado, desde sua descoberta, para determinar a potência de substâncias inibidoras de crescimento, como os antibióticos, bem como a potência de substâncias promotoras de crescimento, como os aminoácidos.

O doseamento microbiológico é o método mais sensível e aplicável a uma variedade de materiais sem requerer uma extensa preparação de amostra, além de ser o método de escolha na rotina dos laboratórios de análise (SOLVE et al., 1994). O mesmo depende da inibição do crescimento de um micro-organismo indicador que deve ser sensível ao fármaco presente na amostra, bem como, sensível à concentração do fármaco-padrão (HOLT et al., 1975).

Nos métodos microbiológicos, como a difusão em ágar e a turbidimetria, são utilizados micro-organismos como reagentes para uma determinação

quantitativa do composto químico, bem como de um padrão de referência para se determinar uma possível redução na atividade deste antimicrobiano (ESMERINO et al., 2006; GAVIN et al., 1956). Neste tipo de doseamento, a resposta do micro-organismos à amostra é comparada com a resposta à uma preparação padrão, cuja concentração e composição são conhecidas (KAVANAGH, 1972; PINTO et al., 2010).

Os métodos de doseamento de antifúngicos seguem a mesma linha daqueles utilizados para o doseamento de antibióticos, isto é, medindo seus efeitos sobre o micro-organismo teste por microscopia, turbidimetria, difusão em ágar, diluição em ágar e respirometria. Em 1954, Tarbet e Sternberg desenvolveram um método para o doseamento da ciclohexamida, ascocin, condicidina, nistatina e rimocidina baseados na habilidade do antibiótico em inibir a formação de blastóporos pela *Candida tropicalis*, utilizando um hemocítômetro para contagem de blastóporo (GERKE, 1963).

Para desenvolvimento de um doseamento microbiológico é necessário selecionar um micro-organismo que poderá ser utilizado como reagente, em função disso, o mesmo deve apresentar atividade na presença do produto a ser testado. As características que os micro-organismos testes devem possuir são: sensibilidade à substância teste, fácil cultivo, função ou resposta metabólica mensurável e não ser susceptível a variação em sensibilidade ou fase. De acordo com Gavin e colaboradores (1956) a resposta microbiológica esperada depende do efeito bioquímico que a substância exerce sobre o micro-organismo analisado. São esperadas respostas ao crescimento, este, por sua vez, depende da reação do micro-organismo ao meio, isto é, o crescimento pode ser positivo, quando há um aumento no número de micro-organismo, ou negativo, quando a substância inibe o crescimento dos mesmos. Durante o método de doseamento microbiológico o controle de crescimento é essencial. A abordagem de um crescimento controlado depende da necessidade da resposta positiva ou negativa. Contudo, a resposta negativa pode ser controlada com o arranjo condicionado pela quantidade de substância inibitória presente, junto, com as necessidades nutricionais para um ótimo crescimento (GAVIN et al., 1956).

2.2. Difusão em ágar

A difusão em ágar, por princípio, se baseia na inoculação de um meio de cultura com um micro-organismo susceptível, que é dispersado em placas de Petri, sobre este meio são adicionados discos de papel, cilindros de aço inox ou são feitos poços. São utilizadas duas ou mais concentrações de padrão ou de amostra, as quais são distribuídas de forma contrária em cada reservatório. A partir disso, as soluções devem difundir no ágar quando colocadas, a uma baixa temperatura, em repouso. Após este período as placas são colocadas para incubação e, por conseguinte, são medidos os diâmetros dos halos formados (HEWITT, 1977).

Este método quantitativo tem sido utilizado há muitas décadas para demonstrar a atividade antibacteriana. Chain e colaboradores utilizaram, em 1940, esta medida para monitorar o processo de purificação no isolamento da penicilina. A relação entre a dose do antibiótico aplicado e o tamanho da zona de inibição resultante permaneceu por muito tempo como o modelo e para comparação entre a amostra com potência desconhecida e o padrão de referência (HEWITT, 1977; KAVANAGH, 1963).

Em 1885, utilizava-se como método qualitativo a zona de inibição do crescimento de um micro-organismo com o uso de uma substância produzida por outro organismo. Em 1922, Fleming utilizou o método proposto por Garré em 1887, que demonstrou a inibição do *Staphylococcus pyogenes* por *Pseudomonas fluorescens*, em seu trabalho com lisozima. O resultado de sua observação foi a lise do *Staphylococcus* nas imediações das colônias de *Penicillium notatum*, o que resultou em um trabalho futuro sobre a penicilina em 1929 (KAVANAGH, 1963).

O objetivo principal do doseamento por difusão em ágar sempre foi a determinação da potência de inibição de algumas substâncias (por exemplo: antibióticos) e/ou a promoção do crescimento por outras substâncias (por exemplo: amino ácidos) (ALVES et al., 2009). Os métodos químicos podem não demonstrar as alterações sutis, como uma pequena redução na atividade antimicrobiana, que alguns princípios ativos podem apresentar com o passar

do tempo (LOURENÇO et al., 2009). Os antimicrobianos são doseados pela medição da resposta de crescimento da bactéria suscetível à substância antimicrobiana. Os dois parâmetros do crescimento bacteriano afetados pelo agente antimicrobiano são a taxa de crescimento e a fase *lag*, onde a taxa de crescimento é zero e a fase *lag* é infinito até a morte da bactéria (KAVANAGH, 1972).

2.3. Dosagem Microbiológica em Tubos

2.3.1. Diluição seriada

A diluição seriada é muito utilizada em análises quantitativas de substâncias, as quais são graduadas em diferentes concentrações com diluições em uma serie de tubos ou balões (GAVIN et al., 1958). De acordo com Kavanagh (1963), a diluição seriada baseia-se na distribuição de várias concentrações diferentes de antibiótico em tubos ou em micro-tubos, à estas diluições deve ser adicionado o inóculo preparado com o micro-organismo resposta e, após a incubação, as leituras devem ser executadas. A menor concentração que inibe o crescimento do micro-organismo, evidenciada através da alteração do pH, do potencial de oxirredução do meio ou de formação de hemólise, é considerada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (KAVANAGH, 1963; YAMAMOTO et al., 1994).

A diluição seriada é um dos métodos laboratoriais mais utilizados, sendo um procedimento essencial e simples tanto na análise biológica quanto na química, incluindo a caracterização da sensibilidade e da dinâmica do doseamento, bem como medição das constantes de reações cinéticas, na determinação da reação enzimática e na triagem de respostas celulares às drogas e toxinas (ZHANG et al., 2013). Mayers e colaboradores (1993) explicam a diluição seriada como um experimento para estimar a concentração ou a frequência do micro-organismo que está presente na amostra. Este método é utilizado principalmente nos campos da saúde publica, da virologia e imunologia. De acordo com os autores o método de diluição parte da amostra

que será dividida para formar sub-amostras com várias concentrações diferente. Essas sub-amostragens promovem oportunidades para uma medição exata (GELMAN et al., 2004).

Kavanagh (1963) afirma que a determinação de antibióticos realizada através da diluição seriada é reprodutível por um longo período de tempo se for dada a atenção a detalhes como a sensibilidade do micro-organismo, a constância da composição do meio de cultura, ao tamanho do inóculo, a temperatura de incubação e ao pH do meio.

2.3.2. Método Turbidimétrico

O método turbidimétrico foi utilizado primeiramente para medir a Anfotericina B em fluidos corporais, testando a susceptibilidade do fungo isolado de materiais clínicos, por exemplo, e em outras aplicações, as quais a necessidade de determinação é secundária a uma capacidade de adquirir um grande numero de determinações com o mínimo esforço o possível (KAVANAGH, 1963).

De acordo com Kavanagh (1972) o método turbidimétrico baseia-se, primeiramente, no conhecimento da interação entre o micro-organismo e o antibiótico e, posteriormente, na medida fotométrica da turbidez. O método mais comumente utilizado é a leitura da turbidez causada pelo crescimento do micro-organismo em meio líquido. Esse método depende, acima de tudo, da inibição ou da redução do crescimento dos micro-organismos testes pela substância a ser analisada.

O doseamento por turbidimetria é simples e muito conhecido, neste a substância teste é adicionada à suspensão do micro-organismo em meio nutriente e, após incubação, são feitas leituras em espectrofotômetro (PINTO et al., 2010). O tempo de incubação e a composição do meio são parâmetros que serão avaliados de acordo com o micro-organismo utilizado, sendo, neste caso, o único fator limitante à concentração do fármaco utilizada dentro do tubo.

No doseamento de antibióticos, a concentração da massa celular é inversamente proporcional a quantidade de substância responsável pelo crescimento no tubo, então, quanto menor a quantidade de células presentes maior é a concentração do antibiótico testado, sendo este diferente do doseamento realizado para vitaminas cujo objetivo principal é o aumento do número de células (TREFFERS et al., 1955). Treffers e colaboradores (1955) também demonstraram as vantagens do método turbidimétrico, como, por exemplo, a rapidez na obtenção de resultados, a objetividade de avaliação numérica, a possível definição da concentração inicial do fármaco e a ausência de efeitos de difusão. Este método permite estimar a potência do fármaco e determinar os níveis de sensibilidade do micro-organismo.

O método turbidimétrico possui muitas aplicações. Uma delas visa a determinação do tamanho médio de bactérias, como, por exemplo, a dissimétrica de Merek, que em 1969, determinou a absorbância de uma suspensão utilizando espectrofotômetro ajustado com ângulos de tamanhos diferentes com intuito de se determinar o tamanho das bactérias independente da concentração e do tamanho ou do ângulo (KAVANAGH, 1972).

O método turbidimétrico foi utilizado, inicialmente, com a finalidade de testar a susceptibilidade de fungos isolados de material clínico, em estudo envolvendo a determinação da anfotericina B em fluídos corporais. Neste caso, a necessidade de precisão é secundária á capacidade de efetuar um grande número de determinações sem esforço (GERKE et al., 1963).

O método fotométrico de doseamento utilizado para medir antifúngicos, é recomendado quando existe a necessidade de alta precisão dos resultados, isto é, em ensaios de formas farmacêuticas, no desenvolvimento e controle de amostras, na comparação de padrões e no estudo de amostras metabólicas de fármacos. Gerke e Madigan (1963) descreveram que este método pode ser utilizado para uma série de propósitos, como por exemplo na modificação de métodos e de fatores que influenciam a atividade dos antifúngicos poliênicos, como a Anfotericina B.

Gavin e colaboradores (1957) descrevem este método a partir da distribuição de substâncias, com concentrações previamente estabelecidas, em uma série de tubos contendo um meio líquido inoculado com um micro-organismo teste. Deste modo, se pode determinar a potência da amostra através da resposta do micro-organismo tanto para a amostra quanto para a substância padrão. Este método pode ter variações de acordo com a quantidade de inóculo. Alguns antibióticos podem ter suas potências testadas, além de excelentes respostas, utilizando, apenas, uma pequena quantidade de inóculo.

O método turbidimétrico pode ser classificado em qualitativo quando a resposta “sim” ou “não” é obtida. Essa resposta é obtida através da observação do crescimento microbiano, o que promove a turvação do meio, sendo que o ponto final é determinado entre a concentração na qual ocorre o crescimento e a concentração onde não há mais o crescimento. Sendo assim, se forem ensaiadas diluições conhecidas de uma preparação padrão ao mesmo tempo, nas mesmas condições da amostra, a potência da amostra será obtida. O método também pode ser classificado como quantitativo quando a resposta numérica é obtida através de um fotômetro fotoelétrico, ou seja, quando há uma relação entre a proporção de crescimento da população microbiana no meio líquido e a concentração da substância ensaiada (PINTO et al., 2010). O ensaio do tipo quantitativo tem por base a medida do crescimento gradativo do micro-organismo teste. O ensaio pode ser finalizado após um curto e determinado período de incubação ou após a obtenção de um valor de turvação definido é alcançado em um tubo controle (GAVIN et al., 1957).

Fatores de influência

Além da interação entre os antibióticos e os micro-organismos teste, existem outros fatores que podem influenciar no tamanho da população final de micro-organismo, alguns deles podem ser inerentes à amostra e/ou ao padrão em uma extensão diferente, o que pode interferir na estimativa da potência da amostra. Tal influência pode estar relacionada ao procedimento de integral ou

apenas a uma única parte desse (HEWITT, 1977). Os fatores gerais, como os descritos, tem efeito sobre todos os processos durante o ensaio turbidimétrico.

Substâncias ensaiadas:

A preparação da amostra pode afetar o doseamento, influenciando na concentração das substâncias inibidoras e no estímulo de crescimento. No caso das substâncias inibidoras a interferência é positiva devido ao aumento aparente na potência da amostra, por outro lado, no caso do estímulo ao crescimento há uma aparente redução da potência da amostra. Os dois tipos de influência devem ser detectadas e anuladas, em função disso, o preparo da amostra deve ser o mais simples o possível. A extração e a diluição são os métodos de preferência para o preparo das amostras (KAVANAGH, 1972).

De acordo com Kavanagh (1972), o estabelecimento de uma curva dose-resposta do padrão pode auxiliar na detecção de interferentes. Se a potência da amostra for independente da concentração da mesma quando se utiliza o método em tubos, pressupõe-se que não há interferentes. Outra forma de detecção é a adição de uma concentração conhecida de padrão ao placebo e a repetição do doseamento, se o padrão adicionado for recuperável em todas as concentrações de amostras então não há presença de interferentes.

Interferências são causadas por algo que está presente na amostra, contudo, está ausente ou deficiente no padrão. Esses interferentes podem afetar a resposta ao crescimento do micro-organismo de várias maneiras: através de uma turvação no meio de cultura; da solubilidade em água ou em um solvente miscível em água, não sendo possível a mudança na concentração ensaiada; da turvação na solução teste ou formação de precipitado quando em contato com o meio de cultura; ou através do escurecimento do meio de cultura (GAVIN, 1957).

De acordo com Kavanagh (1972), a influência de certas substâncias interferentes pode ser anulada por compensação, sendo essa mais utilizada

em casos onde são analisados fluídos corporais, isto é, onde são analisados os fluídos antes e depois do uso de antibióticos.

Meio de cultura e solução amostra:

O meio de cultura possui grande importância, pois há a incorporação da solução amostra ao meio como uma solução intrínseca que deve atender às exigências nutricionais mínimas do micro-organismo teste. Os meios de cultura preparados são mais convenientes e adequados para muitos ensaios, isto é, muitos laboratórios obtêm resultados mais consistentes utilizando meios de cultura preparados (GAVIN, 1957; KAVANAGH, 1972).

A solução amostra é responsável por várias reações, como por exemplo, a mudança do meio, afetando o crescimento do micro-organismo, pela alteração da claridade ou cor, pela redução da capacidade de tamponamento e pela alteração na concentração de sal do meio de cultura (GAVIN, 1957).

No caso do método turbidimétrico a coloração do meio de cultura é importante e os fatores que podem alterar esta coloração podem ser atribuídos a recursos como a esterilização, a incorporação de componentes capazes de ocasionar turbidez, cor, precipitem, ou de desencadear alguma reação sob as condições do ensaio desencadeando condições inadequadas á medida ótica; a condição de incubação e ao micro-organismo (GAVIN, 1957).

Incubação e micro-organismo:

O micro-organismo teste usualmente é aquele que pertence às várias estirpes presentes em muitos laboratórios (KAVANAGH, 1972).

A temperatura de incubação depende do micro-organismo e da natureza da substância a ser ensaiada devendo ser ideal para que se permita o crescimento do micro-organismo. A variação de temperatura no incubador pode ser um sério problema entre um tubo replicado e aquele que pode ser

representado por uma população de micro-organismo, portanto a uniformização da incubação de todos os tubos se faz obrigatória (GAVIN et al., 1956; TREFFERS et al., 1955). Os micro-organismos comuns para o doseamento têm a temperatura ótima de crescimento por volta de 37,5 °C, sendo essa utilizada para incubação durante o ensaio.

A temperatura ideal deve ser investigada do ponto de vista de sensibilidade e precisão. O tempo de incubação pode variar sem afetar a potência da amostra, uma incubação prolongada poderá reduzir a inclinação da curva de dose-resposta, contudo, se excessivamente longa, a linha dose-resposta pode ser apagada porque o antibiótico reduz a taxa de crescimento do micro-organismo, mas não seu crescimento total (KAVANAGH, 1972).

Garrett e Wright, em 1967, calcularam os dados da taxa de crescimento da *Escherichia coli*, concluindo que o tempo e a temperatura de incubação são pontos críticos dentro do experimento. Os cálculos realizados assumem que a fase logarítmica de crescimento ao longo do período de incubação depende da temperatura utilizada (HEWITT et al., 1977).

O tamanho e a fase de crescimento do inóculo também podem aumentar a resposta mediana, o que é definido a partir da concentração do antibiótico que permite que a população bacteriana aumente para 50 % no tubo de controle negativo (HEWITT, 1977).

Curva dose-resposta:

O gráfico dose-resposta, resultante da curva montada através da plotagem da resposta *versus* o logaritmo da dose, está apresentado na Figura 1. Neste gráfico verifica-se que todas as concentrações entre os pontos “a” e “b” não possuem efeito, enquanto que todas as concentrações entre “b” e “f” exercem o máximo de efeito, isto é, uma inibição completa do micro-organismo, o arranjo mais utilizado em análise corresponde a região entre as concentrações “c” e “d”, onde a situação linear é íngreme (HEWITT, 1977).

O gráfico dose-resposta é construído através dos dados obtidos com base no cálculo da suposição de duas retas paralelas simétricas (ZULUAGA et al., 1009). O gráfico linear (X vs Log Concentração) é uma representação precisa de um intervalo curto de concentrações. Muitas vezes uma linha reta é utilizada quando a maior concentração é quatro vezes maior do que a menor concentração (KAVANAGH, 1972).

Figura 1 – Forma geral de apresentação da curva dose-resposta de antibióticos
Fonte: Microbiological assay (HEWITT, 1977)

O requisito básico para aplicação do método turbidimétrico é o conhecimento da porcentagem de micro-organismo que cresce no meio de cultura líquido à uma dada concentração de antibiótico (TREFFERS, 1955). Portanto a relação dose-resposta se dá através da resposta do micro-organismo e a concentração da substancia ativa (KAVANAGH, 1972).

Treffers (1955) demonstrou que para construir um gráfico linear em escala logarítmica são necessários dois pontos de uma série de concentrações de uma solução, com este será possível prever a potência do fármaco.

A equação obtida através da construção do gráfico dose-resposta pode ser definida como $L = L_0 + aC$, onde L_0 é o período Lag de crescimento do micro-organismo na ausência do fármaco, a é uma constante e C é a concentração inibitória do fármaco (KAVANAGH, 1972).

2.4. Métodos rápidos

Já em 2004, a FDA iniciou uma ação associada à Tecnologia Analítica de Processos (TAP) que se destina a apoiar a inovação e a eficiência no desenvolvimento, na fabricação e na garantia da qualidade de produtos farmacêuticos (FDA, 2004).

A TAP é um sistema utilizado para projetar, analisar e controlar a fabricação através da medição em tempo hábil, ou seja, durante o processo produtivo a qualidade crítica e a *performance* atribuídos à matéria-prima e ao material em processamento ou processado são avaliados, com o objetivo de garantir a qualidade do produto final (FDA, 2004).

O quadro, criado pela FDA que compõem a TAP, baseia-se no processo de entendimento para facilitar a inovação e as decisões regulamentares criadas, com base no risco, pela indústria farmacêutica e pela agência regulatória. Este quadro é composto por um conjunto de princípios e ferramentas de apoio à inovação científica e a uma estratégia de implantação de regulamentações que irá acomodar os novos processos. Visa-se, também, a criação de uma equipe de TAP que aborde o controle de fabricação, bem como a inspeção e revisão das boas práticas de fabricação, além dos treinamentos e certificações em conjunto com o pessoal responsável pela inspeção interna (FDA, 2004).

De acordo com a FDA (2004), o sistema de qualidade deve ser construído dentro do projeto, permitindo manter o foco sobre as relações multifatoriais relevantes como, por exemplo, os materiais utilizados durante a fabricação, e/ou processo de fabricação e as variáveis ambientais, além do seu impacto na qualidade do produto final. O objetivo da TAP é projetar e

desenvolver um processo bem definido que consiste em assegurar uma qualidade pré-estabelecida do início ao fim do processo de fabricação, utilizando procedimentos como redução do ciclo de produção, medidas e controles *on-*, *in-* ou *at-line*, bem como prevenindo rejeições, formação de sucata, reprocessamento de materiais, a liberação em tempo-real, o aumento da automação a fim de melhorar a segurança do operador e, conseqüentemente, reduzindo os erros humanos. A melhoria no uso de energia e material, simplificando o processo contínuo, e a utilização de equipamentos de pequeno porte, por exemplo, são procedimentos que consistem no princípio básico de qualidade e que podem reduzir os riscos e melhorar a eficiência.

A qualidade construída em produtos farmacêuticos se dá no entendimento de fatores que envolvam, por exemplo, a terapia proposta, a população paciente, a via de administração e as características farmacológicas, toxicológicas, farmacocinéticas, químicas, físicas e biofarmacêuticas do fármaco, além do projeto, a seleção e a embalagem de um produto, o processo de produção utilizando os princípios de engenharia, o material científico e controle de qualidade que garantam a reprodutibilidade do produto com o mesmo tempo de vida útil (FDA, 2004).

As técnicas pertencentes a PAT também fazem parte do processo de fabricação das formas farmacêuticas. Diferente dos métodos tradicionais, estes envolvem parâmetros como temperatura, pressão, pH, misturas, secagem de solventes, sondas de redução, além de técnicas espectrométricas, como ultra-violeta, infra-vermelho, RAMAN etc (HINZ, 2006; FDA, 2004).

Os Métodos Microbiológicos Rápidos (MMR) permitem que os ensaios microbiológicos façam parte da TAP no controle de processos. Os métodos existentes utilizados em produtos não-estéreis estão descritos em compêndios como a *U.S. Pharmacopeia*, não necessitando do processo de validação para serem aprovados pelos órgãos regulatórios, estes são de simples execução e fácil entendimento, porém possuem algumas desvantagens, como por exemplo, o tempo necessário que utilizam para apresentar resultados variando de dias a semanas. Tal fato vai de encontro a iniciativa do FDA com o uso do TAP, que tem como objetivo a implantação de novas tecnologias para análise e

controle do processo produtivo nas indústrias no setor de microbiologia. Um dos setores a se modificar é o de controle de qualidade microbiológico através da implantação de métodos microbiológicos rápidos destinados, primeiramente, a produtos acabados, promovendo um controle e entendimento dos processos através da liberação de resultados rápidos, refletindo a qualidade da matéria-prima, bem como as condições de processamento, manuseio e estocagem (RILEY, 2006; FDA, 2004; HINZ, 2006).

Em seu trabalho, Riley (2006) afirma que as indústrias farmacêuticas estão relutantes em introduzir, no setor de controle de qualidade, o sistema de MMR apesar de suas inúmeras vantagens, em contrapartida, o autor demonstra as varias áreas em que os MMR podem ser instituídos, como a liberação de teste para fármacos, ou no teste de limite microbiológico de drogas não-estéreis, ou no teste de esterilidade de produtos parenterais e/ou oftalmológicos. No monitoramento ambiental, no teste do ar, da água, de superfície e de pessoas que compõem a equipe esse tipo de teste é muito empregado. Os MMR são divididos em qualitativos utilizados para contaminação microbiana fornecendo respostas sim ou não (por exemplo, teste de esterilidade); e quantitativo, fornecem um valor numérico para o conteúdo microbiano da amostra, incluindo teste de limite microbiano, além de ser aptos para a substituição do teste de esterilidade.

Os métodos microbiológicos tradicionais podem ser utilizados em materiais que estão em processo ou já processados, todavia estes não promovem resultados considerados em tempo hábil, utilizando dois dias a duas semanas, entretanto os métodos rápidos estão sendo desenvolvidos para substituir os métodos tradicionais fornecendo os resultados em tempo real podendo ser utilizados com o produto em processamento. A escolha do método rápido depende da necessidade do fabricante entre rapidez ou sensibilidade, conforme a Tabela 1 (READ et al., 2010; FDA, 2004; RILEY, 2006). De acordo com Cosgrove (1977), um método de doseamento ideal deve ser rápido, sensível e reprodutível.

Existem muitas ferramentas disponíveis que promovem a efetividade e a eficácia na aquisição de dados que irão facilitar o entendimento do processo de

fabricação, a melhoria continua no desenvolvimento de estratégias que reduzem os riscos (FDA, 2004).

Tabela 1 – Métodos Microbiológicos Rápidos

Princípios de Detecção	Necessidade de Crescimento	Vantagem e/ou Desvantagem	Tipos de resultados	Tempo de Resposta
Bioluminescência de ATP	Sim	Necessidade de crescimento o suficiente para detecção de ATP	Quantitativo e Qualitativo	8 horas
Detecção de micro-colônias em meio sólido usando auto fluorescência microbiana	Sim	Permite a confirmação de contagem e identificação de colônias \	Quantitativo	8 horas
Detecção de CO ₂ dado pelo metabolismo microbiano em cultura líquida	Sim	Útil para amostras turvas	Qualitativo	8 horas
Citometria em fase sólida usando fluorescência indicando viabilidade de manchas	Não	A amostra pode ser filtrada.	Quantitativo	2 horas
Citometria de fluxo usando fluorescência indicando viabilidade de manchas	Não	Apenas para amostras líquidas, limitado pela quantidade de amostra (<1 mL)	Quantitativo	< 1 hora
Teste de água <i>on-line</i> usando multi-ângulo de espelhamento de luz	Não	Limitado pela taxa de fluxo (1 mL/min)	Quantitativo	Tempo-real
Monitoramento de ar usando espectroscopia ótica	Não	Não pode identificar o micro-organismo	Quantitativo	Tempo-real
Amplificação do ácido nucleico	Não	Útil para identificar a presença de um micro-organismo específico	Quantitativo e Qualitativo	1,5 horas
Detecção de endotoxina <i>on-line</i> ou <i>at-line</i>	Não	Destina-se a ser usado no chão da fábrica	Qualitativo e Quantitativo	30 minutos

Fonte – Process Analytical Technology (PAT) for Biopharmaceutical Products: Part II Concept and Applications (READ et al., 2009).

As ferramentas criadas pela FDA (2004) são:

Ferramentas multivariadas para *design*, data de aquisição e análise

O benefício da melhoria do processo pode ser adquirido através do uso de recursos matemáticos, como delineamentos estatísticos, metodologias de superfície de resposta, simulação de processos e ferramentas de reconhecimento de padrões. A aplicabilidade e a confiabilidade desses recursos na forma matemática podem ser acessados através da avaliação estatísticas de previsões de modelos. Experimentos metodológicos baseados

no princípio da estatística como a ortogonalidade, a distribuição referenciada e randomização, fornecem meios eficazes para identificar e estudar o efeito e a interação do produto do processo variável. Essas ferramentas permitem a identificação e a avaliação das variáveis do produto e do processo de fabricação que podem ser críticas para a qualidade e performance do produto final (FDA, 2004).

Análise de processo

Já no ano de 2014 observou-se a melhora significativa e a intensificação da análise de processo na indústria farmacêutica. A produtividade, a qualidade e o impacto ambiental das unidades industriais tem apoiado grandes avanços no PAT (FDA, 2004).

Alguns processos de análise utilizam uma medição não-destrutiva que contém informações relativas, com atributos biológicos, físicos químicos de materiais a serem processados. Essas medidas podem ser obtidas por processos: *at-line* (onde a medição é feita removendo a amostra da linha de processo), *on-line* (onde a medição é feita retirando a amostra do processo de fabricação e, após análise, a amostra é recolocada no processo) e *in-line* (onde a medição é feita sem remover a amostra do processo de fabricação, podendo esse ser invasivo ou não-invasivo) (FDA, 2004).

Os processos de análise geram muitos dados e alguns desses são relevantes para a rotina de garantia da qualidade. A habilidade de medir a amostra antes, durante e após o processo de fabricação pode gerar informações úteis para o controle do processo. O avanço no processo de trabalho faz com que o controle em tempo real e a garantia da qualidade sejam viáveis (FDA, 2004).

Ferramentas de controle de processos

A forte ligação entre o projeto do produto e o seu processo de desenvolvimento é essencial para garantir o controle eficaz da qualidade. O

projeto e a otimização do processo de formulação e de fabricação podem ser facilitados com passos disponibilizados pelo FDA, como a identificação e medição do material crítico e atributos do processo relativo a qualidade do produto final, a projeção de um sistema de medição do processo para dar o tempo real ou tempo de monitoramento (por exemplo, *on-*, *in-* ou *at-line*) de todos os atributos críticos, a projeção de um controle de processo que promove ajustes que garantam o controle sobre todos os atributos críticos e o desenvolvimento de uma relação matemática entre os atributos de qualidade do produto e a medida do material crítico e as atribuições do processo (FDA, 2004).

Rigorosos princípios estatísticos devem ser usados para definir um critério aceitável para considerar os atributos medidos pelas estratégias de amostragem e medidas. Um sistema que afere um produto e um processo de entendimento pode promover uma alta segurança na qualidade de cada lote, além disso cria alternativas efetivas para demonstrar as validações que podem ser apresentadas pela garantia da qualidade, onde o processo é constantemente monitorado, avaliado e ajustado usando a validação de medidas dentro do processo (FDA, 2004).

Gerenciamento contínuo de melhoria e conhecimento

O processo de entendimento e aprendizagem sobre os dados coletados e analisados do ciclo de vida do produto é necessário. Esses dados podem contribuir para a justificativa da proposta de mudança no processo de análise e pelo controle de qualidade (FDA, 2004).

2.5. Ensaio em Microplaca

Existe uma variedade de métodos empregando a leitura cinética em microplaca, como a medição da suscetibilidade de bactérias a antibióticos, bem como o efeito do antibiótico sobre o micro-organismo. A microdiluição é um

exemplo de ensaio em microplaca, onde os micro-organismos teste são distribuídos em uma placa de micro-titulação e junto a eles são distribuídas concentrações diferentes de um antimicrobiano. Essa placa, por sua vez, é encubada em tempo e temperaturas ideais, sendo avaliados o crescimento bacteriano e o efeito do antimicrobiano (LEHTINEN et al., 2006; STUBBING et al., 2006).

O perfil de susceptibilidade do micro-organismo ao antibiótico foi estudado por Ribeiro e colaboradores (2004), utilizando como micro-organismo teste o *M. tuberculosis* na presença de izoniazida (INH) e rifampicina (RMP). Lehtinen e colaboradores (2006) afirmam que o método ideal para medir a cinética da relação entre micro-organismo e antibiótico é o estudo fotométrico, onde a densidade ótica reflete o número celular, bem como o efeito bacteriostático ou bactericida, baseando-se na lise das células. Eles também verificaram o efeito bacteriostático que pode ser observado em todos os métodos, sendo que o efeito bactericida, associado à viabilidade, foi detectado pela luminometria, em contagem em placa, contudo a lise das células bacterianas foi observada pela fotometria devido a turbidez gerada no meio de cultura.

Lourenço e colaboradores (2011) realizaram a leitura cinética em microplaca para o doseamento microbiológico de apramicina, neste caso ele utilizou o princípio turbidimétrico para desenvolver o método e encontrar os parâmetros ideais.

Ensaio de antibióticos em Microplaca

Stubbings e colaboradores (2004), relataram em estudos do efeito pós-antibiótico (EPA) realizados nos últimos 40 anos e, nestes, foram investigados os efeitos dos antibióticos sob o qual determinados micro-organismos são expostos, sem a necessidade do constante efeito da CIM. Concluiu-se que os métodos que fizeram uso de espectrofotômetro são ideais para medir a atividade do antibiótico devido a velocidade com quem este age sobre o micro-organismo.

Kobayashi e colaboradores (2004), realizaram um estudo comparativo para a determinação da CIM da claritromicina e da amoxicilina utilizando *Helicobacter pylori*, comparando dois métodos um em microplaca com ar-seco e o outro o de difusão em ágar. Foram testadas a capacidade e a confiabilidade do método utilizando microplaca com ar-seco para determinar a susceptibilidade do *H. pylori* à amoxicilina e à claritromicina, neste método utilizou-se a microplaca previamente revestida com diluições seriadas do antibiótico. Comprovou-se que os dois métodos chegaram ao mesmo resultado de CIM tanto para claritromicina quanto para amoxicilina. Portanto, pode-se afirmar que o método de difusão em ágar pode ser substituído pelo método proposto para determinação do CIM.

Lehtinen e colaboradores (2006) realizaram um estudo comparativo entre a técnica de contagem em placa com as técnicas de bioluminescência, proteína verde fluorescente e medida de densidade ótica, verificando a possibilidade de utilizar estes métodos para medir as atividade bacteriostática, bactericida e bacteriolítica dos antibióticos ampicilina, eritromicina, ácido nalidíxico, polimixina B, tetraciclina e trimetropina. Verificou-se que, utilizando processos cinéticos, os efeitos dos antibióticos e o tempo de exposição do micro-organismo ao agente microbiano podem ser determinados a qualquer momento da incubação. Concluindo que as medidas fotométricas são aplicáveis de forma rápida e eficiente para medir os efeitos bacteriostático, bacteriolítico e bactericida dos agentes microbianos.

Caviedes e colaboradores (2002) desenvolveram um método de doseamento em microplaca com tetrazolium (TEMA) para determinar a susceptibilidade da *Mycobacterium tuberculosis* aos antibióticos isoniazida (INH), rifampicina (RMF), streptomina (STR) e ethambutol (ETB). A comparação foi feita entre o método desenvolvido e o método de doseamento em microplaca Alamar Blue (MABA). Nos dois casos é observada a alteração de cor pelas soluções tanto de tetrazolium quanto da solução Alamar Blue. Houve concordância entre os resultados dos dois métodos para determinação do CIM para dois antibióticos, INH e RIF. Por outro lado, houve uma discordância nos dados da susceptibilidade na presença de ETB. Portanto,

concluiu-se que o método desenvolvido foi capaz de substituir o método que utilizou a solução de Alamar Blue, por ser um método rápido, preciso e barato.

No ensaio realizado por Ribeiro e colaboradores (2004), foi avaliado o perfil de suscetibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à INH e a RMP, através do uso de indicadores de viabilidade celular determinando a CIM dos antibióticos, foi constatado que os testes que determinaram a CIM realizado em meio líquido, assumindo como variáveis o tamanho do inóculo, a fase de crescimento do micro-organismo, a característica e a estabilidade do fármaco, apresentaram baixa reprodutibilidade, em função disso, o controle de tais variáveis foi fazendo uso do mesmo inóculo, do mesmo meio de cultura e da mesma preparação dos fármacos ensaiados. Com isso observou-se maior reprodutibilidade entre os ensaios, rapidez e alta taxa de concordância com o padrão ouro de métodos, indicando que o teste de susceptibilidade em microplaca utilizando indicadores de oxirredução pode ser uma alternativa para os laboratórios.

2.6. Delineamento Experimental

Para desenhar o tipo de experimento foi necessário definir a unidade experimental e a variável, além do tratamento em comparação, a maneira de designar os tratamentos às unidades e o número de unidades utilizadas, este tem por objetivo reduzir o erro experimental e a variação ao acaso (VIEIRA, 2006). Por se tratar de um método experimental, com pesquisa laboratorial, com o objetivo de obter informações sobre o doseamento microbiológico de um antifúngico, foram coletados dados através da realização de experimentos. Estes dados são expostos em forma de gráficos.

Para a determinação da potência de uma amostra desconhecida de antibiótico é necessário a utilização do ensaio de difusão em ágar ou do método turbidimétrico de doseamento, no qual a resposta considerada é o diâmetro da zona de inibição de crescimento ou a medida de absorbância ou transmitância respectivamente (PINTO et al., 2010).

A partir dessas medições, tanto do diâmetro da zona de inibição, quanto da absorbância, será montado um gráfico de dose-resposta, onde será plotada a relação entre o quadrado da medição e o logaritmo da concentração (x^2 vs Log Conc), resultando em uma linha reta. Considerando os desvios que ocorrem durante o ensaio, se faz necessário trabalhar com réplicas. Além disso, tratamentos prévios, como extrações, diluições, teor de umidade, também devem ser observados, para possível correção posterior (PINTO et al., 2010).

O delineamento em quadrado latino exige a construção de blocos em duas direções, linhas e colunas, sorteando os tratamentos, onde cada um deles deve aparecer uma única vez nas linhas e nas colunas. Os experimentos utilizando o quadrado latino como delineamento também são chamados de cruzados ou *crossed*, onde as linhas e as colunas se cruzam, conforme demonstrado na Figura 2, que exemplifica a produção realizada por uma indústria, cujo o engenheiro deseja saber se o número de itens produzidos por dia varia com o operador das máquinas (VIEIRA, 2006).

Para se obter a potência da amostra deve-se dimensionar a resposta de uma diluição, através da medida de absorbância, seguida de leitura em curva padrão, ou seja, deve-se realizar um ensaio com a amostra e em paralelo o ensaio com o padrão. É ideal adotar um planejamento experimental cujos resultados indiquem a validade do ensaio (PINTO et al., 2010).

	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
Máquina 1	A	B	C	D	E
Máquina 2	B	C	D	E	A
Máquina 3	C	D	E	A	B
Máquina 4	D	E	A	B	C
Máquina 5	E	A	B	C	D

Figura 2 - Esquema de um experimento em quadrado latino
Fonte: Análise de variância (ANOVA) (VIEIRA, 2006)

Quanto as características da resposta retilínea esperada do gráfico (x^2 vs Log Conc) é considerada a de maior importância a obtenção das curvas das substâncias qualitativamente idênticas possuindo a mesma inclinação, para

isso são necessários no mínimo dois pontos para estimar a inclinação da linha de resposta, contudo, se não existir paralelismo entre a curva padrão e a curva da amostra, as potências de ambos devem ser idênticas no ponto de intersecção, se isto não ocorrer invalida-se o método (PINTO et al., 2010).

Ensaio com interpolação em curva padrão (2x2)

O ensaio balanceado ou fatorial com duas doses é realizado aplicando-se a uma placa de Petri duas doses de padrão e duas doses de amostra, de forma que o número de replicas seja igual ao número de placas empregadas. A potência da amostra é obtida através da distância entre as retas, calculadas a partir dos valores médios de quatro tratamentos e considerando as réplicas efetuadas, P_1 e P_2 (doses baixa e alta do padrão), e A_1 e A_2 (doses baixa e alta da amostra) (PINTO et al., 2010).

Os resultados obtidos durante a análise empregando delineamento 2x2 foram calculados utilizando as equações abaixo:

A diferença na resposta entre as doses alta e baixa é através da equação 1, utilizando a média de cada valor.

$$E = \frac{1}{2} [(P_2 + A_2) - (P_1 + A_1)] \text{ (Equação 1)}$$

A diferença entre as preparações, é obtida através da equação 2

$$F = \frac{1}{2} [(A_2 + A_1) - (P_2 + P_1)] \text{ (Equação 2)}$$

Colocando em gráfico (Log Conc vs Resposta), e admitindo-se como b o aumento hipotético em resposta corresponde ao aumento de 10 vezes na dose, I como o Log da diferença entre as doses adjacentes e M como o Log da diferença entre as potências do padrão e da amostra chega-se a equação 3 e 4

$$\frac{F}{M} = \frac{E}{I} = b \text{ (Equação 3)}$$

Portanto

$$M = \frac{F}{E} \times \text{Log} (\text{resposta}) \text{ (Equação 4)}$$

A potência da amostra é dada pelo anti-Log de M (HEWITT, 1977).

2.7. Antifúngicos

O descobrimento dos primeiros antifúngicos data do ano de 1939, quando Oxford e colaboradores repostaram o isolamento do primeiro antifúngico, a griseofulvina, produzida pela cultura de *Penicillium griseofulvin* (GUPTE et al., 2002).

Existem 250.000 espécie de fungos catalogados, destas espécies 300 foram reportadas como patogênicas ao ser humano. As infecções fúngicas ganharam uma grande importância devido ao número de morbidade de pacientes hospitalizados, sendo a *Candida albicans* apontada como responsável por 90 % das causas de infecções por fungo e, em 2002, assumiu a quarta posição de maior prevalência entre os fungos (GUPTE et al., 2002).

Nas últimas décadas houve um crescente aumento no número de antifúngicos (BENNETT, 2006). Os agentes antifúngicos podem ser divididos de acordo com a sua via de administração, seja ela sistêmica seja ela tópica. Os imidazóis, triazóis e os poliênicos são ministrados tanto por via sistêmica quanto por via tópica (BENNETT, 2006). O grupo de medicamentos azólicos teve seu uso indicado na década de 70, causando um grande impacto devido ao seu amplo espectro de ação e pela facilidade de administração por via oral (MARTINEZ, 2006).

2.7.1. Antifúngicos poliênicos macrolídeos

O primeiro antifúngico pertencente ao grupo dos poliênicos macrolídeos, foi descoberto por Hazen e Brown em 1950, chamado, mais tarde, de nistatina. Desde 1950, mais de 90 tipos diferentes de antifúngicos deste grupo foram descritos (GUPTE et al., 2002).

São produzidos pelo grupo *Streptomyces*, sendo o seu principal componente a Anfotericina B. Todas as moléculas desse grupo são cíclicas, fechadas por uma ligação a um éster, compreendendo em duas partes: uma apolar rígida composta por duas ligações conjugadas e uma parte polar, que compreende um grupamento hidroxila e um açúcar amino, micosamina (GRILLOT et al., 1999). Os antifúngicos pertencentes a este grupo são sensíveis à luz e altamente tóxicos (GUPTE et al., 2002)

2.7.2. Nistatina

Em 1954, este macrolídeo tetraênico foi descoberto no Laboratório de Saúde do Estado de Nova York, produzido pelo micro-organismo *Streptomyces noursei* (BENNETT, 2006; GRILLOT et al., 1999). Em setembro de 1957 o Comitê de Padronização Biológica (CPB) da Organização Mundial da Saúde (OMS) solicitou ao Departamento de Padronização Biológica do Instituto Nacional de Pesquisas Médicas de Londres, para obter e examinar uma quantidade adequada de amostra de nistatina para possível uso no futuro.

Em 1958 foi estabelecida a Preparação de Referência Internacional de Nistatina pela OMS (LIGHTBOWN et al., 1963). Sua estrutura química é caracterizada por possuir um anel macrolídeo com duas ligações conjugadas e um grande número de grupos hidroxilas, esses dois recursos químicos são responsáveis pela atividade biológica da molécula (BEEZER et al., 1977).

Por se tratar de um medicamento que não é absorvido pelo trato gastrointestinal, é comumente utilizado pela via tópica (cutâneas, oral e vaginal), no tratamento de doenças causadas por fungos, particularmente, em forma de leveduras e organismos eucariontes, como por exemplo a candidíase, doença causada pelo micro-organismo *Candida albicans*. Esse fungo está presente nas mucosas vaginal, bucal e no trato intestinal. (BENNETT, 2006; BREEZER et al., 1977; DAVIS et al., 1968).

Figura 3 – Estrutura química da Nistatina

Fonte: *The heterogeneous composition for farmacêutica-grade* (THOMAS et al.,

O mecanismo de ação da nistatina se dá através da ligação com os esteróis presentes na membrana celular, com isso há um aumento da permeabilidade celular, através da formação de poros, proporcionando o extravasamento dos compostos intracelulares, como íons de potássio (K^+) e amônio (NH_4^+), bem como as moléculas maiores, como os nucleotídeos e as proteínas (BREEZER et al., 1977; CHAMBERS et al., 2006; NDZINGE et al., 1977; YAMASAKI et al., 2011), conforme demonstrado na Figura 4.

Figura 4 – Mecanismo de ação dos antifúngicos poliênicos

Fonte: Amphotericin primarily kills yeast by simply ergosterol (GRAY et al, 2012)

O fármaco em estudo está registrado internacionalmente , IUPAC, com ácido (1S, 3R, 4E, 6E, 8E, 10E, 14E, 16E, 18S, 19R, 20S, 21S, 25R, 27R, 29R, 32R, 33R, 35S, 37S, 38R) – 3 - [(2R, 3S, 4S, 5S, 6R) – 4 – amino - 3,5 – dihidroxi – 6 – metiloxan – 2 - il] oxi - 19, 25, 27, 29, 32, 33, 35, 37 – octahidroxi - 18, 20, 21 – trimetil – 23 – oxo - 22, 39 – dioxabicyclo [33.3.1] nonatriaconta - 4, 6, 8, 10, 14, 16 – hexaene – 38 - carboxílico, e se caracteriza como pó higroscópico, fino, de cor amarelada ou castanha, praticamente insolúvel em

água, etanol, clorofórmio e éter etílico, sendo pouco solúvel em metanol e totalmente solúvel em solventes orgânicos como dimetilformamida ou dimetilsulfóxido. As soluções e suspensões aquosas começam a perder sua atividade assim que preparadas sendo estáveis por 10 minutos quando mantidas a temperatura de 100 °C em pH 7, e lábeis entre pH 2 e 9. O calor, a luz e o oxigênio aceleram a decomposição. A nistatina apresenta ainda logP igual a -0,2 e pKa igual a 7,08 (PUBCHEM, 2014; ANVISA, 2014).

Métodos Físico-Químicos de determinação da Nistatina

As formas farmacêuticas comercializadas do fármaco em estudo devem possuir concentração de 100.000 UI por grama ou por mililitro, sejam elas na forma de pós, cremes ou suspensões. Os métodos físico-químicos disponíveis para análise da nistatina em seus produtos acabados são ferramentas úteis para avaliação da concentração e qualidade destes.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A Farmacopéia Americana (35^a ed, 2012) preconiza como um dos ensaios para determinação da pureza das formas farmacêuticas contendo nistatina o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este método, além de identificar e quantificar a nistatina em formulações, também é capaz de evidenciar a presença de outros componentes, como impurezas e produtos de degradação (CIONE et al.).

No estudo realizado, em 1982, por Thomas e colaboradores, foi utilizada uma fase móvel composta por metanol e tampão acetato de sódio com pH de 5,8. As leituras de absorvância foram realizadas a 230 nM, 291 nM, 304 nM e 318 nM, para absorvância mínima e 280 nM e para uma absorvância máxima de 304 nM. A ANVISA sugere que se determine a pureza da matéria-prima por CLAE através do uso de cromatógrafo provido de detector de ultravioleta

ajustado a 304 nM e coluna cromatográfica de fase reversa C18 (150 x 4,6 mM; 5 μ m) (ANVISA, 2014).

Espectrofotometria em UV-visível

No trabalho de Aguiar e colaboradores (2007) a análise de teor de nistatina em comprimidos bucais, foi realizada através do uso da espectrofotometria em UV-visível em 279 nM, a linearidade foi obtida através da análise de cinco amostras com concentrações diferentes, a exatidão foi obtida através do placebo contaminado com nistatina nas mesmas proporções que as amostras preparadas. Neste ensaio foi constatado que a análise por espectrofotometria em UV – visível é reprodutível para comprimidos.

A ANVISA (2014) preconiza que o espectro de absorção no UV deve estar na faixa de 220 nM a 350 nM, exibindo máximos em 230 nM, 291 nM, 305 nM e 319 nM.

2.8. Validação de métodos

Os elementos essenciais para validação podem variar dependendo do tipo de ensaio desenvolvido, seja ele quantitativo, qualitativo ou de identificação. Os critérios de validação podem ser melhor examinados, experimentalmente, através do uso de amostras contendo um micro-organismo conhecido. Para avaliação quanto a equivalência entre um método novo, desenvolvido e validado, e um método antigo bem estabelecido são sugeridos testes em paralelo (RILEY, 2004).

Validar um método é torna-lo legítimo através da documentação de tudo aquilo que envolve o processo de produção e o controle de qualidade, isto é, garantir a rastreabilidade desde as condições ambientais até os insumos e matérias-primas utilizados, garantindo, assim, que o produto seja fabricado da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância pré-estabelecidos (VALENTINI et al., 2007).

Para que um método novo ou modificado seja implementado em uma rotina de trabalho, este deve ser, primeiramente, validado pelo laboratório que o planejou ou o modificou, sendo esta etapa parte essencial às Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPFM). Para tal fim, este procedimento deve ser conduzido de acordo com protocolos pré-definidos e aprovados. A validação, nesses casos, é utilizada como etapa preliminar para o desenvolvimento da metodologia (BOTELHO, 2010; PINTO et al., 2010; ANVISA – RDC N° 17, 2010; RIBANI et al., 2004). Em se tratando de uma técnica microbiológica, para que um método seja considerado validado, deve-se levar em consideração o grau de variabilidade associado à técnica de doseamento (RE n° 899, 2003).

Existem fatores externos que podem influenciar nos valores obtidos em um ensaio como, por exemplo, as condições do laboratório, os equipamentos, a experiência global na realização do método, a habilidade e a experiência de cada analista (UHLING, 2010). Há também fatores considerados inerentes às formulações que podem influenciar nos resultados como, por exemplo, a estrutura química do fármaco, o nível de dose terapêutica e as diferenças entre as formulações de um fabricante para outro. Para cada caso há a necessidade de resultados experimentais evidentes, que garantam a funcionalidade do método, bem como o tratamento analítico adequado, a análise estatística dos dados e a definição do critério de aceitação (VALENTINI et al., 2007).

O processo de validação deve estar descrito em um procedimento e os estudos, que permitem determinar os parâmetros utilizados, devem ser realizados fazendo uso de equipamentos e de instrumentos dentro das especificações e por um profissional competente da área. Para desenvolver o método é necessário um planejamento definindo, a aplicação, o objetivo, o escopo do método, os parâmetros de validação e os critérios de aceitação. Além disso, é preciso verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis, além de qualificar os materiais, planejar e realizar todos os experimentos de validação (INMETRO, 2011).

Os parâmetros de validação, que devem ser documentados, estão especificados no Quadro 1 (INMETRO, 2011).

As metodologias que não estão descritas em compêndios ou não são reconhecidas pela ANVISA, serão consideradas válidas desde que estejam dentro dos parâmetros de seletividade, especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez (RE nº 899, 2003).

Quadro 1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Parâmetros	Tipo de ensaio			
	Qualitativo	Determinação do componente (ou analito) em maior teor (1)	Análise de elementos menores e Traços (2)	Propriedades Físicas
Precisão		√	√	√
Seletividade	√	√	√	√
Tendência / recuperação		√	√	√
Robustez	√	√	√	√
Sensibilidade / linearidade / faixa de trabalho		√	√	√
Limite de detecção	√		√	
Limite de quantificação			√	

Fonte: INMETRO – DOQ – CGCRE – 008 – Revisão 4, 2011

Os métodos novos ou modificados devem ser submetidos aos testes listados e categorizados no Quadro 2 de acordo com a sua finalidade. No Quadro 3, encontram-se listados os testes exigidos para cada categoria (RE nº 899, 2003).

Quadro 2 – Classificação dos testes, segundo sua finalidade

CATEGORIA	FINALIDADE DO TESTE
I	Teste quantitativo para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Teste quantitativo ou ensaio limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
III	Teste de performance
IV	Teste de identificação

Fonte: INMETRO – DOQ – CGRE – 009 – Revisão 04 – JUL/2011

Quadro 3 – Ensaios necessários para a validação do método analítico de acordo com o Instituto Nacional de Metrologia

PARÂMETROS		CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
			QUANTITATIVO	ENSAIO LIMITE		
Especificidade		Especificidade	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade		Linearidade	Sim	Não	*	Não
Intervalo		Intervalo	Sim	*	*	Não
Precisão	Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção		Limite de detecção	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação		Limite de quantificação	Sim	Não	*	Não
Exatidão		Exatidão	Sim	*	*	Não
Robustez		Robustez	Sim	Sim	Não	Não

FONTE: INMETRO – DOQ – CGCRE – 008 – Revisão 04 – JUL/ 2011

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico

** se houver comparação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão intermediária

2.8.1. Especificidade e seletividade

Especificidade é a capacidade do método de medir um composto na presença de outro componente, este parâmetro indica a habilidade do método de diferenciar e quantificar o analito na presença de outro componente (RE nº 899, 2003; SARRIO et al., 1996). A amostra pode conter substâncias que podem interferir no desempenho do método, aumentando ou reduzindo o sinal, bem como na magnitude do efeito (INMETRO, 2011)

Um modo de avaliar a especificidade de um método durante o processo de validação envolve ensaios utilizando padrões ou materiais de referência, amostras com ou sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação deste na presença de interferentes (INMETRO, 2011).

A avaliação da especificidade e/ou da seletividade é de grande valia no desenvolvimento e na validação de métodos analíticos. Em análises qualitativas, quantitativas e ou semi-quantitativas este parâmetro permite a identificação do analito na presença de compostos com estruturas químicas semelhantes, a identificação das possíveis impurezas e/ou interferentes, o que pode ser avaliado mediante o uso de matrizes contaminadas com excipientes,

impurezas e/ou com amostras, além da indicação que a determinação da potência é do analíto apenas. (SARRIO et al., 1996; RE nº 899, 2003). Este último caso é o mais importante para os métodos microbiológicos rápidos (MMR) pois os mesmos se destinam a determinação da potência da amostra.

2.8.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância testada, dentro de uma determinada faixa de aplicação (SARRIO et al., 1996; RIBANI et al., 2004; RE nº 899, 2003).

Quando um equipamento estabelece sua faixa linear, se faz necessário verificar até que ponto a faixa de concentração do analíto coincide com a faixa dinâmica linear do equipamento (INMETRO, 2011).

Este parâmetro pode ser demonstrado diretamente com a substância testada através das diluições de uma solução estoque ou através da pesagem das misturas sintéticas dos componentes da amostra separadamente. São utilizadas, pelo menos, cinco concentrações diferentes para determinar a faixa linear de um método (HUBER, 2010). Nas técnicas de determinação quantitativa do analíto em matérias-primas ou em formas farmacêuticas a linearidade possui um alcance de 80 % a 120 % da concentração teórica (RE nº 899, 2003).

Deve ser feita uma correlação entre o sinal medido, a absorvância, e a concentração do fármaco a ser quantificado, esta relação matemática é, normalmente, determinada empiricamente a partir dos sinais medidos para a massa ou para as concentrações conhecidas do fármaco. Essa relação é expressa através da Equação 5, sendo y a resposta medida (absorvância), x a concentração, a a intersecção com o eixo y quando x é igual a zero, e b a inclinação da curva analítica, que é referente a sensibilidade.

$$y = ax + b \text{ (Equação 5)}$$

A estimativa dos coeficientes de regressão a e b e de correlação r é feita através da regressão linear. O coeficiente de correlação (r), estima a qualidade da curva obtida, que se demonstra ideal quando próximo a um (1), a ANVISA (2004) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2011) recomenda um valor acima de 0,90. Quanto mais próximo de um (1) o coeficiente de correlação, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor é a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004). Um método é mais sensível quando pequenas variações das concentrações resultam em maior variação da resposta, fornecendo maior inclinação (INMETRO, 2011).

O gráfico é construído com as respostas obtidas plotadas no eixo y e as concentrações correspondentes, em escala logarítmica, são plotadas no eixo x . Podem ser desenhadas linhas paralelas no gráfico, para 95 % e 105 % da linha na faixa linear (RIBANI et al., 2010).

2.8.3. Intervalo, faixa de trabalho e faixa linear

O intervalo entre a maior e a menor concentração do analíto dentro da amostra permitem demonstrar que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados (RE nº 899, 2003; RIBANI et al., 2004; SARRIO et al., 1996; HUBER, 2010).

Este parâmetro, que é mais utilizado em análises quantitativas, é demonstrado na mesma unidade de medida utilizada para os valores de concentração (HUBER, 2010; INMETRO, 2011). Deve ser escolhida uma faixa preliminar, a faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve estar no meio da faixa estabelecida (INMETRO, 2011).

2.8.4. Precisão

A precisão de um método analítico expressa o grau de concordância entre uma série de medidas obtidas a partir de uma amostragem múltipla de uma amostra homogênea de acordo com as condições prescritas (SARRIO et al., 2013; HUBER, 2013).

Este parâmetro representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, ou amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Podendo ser expresso através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável (RIBANI et al., 2010).

A estimativa do desvio padrão relativo (DPR) é uma expressão da precisão, podendo ser chamado de coeficiente de variação (CV) (VALENTINI et al., 2007), sendo calculado pela equação 6.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \text{ (Equação 6).}$$

Onde são utilizados os valores de desvio padrão (DP) e concentração média determinada (CMD) (INMETRO, 2011). O grau de concordância entre os resultados de cada teste quando aplicada repetidamente às várias amostragens de uma mesma amostra pressupõe que não existem erros sistemáticos inerentes ao processo (VALENTINI et al., 2007).

As três formas de expressar a precisão podem ser exemplificadas através dos testes de repetibilidade, de precisão intermediária e de reprodutibilidade, demonstrados de forma resumida no Quadro 4 (INMETRO, 2011).

Quadro 4 – Repetibilidade, Precisão intermediária e Reprodutibilidade

Analisar: padrões , materiais de referência ou amostras fortificadas às várias concentrações ao longo da faixa de trabalho	Repetições (independentes)	O que calcular a partir dos dados?	Comentários
a) Mesmo analista, equipamento, laboratório, período curto (repetibilidade)	≥ 7	Determinar o desvio-padrão amostral (s) de cada concentração	Determinar o desvio-padrão amostral da repetibilidade
b) Analistas e equipamentos diferentes, mesmo laboratório, período estendido (precisão intermediária)	≥ 7	Determinar o desvio-padrão amostral (s) de cada concentração	Determinar o desvio-padrão da reprodutibilidade interlaborial de cada concentração
c) Analistas, equipamentos e laboratórios diferentes, período estendido (reprodutibilidade)	≥ 7	Determinar o desvio-padrão amostral (s) de cada concentração	Determinar o desvio-padrão da reprodutibilidade interlaborial de cada concentração. Requer estudo colaborativo.

Fonte: INMETRO – DOQ – CFCRE – 008 – Revisão 04 - 2011

Repetibilidade

A repetibilidade expressa a precisão de um método analítico sob as mesmas condições de funcionamento, com os mesmos analistas e os mesmos equipamentos, dentro de um curto intervalo de tempo (VALENTINI et al., 2007; HUBER, 2013).

É verificada por nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, com três concentrações baixas, médias e altas, com três réplicas cada ou de seis determinações a 100 % da concentração teste (RE nº 899, 2003; INMETRO, 2011).

Precisão intermediária

É a concordância entre os resultados obtidos dentro de um mesmo laboratório, avaliando os efeitos como por exemplo dias diferentes, analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes, estas medidas dependem da circunstância sob a qual o processo se destina, sendo o laboratório o responsável por estabelecer os efeitos (INMETRO, 2011).

Reprodutibilidade

É a concordância entre resultados obtidos através da análise de uma mesma amostra realizada em condições variadas, como diferentes laboratórios, diferentes analistas e diferentes dias. Neste estudo são observados muitos desacordos entre métodos analíticos, por isso se torna importante na busca da verificação do desempenho dos métodos (INMETRO, 2011; RE nº 899, 2003; RIBANI et al., 2004; VALENTINI et al., 2007).

2.8.5. Limite de quantificação e Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito, presente em uma amostra, que pode ser detectada sob determinadas condições (SARRIO et al., 2013; BARROS, 2002; RE nº 899, 2003). É estabelecido por análise de soluções com concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível aceitável. Em ensaios (RE nº 899, 2003).

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito, presente em uma amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão, aceitáveis, sob determinadas condições analíticas (SARRIO et al., 2013; BARROS, 2002; RE nº 899, 2003). Este é um parâmetro de doseamento para baixas concentrações dos componentes na mesma amostra, sendo utilizado para determinação de impurezas e/ou degradação de produtos (SARRIO et al., 2013).

2.8.6. Exatidão

Um teste de exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método novo com os resultados esperados ou verdadeiros (RE nº 899, 2003; RILEY, 2004). Os resultados do novo teste quantitativo não devem ser significativamente menores que os resultados do método antigo, somente se consideram aceitáveis para o método novo os resultados mais altos, sendo estes indicativos de uma maior exatidão (RILEY, 2004).

Os resultados são calculados pela diferença entre o valor da concentração considerado como verdadeiro e o valor experimental, obedecendo a intervalos de segurança. Este reflete a dispersão dos vários resultados individuais do doseamento em relação ao valor médio, estando ou não próximo ao valor verdadeiro (VALENTINI et al., 2007).

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, sendo exemplificada pela equação 7 (RE 899, 2003).

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \text{ (Equação 7).}$$

Para a determinação da exatidão do fármaco, é feita a análise de uma substância de pureza conhecida, isto é, o padrão de referência. São comparados os dados obtidos pela metodologia oficial com os dados obtidos pela metodologia nova. Para a determinação da exatidão da forma farmacêutica, é feita a análise de uma amostra, onde uma quantidade conhecida de fármaco é adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento, isto é, um placebo contaminado (RE nº 899, 2003).

2.8.7. Robustez

É a medida da capacidade de um procedimento analítico de se manter inalterado quando exposto à pequenas e deliberadas variações dos parâmetros do método. Ele fornece indicações de confiança do processo durante o uso normal (RE nº 899, 2003). O teste de robustez examina o efeito que os parâmetros operacionais têm sobre os resultados da análise (RIBANI et al., 2004; HUBER, 2010).

Quando são definidas as susceptibilidades do método às possíveis variações nas condições analíticas, estas devem ser monitoradas e as precauções devem ser incluídas no procedimento (RE nº 899, 2003).

O preparo da amostra é um fator que pode alterar as respostas dos ensaios, as variações que devem ser consideradas possíveis são a estabilidade da solução analítica e o tempo de extração. Quanto a espectrofotometria, as possíveis variações estão ligadas ao pH da solução, à temperatura e aos diferentes fabricantes dos solventes (RE nº 899, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Desenvolver e validar método microbiológico rápido de doseamento de cremes vaginais contendo o antifúngico Nistatina, para avaliar sua qualidades e dar subsídios ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e a Fundação para o Remédio Popular (FURP) de garantir o uso adequado e seguro do medicamento

3.2. Específico

- Desenvolver e validar o método turbidimétrico utilizando microplaca e leitura em espectrofotômetro.
- Análise comparativa entre os dados estatísticos obtidos tanto no método oficial e quanto no método desenvolvido.

4. Material e Método

4.1. Material

4.1.1. Meios de Cultura

Sabouraud Dextrose Agar (SDA - BD®)

Tubos *slant* com 9 mL de SDA estéril utilizado para repicar o micro-organismo

Componente	Quantidade
Dextrose	20 g
Digestivo péptico de tecido animal	5 g
Digestivo pancreático de caseína	5g
Ágar	15 g
Água	1000 mL
pH após esterilização	5,7±0,1

Sabouraud Dextrose Broth (SDB - BD®)

Tubos com meio de cultura líquido para ativar o micro-organismo.

Componente	Quantidade
Dextrose	20 g
Digestivo péptico de tecido animal	5 g
Digestivo pancreático de caseína	5 g
Água	1000 mL
pH após esterilização	5,7±0,1

Meio de Cultura líquido

Meio de cultura utilizado para o método de doseamento turbidimétrico.

Componente	Quantidade
Caseína	5 g
Peptona	5 g
Dextrose	20 g

Água	1000 mL
pH após esterilização	5,7 ± 0,1

4.1.2. Tampão nº 6

Tampão indicado pela *U.S. Pharmacopeia* para suspender o antibiótico.

Componente	Quantidade
Fosfato de potássio dibásico	20 g/L
Fosfato de potássio monobásico	80 g/L
Água	1000mL
pH após esterilização	6,0±0,05

4.1.3. Materiais

Os materiais que devem estar estéreis utilizados para o doseamento são: tubos de ensaio para *slant* com nove mililitros de SDA®, espátulas, microplaca com 96 poços de fundo chato transparente, ponteiras para micropipeta (0,1 µL a 1000 µL), pipetas (2 mL, 5 mL e 10 mL), sistema Millipore® para esterilização por filtração, seringa de plástico estéril.

Os materiais não-estéreis utilizado durante o procedimento de doseamento são: micropipeta (0,5 µL a 10 µL; 20 µL a 200 µL; 100 µL a 1000 µL), balão volumétrico (50 mL), proveta, solvente dimetilformamida (DMF), béquer, filtro RC celulose regenerada 045®

4.2. Método

4.2.1. Preparo do meio de cultura

O meio de cultura é preparado com água Milli-Q estéril, dentro de fluxo laminar, a esta serão adicionados os componentes na proporção correspondente ao volume a ser preparado.

O meio de cultura é esterilizado pela técnica de filtração utilizando o sistema de filtração Millipore® com membrana filtrante de celulose (nitrato 75 – 80% e acetato) com trama de 0,45 µm.

Alíquotas do meio de cultura são transferidas para tubos estéreis com tampa e armazenadas em geladeira.

4.2.2. Preparo do inóculo

O micro-organismo é ativado em SDB - BD® estéril, a temperatura de 30 °C por 24 horas. Desta cultura é transferida uma alíquota para o meio SDA - BD® com auxílio de alça bacteriológica de 10 µL, a fim de manter o cultivo, nas mesmas condições de incubação, ou seja, 30 °C por 24 horas.

Para a realização do método de ensaio, o micro-organismo é passado do meio de cultura sólido (SDA - BD) para o meio de cultura líquido preparado, incubando por mais 24 horas a 30 °C.

Meio de cultura inoculado

Para a definição da concentração do inóculo, o meio de cultura estéril foi inoculado com o micro-organismo nas proporções 2, 4, 5, 8 e 12 %, de acordo com o esquema mostrado na Figura 5. Para o doseamento a condição de trabalho utilizada foi de 5 % de inóculo.

Figura 5 – Exemplo de inoculação do meio de cultura líquido

4.2.3. Preparo da solução padrão

O preparo das soluções padrão, utilizadas em todos os ensaio, foi realizado conforme descrito abaixo:

Transferir uma quantidade de nistatina padrão para balão volumétrico (1), com auxílio de dimetilformamida (DMF), a fim de se obter solução com concentração final 1000 UI/mL. Deste balão (1) foi coletada alíquota equivalente a 5000 UI/mL nistatina e transferida para um segundo balão volumétrico (2). A este (2) foi acrescentado mais 1,25 mL de DMF e o volume foi levado a marca com Tampão 6, obtendo-se uma concentração final de 100 UI/mL nistatina. Cerca de 10 mL desta solução foi filtrada em papel de filtro. Do filtrado foram retiradas alíquotas com intuito de se preparar os padrões P2 e P4, utilizadas no doseamento, com concentrações finais de, respectivamente, 0,4 UI/mL e 0,8 UI/mL, bem como as concentrações P1, P3, P5 e P6, com concentrações finais de 0,2, 0,6, 1,0 e 1,2, respectivamente, utilizadas na definição da concentração do padrão. Foi utilizado tampão 6 como diluente.

Em seguida, alíquotas de 5 mL de cada uma destas soluções foram submetidas a filtração, com auxílio de filtro de celulose regenerada 0,45 µm. Os dois primeiros mL do filtrado foram descartados, e o restante foi transferido separadamente para tubos estéreis com tampa, conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Preparo da solução padrão

A Tabela 3 demonstra as cinco concentrações de padrão utilizadas para a obtenção da curva padrão.

Tabela 2 – Concentrações do padrão

Padrão	Nistatina (UI/mL)
P1	0,2
P2	0,4
P3	0,6
P4	0,8
P5	1,0

4.2.4. Preparo da amostra

A solução amostra, utilizada para o doseamento, foi preparada do mesmo modo que o padrão, sendo que a solução estoque inicial foi preparada com concentração equivalente a 800 UI/mL em DMF. A partir desta, foi preparada uma segunda solução a 100 UI/mL nistatina utilizando tampão número 6 como diluente. Alíquotas de cerca de 10 mL desta solução foram filtradas com auxílio de papel filtro e, a partir do filtrado, foram preparadas as soluções A1 e A2 com concentrações de 0,4 e 0,8 UI/mL, respectivamente. Aproximadamente, cerca de 5 mL das soluções A1 e A2 foram filtradas com auxílio de filtro de celulose regenerada de 0,45 μ m e transferidas para tubos estéreis com tampa. Os primeiros 2 mL do filtrado foram descartados. O esquema do preparo está demonstrado na Figura 7.

Figura 7 – Preparo da amostra

4.2.5. Preparo da solução placebo

A solução placebo, utilizada na validação e na definição da concentração de inóculo, foi preparada transferindo para um balão volumétrico de 50 mL cerca de 1,6 g de placebo, fornecido pela Fundação do Remédio Popular, e utilizando DMF como solvente.

4.2.6. Preparo da amostra simulada

Para o preparo da amostra simulada, utilizada na validação e no ensaio de definição da concentração de nistatina, foi utilizada a solução estoque padrão e solução estoque do placebo.

Do balão da solução estoque (1) foi retirada uma alíquota de 5 mL e do balão da solução placebo (2) foi retirada uma alíquota de 1,25 mL, as quais foram transferidas para um terceiro balão (3), a fim de se obter concentração final de 100 UI/mL de nistatina. A solução preparada foi filtrada e desta foram retiradas alíquotas para o preparo das soluções A1 e A2, cujas concentrações devem ser 0,4 UI/mL e 0,8 UI/mL, respectivamente, de acordo com o demonstrado na Figura 9.

Figura 8 – Preparo da amostra simulada

4.2.7. Montagem da microplaca

A microplaca com 96 poços, foi montada no sistema de Quadrado Latino com delineamento 2X2 conforme demonstrada na Figura 8.

Figura 9 – Esquema demonstrativo para montagem da microplaca para ensaio com delineamento 2x2

Em cada poço foram colocados 100 μ l de meio inoculado e 100 μ l de solução do padrão ou solução da amostra. Nos poços de controle negativo (CN) serão colocados 100 μ l de meio de cultura sem inóculo e 100 μ l de tampão, nos poços de controle positivo (CP) foram colocados 100 μ l de meio de cultura inoculado e 100 μ l de tampão.

4.3. Condições de Incubação e Leitura

Para a realização da validação as condições de análise propostas estão especificadas na Tabela 4.

Tabela 3 – Condições de incubação e análise

Conc (UI/mL)	Inóculo (%)	ΔT (min)	Temp ($^{\circ}C$)	Δ (nM)
0,2	5	480	30	630
0,8				

O equipamento Celer, modelo Polaris (Figura 10), foi empregado para a leitura das microplacas. Foram realizadas leituras nos tempo zero e oito horas,

em comprimento de onda de 630 nM. A incubação da microplaca foi realizada no aparelho BioShake IQ (Figura 11), com temperatura ajustada a 30 °C.

Figura 10 – Aparelho Celer Polaris – Leitor de Elisa

Figura 11 – Aparelho BioShake IQ – Incubação

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios microbiológicos turbidimétricos são classificados de acordo com o tipo de resposta fornecida: tudo ou nada (método semi-quantitativo) ou gradual (quantitativo) (PINTO et al., 2010; LOURENÇO et al., 2009).

A substituição do método convencional, difusão em ágar do creme de nistatina, pelo método novo empregando leitura cinética em microplaca apresenta vantagens quanto a quantidade de material utilizado, bem como a rapidez no preparo do ensaio, o que possibilita a detecção da resposta de forma objetiva, além da facilidade operacional.

5.1. Desenvolvimento

No método proposto para doseamento do creme vaginal de nistatina foram determinadas as concentrações de 0,4 UI/mL e 0,8 UI/mL, dentro da faixa de trabalho (0,4, 0,6, 0,8, 1,0 UI/mL) para realização do ensaio, definindo um delineamento experimental 2x2 para o método. Esse delineamento permite a análise de quatro amostras por ensaio.

Os gráficos foram construídos utilizando como variáveis: (a) as leituras de absorbância, (b) logaritmo da concentração, (c) intervalo de tempo (480 minutos) e (d) crescimento (%) do micro-organismo. As leituras de absorbância foram corrigidas com as respectivas leituras iniciais e, desta forma, foi eliminada a interferência dada pela coloração.

Como micro-organismo teste foi utilizada a *Candida albicans* (ATCC 10231), por este ser o agente causador da candidíase, doença cujo tratamento é realizado com o creme vaginal de nistatina. O meio de cultura foi inoculado com o micro-organismo a 5 %, incubado a 30 °C por 480 min. Para a definição da concentração do inóculo foram realizados ensaios com o micro-organismo teste nas proporções de inóculo (2, 4, 5, 8 e 12 %), na presença de nistatina nas concentrações de 0,1 e 1,0 UI/mL.

A concentração do inóculo (5 %) foi definida através da Equação 8, construída a partir das concentrações de 0 ; 0,1 e 1 UI/mL do padrão de

nistatina. Este valor de inóculo apresentam menor variação em relação as concentrações de nistatina, tempo de inoculação e leituras de absorbância. Através do ensaio foram definidas as equações para definição do inóculo.

$$a = 0,294011 + 8,67 \times 10^{-4} \times T - 3,264 \times 10^{-2} \times y - 2,719 \times 10^{-2} \times z - 4,32 \times 10^{-6} \times T^2 + 5,134 \times 10^{-3} \times y + 3,568 \times 10^{-3} \times y^2 - 1,51 \times 10^{-5} \times T \times z + 7,88 \times 10^{-4} \times y \times z \quad (\text{Equação 8}) \quad (\text{Minitab 16®}).$$

Nesta equação as variáveis a , T , y e z referem-se, respectivamente, a absorbância, tempo, concentração de nistatina e concentração do inóculo.

O emprego de grande quantidade de micro-organismo promove uma redução do tempo necessário para a obtenção da resposta, contudo este recurso pode gerar uma diminuição na sensibilidade do método. A quantidade de antibiótico também promove uma alteração na obtenção do resultado, pois este reduz a velocidade de crescimento do micro-organismo (LOURENÇO et al., 2009). Nota-se pelo Gráfico 1, construído a partir das Equações 8 e 9, que a concentração de nistatina é inversamente proporcional ao crescimento do micro-organismo, ou seja, quanto maior a quantidade de nistatina menor a absorbância e, conseqüentemente, menor a concentração de microrganismo. A equação da reta obtida ($y = -0,0311x + 0,32$) e o coeficiente de correlação com valor igual a 0,99778 indicam que o método de definição do inóculo é linear.

Gráfico 1 – Gráfico de Definição de inóculo

As curvas de crescimento microbiano em meio de cultura líquido inoculado na proporção de 5 %, contendo nistatina nas concentrações de 0,2,

0,4, 0,6, 0,8 e 1 UI/mL, demonstram que a cinética de crescimento da *Candida albicans* (ATCC 10231), conforme demonstrado no Gráfico 3, é alterada de forma que o antibiótico reduz a velocidade de crescimento do micro-organismo teste. As inclinações da curva de crescimento da *Candida albicans* (ATCC 10231), na fase *log*, permitem concluir que em concentrações mais altas de nistatina a velocidade de crescimento microbiano é menor (KAVANAGH, 1972; PINTO et al., 2010; LOURENÇO et al., 2009).

Gráfico 2 – Gráfico Absorbância vs Tempo (min), empregando 5 % de inóculo de *Candida albicans* (ATCC 10231), obtido através da leitura cinética do tempo de 0 a 480 min.

O período de incubação utilizado no ensaio está diretamente relacionado com o tempo necessário para a visualização do crescimento microbiano. A otimização do período de incubação pode ser obtida de três formas: (a) utilização do meio de cultura com composição rica, permitindo o crescimento rápido do micro-organismo (KAVANAGH, 1972; LOURENÇO et al., 2009); (b) utilização de cultura microbiana recente preparada em meio de cultura idêntico ao empregado no ensaio, com o intuito de reduzir a fase *lag* (KAVANAGH, 1972; PINTO et al., 2010; LOURENÇO et al., 2009); (c) utilização de uma alta concentração de micro-organismo no inóculo (KAVANAGH, 1972; LOURENÇO et al., 2009). Baseando-se nessas abordagens, o inóculo de *Candida albicans* (ATCC 10231) foi preparado em meio de cultura líquido na proporção de 5%, o que permitiu o crescimento rápido e, por consequência, a redução do tempo para obtenção da turbidez necessária para a leitura.

A temperatura de incubação assim como a sedimentação do micro-organismo podem ser fatores preocupantes para a análise. A quantidade de

meio de cultura e antibiótico dispensados na microplaca (200 μ L) e a incubação com agitação, constante ou periódica, diminuem a influência destes dois fatores. A quantidade de solução empregada de forma reduzida permite melhor condução térmica durante o período de incubação, além de minimizar a diferença na quantidade de oxigênio, esse último pode variar de acordo com a concentração de micro-organismo presente no fundo ou na superfície do microtubo (PINTO et al., 2010; LOURENÇO et al., 2009; KAVANAGH, 1963).

O ensaio microbiológico preconizado para a determinação da potência da nistatina é o doseamento com difusão em ágar e está descrito na *US Pharmacopeia* (*US Pharmacopeia* 37ªed, 2014). O método recomenda a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), como micro-organismo teste, cuja temperatura de incubação é de 29 a 31 °C e tempo de incubação de 48 horas. O meio de cultura empregado é o número 19, cuja formulação está descrita no mesmo compêndio, em monocamada de 8 mL. A concentração de padrão deve estar na faixa de 20 a 1000 UI/mL.

As condições experimentais foram determinadas, conforme demonstrado na Tabela 5, com base nos parâmetros apresentados pela melhor curva dose-resposta.

Tabela 4 – Condições nominais

CONDIÇÕES NOMINAIS	
Micro-organismo	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
Inóculo	5 %
Temperatura de incubação (°C)	30 $\pm$ 2
Tempo de incubação (min)	480
Comprimento de onda (nm)	630
Diluyente	Tampão pH 6
Tempo de agitação (s)	30

5.2. Validação

O método proposto, validado segundo as normas preconizadas pela ANVISA e pelo INMETRO, demonstrou ser adequado para a substituição do método especificado pela *US Pharmacopeia*.

O Gráfico 3, obtido através da leitura do ponto final, demonstra a linearidade fornecida pelo método, obtendo a equação da reta equivalente a $y = -0,0559x + 0,3739$ e coeficiente de correlação igual a 0,97332, o mesmo deve apresentar valor próximo a 1, conforme definido pela ANVISA e pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO).

Gráfico 3 – Gráfico Absorbância vs Log Concentração (UI/mL), empregando 5 % de inóculo de *Candida albicans* (ATCC 10231), obtido através de leitura de ponto final no tempo 480 min.

Nota-se, através do Gráfico 4, que ocorre um paralelismo das retas do padrão e da amostra, o que indica que o delineamento 2x2 é ideal para ser aplicando ao método de doseamento proposto.

Gráfico 4 – Gráfico de Log Concentração (UI/mL) vs Crescimento (%), empregando 5 % de inóculo de *Candida albicans* (ATCC 10231), com leitura em tempo final de 480 min, obtido com as concentrações 0,4 e 0,8 UI/mL de padrão e amostra simulada.

Como o ensaio turbidimétrico avalia a interação entre o micro-organismo teste com o antibiótico através da medida da turbidez, pode-se concluir que esta resposta, resultante do crescimento do micro-organismo, é inversamente proporcional a concentração do antibiótico a que esse foi exposto (KAVANAGH, 1972; LOURENÇO et al.; 2009). Portanto, o micro-organismo utilizado deve crescer no meio de cultura, contudo esse crescimento é diferenciado em presença do antibiótico.

A interação, micro-organismo e antibiótico, confere ao método especificidade, uma vez que a formação da turbidez se dá em função da presença do antibiótico. Em função disso e através dos resultados obtidos pode se evidenciar que o método desenvolvido e validado é específico.

O valor de limite de detecção e limite de quantificação foram definidos como 0,2 UI/mL e 0,4 UI/mL respectivamente. A definição desses valores se deu pelo método empírico de tentativa e erro, obtidos através dos ensaios de desenvolvimento realizados para determinar a faixa de trabalho.

Os dados obtidos permitem dizer que o método desenvolvido apresenta a precisão necessária para a finalidade proposta. Os dados de precisão para as amostras simuladas (A e B), nas concentrações de 0,4 UI/mL e 0,8 UI/mL para cada amostra, estão descritas na Tabela 6. Pode se verificar que o

método proposto demonstra ser preciso, apresentando repetibilidade e precisão intermediárias favoráveis.

Tabela 5 – Valores de precisão utilizando a amostra simulada com padrão e placebo

PREPARO (amostra simulada)	DIA 1	DIA 2	DIA 3	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA
A	101%	94%	92%	7 %
	99%	93%	91%	
B	118%	88%	103%	
	112%	80%	97%	
MÉDIA	107%	89%	96%	
REPETIBILIDADE	9%	7%	6%	

O Gráfico 5 apresenta uma intersecção entre a reta do padrão e do creme vaginal de nistatina, contudo este gráfico apresenta a queda no crescimento do micro-organismo quando este se encontra em contato com o antifúngico.

Gráfico 5 – Gráfico de Crescimento (%) vs Log Conc (UI/mL), empregando 5 % de inóculo de *Candida albicans* (ATCC 10231) com leitura de ponto final de 480 min, utilizando creme vaginal de nistatina como amostra.

Os dados de precisão do ensaio utilizando o creme vaginal de nistatina como amostra estão apresentados na Tabela 7. A precisão apresentada

durante o ensaio utilizando o creme vaginal como amostra corrobora com os resultados apresentados no ensaio realizado com a amostra montada, fornecendo valores de precisão intermediária e repetibilidade adequados. Confirmando, desta forma, que o método se demonstra preciso.

Tabela 6 – Valores de precisão utilizando creme vaginal de nistatina 25.000 UI/g como amostra

PREPARO (creme)	DIA 1	DIA 2	DIA 3	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA
C	92 %	95 %	101 %	6 %
	81 %	91 %	85 %	
D	93 %	94 %	89 %	
	83 %	89 %	86 %	
MÉDIA	87 %	92 %	90 %	
DPR	7%	3%	8%	

A potência apresentada pelo creme vaginal de nistatina neste ensaio apresentou o valor de 104 %, com intervalo de confiança (IC 95 %) de 103 ± 2 % e erro de -0,0098.

O método de ponto final empregando *Candida albicans* (ATCC 10231) na proporção de 5 % como inóculo após 480 min de incubação apresentou exatidão adequada (DPR 7 %), cujos valores estão presentes na tabela 8, quando são utilizadas duas concentrações diferentes tanto para padrão quanto para amostra.

Tabela 7 – Valores de exatidão utilizando creme vaginal de nistatina 25.000 UI/mL como amostra

PREPARO (CREME)	DIA 1	DIA 2	DIA 3	EXATIDÃO
C	101 %	102 %	89 %	97 %
	88 %	106 %	106 %	
D	99 %	105 %	94 %	
	88 %	99 %	91 %	
MÉDIA	94 %	103 %	95 %	
DPR	7 %	3 %	8 %	7 %

A robustez é avaliada utilizando como parâmetro a equação para definição do inóculo, onde os pontos críticos são concentração de inóculo, concentração de nistatina e tempo. Quando foram definidas as concentrações: de inóculo igual a 5 %, de nistatina igual a 0,4 e 0,8 UI/mL e o tempo de 480 minutos, houve uma redução nos pontos críticos e o método se tornou mais robusto.

5.3. Comparação entre o método em microplaca com método de difusão em ágar

Alguns aspectos gerais devem ser considerados para a escolha de um determinado método: (a) custo dos equipamentos e reagentes necessário; (b) tempo envolvido na execução do método; (c) número de amostras a serem testadas simultaneamente e (d) possibilidade de automação do método. Ainda devem ser considerados aspectos técnicos como: (a) especificidade e seletividade, (b) linearidade e faixa ou intervalo linear, (c) exatidão, (d) limite de detecção e quantificação e (e) precisão.

Também serão relacionadas as vantagens e desvantagens do ensaio em microplaca em comparação com o ensaio indicado pela *US Pharmacopeia* (Tabela A). Assim, o ensaio em microplaca empregando *Candida albicans* (ATCC 10231) na proporção de 5% de inóculo após 480 minutos de incubação foi comparado com o método microbiológico de difusão na Tabela 8.

Tabela 8 – Comparação entre o método inovador e o método convencional.

Parâmetros	Leitura do ponto final	Método de difusão em ágar
Faixa de trabalho	0,4 a 0,8 UI/mL	128 a 312,5 UI/mL
Precisão	6 %	6 %
Tempo médio para realização do ensaio	9 horas (1 hora preparo + 8 horas de leitura)	50 horas (2 horas de preparo + 48 horas para leitura)
Vantagens	Relevância terapêutica	Maior sensibilidade
	Maior Rapidez	Não necessita de equipamento
	Facilidade operacional	específico
	Maior precisão	
Desvantagens	Necessário equipamento	Demora no ensaio
	específico	Menor precisão

6. CONCLUSÃO

O método desenvolvido foi validado de acordo com as guias oficiais demonstrando ser específico, linear, preciso, exato e robusto. Os resultados obtidos durante o processo de validação demonstraram que o método proposto pode ser perfeitamente intercambiável com o preconizado pela *US Pharmacopeia* para determinação da potência de Nistatina presente no creme vaginal em estudo.

De acordo com a literatura consultada entre as principais desvantagens do método em microplaca destacam-se: (1) o custo elevado devido a necessidade de equipamento para incubação e leitura de microplaca, além de (2) menor precisão e reprodutibilidade dos resultados quando os mesmos são comparados com os resultados do método físico-químico.

As principais vantagens do método desenvolvido e validado são: (1) a avaliação da atividade do antibiótico frente ao micro-organismo teste sensível; (2) a facilidade operacional; (3) maior rapidez para obtenção de resposta; (4) possibilidade de análise simultânea de um grande número de amostras e (5) a utilização de menor quantidade de reagentes e de meio de cultura.

A utilização de dois equipamentos, um para a incubação e o outro para a leitura, bem como o uso de um equipamento único para as duas tarefas, podem ser utilizados na execução do ensaio, uma vez que permitem a obtenção de resultados equivalentes entre si.

O método desenvolvido e validado pode ser considerado inovador, rápido e eficiente. Com ele é possível otimizar a liberação do produto acabado, garantindo a qualidade e eficácia terapêutica para o consumidor final.

7. REFERÊNCIAS

AGUIAR, M.M.G.B. Desenvolvimento de novos comprimidos bucais de nistatina para o tratamento da candidíase oral. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em: http://teses.ufrj.br/FF_M/MichelleMariaGoncalvesBaraoDeAguiar.pdf Acessado em 19 de junho de 2013.

AGUIAR, M.M.G.B.; ALBUQUERQUE, R.P.; MARINHO, D.S.; BRAGA, B.R.S.; DORNELAS, C.B.; OLIVEIRA, A.; SOUSA, V.P.; TORRES, S.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; CABRAL, L.M.; HOLANDINO, C. Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, São Paulo, vol 36, nº 5, p 594 – 600.

ALVES, S.H.; CURY, A.E. Estudo comparativo entre as técnicas de diluição em caldo e diluição em ágar, nos antibiogramas para *Candida*. *Revista Internacional Medicina Tropical*, São Paulo, vol 34, nº 3, p 259 – 262, 1992.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 17 – Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, de 16 de abril de 2010.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/cp_220509/28_nistatina.pdf

BARROS, C.B. Validação de Métodos Analíticos. São Paulo: Biologico, 2002 Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v64_2/barros.pdf . Acessado em: 11 de junho de 2014

BENNETT, J. E. Agentes Antimicrobianos: Agentes Antifúngicos. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. *Goodman & Gilman: As bases*

farmacológicas da Terapêutica. 11^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, p 1103 – 1118, 2006.

BEEZER, A. E.; NEWELL, R.D.; TYRRELL, H.J. *Bioassay of nystatin bulk material by flow microcalorimetry*. *Analytical Chemistry*: Londres, vol 49, nº 1, p 34 – 37, 1977.

BOTELHO, Túlia de Souza. Doseamento microbiológico de vancomicina - desenvolvimento e validação de método empregando leitura cinética em microplacas. 2010. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-25072011-094229/>>. Acesso em: 2013-06-24.

CARANDANG, D.; RECH, N.; JARAMILLO, N.M. Qualidade e Segurança dos Produtos Farmacêuticos Disponíveis no País – Avaliação da Assistência Farmacêutica no Brasil: Estrutura, Processo e Resultados. Organização Pan-Americana – Ministério da Saúde, Brasília, p. 75 – 78, 2005.

CAVIEDES, L.; DELGADO, J.; GILMAN, R.H. Tetrazolium Microplate Assay as a Rapid and Inexpensive Colorimetric Method for Determination of Antibiotic Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical Microbiology*: Lima, Peru, vol 40, nº 5, p 1873 – 1874, 2002.

CHAMBERS, H. F. Princípios gerais de terapia antimicrobiana. *In*: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da Terapêutica*. 11^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, p. 983 – 997, 2006.

CIONE, A.P.P.; LIBERALE, M.J.; SILVA, P.M. Development and validation of an HPLC method for stability evaluation of nystatin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*: Piracicaba, vol 46, nº 2, p 305 – 310, 2010.

COSGROVE, R.F. Rapid Microbiological Assay for Chlorhydroxyquinoline That Uses a Cryogenically Stored Inoculum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Inglaterra, vol 11, nº 5, p 848 – 851, 1977.

DAVIS, B.D; DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S.; WOOD, W.B. Microbiology: Micoses due to opportunistic fungi. Hoeber Medical Division: Nova York, 1968.

DIAS, V.M.; SILVA, N.P.M. Diferenciação entre *Listeria monocytogenes* e *Erysipelothrix rhusiopathiae* com cloreto de trifeniltetrazólio. Memórias do Inst. Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro

DOONER, H.; BOSCH, E.H. Stability and *in vitro* activity of nystatin and its γ -cyclodextrin complex against *Candida albicans*. *International Journal of Pharmaceutics*, Groningen, vol 73, p 43 – 49, 1991.

ESMERINO, L. A., PEREIRA, A. V., ANDAMOWICZ, T., BORGES, D.M., TALACIMON, E. A., SCHELESKY, M. E. Método Microbiológico para determinação da potencia de antimicrobianos. *Publ. UEPG. Ciên. Biológicas e da Saúde, Ponta Grossa, v 10 (1), p 53 – 60, 2004.*

FARAGO, P. V., ESMERINO, L. A., PAULA, J. P., JACOB, J. S., SERVAT, L. Método Microbiológico para o Doseamento da Potência da Amoxicilina em Suspensões Orais. *Acta Farm. Bonaerense, v 25 (1), p 112 – 116, 2006.*

FARMACOPÉIA Brasileira. 5ª edição. Brasília: Editora Fiocruz, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Innovation and Continuous Improvement in Pharmaceutical Manufacturing: Pharmaceutical CGMPs for the 21st Century*. 2004. Disponível em:

[http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/briefing/2004-](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/briefing/2004-4080b1_01_manufSciWP.pdf)

[4080b1_01_manufSciWP.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/briefing/2004-4080b1_01_manufSciWP.pdf) Acessado em: 19 de junho de 2013

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry: PAT – A framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. 2004. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070305.pdf> Acessado em 13 de junho de 2013.

GAVIN, J.J. Microbiological Process Report. I. The Test Organism, v 4, p 323 – 331, 1956.

GAVIN, J. J. Microbiological Process Report: Analytical Microbiology. Part III: Turbidimetric Methods. Vol 5, p 235 – 243, 1957.

GAVIN, J. J. Microbiological Process Report: Analytical Microbiology. Part V: Metabolic Response Methods. Vol 7, p 180 – 192, 1958.

GELMAN, A.; CHEW, G.L.; SHNAIDMAN, M. Bayesian Analysis of Serial Dilution Assay. *Biometrics*, Nova York, vol 60, p 407 – 417, 2004.

GERKE, J.R.; LEVIN, J.D.; PAGANO, J.F. Antibiotic Substances Part II: Antifungal Assays. In: KAVANAGH, F. Analytical Microbiology. New York: Academic Press, 1963, p 387 – 409.

GRAY, K.C.; PALACIOS, D.S.; DAILEY, I.; ENDO, M.M.; UNO, B.E.; WILCOCK, B.C.; BURKE, M.D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *PNAS*, vol 109, nº 7, Illinois, 2012. Disponível em: <http://www.scs.illinois.edu/burke/files/pubs/pub26.pdf> Acessado em: 07 de junho de 2014.

GRILLOT, R.; LEBEAU, B. *Systemic Antifungal Agents. In: Antimicrobial Agents: Antibacterial and Antifungals*. Washington DC: ASM Press. 1999. p. 1260 – 1285.

GUPTE, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B.N. Antifungal antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol 58, India, 2002.

HEWITT, W. *Microbiological Assay I*. Orlando: Academic Press. p 1 – 16. 1977

HINZ, D.C. Process analytical Technologies in the pharmaceutical industry the FDA's PAT initiative. *Anal. Bioanal. Chem*: Berlim, vol 384, p 1036 – 1042, 2006

INMETRO – Coordenação Geral de Acreditação. Orientação sobre validação de métodos analíticos – DOQ – CGCRE – 008. Revisão 04, 2011. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf Acessado em: 19 de junho de 2013.

HUBER, L. *Validation of Analytical Methods*. Agilent Technologies, Alemanha, 2010. Disponível em: <http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990-5140EN.pdf> Acessado em: 19 de junho de 2013.

HOLT, R.J. Laboratory tests of antifungal drugs. *Journal of Clinical Pathology*, vol 28, p 767 – 774, Surrey, 1975.

JOSLYN, D.A.; GALBRAITH, M. A turbidimetric method for the assay of antibiotics. *Journal of Bacteriology*, Michigan, vol 59, nº 6, p 711 – 716, 1950.

KAVANAGH, F. *Analytical Microbiology*. Nova York: Academic Press, 1972, v2, p 1 – 12.

KAVANAGH, F. *Analytical Microbiology*. Nova York: Academic Press, 1963, v1, p 387 - 410.

KOBAYASHI, I.; MURAOKA, H.; SAIKA, T.; NISHIDA, M.; FUJIOKA, T.; NASU, M. Micro-broth dilution method with air-dried microplate for determining MICs of clarithromycin and amoxycilin fo *Helicobater pylori* isolates. *Journal of Medical Microbiology*: Tokyo, vol 53, p 403 – 406, 2004.

LEHTINEN, J.; JÄRVINEN, S.; VIRTÄ, M.; LILIUS, E.M. Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. *Journal of microbiological Methods*: Turku, vol 66, p 381 – 389, 2006.

LIGHTBOWN, J.W.; KOGUT, M.; UEMURA, K. The International Standard for Nystatin. *Bull. Wld. Hlth Org.*, vol 29, p 87 – 94, 1963.

LOURENÇO, F.R. Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão em ágar: Proposta de delineamento experimental. 18 de dezembro de 2006. Dissertação Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Comparison of three experimental designs employed in gentamicina microbiological assay through agar diffusion. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, vol 45, nº 3, 2009, p 559 – 566.

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, vol 47, nº 3, p. 573 – 584, 2011.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, São Paulo, vol 32, nº 5, p 449 – 460, 2006.

MCPOLIN, O. *Validantion of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis*. *Mourne Training Services*, Irlanda, 2009.

MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P.; MEISSNER, P.E.Fº; BARTH, O.M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. *Revista Brasileira de Botânica*: Rio de Janeiro, vol 31, n 2, p 209 – 214, 2008.

MYERS, L.E.; MCQUAY, L.J.; HOLLINGER, F.B. Dilution Assay Statistics. *Journal of Clinical Microbiology*: Houston, vol 32, nº 3, p 732 – 739, 1993.

NDZINGE, I; PETERS, S.D.; THOMAS, A.H. Assay of Nystatin Based on the Measurement of Potassium Released from *Saccharomyces cerevisiae*. *Analyst*: Holly Hill, vol 102, p. 328 – 332, 1977.

PINTO, T.J.A.; Controle Total e Garantia de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. In: PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos, 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 3 – 91, 2010.

PINTO, T.J.A. Dosagem Microbiológica de Antibióticos e Fatores de Crescimento. In: PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos, 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 633 – 693, 2010.

READ, E.K.; SHAH, R.B.; RILEY, B.S.; PARK, J.T.; BRONSON, K.A.; RATHORE, A.S. *Process Analytical Technology (PAT) for Biopharmaceutical Products: Part II. Concepts and Applications*. Biotechnology and Bioengineering: Nova Deli, vol 105, nº 2, p 285 – 295, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, Campinas, vol 27, nº 5, p 771 – 780, 2004.

RIBEIRO, M.O.; GOMES, M.S.; SENNA, S.G.; ROSSETTI, M.L.R.; FONSECA, L.S. Avaliação de testes rápidos em microplaca usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Rio de Janeiro, vol 30, nº 4, p 455 – 460, 2004.

RILEY, B. S. Rapid Microbiology Methods in the Pharmaceutical Industry. *American Pharmaceutical Review*, Estados Unidos, 2006. Disponível em: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/113094-Rapid-Microbiology-Methods-in-the-Pharmaceutical-Industry/> Acessado em: 19 de junho de 2013.

ROSENBLATT, P.; WERBER, E.A.; KASHDAN, F.; LOEWE, L. A method for the determination of penicillin levels in body fluids. *Journal of Bacteriology*, vol 48, Nova York, 1944.

SARRIO, R.V.; SILVESTRI, L.J. *Validation of Analytical Assays and Test Methods for the Pharmaceutical Laboratory*. The Regulatory Forum – Sponsors by AccuReg, Florida, 1996. Disponível em: <http://www.regulatory.com/forum/article/test-val.html> . Acessado em: 09 de abril de 2013.

SANT'ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R.P. Comparação entre os métodos rápidos Simplate® TPC-CI e Petrifilm® AC e os métodos convencionais de contagem em placa para a numeração de aeróbios e mesófilos em sorvetes. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*

SOLVE, M.; ERIKSEN, H.; BROGREN, C.H. *Automated microbiological assay for quantitation of niancin performed in culture microplate read by digital image processing*. Food Chemistry: Analytical Methods Section, vol 49, p 419 – 426, 1994.

STUBBING, W.J.; BOSTOCK, J.M.; INGHAM, E.; CHOPRA, I. Assessment of microplate method of determining the post-antibiotic effect in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Leeds, vol 54, p 139 – 143, 2004.

THOMAS, A.H.; NEWLAND, P.; SHARMA, N.R. The heterogeneous composition of pharmaceutical-grade nystatin. *The Analyst*: Holly Hill, vol 107, nº 1277, p 849 – 853, 1982

THOMAS, A.H.; PETERS, S.D. Microbiological Assay of the Polyene Antifungal Antibiotics Amphotericin B, Candicidin and Nystatin. *The Analyst*: Holly Hill, vol 102, p 333 – 339, 1977.

TREFFERS, H.P. *The linear representation of dosage-response curves in microbial-antibiotic assays*. Journal of Bacteriology, Connecticut, vol 72, nº 1, 1955. Disponível em: <http://jb.asm.org/content/72/1/108.full.pdf>

UHLIG, S.; GOWIK, P. Factorial interlaboratory tests for microbiological measurement methods. Journal of Consumer Protection and Food Safety, vol 5. Seitzerland, 2010, p 35 – 46.

UNITED States Pharmacopeia. 35ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2012. p 74 – 88.

UNITED States Pharmacopeia. 35ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2012. p 4090 – 4096.

VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. Arq. Mudi. Vol 11, nº 2, Maringá, 2007, p26 – 31.

VIEIRA, S. Delineamentos Experimentais. In: VIEIRA, S. Análise de Variância (ANOVA). 1ª edição. São Paulo: Atlas, 2006. P 11 - 22

VITAL, T. M., REIS, C., GARCIA-ZAPATA, M. T. A., CUNHA, L. C. Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol 40, nº2, p219 – 227, 2004.

YAMAMOTO, C. H.; Dosagem Microbiológica de Neomicina por Difusão em Ágar: Redução do Tempo de Análise pela Aplicação de Cloreto de Trifeniltetrazólio. Defesa 22 de junho de 1994. Nº folhas 169. Dissertação Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1994.

YAMAZAKI, M.; TAMURA, N.; NAKAMURA, K.; SASAKI, N.; MARAKAMI, M.; RAJAPAKSHAGE, W.; KUMARA, B; TAMURA, Y.; LIM, S.Y.; OHTA, H.; TAKIGUCHI, M. Effects and Mechanisms of Action of Polyene Macrolide

Antibiotic Nystatin on *Babesia gibsoni* in vitro. *Journal of Parasitology*, vol 97, p 1190 – 1192, Japão, 2011.

ZHANG, Y.; SHIN, D. J.; WANG, T.H. Serial dilution *via* surfaceenergy trap-assisted magnetic droplet manipulation. *RSCPublishing – LabChip*, vol 13, 4827, MaryLand, 2013.

ZULUAGA, A. F.; AGUDELO, M.; RODRIGUEZ, C.A.; VESGA, O. Application of microbiological assay to determine pharmaceutical equivalence of generic intravenous antibiotics. *BMC Clinical Pharmacology*, vol 9, nº 1, p. 1 – 11, 2009. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6904/9/1n>