



Development and Validation of a Microplate Bioassay for Nystatin Using Analytical Quality by Design (QbD) Approach

Carmen R.P. JAMIL, Felipe R. LOURENÇO*, Daniela D.M. GHISLENI & Terezinha J.A. PINTO

Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 580
Bloco 13. São Paulo, SP, Brasil.

SUMMARY. Nystatin is an antifungal agent widely used in the treatment of candidiasis and other fungal infections. Agar diffusion official method has been used in the last decades to assess the relative potency of nystatin, however this method is laborious and time-consuming. The aim of this work was to develop, optimize and validate a microplate bioassay for nystatin using an analytical Quality by Design (QbD) approach. *Candida albicans* (ATCC 10231) was used in microplate bioassay, due to its clinical importance. A design of experiments (DoE) was performed to establish inoculum proportion and nystatin concentration. Optimized conditions were achieved using inoculum proportion of 5%, incubation at 30 °C for 480 min, and nystatin concentration from 0.2 to 0.8 IU/mL. Microplate bioassay was specific, linear (R-Sq = 0.9978), accurate (mean recovery = 97%) and precise (RSD for repeatability = 6%, RSD for intermediate precision = 7%). Therefore, microplate bioassay is a useful alternative for routine analysis of pharmaceutical products containing nystatin.

RESUMEN. La nistatina es un agente antifúngico utilizado ampliamente en el tratamiento de la candidiasis y otras infecciones fúngicas. El método oficial de difusión en agar se ha utilizado en las últimas décadas para evaluar la potencia relativa de la nistatina, pero este método es laborioso y requiere mucho tiempo. El objetivo de este trabajo fue desarrollar, optimizar y validar un bioensayo en microplaca para nistatina utilizando un enfoque analítico por Quality by Design (QbD). Debido a su importancia clínica, en el bioensayo de microplacas se utilizó *Candida albicans* (ATCC 10231). Se realizó un diseño de experimentos (DoE) para establecer la proporción de inóculo y la concentración de nistatina. Se lograron condiciones optimizadas utilizando una proporción de inóculo del 5%, incubación a 30 °C durante 480 min y una concentración de nistatina de 0,2-0,8 IU/mL. El bioensayo de microplacas resultó específico, lineal (R-Sq = 0,9978), seguro (media de recuperación = 97%) y preciso (RSD para repetibilidad = 6%, RSD para precisión intermedia = 7%). Por lo tanto, el bioensayo en microplaca es una alternativa útil para el análisis de rutina de los productos farmacéuticos que contienen nistatina.

KEY WORDS: analytical quality by design (QbD), bioassay, design of experiments (DoE), nystatin.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: feliperl@usp.br