

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
BIOANALÍTICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR PARA
DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DO FENTICONAZOL
CREME VAGINAL

ADRIANA SAYURI ICHIMURA

ARARAQUARA

2013

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
BIOANALÍTICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR PARA
DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DO FENTICONAZOL
CREME VAGINAL**

Adriana Sayuri Ichimura

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

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Co orientadora: Josilene Chaves Ruela Corrêa

ARARAQUARA

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me ensina todos os dias, que guia o meu caminho, meus pensamentos e o meu coração em tudo o que eu faço.

Agradeço aos meus pais, Celina e Sussumo, por todo o amor e zelo, pela preocupação com as minhas escolhas e pelo apoio nos caminhos que decido seguir sempre.

Agradeço à minha irmã, Karina, por sempre acreditar e confiar em mim.

Agradeço à Professora Dra Hérica Regina Nunes Salgado pela sabedoria e conhecimento transmitidos em aulas e para este Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço à minha co-orientadora, Josilene Chaves Ruela Corrêa, por toda a paciência comigo e a sua disponibilidade em ajudar sempre.

Agradeço à indústria farmacêutica EMS, que gentilmente doou a substância química de referência e o creme vaginal do fármaco deste estudo.

Agradeço à todos os amigos e colegas do Laboratório de Controle de Qualidade pela torcida para que este Trabalho de Conclusão de Curso acontecesse. Especialmente à Fátima, que me ajudou e me ensinou muito do que sei hoje.

Agradeço aos melhores amigos que pude conhecer na faculdade, que se preocuparam comigo, com este Trabalho de Conclusão de Curso, que me ensinaram muito, que me fizeram viver os melhores anos da minha vida. Aqueles que cuidaram, abraçaram, brigaram, estudaram, “festaram” e curtiram muito comigo nestes curtos 5 anos: Diego Tonhoque, Guilherme Caldeira, Luan Mialick, Natália Salomão, Mariana Ueda, Maisa Ikeda, Maria Clara Marin, Maysa Yoshino, Juliane Vicentino, Alice Haddad, Simone Yamashita, Arianne Paião, Flávia Nachbar. Sem vocês nada disso teria o menor sentido.

Agradeço à República Intrameteu que sempre me acolheu em Araraquara quando precisei, tornando meus finais de semana mais alegres e divertidos. Meu carinho é enorme por vocês, Caio Nardin, Diego Kashiura, Gustavo Cioci, Lucas Lopes, Danilo Moreira, Caetano Toshio, Lucas Henares e Felipe Hilário.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO	11
3. DESENVOLVIMENTO	11
3.1. Experimento	11
3.1.1. Material	11
3.1.2. Reagentes	11
3.1.3. Equipamentos	12
3.2. Peso Médio	13
3.3. Desenvolvimento Analítico	14
3.3.1. Preparo do inóculo	16
3.3.2. Preparo da solução de nitrato de fenticonazol padrão	16
3.3.3. Preparo da solução de nitrato de fenticonazol amostra	17
3.3.4. Validação	17
3.4. Resultados	18
3.4.1. Curva analítica	18
3.4.2. Validação	22
3.4.2.1. Linearidade	22
3.4.2.2. Cálculo da Potência e Precisão	23
3.4.2.3. Exatidão	24
3.5. Discussão	25
4. CONCLUSÃO	28
5. REFERÊNCIAS	29

Resumo

O nitrato de fenticonazol é um derivado imidazólico de amplo espectro de ação contra patógenos dermatófitos, como *Malassezia furfur* e leveduras, a principal delas *Candida albicans*. É necessário que se possa garantir a qualidade dos medicamentos produzidos. O controle de qualidade é uma ferramenta que assegura a qualidade, eficácia e segurança desses produtos até o momento de sua utilização e faz-se necessário que métodos analíticos sejam desenvolvidos e validados para o doseamento desses fármacos. A grande importância dos métodos microbiológicos utilizados no controle de qualidade de fármacos com atividade antimicrobiana é demonstrar sua atividade biológica por meio de seu efeito inibitório no crescimento de micro-organismo. A diminuição da atividade antimicrobiana ou potência pode indicar alguma alteração sutil na molécula, que é pouco detectável em um método analítico físico-químico. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar o método microbiológico difusão em ágar para o produto nitrato de fenticonazol creme vaginal. O método de difusão em ágar foi desenvolvido utilizando meio de cultura ágar Sabouraud e cepa de *Candida albicans* ATCC 64548 como micro-organismo teste. Para o ensaio foi utilizado o delineamento 3 x 3, conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira (2010). A validação do método proposto demonstrou linearidade entre os diâmetros dos halos de inibição e o logaritmo da concentração na faixa de 50,0 a 200,0 µg/mL. O método obteve resultados precisos e lineares com $r^2=1$. A exatidão foi comprovada pelo intervalo de tolerância de 98,83%, dentro dos limites permitidos. O método foi validado de maneira satisfatória, podendo ser utilizado em análises do Controle de Qualidade deste fármaco.

Palavras-chave: controle de qualidade, difusão em ágar, nitrato de fenticonazol, validação, método microbiológico, creme vaginal.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Estrutura química do nitrato de fenticonazol.....8
- Figura 2.** Esquema do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções padrão (P) e amostra (A) na placa de Petri, sendo P1 (50 µg/mL); P2 (100 µg/mL); P3 (200 µg/mL) e A1 (50 µg/mL); A2 (100 µg/mL); A3 (200 µg/mL).....19
- Figura 3.** Representação gráfica da curva analítica de nitrato de fenticonazol padrão e amostra, no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.21

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores medidos para a determinação do peso médio a partir da diferença entre bisnagas cheias e bisnagas vazias..	14
Tabela 2. Parâmetros testados para o ensaio microbiológico de difusão em ágar para nitrato de fenticonazol.	14
Tabela 3. Parâmetros utilizados para a validação do ensaio microbiológico de difusão em ágar para nitrato de fenticonazol.	15
Tabela 4. Valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento obtidos com a solução de nitrato de fenticonazol no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.	20
Tabela 5. Análise da variância dos dados obtidos no ensaio microbiológico de nitrato de fenticonazol pelo método de difusão em ágar	22
Tabela 6. Valores experimentais obtidos para o doseamento de solução padrão de nitrato de fenticonazol pelo método de difusão em ágar.	23
Tabela 7. Valores das médias e desvios padrão relativos das leituras dos halos para as soluções padrão e amostra para nitrato de fenticonazol pelo método de difusão em ágar.	24
Tabela 8. Valores experimentais obtidos no teste de recuperação do nitrato de fenticonazol padrão no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.	24

1. INTRODUÇÃO

As infecções vaginais têm sido responsáveis por grande índice de consultas ginecológicas, sendo comprovadas por diagnósticos recorrentes em clínicas especializadas. Atualmente aproximadamente 75% das mulheres em idade reprodutiva apresentam a candidíase vulvovaginal não complicada, sendo a *Candida albicans* uma das principais causas. Apesar dos avanços terapêuticos, a candidíase vulvovaginal aparece como um problema mundial comum, afetando as diversas classes sociais (SOBEL, 2007).

O nitrato de fenticonazol, 1-(2,4-dicloro-beta-((p-(feniltio) benzil) oxi) fenetil) imidazol mononitrato (Figura 1), é um derivado imidazólico de amplo espectro de ação contra patógenos dermatófitos, como *Malassezia furfur* e leveduras, a principal delas *Candida albicans*. O nitrato de fenticonazol demonstrou possuir também espectro de ação contra bactérias, quando estas estão normalmente associadas com fungos causadores de infecções cutâneas ou infecções vaginais, além disso, possui ação antiparasitária contra o protozoário *Trichomonas vaginalis*. Por possuir esse amplo espectro de ação contra espécies micóticas, bacterianas, dermatófitos e/ou *Trichomonas*, o nitrato de fenticonazol pode ser utilizado como tratamento tópico alternativo nas infecções mistas causadas por esses patógenos (VERALDI, 2008).

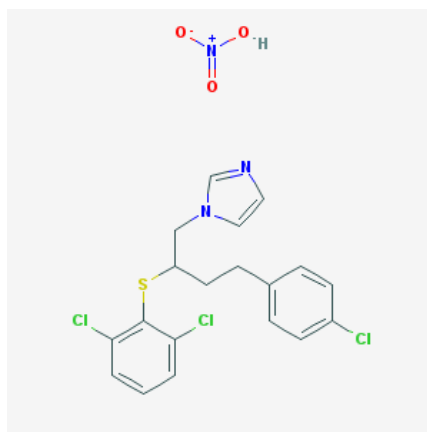


Figura 1. Estrutura química do nitrato de fenticonazol.

O nitrato de fenticonazol é um pó cristalino fino, branco, praticamente insolúvel em água e muito solúvel em metanol e dimetilformamida (MARTINDALE, 2009).

O mecanismo de ação do nitrato de fenticonazol contra *Candida albicans* é baseado em três etapas: inibição da secreção de protease ácida da levedura, promoção de danos à membrana citoplasmática e bloqueio da oxidase do citocromo (VERALDI, 2008). O nitrato de fenticonazol atua alterando a permeabilidade da membrana do fungo com a inibição da formação de ergosterol, um constituinte vital para sua estrutura, além de inibição na produção de proteinases ácidas. Esse duplo mecanismo de ação culmina na destruição do patógeno por inviabilizar o crescimento do fungo e também diminui a incidência de recidivas (NAUD et al., 2003).

O nitrato de fenticonazol apresenta baixo grau de absorção sistêmica em sua aplicação dérmica ou vaginal. O valor da concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração que ainda causa inibição no crescimento microbiano do nitrato de fenticonazol se apresenta na faixa de 5–40 µg/mL (LÓPEZ-OLMOS, PARRA, 2003). A máxima atividade do fenticonazol contra a *Candida albicans* é alcançada em pH semelhante ao ambiente vaginal. Este perfil de atividade o torna

uma excelente indicação nas vulvovaginites por *Candida albicans*, principalmente devido à diminuição de pH que ocorre durante esta infecção (HALBE et al., 2000).

A boa absorção pela parede vaginal e sua concentração permanente no local são características importantes do nitrato de fenticonazol que corroboram sua eficácia terapêutica no tratamento de vulvovaginites (DE CECCO et al., 1988).

No Brasil, as formas farmacêuticas encontradas para o nitrato de fenticonazol são creme vaginal e óvulo. O produto referência para a forma farmacêutica creme vaginal é o Fentizol[®], produzido pelo laboratório Aché. Existem ainda no mercado produtos genéricos.

Segundo o Bulário da ANVISA (2013), quando utilizado na forma de creme vaginal, o produto contendo 0,02 g de nitrato de fenticonazol por grama de creme deve ser introduzido na vagina com o aplicador cheio (5 g de creme). Deve ser utilizado apenas um aplicador por dia e este não deve ser reutilizado. O creme deve ser utilizado por sete dias consecutivos.

Atualmente, o grande número de incidentes que envolvem produtos alimentícios e medicamentosos nas indústrias traz uma preocupação com a qualidade desses produtos durante sua produção. Estes devem ser produzidos visando um produto final com qualidade, que seja comercializado e atenda os efeitos esperados pelo consumidor/ paciente.

O controle de qualidade é extremamente importante e uma ferramenta que assegura a qualidade, eficácia e segurança dos produtos até o momento de sua utilização. Como ferramenta para o controle de qualidade, métodos analíticos desenvolvidos e validados, descritos nas farmacopeias ou em periódicos internacionais, têm papel importante na avaliação dos produtos farmacêuticos.

A grande importância dos métodos microbiológicos utilizados no controle de qualidade de fármacos com atividade antimicrobiana é demonstrar sua atividade biológica por meio de seu efeito inibitório no crescimento de micro-organismo. A diminuição da atividade antimicrobiana ou potência pode indicar alguma alteração sutil na molécula, que é pouco detectável em um método analítico físico-químico (LOURENÇO, 2007).

Os ensaios microbiológicos utilizam a potência conhecida do padrão de referência para estimar, por comparação dos efeitos produzidos em um sistema biológico, a potência de um produto ou material desconhecido (HEWITT, 2007).

Para a determinação da potência dos antimicrobianos, os ensaios microbiológicos mais utilizados são o método de difusão em ágar e o método turbidimétrico, ambos descritos na Farmacopeia Brasileira (2010). Em relação ao método por difusão em ágar, sob condições adequadas, é possível demonstrar a potência antibiótica comparando os halos de inibição produzidos a partir de concentrações conhecidas do antimicrobiano analisado e o seu padrão de referência (MORENO; SALGADO, 2007).

O método de difusão em ágar consiste na difusão do antifúngico ou antibiótico por meio de uma camada de meio de cultura uniformemente inoculada. A solução de antifúngico ou antibacteriano é aplicada no interior de cilindros de aço inoxidável, *templates*, orifícios ou discos de papel, dependendo da técnica utilizada. O crescimento do micro-organismo inoculado é limitado na área de onde se difundiu a solução antimicrobiana, formando uma área circular ou “zona”, também chamado de halo de inibição. Dessa forma, o próprio micro-organismo é o agente revelador do ensaio microbiológico, permitindo identificar concentrações baixas do antimicrobiano que limita o seu crescimento (HEWITT, 2007).

Atualmente, não existe monografia farmacopeica para o fármaco nitrato de fenticonazol na forma farmacêutica de creme vaginal disponível em compêndios oficiais aceitos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e nem métodos microbiológicos publicados em periódicos internacionais para a determinação da potência do nitrato de fenticonazol matéria prima ou produto acabado. Sendo o nitrato de fenticonazol um fármaco antifúngico, a determinação de sua potência durante o controle de qualidade da matéria prima ou produto acabado é imprescindível de modo a assegurar a eficácia deste medicamento. A ausência de um método microbiológico para o nitrato de fenticonazol demonstra a importância e inovação do método desenvolvido neste trabalho.

2. OBJETIVO

O objetivo deste Trabalho de Conclusão de Curso foi o desenvolvimento do método microbiológico de difusão em ágar para o nitrato de fenticonazol na forma farmacêutica creme vaginal e sua validação segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) e a Resolução RE nº 899 da ANVISA (BRASIL, 2003).

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. EXPERIMENTO

3.1.1. Material

- Fenticonazol substância química de referência e creme vaginal (lote: 469175, validade: 07/2014), gentilmente doados pela EMS, indústria farmacêutica;

3.1.2. Reagentes

- Cepas de *Candida albicans* ATCC 64548;
- Meios de cultura: ágar Sabouraud (Himedia) e ágar nº 1 (Acumedia);
- Metanol - álcool metílico (Synth).

3.1.3. Equipamentos

- Micropipetadores;
- Placas de Petri;
- Templates de aço inoxidável;
- Estufa para câmara bacteriológica (FANEM Modelo 315 SE);
- Autoclave (Norte-Científica);
- Estufa para esterilização (Nova Ética);
- Capela de fluxo laminar (VECO);
- Espectrofotômetro (Quimis);
- Paquímetro digital (Starret).

Para o desenvolvimento do método e sua validação foram utilizados nos ensaios o nitrato de fenticonazol, substância química de referência, identificada pelo lote FN/00C/11, e o nitrato de fenticonazol creme vaginal 0,2 g/g, identificado pelo lote L469175, os quais foram doados gentilmente pela empresa EMS indústria farmacêutica, localizada na cidade de Hortolândia no estado de São Paulo. A amostra utilizada consistiu em caixas de nitrato de fenticonazol creme vaginal 0,2 g/g, as quais possuíam, cada uma, uma bisnaga com 40,0 gramas de creme vaginal e sete aplicadores.

A cepa fúngica utilizada foi a *Candida albicans* ATCC 64548 e sua manutenção foi feita em meio ágar Sabouraud (Himedia) em tubos de ensaio inclinados, previamente preparados e autoclavados. Para os ensaios foram preparadas placas com meio base do ágar antibiótico número 1 (Difco), para nivelamento das placas. Como meio superfície, foi utilizado meio ágar Sabouraud (Himedia) acrescido de caldo Sabouraud (Acumedia) inoculado com o micro-organismo.

Todos os meios de cultura e ponteiros utilizados nos ensaios foram esterilizados previamente em autoclave durante 15 minutos a temperatura de 121°C. Foram utilizadas placas de Petri com 20,0 mm de altura x 100,0 mm de diâmetro e nas tampas foi colocado papel filtro a fim de impedir que gotículas de condensação interferissem ou dificultassem os resultados do ensaio, nesse caso, a leitura dos halos de inibição. Para o ensaio também foram utilizados pipeta volumétrica de 10 mL, proveta de 25 mL, *templates* e pinça, todos esterilizados em estufa (Nova Ética) a 180°C por 1 hora, juntamente com as placas de Petri.

Para a incubação das placas foi utilizada estufa (FANEM Modelo315 SE) e os halos de inibição foram lidos com o auxílio de paquímetro digital Starret.

3.2. PESO MÉDIO

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), realizou-se a determinação do peso médio, em que foram pesadas 10 bisnagas individualmente. Após serem pesadas cheias, as bisnagas foram esvaziadas e pesadas novamente. Foi feita a diferença das bisnagas cheias com as bisnagas vazias. O valor do peso médio encontrado foi de 44,62 gramas e todas as bisnagas atendiam as recomendações da Farmacopeia Brasileira (2010). Os resultados do Peso médio podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores medidos para a determinação do peso médio a partir da diferença entre bisnagas cheias e bisnagas vazias.

Bisnagas cheias	Bisnagas vazias	Diferença
50,68 g	6,05 g	44,63 g
50,76 g	5,95 g	44,81 g
50,84 g	6,08 g	44,76 g
51,13 g	5,98 g	45,15 g
50,77 g	6,07 g	44,70 g
50,43 g	5,99 g	44,44 g
50,37 g	5,95 g	44,42 g
50,56 g	5,93 g	44,63 g
50,54 g	6,04 g	44,50 g
50,17 g	6,03 g	44,14 g

3.3. DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO

Durante o desenvolvimento analítico, diversas modificações foram testadas nos parâmetros do método a fim de encontrar as melhores condições para obter os melhores resultados. Os parâmetros testados constam na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros testados para o ensaio microbiológico de difusão em ágar para nitrato de fenticonazol

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Candida albicans</i> ATCC 64548
Meio de cultura	Ágar Sabouraud
Solvente solução-estoque	Metanol, etanol, DMSO
Solução diluente	Água, metanol, etanol
Concentração do inoculo	0,5%; 1,0%; 2,0%
Concentração das soluções	50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL
	100,0; 200,0 e 400 µg/mL
	125,0; 250,0 e 500 µg/mL
Temperatura de incubação	25 °C
Tempo de incubação	24h e 48h

Após testar esses parâmetros, foram encontrados os melhores resultados que traziam melhor linearidade entre as concentrações, melhor visualização dos halos e que permitissem fácil manipulação da amostra, já que o fármaco apresenta solubilidade aquosa limitada. Os parâmetros selecionados para a validação se encontram na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros utilizados para a validação do ensaio microbiológico de difusão em ágar para nitrato de fenticonazol

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Candida albicans</i> ATCC 64548
Meio de cultura	Ágar Sabouraud
Solvente solução-mãe	Metanol
Solução diluente	Metanol
Concentração do inoculo	0,5%
Concentração das soluções	50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL
Temperatura de incubação	25°C
Tempo de incubação	24h

Esses parâmetros foram escolhidos, pois demonstraram melhores condições para o crescimento das cepas fúngicas e halo de inibição proporcional às concentrações das soluções.

O metanol foi o solvente orgânico utilizado para realizar as diluições, pois entre os solventes testados, este foi o que mais demonstrou solubilização do fármaco, visto que o nitrato de fenticonazol é pouco solúvel em água e muito solúvel em metanol. Contudo para a realização do ensaio foi feito um teste controle em placas inoculadas com *Candida albicans* utilizando apenas o metanol, a fim de provar que o poder bactericida/ bacteriostático provém do fármaco em estudo e não do metanol.

O resultado do teste controle foi negativo para metanol, o que viabiliza o ensaio proposto.

A utilização de metanol para solubilizar antibióticos em ensaios microbiológicos não é algo inovador, mas usado e, inclusive recomendado pela Farmacopeia Brasileira (2010).

3.3.1. Preparo do Inóculo

O caldo Sabouraud utilizado para o preparo do inóculo foi feito de acordo com as recomendações do fabricante, presentes no rótulo do produto. Após pesado e preparado, o caldo Sabouraud foi autoclavado e mantido sob refrigeração a 8 °C até seu uso. Em 15 mL desta solução foram suspensas duas alçadas de cepa de *Candida albicans*, cultivadas por 24 horas a temperatura de 25 °C em estufa. Após o tempo de incubação, a suspensão do micro-organismo foi padronizada em espectrofotômetro a 580 nm e $25 \pm 2\%$ de transmitância, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010). Uma alíquota de 250 µL do inóculo padronizado foi transferida em 50,0 mL do meio de cultura ágar Sabouraud, obtendo-se a concentração de 0,5% do inóculo.

3.3.2. Preparo da solução de nitrato de fenticonazol padrão

Para a preparação das soluções padrão de nitrato de fenticonazol, foram feitas diluições a partir de uma solução-mãe. Para esta solução primária, foi pesado exatamente, em balança analítica, cerca de 10,00 mg do fármaco, que foi colocado em balão volumétrico de 10,0 mL. Foi completado o volume com metanol e a solução foi colocada por 1 hora em ultra-som, para total homogeneização do fármaco. O volume foi completado com metanol, obtendo-se a concentração de

1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo e foram retiradas alíquotas de 0,25; 0,50 e 1,00 mL para o preparo de soluções em balão volumétrico de 5 mL para obtenção das concentrações de 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

3.3.3. Preparo da solução de nitrato de fenticonazol amostra

As soluções de nitrato de fenticonazol amostra foram preparadas da mesma forma que as soluções padrão. Foi pesado 0,05 g da amostra nitrato de fenticonazol creme vaginal 0,2 g/g. A amostra foi pesada em béquer de 10 mL e diluída e homogeneizada em 5 mL de metanol. Após total homogeneização da amostra, a solução foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o béquer foi lavado 3 vezes com 1 mL de metanol, para garantir que toda a amostra tenha sido transferida para o balão volumétrico. A solução foi colocada por 1 hora em ultra-som e depois de completado o volume com metanol, a solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo. Alíquotas de 0,25; 0,50 e 1,00 mL foram retiradas da solução filtrada para o preparo de soluções em balão volumétrico de 5 mL para obtenção das concentrações de 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

3.3.4. Validação

A validação do ensaio foi conduzida de acordo com a Resolução RE nº 899 da ANVISA (BRASIL, 2003) e segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) para os parâmetros de linearidade, exatidão e precisão.

Para a verificação estatística da linearidade, o cálculo da regressão linear foi feito através do método dos mínimos quadrados verificado segundo a Análise de

Variância para as três concentrações (50,0, 100,0 e 200,0 µg/mL) empregadas para padrão e amostra.

Na precisão foi realizado o ensaio em dois dias diferentes e a partir da repetibilidade e da precisão intermediária determinou-se a atividade percentual do nitrato de fenticonazol e o cálculo do desvio padrão relativo da potência de cada ensaio.

Para o parâmetro de exatidão foi realizado o ensaio de recuperação pelo método do placebo enriquecido.

3.4. Resultados

3.4.1. Curva analítica

Para a realização do ensaio foram preparadas placas de Petri com camada base de 20,0 mL do meio de cultura ágar bacteriológico número 1. Após a sua solidificação, foram adicionados 5,0 mL da camada superfície, preparada pela mistura do meio de cultura ágar Sabouraud e o inóculo padronizado. Depois de solidificado, os *templates*, previamente esterilizados, foram colocados na superfície com o auxílio de pinça, também estéril. Foram transferidos 200 µL de cada uma das soluções padrão e soluções amostra do nitrato de fenticonazol para pocinhos dos *templates* segundo esquema apresentado na Figura 2. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

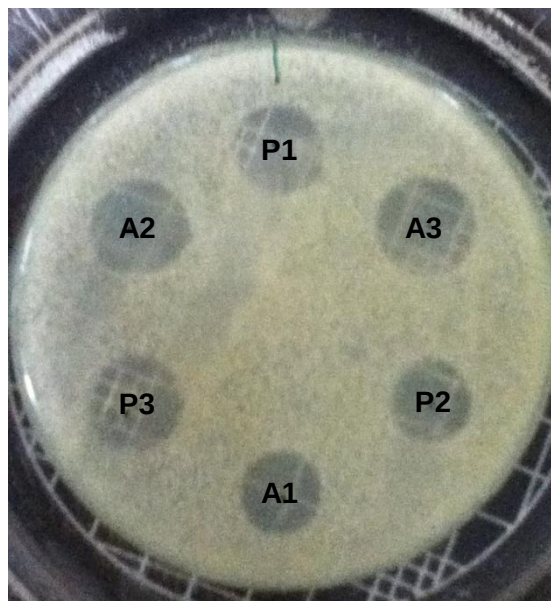


Figura 2. Esquema do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções-padrão (P) e amostra (A) na placa de Petri, sendo P1 (50 µg/mL); P2 (100 µg/mL); P3 (200 µg/mL) e A1 (50 µg/mL); A2 (100 µg/mL); A3 (200 µg/mL).

Após a preparação das placas, estas foram incubadas a 8 °C por 2 horas para que as soluções com o fármaco pudessem difundir no meio de cultura de forma adequada. As placas foram novamente incubadas, agora na temperatura de 25°C durante 24 horas e após esse período os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com paquímetro digital.

Para a construção da curva analítica, foram utilizadas a média dos diâmetros dos halos de inibição obtidos e o logaritmo das concentrações utilizadas nas diluições. O delineamento 3 x 3 utilizado foi feito conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira (2010).

Os resultados obtidos juntamente com a curva analítica construída com esses valores podem ser verificados na Tabela 4 e na Figura 3, respectivamente.

Tabela 4. Valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento obtidos com a solução de nitrato de fenticonazol no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.

Concentração (µg/ mL)	Diâmetro dos halos de inibição (mm)		Média		Desvio Padrão		DPR (%)	
	P	A	P	A	P	A	P	A
50	13,15	13,01	13,43	13,39	0,34	0,35	2,50	2,63
	13,63	13,60						
	13,37	13,21						
	12,99	13,62						
	13,53	13,05						
	13,92	13,87						
100	14,11	14,21	14,34	14,27	0,31	0,12	2,16	0,81
	14,15	14,23						
	14,59	14,13						
	14,81	14,37						
	14,01	14,44						
	14,36	14,21						
200	15,08	15,31	15,12	15,15	0,27	0,16	1,78	1,04
	14,87	15,01						
	15,02	15,17						
	15,38	15,31						
	14,86	14,92						
	15,51	15,18						

DPR% - desvio padrão relativo percentual

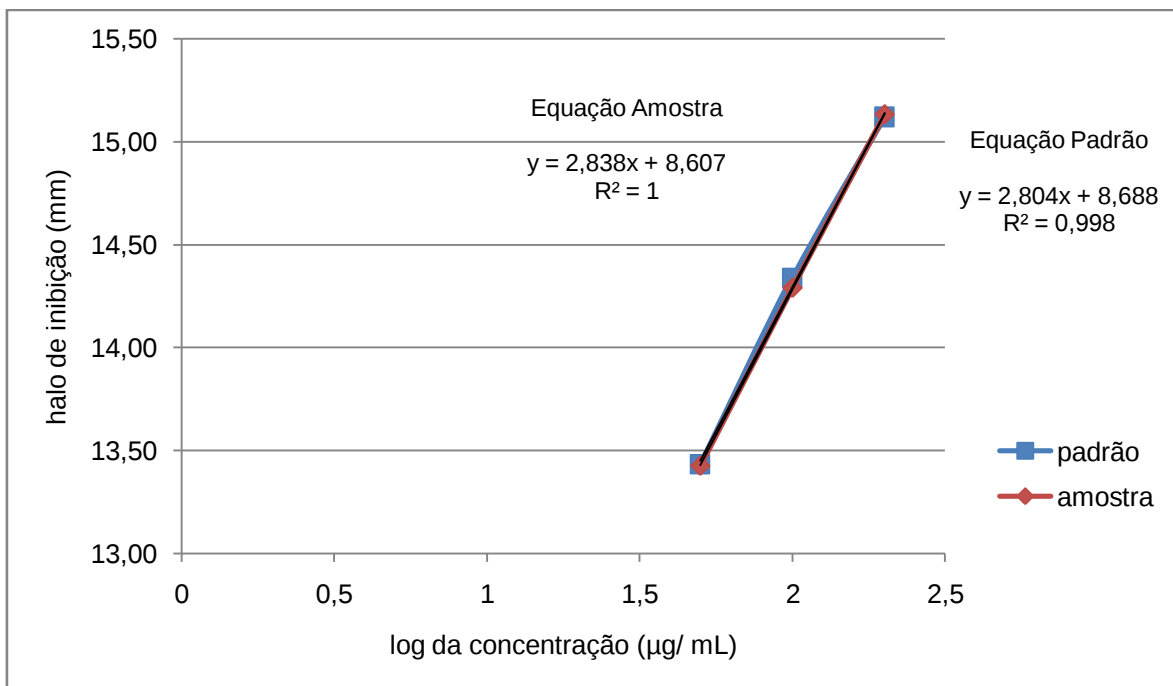


Figura 3. Representação gráfica da curva analítica de nitrato de fenticonazol padrão e amostra, no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.

Depois de 24 horas de incubação a 25 °C, foram obtidos os resultados dos tamanhos dos halos de inibição. A partir deles foi construída a curva analítica correlacionando esses valores com o logaritmo das concentrações utilizadas, no caso, 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL. Esta curva obteve um coeficiente de correlação para o padrão igual a 0,998, e a equação da reta obtida foi $y = 2,804x + 8,688$. Para a amostra, o coeficiente de correlação apresentou valor igual a 1, sendo que a equação da reta foi $y = 2,838x + 8,607$. O coeficiente de determinação indica a linearidade do método, quanto mais próximo a 1, mais linear ele se apresenta. A Resolução RE 899 (ANVISA) preconiza que as curvas analíticas obtidas sejam paralelas e possuam, no mínimo, coeficiente de correlação igual a 0,990. Portanto, o valor obtido nos coeficientes de correlação indica que o método é linear e possui paralelismo, também comprovados pela análise de variância e a representação gráfica da Figura 3.

3.4.2. Validação

3.4.2.1. Linearidade

A análise da variância segundo a ANOVA foi utilizada para a validação do método. O tratamento estatístico para o ensaio 3 x 3 utilizando templates foi feito como preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010) para o teste da linearidade.

Tabela 5. Análise da variância dos dados obtidos no ensaio microbiológico de nitrato de fenticonazol pelo método de difusão em ágar.

ANÁLISE DE VARIÂNCIA	GL	SQ	MQ	Fcal	Ftab
Preparações	1	0,0066695	0,0066695	0,1072969	4,24
Regressão	1	17,80204	17,80204	286,3962*	7,77
Desvio de Paralelismo	1	0,0070044	0,0070044	0,112682	4,24
Quadrático	1	0,006235	0,006235	0,1003032	4,24
Diferença de Quadrático	1	0,009568	0,009568	0,1539293	4,24
Entre doses	5	17,831514	3,5663028	---	---
Entre placas	5	0,666681	0,1333362	---	---
Dentro (erro)	25	1,553969	0,06215876	---	---
Total	35	20,052164		---	---

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

*significativo $p < 0,05$

Para a validação do método proposto, a Farmacopeia Brasileira (2010) preconiza que o desvio de paralelismo e o desvio de linearidade sejam não significativos e a regressão linear deve ser significativa para $p < 0,05$. Como pode ser verificado na Tabela 5, todas as condições foram cumpridas no ensaio proposto.

3.4.2.2. Cálculo da Potência e Precisão

O cálculo da potência foi estimado conforme a equação de Hewitt (HEWITT, 2007) e os resultados apresentados foram realizados em dois dias diferentes e cada ensaio corresponde à média de seis determinações.

Equação de Hewitt:

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

Em que:

$$M = F/b$$

$$b = E/I$$

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

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

$$I = \text{logaritmo da razão das doses}$$

A partir do cálculo da potência dos resultados obtidos de cada placa foi possível calcular a potência de cada dia e sua média e desvio padrão relativo, confirmando a precisão intradia do ensaio. Também foi calculada a potência interdia do ensaio. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores experimentais obtidos para o doseamento de solução padrão de nitrato de fenticonazol pelo método de difusão em ágar.

	Dia	Potência (%)	DPR (%)
Precisão Intradia	1	97,88	9,31
Precisão Interdia	1 e 2	93,73	10,07

A precisão do ensaio foi calculada de duas formas: através do cálculo de potência e também através do cálculo do desvio padrão relativo das leituras dos halos, nas diferentes placas, para cada concentração testada para as soluções padrão e amostra, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7. Valores das médias e desvios padrão relativos das leituras dos halos para as soluções padrão e amostra para nitrato de fenticonazol pelo método de difusão em ágar

	P1	P2	P3	A1	A2	A3	
Média	13,32	14,30	15,12	13,25	14,08	15,00	
DPR %	3,3	3,15	3,04	2,9	2,27	2,77	Precisão interdia
Média	13,32	14,31	15,07	13,43	14,29	15,14	
DPR %	2,73	1,93	2,23	2,43	1,5	0,9	Precisão intradia

3.4.2.3. Exatidão

Para a verificação da exatidão do método proposto foi utilizado o teste de recuperação através do método do placebo enriquecido. Neste método são adicionadas quantidades conhecidas da substância padrão ao placebo, permitindo a quantificação.

Para o desenvolvimento do teste de recuperação foi adicionada quantia de 10 mg de substância padrão de nitrato de fenticonazol a 0,0490 gramas de placebo, formando o placebo enriquecido. O padrão e o placebo foram pesados em balança analítica. Esta mistura foi completada com metanol em balão volumétrico de 10 mL, reproduzindo a solução-estoque utilizada para a amostra, procurando utilizar as mesmas condições do método.

Tabela 8. Valores experimentais obtidos no teste de recuperação do nitrato de fenticonazol padrão no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.

Concentração de nitrato de fenticonazol nos placebos enriquecidos (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)	Recuperação Média (%)	DPR (%)
50,0	98,37	4,24		
100,0	98,69	3,44	98,83	3,20
200,0	99,41	2,10		

Os resultados obtidos se mostraram satisfatórios para a Resolução RE 899, no qual a exatidão deve estar próxima a 100%, conforme observado na Tabela 8.

3.5. Discussão

A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares aos que foram utilizados no método proposto, foi possível encontrar as melhores condições de solubilidade do padrão e amostra, melhor tempo de incubação e concentração do inóculo, entre outros parâmetros que permitiram o desenvolvimento do método.

Para assegurar a validade do ensaio na determinação da potência de nitrato de fenticonazol, foram utilizadas três diferentes concentrações para a amostra, idênticas às da solução padrão, em delineamento 3 x 3. As doses utilizadas estão em progressão geométrica com razão 2, seguindo relação linear entre o logaritmo da concentração da substância testada e o diâmetro dos halos de inibição. Os melhores resultados encontrados foram nas concentrações de 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL, observando o tamanho do halo e a distância entre eles, de forma que não houvesse sobreposição.

Foi eleita uma cepa de fácil manuseio, além de ter um crescimento satisfatório em meio de cultura. Dessa forma, foi escolhida a *Candida albicans* ATCC 64548, disponível no laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. A concentração do inóculo utilizada foi de 0,5% devido ao seu crescimento homogêneo no meio de cultura escolhido, além dessa concentração também foram testadas as concentrações de 1,0% e 2,0%, as quais tiveram crescimento de micro-organismo muito grande durante o tempo de incubação das placas. A homogeneidade do crescimento do micro-organismo

depende da padronização prévia do inóculo em espectrofotômetro a 580 nm, com $25 \pm 2\%$ de transmitância, o qual foi seguido para a realização de todos os ensaios.

Os resultados para o ensaio de linearidade mostraram que o método nas concentrações testadas é linear, pois não apresentam qualquer desvio de linearidade em sua análise de variância. Os tratamentos, tanto para padrão quanto para amostra, demonstraram ser estatisticamente iguais e as três diferentes concentrações são estatisticamente diferentes, apresentando relação linear entre elas.

A precisão do método foi obtida empregando-se seis determinações de nitrato de fenticonazol em solução de metanol durante dois dias diferentes. Dessa forma, foi possível calcular a precisão intradia no dia 1, no qual foi obtida a potência de 97,88% e desvio padrão de 9,31%. Também foi possível calcular a precisão interdia, na qual foi utilizada 12 determinações (dias 1 e 2) para o cálculo da potência, o resultado obtido foi de 93,73% para o teor e 10,07% para o DPR%. Este resultado apresenta-se em acordo com preconizado pela RE 899 da ANVISA, que permite variação de até 15%. O cálculo utilizado para a determinação das potências foi a equação de Hewitt.

Para a exatidão do método foi utilizado o teste de recuperação, pelo método do placebo enriquecido, no qual são adicionadas quantidades conhecidas da substância padrão no placebo, permitindo a sua quantificação. A recuperação média obtida no ensaio foi de 98,83%, que atende perfeitamente os requisitos da RE 899 da ANVISA, na qual é pedido que os resultados estejam próximos a 100%.

O método de difusão em ágar desenvolvido nesse trabalho para o nitrato de fenticonazol demonstrou ser linear, preciso e exato, atendendo a todos os requisitos necessários para ser uma técnica futuramente utilizada, principalmente pela

importância e vantagens dos métodos microbiológicos. Além disso, é um método de fácil execução e de baixo custo por não requerer instrumentos de alto custo. Este método pode facilmente ser incorporado à rotina dos laboratórios analíticos para a determinação do nitrato de fenticonazol em creme vaginal.

A grande importância dos ensaios microbiológicos frente aos ensaios físico-químicos para a quantificação de antimicrobianos consiste na capacidade que o ensaio bioanalítico possui em apontar a verdadeira atividade biológica do fármaco. Apesar de serem muito precisos, os métodos analíticos físico-químicos podem não detectar algumas alterações na molécula desses fármacos (ADAMS et al., 1998; SALGADO, LOPES, LUCCHESI, 2006).

Os métodos microbiológicos possuem algumas vantagens com relação a outros métodos, o principal deles é que é um método de fácil acesso e baixo custo, pois não requer equipamentos especializados. Além disso, a técnica normalmente utiliza solventes com baixa toxicidade tanto para o meio ambiente quanto para o analista que realiza o ensaio. Os métodos microbiológicos são considerados de fácil execução, entretanto alguns aspectos, como temperatura de incubação, micro-organismo utilizado, espessura do ágar, devem ser considerados no desenvolvimento para que o método demonstre exatidão e segurança.

4. CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e validado método de difusão em ágar, utilizado para estimar a potência de antimicrobianos, o qual demonstrou ser um método linear, preciso e exato para o doseamento do produto nitrato de fenticonazol creme vaginal. Os resultados de validação estão em acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010) e ANVISA (BRASIL, 2003). O ensaio microbiológico escolhido demonstrou ser uma técnica simples e de baixo custo e o trabalho aqui apresentado se mostra inovador e com grande potencial para ser futuramente utilizado para garantir a qualidade deste produto farmacêutico.

5. REFERÊNCIAS

ADAMS, E.; LIU, L.; DIERICK, K.; GUYOMARD, S.; NABET, P.; RICO, S.; LOUIS, P.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Neomycin: microbiological assay or liquid chromatography? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.17, p.757-766, 1998.

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

BULÁRIO DA ANVISA. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25252-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25252-1-0].PDF)>, acessado em: 09 out/ 2013.

DE CECCO, L.; GORLERO F.; BRUNENGHI, M.C.M.; AMBROSINI, A. Studio multicentrico sull'efficacia e tollerabilita del fenticonazole nel trattamento delle vulvovaginiti da Candida. *International Journal of Drug*, v.5, p 296-501, 1988.

FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília, ANVISA, 2010.

HALBE, H.W.; HEGG, R.; FERNANDES, C.E.; GONÇALVES, N.; ROSSI, M.C.; CURY, T.Q. Study on the efficacy and tolerability of fenticonazole in the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Revista Brasileira de Medicina*, v.57, p.1306-1311, 2000.

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

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

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

LÓPEZ-OLMOS, J.; PARRA, I. Comparison of single dose fenticonazole versus sertaconazole as the treatment of vulvovaginal candidiasis. A prospective, multicentre study over one year. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*. v. 30, 2003.

LOURENÇO, F.R. *Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão em ágar – proposta de delineamento experimental*. Dissertação Mestrado, São Paulo, Universidade de São Paulo, 2007. 200 p.

MARTINDALE. The Complete Drug Reference. 35 ed. London, PhP, 2009.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for ceftazidime injection. *Journal of AOAC International*.; v.90, n.5, p.1379-1382, 2007.

NAUD, P.; MATOS, J.; HAMMES, L.; MAGNO, V.; BROWERS, C.; SPILKI, M; D'ÁVILA, A.; MARTINEZ, G. Estudo da eficácia e tolerabilidade do fenticonazol no tratamento da vaginose bacteriana - Estudo duplo-cego, randomizado, prospectivo, controlado e comparado com grupo placebo. *Revista Brasileira de Medicina*, v.60, n. 1/2, p. 67-70, 2003.

REICHMANN, C. *Desenvolvimento e Validação do método de difusão em ágar para quantificação de fluconazol cápsulas e aplicação em estudos de estabilidade*. Trabalho de Conclusão de Curso, Araraquara, UNESP, 2012. 37 p.

SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.O.; LUCCHESI, M.B.B. Microbiological assay gatifloxacin in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.40, p.443-446, 2006.

SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*, v.369, p.1961-1971, 2007.

VERALDI, S.; Milani, R. Topical fenticonazole in dermatology and gynaecology: current role in therapy. *Drugs*, v.68, n.15, p.2183-2194, 2008.