

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA

UNAN LEON

FACULTAD CIENCIAS QUIMICAS



CARRERA DE FARMACIA

Departamento de Analisis y Drogas

TEMA: VALIDACION DE POTENCIA DE ERITROMICINA (SUSPENSION)
POR EL METODO CILINDRO/ PLACA, EN EL LABORATORIO DE CONTROL
MICROBIOLOGICO FACULTAD CCQQ UNAN-LEON.

MONOGRAFIA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADO
QUIMICO- FARMACEUTICO

AUTOR:

- Br. Raquel Gonzalez Gonzalez

TUTOR:

- MSc. Fernando Emilio Baca Escoto

AGRADECIMIENTO

A Dios mi padre celestial por su gran misericordia, por darme inteligencia y perseverancia en el transcurso de la carrera, el transcurso de mi vida personal y durante este trabajo investigativo.

A mis padres que tanto amo Apolinar González y Hermelinda González por su gran apoyo y amor incondicional, por estar conmigo siempre en todo momento.

A mi tutor y profesor Licenciado Fernando Emilio Baca Escoto por sus orientaciones durante el transcurso de la validación y al Licenciado Gustavo Delgado por formar parte del proceso de este trabajo investigativo.

A todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron y me apoyaron en el transcurso de este trabajo investigativo.

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo ha sido realizado con mucha dedicación y empeño el que es dedicado especialmente a dos personas que quiero y respeto mucho; Apolinar González mi padre y Hermelinda González mi madre quienes me han dado su amor y apoyo en todo el transcurso de mi vida y mi carrera profesional, especialmente para ellos.

INDICE

Contenido	Pág.
Introducción	4
Objetivos	6
Marco Referencial	7
Material y método.....	28
Resultados	34
Análisis de Resultados	43
Conclusión	44
Recomendaciones	45
Glosario.....	46
Bibliografía	48
Anexos	50

INTRODUCCIÓN

La validación es establecer una evidencia documentada de que un proceso se realiza correctamente. La validación de los métodos de control microbiológico persigue los mismos objetivos que la validación química, sin embargo, el trabajo en microbiología tiene unas peculiaridades necesarias a destacar. Existen instrumentos y equipos característicos, reactivos y materiales propios del entorno microbiológico que requieren igualmente la aplicación de los principios de BPL; es necesario estandarizar cuidadosamente todos los factores que intervienen en las tareas a realizar, también se deben de evaluar de manera muy cuidadosa los criterios de repetición del ensayo cuando un primer análisis es incorrecto. La obtención de resultados seguros y fiables depende en gran medida de la correcta aplicación de las BPL.

La potencia de un antibiótico se estima mediante la comparación de la actividad de un producto (problema) y la de una sustancia de referencia (patrón) en presencia de un microorganismo testigo.

Las valoraciones de antibióticos se pueden efectuar por difusión en Agar o turbidimetría, dependiendo de la naturaleza de la muestra a ensayar; cabe destacar que será utilizado el método en placa según especificaciones de la farmacopea.

Las cepas de control han de ser utilizadas en el presente trabajo investigativo son de acuerdo al fármaco a ser evaluado en el que nos referimos a Eritromicina en suspensión, el cual es activo contra *Micrococcus luteus* Según especificaciones de USP 30 Y Farmacopea Mexicana 7ª Edición, tales cultivos proceden de colecciones estandarizadas como American Type Culture Collection (ATCC) Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Históricamente los cambios habidos en las leyes y regulaciones de FDA han sido consecuencia directa de muertes, enfermedades y otros problemas. Recordemos los incidentes de 107 muertes a causa del elixir de sulfanilamida en 1973 y las deformidades causadas por la talidomida en los años 60 como ejemplos históricos.

A comienzos de 1970, fueron retiradas del mercado de LVP, parenterales de gran volumen, a causa de la contaminación provocada por falta de esterilidad de estos productos.

Los equipos de investigadores multidisciplinarios, no habían sido utilizados por la FDA en inspecciones de producción Farmacéutica. El

trabajo de estos equipos, sobre todo en Plantas Farmacéuticas de fabricación de parenterales de gran volumen permitió al cabo de los años la incorporación de la validación como un requerimiento de las BPL en 1978. Se demostró a través de las inspecciones, que la mayoría de las firmas inspeccionadas, la documentación de los sistemas de la producción y control de proceso eran incompletos y los procesos de monitorización del medio ambiente y especificaciones del aire y agua, eran mínimos, lo cual no aseguraba una fiabilidad de los controles y procesos que se estaban llevando a cabo.

Durante estas inspecciones, nació un nuevo vocabulario por el personal de la FDA. Los términos protocolo, cualificación y validación, empezaron a utilizarse.

El concepto de validación, se ha ido ampliando a lo largo de los últimos 22 años. En 1987, la FDA, editó la "Compliance Policy Guide" (CPG) en donde acepta oficialmente la liberación paramétrica de productos estériles basándose en el proceso validado.

Finalmente la validación se ha convertido en un concepto a aplicar obligatoriamente en la fabricación de todas las formas de dosificación. (2). En Nicaragua se han mostrado estudios de los procesos de validación pero aun no se tiene con certeza los antecedentes del estudio de los mismos.

El presente trabajo investigativo pretende el desarrollo de la validación de potencia de Eritromicina en suspensión en el área de control microbiológico el que se realiza con el fin de cumplir con la normativa de garantía de calidad; las actividades organizadas que se pretenden seguir garantizan que el medicamento posea la calidad requerida para su uso previsto, se toma en cuenta que uno de los requisitos básicos de Normas de Correcta Fabricación consiste en que las fases críticas de fabricación y los cambios significativos de estos procesos deben estar validados así como también los requisitos básicos de control de calidad deben estar igualmente validados.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ✚ Determinar potencia de Eritromicina (suspensión) por el método cilindro/ placa en el laboratorio de control microbiológico Facultad Ciencias Químicas UNAN-León.

Objetivo específico

- ✚ Determinar la relación dosis respuesta de la Eritromicina.
- ✚ Evaluar la precisión y exactitud del método.

MARCO REFERENCIAL

CEPAS CONTROL

Antes de iniciar la validación del método microbiológico es imprescindible contar con cepas de microorganismos control que constituyen “el reactivo estándar biológico”. Estos microorganismos serán necesarios para la comprobación del método de control del producto no estéril y estéril.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Salmonella* sp.
- *Bacillus subtilis* ATCC6633
- *Clostridium sporogenes* ATCC 11437
- *Micrococcus luteus* ATCC9341
- *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482
- *Candida albicans* ATCC10231
- *Aspergillus niger* ATCC16404

Las cepas de microorganismos tienen un origen e idoneidad conocida así como una estabilidad bioquímica que minimiza la variabilidad durante la validación, debida al reactivo biológico. El crecimiento y la preparación del microorganismo determinan el estado fisiológico de las células, el cual tiene influencia directa en el resultado de los ensayos. Los ensayos microbiológicos no utilizan células individuales sino poblaciones de células. Los datos generados en el ensayo son menos variables si las poblaciones celulares son homogéneas.

Según se indica en la Farmacopea y USP el cultivo de un microorganismo que se vaya a utilizar como inóculo en una validación debe proceder de una cepa que no haya sido subcultivada más de 5 veces desde la cepa de referencia original. Un subcultivo se define como la resiembra del microorganismo a partir de un cultivo a medio fresco estéril. En el caso de

microorganismos que se conservan congelados cada ciclo de congelación, descongelación y revivificación se considera un subcultivo. La conservación se puede efectuar por congelación o por liofilización. El método de liofilización consiste en inocular el microorganismo de un medio crioprotector, hacer una congelación rápida con nitrógeno líquido y después pasarlo al liofilizador.

Congelación de Microorganismos

Medios de congelación

Para la congelación se utilizan medios crioprotectores:

- Caldo de TSB mas un 10-15% de glicerol.
- Caldo infusión corazón-cerebro mas un 10-15 % de glicerol.
- Medio selectivo adecuado mas un 10-15 % de glicerol.

Se pueden preparar en el laboratorio, repartiéndolos en viales con 2-4 ml y esterilizándolos en autoclave a 121 °C, 20 minutos.

Método

Se toman cuatro o cinco colonias (o más según el tamaño) del aislamiento y se suspenden en uno de los caldos crioprotectores. Se dejan en incubación durante 24 horas entre 30 y 35 °C o en las condiciones más idóneas para el crecimiento del microorganismo y posteriormente se congelan entre -15 y -50 °C. Se preparan suficientes viales para disponer de una fuente cepas patrón durante el tiempo en que se compruebe la viabilidad del microorganismo o como máximo un año. Cuando sea necesario se extrae el vial del congelador y se descongela sumergiéndolo en baño de agua a unos 40-45 °C, agitando. La suspensión que no se emplee debe desecharse y nunca recongelarse. También puede resembrarse en medio líquido o sólido “rascando” parte del congelado y devolviendo el vial al congelador. En el caso de los viales con bolitas se toman una o dos bolitas y se inoculan en un medio sólido o líquido, procediendo a la incubación en las condiciones adecuadas para el microorganismo. El cultivo obtenido por uno de estos procedimientos será el cultivo primario del trabajo.

Cultivos de trabajo

A partir del cultivo primario pueden utilizarse cuatro subcultivos de trabajo y de estos realizar dos o tres siembras, según las necesidades. Aumentar el número de resiembras incrementa el riesgo de alteración

fenotípica. Se recomienda no realizar más de 5 pases desde la cepa original.

Para obtener un subcultivo de trabajo, se siembra sobre medio inclinado o placa a partir del cultivo primario. Se incuba en las condiciones que requiera el microorganismo hasta obtener el crecimiento adecuado. Los subcultivos pueden conservarse a temperatura ambiente durante cuatro semanas, si bien es preferible mantenerlos en nevera a 2-8 °C.

Validación del archivo de microorganismos

Para validar el método de conservación debe realizarse el ciclo de congelación, descongelación y revivificación un mínimo de tres veces con todas las cepas de microorganismos que el laboratorio utilice para sus controles internos.

Se efectuara una identificación mediante pruebas bioquímicas cada ves que haya duda o semestralmente.

Suspensiones normalizadas o estandarizadas

La estandarización de las suspensiones de microorganismos proporciona una metodología de trabajo que facilita la obtención de los resultados esperados. Normalmente, la Farmacopea para ensayos de recuperación microbiana en presencia de producto (validación de la esterilidad o grado de contaminación) indica que se siembren un número determinado de microorganismos de cultivos recientes. Es por ello, que se debe tener un sistema para asegurar el numero aproximado de microorganismos que tenemos en una suspensión sin tener que esperar los resultados de un recuento (mínimo 24 horas de espera) ni trabajar a ciegas.

La manera más fácil de estandarizar una suspensión de microorganismos es por determinación de la turbidez en un espectrofotómetro o en escala de MacFarland. Siempre que preparemos la suspensión en un mismo medio y a la misma turbidez medida en espectrofotómetro a una longitud de onda determinada, tendremos aproximadamente el mismo numero de microorganismos.

Medios de Cultivo

Antes de afrontar una validación de un método microbiológico se debe tener la seguridad de que los medios de cultivo que se van a utilizar tienen una calidad adecuada. Esta calidad viene definida por sus nutritivas y selectivas. Se pueden obtener medios de cultivo de dos maneras:

a) Preparados por un laboratorio externo fabricante de medios de cultivo

Se exige un certificado de análisis de cada lote de medio donde consten los resultados obtenidos en los ensayos de esterilidad y de las propiedades nutritivas y selectivas, así como breve descripción del método de control y la fecha de caducidad. Es aconsejable que los controles se realicen como mínimo con las cepas de microorganismos que se especifican en las farmacopeas. Además es recomendable efectuar controles periódicos en el momento de la recepción en el laboratorio para comprobar la calidad de los medios. Se realizan controles visuales, controles de esterilidad y controles de crecimiento/inhibición similares a los que se describen para los medios preparados a partir de medios deshidratados.

b) Preparados en el laboratorio a partir de medios deshidratados

Los medios se preparan según las indicaciones del fabricante utilizando agua purificada (como mínimo de calidad Farmacopea Europea). En este caso se exige el certificado analítico de cada lote de medio deshidratado. Además el laboratorio debe efectuar ensayos que demuestren esterilidad y las propiedades nutritivas y selectivas de los medios de cultivo preparados a partir de medios deshidratados.

Para los medios nutritivos generales se utilizan las cepas que se indican en las Farmacopeas. Para los medios selectivos se utilizan microorganismos que presenten buen crecimiento y otros cuyo crecimiento este inhibido en este medio. Los ensayos se deben hacer para cada lote de medio que se prepare.

Es aconsejable también asignar a los medios preparados en el laboratorio una fecha de caducidad. Esta fecha depende del medio que se trate y las condiciones de conservación.

Medio sólido o líquido. Comprobación de las propiedades nutritivas

Para comprobar las propiedades nutritivas se preparan suspensiones de microorganismos que contengan aproximadamente 10^2 UFC/ml. Se inocula con 1ml de suspensión y por separado una placa de agar (en profundidad o en superficie) o un tubo, frasco de medio. Se suelen utilizar *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* para medios de recuento total y *Candida albicans* para medio de recuento de hongos. Se incuban en las condiciones adecuadas para el microorganismo y se comprueba la presencia de crecimiento.

Medio sólido o líquido. Comprobación propiedades selectivas

Se prepara la suspensión que contenga aproximadamente 10^2 UFC/ml de un microorganismo que crezca abundantemente en el medio y de otro cuyo crecimiento este inhibido. Se debe mantener un registro de preparación de medios de cultivo así como de todos los controles efectuados. (1)

POTENCIA MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS

Para determinar la potencia de antibióticos, se emplean dos métodos generales:

- Difusión en Agar
- Turbidimétrico

Estos métodos comparan la respuesta de un microorganismo específico y sensible, frente a un antibiótico estándar de actividad conocida y una muestra, bajo condiciones idénticas de ensayo.

Método de difusión en Agar

Se basa en la difusión del antibiótico desde un punto de aplicación a través de una superficie de agar inoculado con el microorganismo de prueba. La difusión origina zonas de inhibición de microorganismos, cuyo tamaño (diámetro) esta en relación con la concentración del antibiótico.

El agar para los medios de cultivo debe estar enteramente claro cuando líquido, y homogéneo opaco-translucido cuando sólido; debe tener una translucencia suficiente y permitir a colonias profundas en las placas o las culturas de la puñalada que se observarán fácilmente; no debe contener el material, el sedimento, o pedazos floculentos de papel del algodón o de filtro, éstos obstaculizan el desarrollo típico de la colonia de microorganismos y, al inexperto, se pueden algunas veces confundir desde colonias.(7)

Método turbidimétrico

Este método se efectúa en un medio de cultivo líquido inoculado con el microorganismo de prueba, al que se le agregan concentraciones crecientes del antibiótico. Después del periodo de incubación se determina la turbiedad producida por el crecimiento microbiano, el cual esta en función de la concentración del antibiótico.

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Preparación de las placas. Para cada antibiótico se seleccionan los medios de cultivo, el microorganismo de prueba e inóculo sugerido.

En cada ensayo, preparar 12 placas para la línea dosis respuesta y 3 para cada muestra.

Distribuir sobre una superficie plana y a nivel, la cantidad señalada del medio de cultivo para capa base (estéril, fundido y mantenido a 50 °C aproximadamente). Dejar las tapas de las cajas entreabiertas para evitar la acumulación de agua de condensación. Permitir que el agar solidifique y tapar.

Preparar el volumen necesario del medio de cultivo para capa de siembra (estéril, fundido y mantenido a 48-50 °C) con la cantidad sugerida de la suspensión de microorganismos. Agregar a cada caja conteniendo la capa base solidificada, el volumen de capa de siembra indicado, extender uniformemente y dejar solidificar; en las cajas así preparadas, colocar 6 cilindros de acero inoxidable a intervalos regulares a 60 °C sobre un radio de 2.8cm.

Para la curva de referencia, utilizar un total de 12 placas, 3 para cada una de las soluciones de la curva, excepto para la concentración central o punto de referencia de la curva, esta se incluye en todas las placas. En cada conjunto de 3 placas, llenar 3 cilindros con la concentración media de referencia y alternar 3 cilindros con la concentración más baja de la curva y así sucesivamente con cada concentración de referencia. De esta manera se tendrán 36 zonas de inhibición para la concentración de la SRef y 9 zonas de inhibición para cada una de las otras 4 concentraciones de la curva (a, b, d, e).

Para cada muestra se emplean 3 placas, en las que se llenan 3 cilindros de cada una de ellas con la concentración media de referencia y 3 con la solución de la muestra preparada a la misma concentración media de referencia. Incubar las placas durante 16 horas a 18 horas y a la temperatura indicada para cada antibiótico. Después del periodo de incubación medir el diámetro de las zonas de inhibición.

MÉTODO TURBIDIMETRICO

Para cada antibiótico seleccionar el microorganismo de prueba, medio de cultivo e inóculo sugerido y proceder como sigue: Emplear 15 tubos para los 5 puntos de la línea dosis respuesta y tres para cada muestra.

Colocar 1.0 ml de cada concentración de SRef y de la muestra a la concentración media en cada conjunto de 3 tubos. Agregar a cada tubo 9 ml del medio de cultivo inoculado e incubar de 2 horas a 4 horas en un BM a la temperatura indicada para cada antibiótico. El tiempo de incubación puede determinarse observando el desarrollo en la concentración media de la SRef, el punto final del ensayo es cuando los tubos conteniendo la concentración media de SRef proporcionen lecturas aproximadas del 50 por ciento de transmitancia, aproximadamente.

Retirar los tubos del BM y detener el desarrollo inmediatamente agregando a cada tubo 0.5ml de una solución de formaldehído al 12 por ciento.

Determinar el valor de transmitancia para cada tubo en un fotómetro a una longitud de onda de 530 nanómetros.

Ajustar el instrumento a 100 por ciento de transmitancia con un blanco del medio de cultivo sin inocular y 0.5ml de formaldehído al 12 por ciento.

Trazar la línea dosis respuesta en papel semilogaritmico de un ciclo colocando los valores de la concentración en la escala logarítmica y los valores de transmitancia en la escala aritmética.

La línea dosis respuesta se traza a través de todos los puntos, o bien utilizando los valores alto (H) y bajo (L) obtenidos bajo la siguiente fórmula:

$$L = (3a + 2b + c - e) / 5$$
$$H = (3e + 2d + c - a) / 5$$

En donde L, es el valor de transmitancia calculado para la concentración mas baja de la SRef; H es el valor de transmitancia calculado para la concentración mas alta de la SRef; a, b, c, d, e, son los promedios de los valores de transmitancia para cada concentración de la SRef, del mas bajo al mas alto respectivamente.

Estimación de la potencia de la muestra

Promediar los valores de transmitancia para la muestra y determinar la concentración interpolando en la línea dosis respuesta. Multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución para encontrar el contenido del antibiótico en la muestra. (3)

Factores determinantes

La buena ejecución del método depende de que los siguientes factores sean apropiados y estén bien controlados:

- Microorganismos
- Agar
- pH
- Diámetro de los cilindros (difusión en agar)
- Espectrofotómetro calibrado (turbidimetría)
- Rango de concentraciones
- Temperatura de incubación de las placas o tubos
- Tiempo.

VALIDACION

Definición de validación

Según la Food and Drug Administration (FDA) "Validación es establecer una evidencia documentada que provea un alto grado de garantía de que un proceso específico producirá, de forma consistente, un producto que cumpla con sus especificaciones predeterminadas y atributos de calidad.

La cualificación se refiere esencialmente al funcionamiento de la maquinaria, equipos y aparatos de laboratorio en los cuales se ha de demostrar experimental y documentalmente que funcionan de acuerdo con el uso previsto.

La validación se refiere a procesos, sistemas y métodos; si tenemos en cuenta que la validación es establecer una evidencia documentada de que un proceso se realiza correctamente y produce un producto que está dentro de las especificaciones predeterminadas (nivel de calidad exigido), es evidente que antes de validar un proceso, hemos de tener cualificado la maquinaria necesaria para realizar aquel ensayo.

Existen dos tipos de validación:

- Prospectiva: Se efectúa antes de la comercialización del producto.
- Retrospectiva: Se efectúa con los datos obtenidos mediante ensayos posteriores realizados sobre el producto ya comercializado.(6)

Principios básicos de la validación

El proceso de validación es un elemento clave para asegurar que se cumplen con los objetivos de Garantía de Calidad.

- Por ello la validación debe servir como una garantía de calidad del equipo, procedimiento, proceso, material, actividad, sistema que intervenga en la fabricación del producto farmacéutico y que por lo tanto influya de forma muy directa en la calidad del mismo.
- Debe demostrarse que el equipo, proceso, material, actividad o sistema es homogéneo, fiable y reproducible para conseguir un producto que cumpla las especificaciones establecidas dentro de unos intervalos definidos.
- Esta demostración debe documentarse adecuadamente con las pruebas que se hayan realizado y los datos que se hayan obtenido, según el protocolo de validación definido.

Consideraciones preliminares de la validación

Durante los estudios de investigación y desarrollo farmacéutico, el producto debe definirse cuidadosamente en relación a sus características físicas, químicas y tecnológicas: Es importante trasladar las características del producto a las especificaciones como base para la descripción y control del producto.

La documentación de los cambios realizados durante el desarrollo, provee adecuada trazabilidad, la cual puede ser utilizada mas tarde para futuros problemas.

Deben considerarse todos los aspectos pertinentes del producto los cuales influyen sobre la seguridad y eficacia tales como estabilidad, biodisponibilidad y fiabilidad del proceso. Se han de establecer rangos o limites para cada característica. Estos rangos se han de expresar en términos fácilmente mesurables.

La validez y aceptación de las especificaciones debe verificarse a través de los ensayos del producto y sobre bases científicas, durante las fases iniciales de desarrollo y de producción.

Una vez demostrado que las especificaciones son aceptables, es importante que cualquier cambio de ellos, este de acuerdo con los procedimientos de control de cambios. (2)

El ensayo debe diseñarse de forma que permita examinar la validez del modelo matemático en el que se basa la ecuación de la potencia si se escoge el modelo de las líneas paralelas, las dos líneas de logaritmos de dosis respuesta deben ser paralelas, y lineales en el rango de dosis usadas en el cálculo. Estas condiciones deben verificarse por ensayos de validación con una probabilidad $P= 0.05$. Pueden usarse otros modelos si se demuestra su validez.

Los pasos a seguir para la validación de una valoración de antibióticos son:

LINEALIDAD

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Siempre que sea posible se buscara una respuesta de tipo lineal que facilitara su trazado, interpolación e interpretación.

Procedimiento de determinación de linealidad

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento.

- Dentro del rango establecido se recomiendan estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado ($K=5$, n° de replicas=3 con un total de 15 determinaciones($n=15$)).

- Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes, ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando disoluciones. No obstante para evaluar la linealidad en las impurezas se suelen utilizar sucesivas disoluciones ya que normalmente se trabajan niveles de concentración muy bajos y esto dificultaría las pesadas.

- El número de repeticiones en cada muestra dependerá de la precisión del sistema instrumental empleado, y de lo que se decidirá incluir como rutina en el procedimiento analítico a emplear.

Evaluación estadística de la linealidad

El estudio de la linealidad no solo implica una representación grafica sino que es necesario realizar una comprobación estadística.

Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2).

El coeficiente de correlación nos indica el grado de relación entre las variable x (concentración), la variable y (respuesta). Su valor máximo es 1, si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una posibilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de la relación lineal entre las variables.

El valor recomendable para el coeficiente de correlación es ≥ 0.95 .

La información obtenida mediante el cálculo r es ilimitada y no justificada por sí sola la linealidad, siendo r^2 el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variabilidad total de y explicada por el modelo.

Variación residual constante (homoscedasticidad)

La representación de los residuales e ; aporta mucha información acerca de la validez del modelo. De entre las diversas formas de hacerlo la más habitual consiste en representar los residuales (eje de ordenadas) frente a los valores estimados (eje de abscisas). La distribución de los puntos debería ser aleatoria, no reflejar ninguna tendencia.

Test de Linealidad

Existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

a. Coefficiente de correlación de los factores de respuesta (f)

El factor de respuesta expresa la relación entre la lectura y la respuesta (área) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Valores del coeficiente de variación superiores al 5% serían indicativos de una posible falta de linealidad, siendo recomendable valores no superables al 2%.

b. Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente.

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba de t de student.

Consiste en:

- Demostrar que la recta de regresión construida con el logaritmo de la dosis del antibiótico patrón y la respuesta cumple con los parámetros de regresión lineal y análisis de la varianza.
- Demostrar que la recta de regresión construida con una muestra de producto acabado que contiene el antibiótico a las mismas dosis que la recta del patrón, presenta una relación log. Dosis respuesta que cumple con los parámetros de regresión lineal y análisis de la variancia.
- Demostrar que las dos rectas (patrón y problema) cumplen con el test de coincidencia. Para construir las rectas de regresión, se prepara 5 dosis de antibiótico en progresión geométrica. Una vez efectuado el ensayo, ya sea por difusión en agar o turbidimétrico, obtenemos unos resultados que son los que utilizamos para los cálculos de las rectas.

Para aceptar la validación de la linealidad, se efectúa el ensayo de comprobación de las rectas patrón-problema por triplicado.

Criterios de aceptación:

- ❖ Coeficiente de determinación
- ❖ Cumplimiento de las condiciones de aceptación:
 - a) Normalidad de los resultados.
 - b) Homocedasticidad de los resultados.
- ❖ Análisis de la variancia.
- ❖ Test F1 para la regresión lineal o pendiente.
- ❖ Test para la linealidad, falta de ajuste o curvatura

Análisis de variancia: ANOVA

El análisis de varianza o ANOVA es una herramienta estadística que permite comparar simultáneamente varias medias muestrales. Las medias se comparan para establecer si son todas iguales (hipótesis nulas) o si al menos una de ellas es distinta de las demás (hipótesis alternativa).

El nombre de ANOVA hace ilusión a que la comparación de mas de dos medias se realiza mediante el calculo y la comparación de dos varianzas, pero se debe tener presente que el objetivo es comparar medias y no varianzas.(14)

Para poder realizar un ANOVA se deben cumplir los siguientes supuestos:

- Homogeneidad de variancias.
- Normalidad de los residuales.

Homogeneidad de variancias:

Se puede comprobar aplicando un test. Estadísticamente seria mas correcto normalizar previamente las respuestas, ya que de lo contrario se compararan coeficientes de variación que corresponden a medidas de concentración diferentes entre si. De todas formas es habitual efectuar el test sin cumplir este requisito cuando el intervalo de concentraciones no es excesivamente amplio.

Normalidad de los residuales:

Se puede comprobar mediante la representación grafica que algunos programas estadísticos realizan de los mismos o bien aplicando un test de normalidad. Una vez comprobados estos supuestos se calcularan los estadísticos F1 Y F2.

REPETIBILIDAD (PRECISION) MISMO LABORATORIO EN IDENTICAS CONDICIONES

La procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión puede ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio.

El objetivo de estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el mas-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo).

La precisión engloba diferentes tipos de estudio:

Repetibilidad

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista con los mismos aparatos y reactivos) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

Uno de los factores que más pueden influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas aumenta al disminuir la concentración del analito. Cuando se trabaja a concentraciones altas se aceptan valores de coeficiente de variación mas bajos que cuando se trabaja a concentraciones mas bajas.

Precisión intermedia

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.

Reproducibilidad

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas.

Se determina a partir de un blanco de excipientes al que se le añade la cantidad de antibiótico correspondiente al 100% teórico.

Después de realizar la valoración (9 replicas) se obtienen unos resultados con los cuales se calcula:

- La media
- La desviación estándar (variabilidad del método)
- La desviación estándar de la media
- El coeficiente de variación
- Los límites de confianza de la media
- Los límites de confianza de la desviación estándar
- La tolerancia, que expresa la variabilidad del método respecto al intervalo entre las especificaciones superior e inferior.

Criterios de aceptación:

- ❖ Coeficiente de variación: Para unos límites de 90-125%
- ❖ Tolerancia: 30%.

EXACTITUD

Para determinar la exactitud se preparan 3 alícuotas de un blanco con los excipientes, se añaden a una de ellas la cantidad de antibiótico correspondiente al límite inferior de aceptación, en la otra alícuota se añade la cantidad correspondiente al 100% y en la tercera la cantidad correspondiente al límite superior de aceptación.

Se efectúan tres valoraciones de cada una de las alícuotas y con los resultados obtenidos se comprueba que se cumplan los parámetros estadísticos que definen la exactitud:

- Homogeneidad de variancias
- Test t de student
- Determinación del sesgo o error determinado

Criterios de aceptación

- ❖ Homogeneidad de variancia (no significativo)
- ❖ Sesgo 3%.

Ensayo del producto

En las valoraciones de la rutina cuando la linealidad del sistema ha sido demostrada, usar un ensayo de 3 puntos.

Usar en cada ensayo el número de replicas por dosis que aseguren la precisión requerida. Tomar al menos tres unidades del lote, que correspondan al principio, mitad y final del lote.

Periodicidad de la validación

Farmacopea Europea no indica la periodicidad de la validación, solo se requiere la validación al inicio de control del producto o cuando hay un cambio en la formulación o en el método de validación. (1)

INCERTIDUMBRE

La Guía para la Expresión de la Incertidumbre (GUM ISO 1993) define la incertidumbre de medición como un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos al *mensurando*.

El total de la incertidumbre de un resultado de la prueba consiste en una serie de varios componentes. En Microbiología, por lo menos tres factores están siempre implicados: la incertidumbre del inóculo volumen, al azar debido a la dispersión de partículas estadísticas, y la incertidumbre de la lectura del resultado.

La incertidumbre de dilución es con frecuencia un cuarto factor. La guía ISO incertidumbre (Anon. 1995) clasifica los métodos de estimación de la incertidumbre en dos tipos de llamada de tipo A y tipo B de evaluación (de la incertidumbre).

Tipo A de la evaluación:

El tipo A desviación estándar (incertidumbre estándar) se calcula a partir de una serie de n independiente de mediciones paralelas x_1, x_2, \dots, x_n de la prueba de cantidad por medio de la convencional estadística fórmula de la desviación estándar experimental:

$$s(x) = s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

(X es la media aritmética)

Un tipo de evaluación puede referirse al resultado de la prueba final del procedimiento analítico o una parte de ella (por ejemplo, un volumen de medición).

Un gran número de paralelismos es esencial para una estimación del tipo A. Por ejemplo, la incertidumbre de una estimación basada en 30 mediciones independientes es del 13%, la de una muestra de dos mediciones es considerablemente mayor, el 76% (Anon. 1995).

Tipo B de evaluación:

De acuerdo a la norma ISO (Anon. 1995) en la evaluación de tipo B el valor numérico de la incertidumbre de medición se calcula por otros medios que los métodos estadísticos.

Incertidumbre combinada:

Por lo general, no es factible hacer serie de mediciones repetidas en la vigilancia rutinaria para obtener una estimación del tipo **A** de la incertidumbre de un resultado de la prueba final. Con algunos métodos químicos es posible asumir la validez general del método específico repetibilidad y reproducibilidad parámetros (precisión de las estimaciones), determinado en método de colaboración rendimiento estudios.

Existen razones por las cuales este enfoque es probable que ser menos éxito en la microbiología. Uno de ellos es la colonia impredecible número que varía de caso a caso y por lo general es la principal causa de la incertidumbre. El otro es la inestabilidad de muestras. La incertidumbre de un resultado de la prueba depende demasiado de las irrepetibles condiciones en las que una prueba se hace.

El mejor enfoque en la microbiología parece ser para componer una estimación de la incertidumbre separado de la unidad de operaciones el procedimiento analítico, que se estima por cualquier medio disponible. Un procedimiento matemático, llamada la ley de propagación de la incertidumbre (Anon 1995), se aplica.

La combinación de incertidumbre estimación se basa en el reconocimiento y la lista de las más importantes componentes de la incertidumbre del proceso analítico, teniendo cuidado de evitar "doublecounting", es decir, incluida cualquier incertidumbre componente más de una vez. Encontrar un valor para por cada uno de los componentes de tipo **A** o tipo **B** y la combinación de procesos que hace matemáticamente. Es posible componer una estimación de la incertidumbre de la medición de cualquier situación excepcional.

Algunos de los componentes de incertidumbre son las mejores estimaciones de las medidas de calibración en el propio laboratorio. Asimismo, el análisis de la varianza de los experimentos anteriores, posiblemente llevado a cabo para completamente otros fines, pueden ser fuentes adecuadas de información sobre la variabilidad de la prueba resultados.

Fuentes de información

Cuando sea necesario, otros medios de estimación se utilizan. Los medios incluyen asumió estadística distribuciones (Poisson, binomial) o supone a priori la distribución de posibles valores (rectangulares y triangulares las distribuciones). Otros medios podrían incluir valores basados en experiencia u otra información, así como equipo de las especificaciones de los fabricantes, la literatura científica, la experiencia general del instrumento 'errores', la homogeneidad de los materiales, calibración y certificación de los informes, incertidumbre y valores indicados en los manuales. Incluso una suposición podría ser aceptable si nada más está disponible. Las fuentes de información deben indicar en el informe de la incertidumbre. (5)

Formas de evaluar la incertidumbre (u_i)

A. Por los métodos estadísticos: Evaluación de la desviación estándar a partir de una serie de observaciones ($u_i = s_i / \sqrt{n_i/2}$); utilizando el método de los mínimos cuadrados o el de máxima probabilidad para evaluar la desviación estándar de los coeficientes del modelo lineal y su varianza residual; por análisis de varianza (ANOVA) para identificar y cuantificar los efectos aleatorios en ciertos tipos de mediciones.

B. Por las leyes de la distribución: normal, triangular y rectangular, U.

Ley de la Propagación de la Incertidumbre

La incertidumbre estándar de un mensurando que depende de variables analíticas (concentración de estándar certificado, pureza, peso de muestra, factores de dilución, parámetros ambientales, datos de validación, etc.), se obtiene por combinación de las incertidumbres estándares de las diferentes observables a través de la ley de la propagación de la incertidumbre (o propagación de errores).

Existen dos casos: cuando las variables son independientes y cuando están correlacionadas.

METANOL

El compuesto químico metanol, también conocido como alcohol metílico o alcohol de madera, es el alcohol más sencillo. Es un líquido ligero, incoloro, inflamable y tóxico que se emplea como anticongelante, disolvente y combustible. Su fórmula química es CH_3OH .

Precauciones

A concentraciones elevadas el metanol puede causar dolor de cabeza, mareo, náusea, vómitos y muerte (en el peor de los casos). Una exposición aguda puede causar ceguera o pérdida de la visión, ya que puede dañar seriamente el nervio óptico. Una exposición crónica puede ser causa de daños al hígado o de cirrosis. La dosis letal de metanol para los humanos varía entre 0,3 gramos y 1 gramo por kilogramo de masa corpórea.

El metanol, a pesar de su toxicidad, es muy importante en la fabricación de medicinas.

Usos

El metanol tiene varios usos. Es un disolvente industrial y se emplea como materia prima en la fabricación de formaldehído. El metanol también se emplea como anticongelante en vehículos, combustible de bombonas de camping-gas, disolvente de tintas, tintes, resinas y adhesivos. El metanol puede ser también añadido al etanol para hacer que éste no sea apto para el consumo humano (el metanol es altamente tóxico).

Un grupo funcional es un átomo o grupo de átomos que forman parte de una molécula y que determina el comportamiento físico y químico de un grupo de compuestos. Los grupos funcionales presentan el mismo o muy

Semejante comportamiento químico en todas las moléculas donde se encuentran.

MEDIOS

Antibiótico número 11

Base para determinación de potencia antibiótica por la técnica de ensayo microbiológico.

Instrucciones: Suspensa 30.5g del polvo en 1000ml de agua purificada. Mezcle bien. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Autoclave a 121°C durante 15 minutos. Para elevar el pH a 8.3 ± 0.1 , enfríe la base a una temperatura

de entre 45 y 50°C y agregue NADH. Analice muestras del producto final para verificar su rendimiento usando cultivos de control típicos y estables.

Formula aproximada por litro:

Extracto de res 1.5g

Extracto de levadura 3.0

Digerido pancreático
de caseina 4.0

Peptona 6.0

Dextrosa 1.0

Agar 15.0

pH final 7.95 ± 0.05 . Higroscópico.

Antibiótico numero 1

Base para determinación de potencia antibiótica por la técnica de ensayo microbiológico.

Instrucciones: Suspensa 30.5g del polvo en 1000ml de agua purificada. Mezcle bien. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Autoclave a 121°C durante 15 minutos. Para elevar el pH a 8.3 ± 0.1 , enfríe la base a una temperatura de entre 45 y 50°C y agregue NADH. Analice muestras del producto final para verificar su rendimiento usando cultivos de control típicos y estables.

Formula aproximada por litro:

Extracto de res 1.5g

Extracto de levadura 3.0

Digerido pancreático
de caseina 4.0

Peptona 6.0

Dextrosa 1.0

Agar 15.0

pH final 6.55 ± 0.05 . 25°C.

MICROCOCCUS

Micrococcus es un género de bacteria del filo Actinobacteria. 'Se encuentran en ambientes diversos, incluyendo agua y suelo. Son bacterias Gram-positivas con células esféricas de diámetro comprendido entre 0,5 y 3 micrómetros que típicamente aparecen en tétradas. *Micrococcus* tiene una gruesa pared celular que puede abarcar tanto como el 50% de la materia celular. Su genoma es rico en guanina y citosina (GC), típicamente en porcentaje del 65 al 75% de contenido GC. A menudo contienen plásmidos (de tamaño comprendido entre 1 y 100MDa) que proporcionan al organismo características útiles.

Especies

Algunas especies de *Micrococcus*, tales como *M. luteus* (amarillo) y *M. roseus* (rojo) producen colonias de color amarillo o rosa cuando crecen sobre un medio sólido. En muestras de *M. luteus* se ha detectado que sobre producen riboflavina cuando crecen sobre medios orgánicos tóxicos tales como piridina. Estudios de hibridación indican que las distintas especies del género *Micrococcus* no están próximamente emparentadas, presentando una homología de secuencias genéticas tan pequeña como el 50%. Esto sugiere que algunas especies *Micrococcus* podrían, sobre la bases del análisis de ARN ribosómico, ser reclasificadas en otros géneros.

Hábitats

Estas bacterias se han aislado de la piel humana, productos lácteos y de origen animal, cerveza, etc. También se encuentran en muchos otros ambientes, incluyendo agua y suelo. *M. luteus* vive sobre la piel humana y transforma el sudor en compuestos de olor desagradable. Las especies de este género pueden crecer bien en ambientes con poca agua o con altas concentraciones de sal. La mayoría son mesófilos; algunos como *Micrococcus antarcticus* (encontrado en la Antártida) son psicrófilos.

Aunque no forman esporas, las células de *Micrococcus* pueden sobrevivir durante largos periodos: cultivos no protegidos en muestras de suelo han revivido después de estar almacenados en un refrigerador durante 10 años. Un trabajo reciente de Greenblat et al. prueba que *Micrococcus luteus* ha sobrevivido durante por lo menos 34.000 - 170.000 años sobre la base del análisis de ARNr 16S rRNA, y posiblemente mucho más.

Patogénesis

Se tiende a pensar que *Micrococcus* es generalmente un organismo comensal o saprofítico, aunque podría ser también un patógeno oportunista, particularmente en pacientes con inmunodeficiencia, tales como enfermos de VIH. Puede ser difícil identificar *Micrococcus* como la

causa de una infección puesto que el organismo está presente normalmente en la microflora cutánea. El género es raramente asociado con enfermedades. En raras ocasiones la muerte de pacientes inmunodeprimidos se ha debido a infecciones pulmonares producidas por *Micrococcus*. También puede estar implicado en otras infecciones, incluyendo bacteriemia recurrente, shock séptico, artritis séptica, endocarditis, meningitis y neumonía cavitating (pacientes inmuno deprimidos).

Usos industriales

Micrococcus, como muchos otros géneros de Actinobacteria, pueden ser catabólicamente versátiles, con la habilidad de utilizar un extenso rango de sustratos inusuales, tales como piridina, herbicidas, bifenilos policlorados y petróleo. Pueden también realizar la detoxificación o biodegradación de muchos otros contaminantes ambientales. Otros Micrococcus producen varios productos útiles, tales como largas cadenas (C21-C34) de hidrocarburos alifáticos para aceites lubricantes. (15)

MATERIAL Y METODOS

Tipo de estudio: Experimental.

Muestreo: No probabilístico.

Área de estudio Este estudio fue realizado en el Área de Microbiología del Departamento de Análisis de Drogas, Tóxicos y Medicamentos de la Facultad de Ciencias Químicas, UNAN-LEON.

Universo: Suspensiones de Eritromicina de un laboratorio nacional. El número de lote, tamaño de lote, fecha de fabricación del producto, fecha de caducidad no puede ser revelado debido al compromiso de confidencialidad y ética que el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos tiene para con el laboratorio al que se le realice el análisis.

Muestra: Dos muestras de 100 ml del antibiótico Eritromicina 250mg/5ml. Con la muestra no hubo criterio de selección, se tomaron dos muestras al azar de las muestras que habían sido entregadas al laboratorio de control de calidad de medicamentos para su respectivo análisis.

Unidad de Análisis: Eritromicina 250mg/5ml.

Variables: Actividad Bactericida.

Concentración.

pH.

Material:

La interpretación de los resultados incluye las siguientes etapas:

- ✚ Preparación del inóculo.
- ✚ Preparación de la muestra y soluciones de referencia.
- ✚ Preparación de platos petri.
- ✚ Incubación.
- ✚ Lectura de halos.
- ✚ Procesamiento de datos.

Todo el material debe estar limpio y estéril o perfectamente enjuagado con agua destilada para eliminar cualquier residuo que pueda afectar el crecimiento de microorganismo de prueba. El material de vidrio para mantenimiento, manejo, transferencia y desarrollo de los microorganismos, debe esterilizarse por calor seco a 170°C-180°C durante 1 hora.

- Cajas petri de 100mm x 20mm.
- Tapas de porcelana porosa
- Cilindros de acero inoxidable de las siguientes medidas: 10mm +-0.1mm de longitud, 8mm+-0.1mm de diámetro externo, 6mm +-0.1mm de diámetro interno.
- Medidor de zonas (vernier, reglas milimétricas, proyector óptico)
- Tubos de vidrio de 16 mm x 125mm x 150mm con tapones de plástico o acero inoxidable resistente a la esterilización.
- Colorimétrico fotoeléctrico a 530-580 nm.
- Baño de agua con una variación de +-0.1°C (respecto a la temperatura seleccionada)
- Autoclave.
- Horno esterilizador.
- Incubadora.
- Erlenmeyer 250ml.
- Pinzas estériles.
- Balón.
- Espátula.
- Probeta 100ml.
- Pipeta 2ml, 10ml.
- Micropipeta.
- Asa.
- Balón 25ml, 100ml, 1000ml.
- Ph metro.
- Refrigerador.
- Mechero.
- Horno esterilizador.

Otros:

- Algodón.
- Papel aluminio.
- Fósforos.
- Gradilla.
- Boquilla.
- Guantes.
- Gorros.

Método:

Se preparan cinco soluciones estándar (1.415, 2, 2.83, 4, 5.67ug/ml) donde S3 es la dosis media. Se prepara un nivel de la muestra a una concentración igual que el nivel medio del estándar (S3=D3).

El método a emplear en el ensayo es el método cilindro en placa según recomendaciones de la USP el que consiste en verter 21ml de medio agar 11 y se deja solidificar en una superficie a nivel (capa de agar base) se añaden 5ml del medio con *Micrococcus luteus* (capa siembra) a cada placa, se rota la placa de manera que el agar inoculado cubra toda la superficie de manera uniforme, se deja solidificar. Se colocan 6 cilindros de acero inoxidable en la superficie del medio agarizado, los cilindros se llenan de manera alterna con la solución de dosis media y otra de dosis de prueba. El método se realiza por triplicado 5+1:

- ✓ Tres cilindros con solución S1 y los otros tres con S3.
- ✓ Tres cilindros con solución S2 y los otros tres con S3.
- ✓ Tres cilindros con solución S4 y los otros tres con S3.
- ✓ Tres cilindros con solución S5 y los otros tres con S3.

Las placas se colocan a una temperatura entre 4-10°C por 30 minutos y luego se incuban a 35-37°C por 18-24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se retiran los cilindros y se miden los halos de inhibición formados con un lector de zona.

Se utiliza el diseño experimental cilindro en placa. El ensayo se realiza guardando las buenas prácticas de laboratorio.

Se esteriliza el material y se calibra el equipo a ser utilizado, el ambiente debe estar descontaminado para evitar el crecimiento de cualquier microorganismo distinto al que se estudia, las mesas de trabajo se limpian con alcohol al 70% antes de ser utilizadas.

Preparación de la suspensión del microorganismo de prueba.

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos se siembra *Micrococcus luteus* en tubos con el medio 1 en posición inclinada. Incubar 32-35°C durante 24 horas. Cosechar el crecimiento con 3ml de solución salina estéril. Inocular con esa suspensión 5 tubos de microorganismos que contienen aproximadamente 9 ml de medio de cultivo inclinado. Incubar a 32-35°C durante 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación cosechar el crecimiento de cada tubo con aproximadamente 4 ml de solución salina.

Ajuste de la suspensión. Determinar la suspensión original, la dilución que permita obtener en un fotocolimetro y a una longitud de onda de 580nm, un 25 por ciento de transmitancia \pm 2 por ciento. La dilución solo sirve de referencia para el ajuste de la suspensión original con la cual se debe inocular el medio para capa de siembra. Se determina el volumen de suspensión original que debe agregarse al medio para capa siembra 1.5ml, para obtener zonas de inhibición bien definidas y medibles. Conservar la suspensión original en refrigeración.

Preparación de las soluciones de trabajo.

Previo a la preparación de las soluciones de trabajo, se pesa la cantidad indicada del antibiótico indicado 100 mg de Eritromicina se disuelven en 10ml metanol, se prepara Buffer 3 a pH 8 ± 0.1 utilizándolo como diluyente final hasta poder llegar a obtener las concentraciones deseadas.

Teniendo una solución Stock a una concentración de 1mg/ml se procede a realizar los cálculos necesarios para preparar 50 ml de cada solución de trabajo, las concentraciones son:

- Para solución 1: 1.415 ug/ml
- Para solución 2: 2 ug/ml
- Para solución 3: 2.83 ug/ml
- Para solución 4: 4 ug/ml
- Para solución 5: 5.67 ug/ml
- Para M3: Igual que S3.

Siendo estas las asignadas para el método 5+1. En el caso del método 3+3 las concentraciones son las siguientes:

- Para solución 2: 2 ug/ml
- Para solución 3: 2.83 ug/ml
- Para solución 4: 4 ug/ml

Las concentraciones se obtienen manteniendo una relación de 1.415.

Estas son preparadas el mismo día del ensayo junto con la solución stock y el restante de cada solución es descartado. Por tanto un ensayo es

Independiente de otro siempre manteniendo cada solución con su respectiva concentración.

Preparación de platos petri.

- Platos petri o placas petri deben estar previamente estériles como el resto de material a utilizar, debe estar seco y con tapas de porcelana para evitar alguna posible reacción de fotosensibilidad del fármaco.
- A estas placas se le introduce capa base de medio 11, 21ml a cada placa, se deja solidificar y luego se adiciona medio 11 conteniendo 1.5ml de *Micrococcus luteus* 4ml a cada placa, la manipulación debe hacerse cerca del mechero, se dejan molificar las capas contenidas en la placa.
- Una vez solidificado el agar, se introducen los cilindros de acero inoxidable a cada placa (6 en total) estos se introducen con una pinza estéril.
- Se procede a ser llenados de forma alterna con la solución de dosis media y otra dosis de prueba.
- Se tapa cada placa y se procede a incubarlas.
- Se utiliza un total de 15 placas.

Incubación

Se procede a incubar las 15 placas con su respectivo cilindros a una temperatura de 37°C por un periodo de 18-24 horas, estas nunca deben ser invertidas pues los cilindros se caerían y los halos no se formarían.

Lectura de halos

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se retiraran las placas de la incubadora, se retirara cada cilindro de cada placa con una pinza y se procede a leer cada halo formado haciendo uso del lector de zona.

Procesamiento de datos

En el procesamiento de datos se promedian los diámetros de las 9 zonas de inhibición correspondientes a cada una de las soluciones de trabajo, obteniéndose el promedio de S1, S2, S4, S5. Se promedian también los 36 diámetros de las zonas de inhibición de la solución de referencia, obteniéndose su respuesta promedio, este se considera el diámetro correcto y por lo tanto se usa para corregir los diámetros.

Cuando el promedio total es mayor que el promedio parcial se resta de aquel y la diferencia es el factor de corrección con signo positivo, cuando el valor promedio parcial resulta mayor que el valor promedio total la diferencia es el factor de corrección con signo negativo.

Una vez que se obtienen los datos, estos se procesan mediante un método estadístico, el programa utilizado para digitar los datos es Microsoft Excel.

RESULTADOS

Resultado No 1

Lectura en mm de halos

Concentración	Respuesta
1.415	17.2
1.415	18.6
1.415	17
1.415	19.4
1.415	19.2
1.415	20.4
1.415	17.8
1.415	18.2
1.415	19.4
2	20
2	20
2	20
2	20
2	20
2	20
2	20
2	20
2	20
2	20
2.83	20
2.83	21.2
2.83	21.2
2.83	22.2
2.83	22.2
2.83	22.2
2.83	22.6
2.83	21.4
2.83	22.4
2.83	20.8
2.83	21.8
2.83	21.8
2.83	22.8
2.83	23.2
2.83	21.2
2.83	22.4
2.83	22
2.83	21.8
2.83	22
2.83	20.2

2.83	21.4
2.83	21.8
2.83	18.2
2.83	22.4
2.83	22.8
2.83	22.6
2.83	22.6
2.83	21.6
2.83	21.4
2.83	21.6
2.83	21
2.83	22.4
2.83	20.6
2.83	21
2.83	20.4
2.83	19.8
4	22.2
4	22.4
4	23.8
4	19.6
4	19.2
4	23.4
4	24.4
4	25.6
4	25
5.6	25
5.6	24.8
5.6	24.6
5.6	25.2
5.6	25
5.6	23
5.6	24.4
5.6	23
5.6	24

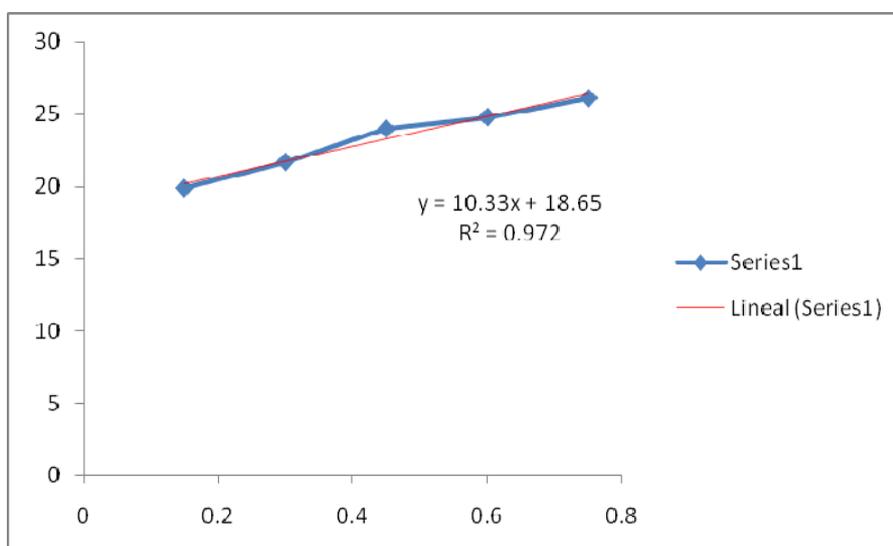
Resultado No 2

Linealidad

Concentración	Medida en mm		Xi-Xm	Yi-Ym	(Xi-Xm)(Yi-Ym)	(Xi-Xm) ²	\hat{y}	Yi- \hat{y}	(Yi- \hat{y}) ²	\hat{y} -Ym	(\hat{y} -Ym) ²
	Ensayo 2	X2									
0.15	19.9	0.0225	0.3	3.4	1.02	0.09	20.2	-0.3	0.09	3.1	9.61
0.3	21.7	0.09	0.15	1.6	1.60	0.02	21.7	0.0	0.0025	1.5	2.4025
0.45	24	0.2025	0	0.7	0	0	23.3	0.7	0.49	0	0
0.6	24.8	0.36	0.15	1.5	0.23	0.02	24.8	0.0	0.0025	1.5	2.4025
0.75	26.1	0.5625	0.3	2.8	0.84	0.09	26.4	-0.3	0.09	3.1	9.61

Resultado No 3

Linealidad



Resultado No 4

Linealidad

Media	0.45	23.3
Pendiente	10.33333333	
Intercepto	18.65	
variancia de los residuales	0.225	
Coeficiente de determinación	0.995067088	
Coeficiente de correlación	0.986241383	
Concentración del analito	0.517741935	0.45
Variancia de la b1	0.181818182	
Variancia del b0	0.045	
Coeficiente de determinación (r2)	≥ 0.95	

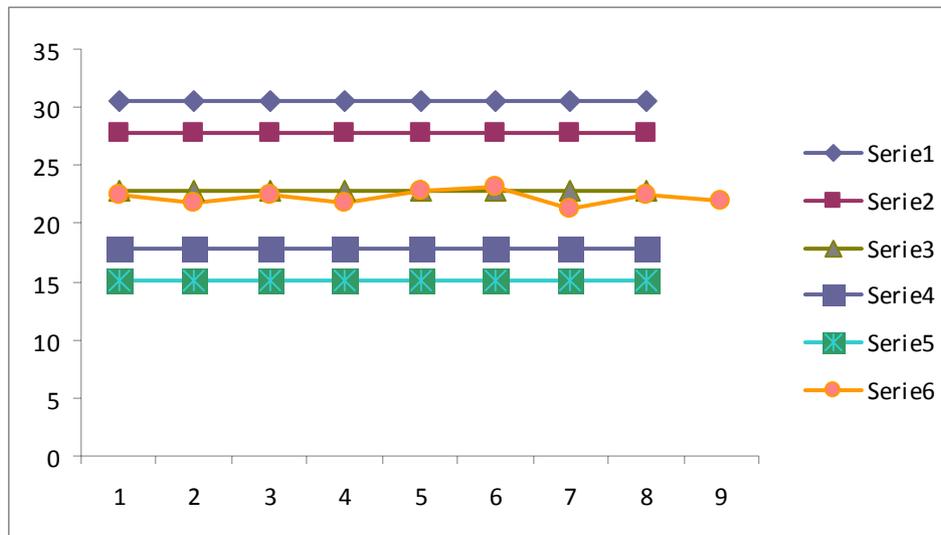
Resultado No 5

Carta Control

3LS	2LS	LC	2LI	3LI
30,5	27,8	22,8	17,8	15,1
30,5	27,8	22,8	17,8	15,1
30,5	27,8	22,8	17,8	15,1
30,5	27,8	22,8	17,8	15,1
30,5	27,8	22,8	17,8	15,1
30,5	27,8	22,8	17,8	15,1
30,5	27,8	22,8	17,8	15,1
30,5	27,8	22,8	17,8	15,1

Resultado No 6

Carta control



Resultado No 7

Análisis de variancia de un factor

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Ensayo 1	5	107.4	21.48	6.727
Ensayo 2	5	116.5	23.3	6.175
Ensayo 3	5	118.6	23.72	6.632
			22.83333333	6.511333333

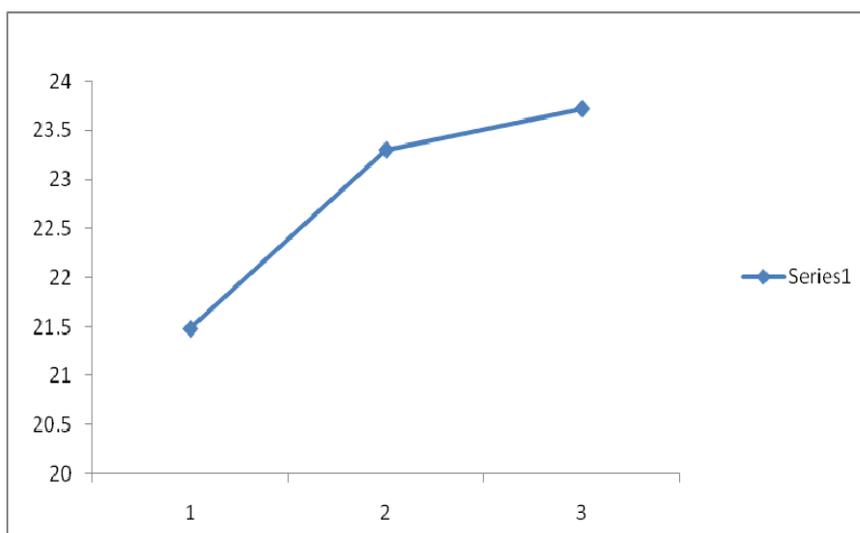
Resultado No 8

Relación concentración-respuesta

	Medida en mm	Medida en mm	Medida en mm	promedio	
Concentración	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Global	
0.15	18.6	19.9	20.8		
0.3	19	21.7	21.2		
0.45	22.1	24	24.8		
0.6	23.2	24.8	25.2		
0.75	24.5	26.1	26.6		
Media	0.45	21.48	23.3	23.72	22.83333333
Desviación estándar		2.593646082	2.484954728	2.575266976	2.55128926
Variancia		6.727	6.175	6.632	6.511333333

Resultado No 9

Relación concentración-respuesta



Resultado No 10

Precisión

Concentración	Estándar	Muestras
2.83	22	22.4
2.83	21.2	21.8
2.83	21.2	22.4
2.83	22.2	21.8
2.83	22.2	22.8
2.83	22.2	23.2
2.83	22.6	21.2
2.83	21.4	22.4
2.83	22.4	22
Media	21.9333333	22.2222222
Desviación estándar	0.52915026	0.59535237
Coficiente de variación	2.41253919	2.679085665
Variabilidad de los resultados	0.37416574	0.420977698
Tolerancia	0.0641427	0.072167605
	6.41426981	7.216760537

Resultado No 11

Exactitud

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre ensayo	1.28	1	1.28	0.1326272 16	0.720491 481	4.493998 418
Dentro de los ensayos	154.4177 78	16	9.6511111 11			
Total	155.6977 78	17				
Sesgo	0.62%	< 3%				

Resultado No 12

Exactitud

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre ensayos	14.17733 333	2	7.088666667	1.088665 916	0.3677 2271	3.8852 93835
Dentro de los ensayos	78.136	12	6.511333333			
Total	92.31333 392	13 3	14			

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los criterios de aceptación para la Linealidad, Precisión y Exactitud se cumplieron en el transcurso de la validación y fueron comprobados al finalizar éste, así tenemos:

- Se estudiaron 5 niveles de concentración (1.415, 2, 2.83, 4, 5.67) los que fueron analizados por triplicado.
- Se realizaron pesadas independientes y preparación de soluciones independientes de cada ensayo, lo que evitó que se produjera una variabilidad significativa en los resultados.
- Valores del coeficiente de variación para el estándar fue de 2.41 y para la muestra de 2.67 lo indica que existe linealidad ya que los valores no deben ser superiores al 5 %.
- El resultado de Tolerancia para el estándar fue de 6.41 y para la muestra 7.21 lo cual indica que esta dentro del rango establecido ya que el criterio de aceptación indica $\leq 30\%$.
- La media del sesgo encontrado fue de 0.62 en el que el valor mayor del sesgo en el análisis fue de 1.6 lo que indica que cumple con el criterio de exactitud el cual debe ser menor al 3%.
- Se calculó el estadístico **F**, utilizando el análisis de varianza de un factor, esto permitió que se calculara el valor de **F** crítico el cual fue de 4.49 y **F** calculado de 0.13 en el que la bibliografía indica que **F** crítico debe ser mayor que **F** calculado, para que exista homogeneidad de las variancias.

CONCLUSION

El presente trabajo ha sido finalizado de una manera satisfactoria en el que se han alcanzado los objetivos planteados al inicio de la investigación, se planteo el método cilindro en placa según especificaciones de United Status Pharmacopea 30 National Formulary 25 para la suspensión de Eritromicina el cual es activo contra *Micrococcus luteus*. Tenemos así el logro de la determinación de la relación que existe entre la dosis aplicada y las respuestas obtenidas de éstas, de esta manera al aumentar la concentración en las soluciones de trabajo hay un aumento considerable en el resultado de los mismos.

Se evaluó la repetibilidad y por ende la precisión del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, en un mismo laboratorio y en periodo de tiempo corto, así en la evaluación de la exactitud del método se expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o teórico y el valor encontrado experimentalmente, se obtuvieron resultados cercano al valor teórico o nominal.

Los parámetros de validación cumplieron con los criterios de aceptación; tenemos así para la linealidad el coeficiente de determinación fue mayor al 0.95%; para la precisión el coeficiente de variación fue menor al 5% y la tolerancia menor al 30% y para la Exactitud el sesgo encontrado en el ensayo fue menor al 3% y existe homogeneidad en las variancias por tanto el cumplimiento de estos parámetros asume que el proceso ha sido validado.

RECOMENDACIONES

A lo largo del trabajo expuesto se observaron una serie de dificultades que conlleva a plantear una serie de recomendaciones a seguir en el laboratorio para futuras investigaciones que se realicen en el mismo:

- Los métodos microbiológicos deben ser validados constantemente tomando en cuenta las condiciones específicas del trabajo de laboratorio.
- La realización del análisis para la obtención de la potencia microbiológica debe hacerse con una cepa reciente (joven).
- Se debe esterilizar material y calibrar el equipo necesario antes de iniciar el ensayo correspondiente.
- Realizar un preensayo para ejercitar sobre la manipulación de material, equipo, reactivos, medios, soluciones que serán utilizadas en el ensayo como tal.
- Procurar en lo mayor posible que la puerta que conduce al área de trabajo no sea abierta en el momento que se realiza el ensayo para evitar contaminación del medio exterior.
- Descontaminar ambiente previo a realizar el ensayo para evitar crecimiento de microorganismos en las placas ajenos a la práctica.
- Procurar perfectas condiciones de cilindros sin picadura ni corrosidad para mayor precisión en el contenido de los mismos.
- Evitar que los cilindros se profundicen en capa base y capa siembra para que el contenido del antibiótico sea bien difundido.
- Tener en cuenta buenas prácticas de laboratorio y uso de vestimenta adecuada.
- Procurar al máximo tener a la disposición suficiente material desechable (gorro, guantes, boquilla, gabacha, zapatos) por cualquier inconveniente evitando así la exposición directa en el ambiente.

GLOSARIO

Validación: Establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.

Obtención de pruebas documentadas de que un método analítico es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos. (1)

Incertidumbre de una medida: Estimación del intervalo dentro del cual se encuentra el valor verdadero de la cantidad medida una vez efectuadas las correcciones debidas a errores sistemáticos. (1)

Esterilización: Destrucción de los microbios existentes en una sustancia u objetos por procedimientos físicos (calor, rayos ultravioletas) o químicos (antisépticos). (8)

Exactitud: Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero, valor nominal, teórico o un valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente. Capacidad del método analítico para proporcionar resultados lo mas cercano posible al valor teórico o nominal. Matemáticamente se expresa como el valor numérico del error sistemático (diferencia entre el valor medio hallado y el verdadero) o bien como error relativo porcentual.

En microbiología, cuando se trata de efectuar contajes microbianos, la exactitud se define como el porcentaje de recuperación frente al valor del inóculo. (1)

Ensayo: Procedimiento que explica detalladamente todas las operaciones necesarias para efectuar un análisis concreto. (1)

Cultivo: Desarrollo de los microbios. Criar, desarrollar microbios o gérmenes. (8)

Caldo: Medio favorable preparado para el desarrollo de un microbio. (8)

Autoclave: Aparato para la desinfección por vapor y altas temperaturas. (8).

Halo: Aureola que rodea la imagen de un punto brillante. (8)

Contaminar: Alterar nocivamente una sustancia u organismo por efecto de residuos procedentes de la actividad humana o por la presencia de determinados gérmenes microbianos. (8)

Solución: Líquido que contiene un cuerpo disuelto. (8)

Diámetro: Línea recta que pasa por el centro del círculo y termina por ambos extremos en la circunferencia. (8)

Desviación estándar: Estadístico básico indicativo de la dispersión o variabilidad de los resultados. (1)

Muestra: Producto resultante de una operación de muestreo. El muestreo debe ser representativo y con un determinado carácter aleatorio si bien, en algunos tipos de análisis y en aplicación de la filosofía del peor caso se propician muestreos sesgados. (1)

Media aritmética: Valor de centralización de una muestra o población. Equivale a la suma de todas las observaciones divididas por el número de las mismas. (1)

Precisión: Capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre si. Grado de dispersión de los resultados analíticos respecto a su valor medio. Se puede estudiar a tres niveles:

Repetibilidad: Evalúa la precisión del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (aparatos, reactivo, analista) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

Precisión intermedia: Evalúa la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (analista, día, instrumento, etc.). Es la precisión intralaboratorio.

Reproducibilidad: Evalúa la precisión entre laboratorios diferentes. (1)

Recta de regresión: Relación entre las respuestas instrumentales que produce un analito y las concentraciones del mismo. Siempre que sea posible se buscara una respuesta que sea de tipo lineal. Cuando no lo sea se podrán efectuar transformaciones matemáticas para rectificar la curva de calibración o bien se ajustara a funciones mas complejas. Cuando el rango de trabajo sea muy amplio se pueden utilizar factores de ponderación. (1)

Residual: Es la diferencia entre el valor observado experimentalmente y el valor estimado en una recta de regresión o curva de calibración. (1)

Sesgo: Error sistemático o determinado. (1)

BIBLIOGRAFÍA

- 1)** Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de métodos analíticos. Barcelona Marzo 2001. Página 190-194.
- 2)** Ramón Salazar Macian. Validación industrial, su aplicación a la industria Farmacéutica y afines. 1ª Edición. Barcelona. 31 de mayo 1999. Pagina No 21-69.
- 3)** Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Séptima Edición. Página No 193-200.
- 4)** United State Pharmacopea 30 National Formulary 25. Pagina No 2058.
- 5)** Advisory commission for metrology chemistry section expert. Group for microbiology. Uncertainly of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Helsinki 2003.
- 6)** Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker. Biología de los microorganismos. Octava edición Madrid 1997. Pagina No 416, 419, 423, 440.
- 7)** Diccionario enciclopédico Larousse. Sexta edición. Tomo I. 1998. Pagina No. 135, 224, 302, 325.
- 8)** George Smith. Introducción a la Micología Industrial. Editorial Acribia Zaragoza España 1969. Pagina 270.
- 9)** Johnson-Kuby. Estadística elemental lo esencial. Tercera edición. Pagina No. 1,2.
- 10)** Pradeau. Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos. Pagina No.818
- 11)** Fuentes Arderiu. M.J. Castiñeires Lacambra. J.M Querato Compañó. Bioquímica clínica y patología Molecular. Segunda edición Editorial Reverte. S.A. volumen II Pagina 598.
- 12)** José Manuel González de Buitrago. Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico. Segunda Edición Masson. Pagina 97.
- 13)** Jonson-Kuby. Estadística elemental lo esencial. Tercera edición.
- 14)** Guillermo Ramis Ramos. Maria Cecilia García Álvarez-Coque. Quimiometria. Editorial Síntesis. Pagina 71, 72, 73, 60, 61.

15) Martin Frobisher, Ronald D. Hinsdill, Kobe T. Crobtree, Clyde R. Goodheart. Microbiología. Salvat editores Mallorca, 41- Barcelona. Quinta edición, 1978. Pagina 560.

16) Ronald E. Walpole, Raymond H. Myers, Sharon L. Myers. Probabilidad y estadística para ingenieros. Sexta Edición. México 1999. Pagina 471.

ANEXOS



Preparación de Medios



Secado del Material



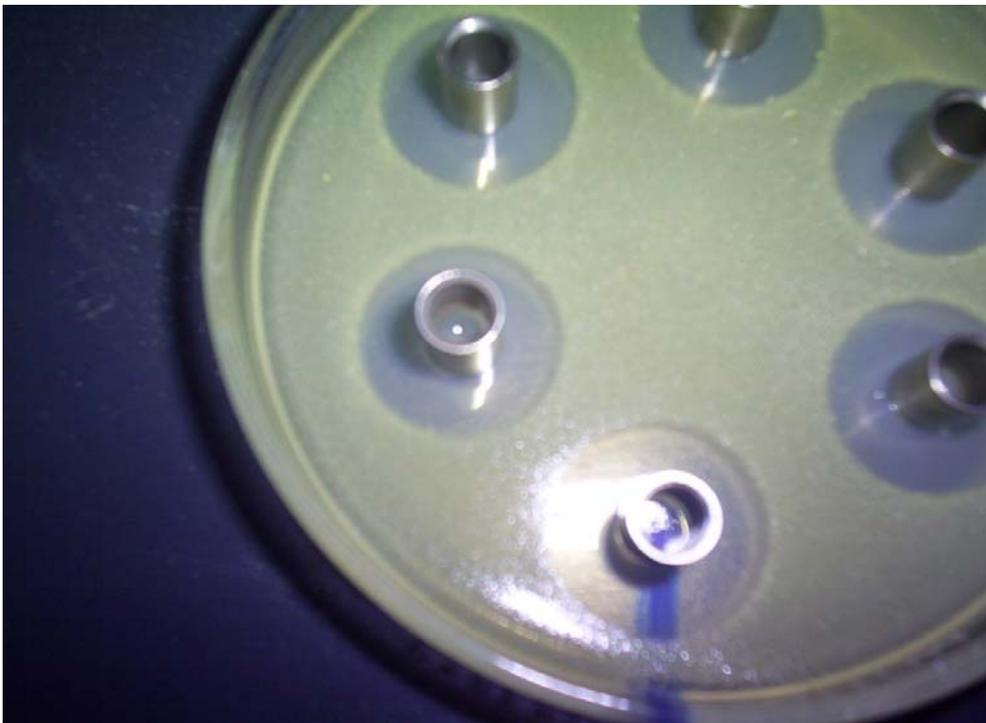
Material Estéril



Suspensión de Microorganismo *Micrococcus luteus*



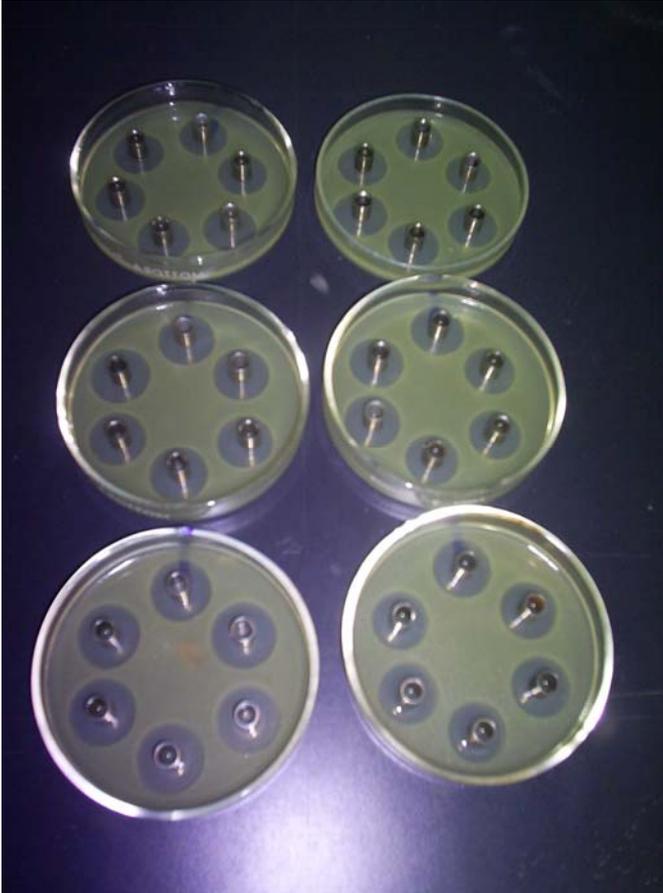
Incubación de Placas



Halos de Inhibición de la Eritromicina



Halos de Inhibición de Eritromicina





Lectura de Halos



Descontaminación del Material

