

**VALIDACIÓN DE MÉTODO MICROBIOLÓGICO CILINDRO EN PLACA PARA
DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA DE NEOMICINA EN PRODUCTO
FARMACÉUTICO TRICONJUGADO (NEOMICINA, CLOTRIMAZOL Y
BETAMETASONA)**

CAROLINA CABRERA PAZMIÑO

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES
2015**

**VALIDACIÓN DE MÉTODO MICROBIOLÓGICO CILINDRO EN PLACA PARA
DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA DE NEOMICINA EN PRODUCTO
FARMACÉUTICO TRICONJUGADO (NEOMICINA, CLOTRIMAZOL Y
BETAMETASONA)**

CAROLINA CABRERA PAZMIÑO

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Especialista en Microbiología Industrial**

**Director:
Mgra. GLORIA INÉS ESTRADA SALAZAR**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES
2015**

Nota de aceptación

Aprobado por el Comité de Grado en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad Católica de Manizales, para optar al título de Especialista en Microbiología Industrial.

Firma de Director del Trabajo de Grado

Firma del presidente del Comité de Programa

Firma de integrante del Comité de Programa

Manizales, 06 de Noviembre de 2015

DEDICATORIA

A Jehová Dios por darme la vida, la salud y la sabiduría para culminar esta etapa, a Joseph, mis padres y mi hermana por brindarme su apoyo incondicional y motivación para alcanzar mis metas, a mis profesores por su dedicación y consejo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecida primeramente con Dios por darme la oportunidad de alcanzar una meta más propuesta en el campo profesional, por dotarme de la fortaleza, sabiduría y amor necesarios para permanecer.

A la empresa Fabrifarma S.A por la oportunidad brindada y el apoyo financiero y logístico durante la realización del proyecto.

A los diferentes miembros del Laboratorio de Control de Calidad, al Director técnico Ricardo Torres, a la Jefe de aseguramiento de la calidad Carmen Jurado, a los analistas y compañeros Eugenio Domínguez y Alejandro Londoño, que de una u otra forma me brindaron su apoyo y consejo.

A los miembros del comité científico de la Universidad Católica de Manizales por sus valiosos aportes y sugerencias.

A mi familia y amigos que siguieron de cerca este proceso, y siempre me brindaron su apoyo, comprensión y aliento para seguir adelante.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	11
1. OBJETIVOS	13
1.1 OBJETIVO GENERAL	13
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
2, MARCO TEORICO	14
2.1 CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA	14
2.2 VALORACION DE ANTIBIÓTICOS POR MÉTODOS MICRO- BIOLÓGICOS	15
2.2.1 Definición	15
2.2.2 Técnica cilindro en placa	16
2.2.3 Elección del diseño experimental	18
2.2.4 Curva Dosis – Respuesta	19
2.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	20
2.3.1 Tipos de validación	22
2.3.1.1 Validación prospectiva	22
2.3.1.2 Validación concurrente	22
2.3.1.3 Validación retrospectiva	22
2.3.1.4 Revalidación	22
2.4 Parámetros a validad en una prueba cuantitativa	23
2.4.1.1 Especificidad (selectividad)	23
2.4.1.2 Precisión	23
2.4.1.3 Repetibilidad	23
2.4.1.4 Reproducibilidad	24
2.4.1.5 Exactitud	25
2.4.1.6 Linealidad	26

3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN (parte experimental)	27
3.1.1 Estandarización del inóculo con el microorganismo de ensayo	27
3.1.2 Preparación de solución buffer	27
3.1.3 Preparación de medio de cultivo y cajas de Petri	28
3.1.4 Preparación de estándares	29
3.1.5 Preparación de la muestra	30
3.1.6 Esquema de ensayos a realizar	32
3.2 DETERMINACION DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	32
3.2.1 Selectividad	32
3.2.2. Precisión del sistema	33
3.2.3. Precisión del método (Repetibilidad)	33
3.2.4. Precisión intermedia (Reproducibilidad)	33
3.2.5. Exactitud	33
3.2.6. Linealidad	34
3.3 CÁLCULO DE LA POTENCIA	35
4. RESULTADOS	37
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
6. CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFIA	48

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Preparación del inóculo	18
Figura 2. Placas de Petri	28
Figura 3. Halos de inhibición de los estándares	30
Figura 4. Halos de inhibición del placebo	39

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Parámetros a evaluar según la categoría de la técnica	21
Tabla 2. Tipo de método	24
Tabla 3. Matriz c.s.p	31
Tabla 4. Esquema de ensayos a realizar	32
Tabla 5. Precisión del sistema	37
Tabla 6. Precisión del método (repetibilidad)	38
Tabla 7. Precisión intermedia (reproductividad)	38
Tabla 8. Resumen de precisión	39
Tabla 9. Muestra al 100% y muestras de degradación	40
Tabla 10. Exactitud y Linealidad	41
Tabla 11. Parámetros de regresión para linealidad y exactitud	42
Tabla 12. Prueba T de Student	42

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Exactitud (Neomicina)	42
Gráfica 2. Linealidad (Neomicina)	44

INTRODUCCIÓN

En la industria farmacéutica toda la manufactura debe ser estrictamente regulada y supervisada en diversos factores, pues se trata de la generación de bienes que se dirigen a un consumo directo por parte de personas o animales, de ahí la trascendental importancia de garantizar la efectividad de dichos medicamentos.¹

Los antibióticos son sustancias de alto consumo que tienden a perder su actividad antimicrobiana en el tiempo bien sea por un inadecuado almacenamiento o una mala elaboración del producto. Estos ligeros cambios químicos que se traducen en pérdidas de actividad no siempre pueden demostrarse por métodos químicos, por ello es indispensable detectarlos a través de métodos de valoración microbiológica que permiten determinar la potencia o actividad antimicrobiana de estos compuestos, de manera que aseguren como parte de sus parámetros de calidad, la eficacia antimicrobiana al ser usados en la terapéutica de las enfermedades infecciosas pues para ese fin son elaborados.²

Uno de los productos empleados para tratamiento de las infecciones bacterianas de la piel es la neomicina en crema, este compuesto hace parte de la familia de antibióticos aminoglucósidos con acción bactericida que inhibe la síntesis de proteínas en las células bacterianas sensibles, por lo general bacilos gram negativos dentro de los cuales se encuentran: *Acinetobacter sp*; *Citrobacter sp*; *Enterobacter sp*; *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* (beta-lactamasa negativo); *Haemophilus influenzae* (beta-lactamasa positiva), *Klebsiella sp*. *Neisseria sp*. *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia sp*. *Salmonella sp*. *Serratia sp*. *Shigella sp*. Y algunos microorganismos gram positivos como *Staphylococcus aureus* (MSSA), y *Staphylococcus epidermidis*.³ Suele encontrarse conjugado con otros principios activos como antifúngicos y antiinflamatorios esteroideos, tal es el caso del producto objeto de este estudio, que se compone de Neomicina, Betametasona y Clotrimazol.

En miras de garantizar la eficacia antibacteriana, este producto fabricado en la empresa Fabrifarma S.A., actualmente se analiza según procedimientos referenciados en la Farmacopea Americana (USP 38), sin embargo se requiere realizar la validación de la metodología de análisis ya que un procedimiento validado es más estable pues la validación permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo.

¹ MORA HUERTAS, Claudia Elizabeth. Calidad farmacéutica: Nuevos enfoques de las buenas prácticas de manufactura. Revista Colombia: ciencia, química y farmacéutica, 38(1), 42-58. Bogotá D.C.: Departamento de farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 2009. Disponible en Internet: www.farmacia.unal.edu.com

² VELEZ M. T. Cuadrado B., Control microbiológico a medicamentos, cosméticos y desinfectantes. Cartagena: Universidad de Cartagena, 2005

³ <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/n013.html>

Por otro lado, esta técnica de valoración microbiológica está definida para productos con único principio activo, por lo cual no se conoce sus alcances cuando se emplea en productos conjugados con otros compuestos activos como es el caso del producto en estudio.

La USP establece por escrito las normas de referencia para los medicamentos, los ingredientes alimentarios, suplementos dietéticos y sus ingredientes. Estas normas son utilizadas por los organismos reguladores y fabricantes para ayudarles a garantizar que estos productos son de la identidad adecuada, así como la fuerza, calidad, pureza y consistencia. Según el Artículo 501 de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, los ensayos y especificaciones de las monografías de la Farmacopea de los Estados Unidos constituyen normas legales, y requieren que los métodos de prueba que se utilizan para evaluar el cumplimiento de los artículos farmacéuticos deben cumplir normas adecuadas de exactitud y confiabilidad. Ahora, si bien no se exige que los usuarios de los métodos analíticos descritos en la USP validen la exactitud y confiabilidad de estos métodos, sino que solamente comprueben su aptitud bajo condiciones concretas de uso, sin embargo es esencial que al adoptar procedimientos analíticos farmacopeicos, se cuente con el respaldo de suficientes datos de laboratorio que documenten su validez y soporten las óptimas características de desempeño de la técnica.

Se realiza entonces la validación con miras a responder la inquietud de si la técnica es un método confiable y apropiado que pueda ser empleado para cuantificar in vitro la actividad antimicrobiana de la neomicina en productos triconjugados, para ello es necesario determinar y calcular los parámetros de exactitud, linealidad, selectividad y precisión que establece la USP para validación de métodos farmacopeicos.

La validación no lleva implícito solamente el desarrollo experimental de los parámetros de validación, sino también toda la documentación involucrada en la misma, donde queda evidencia de cómo fue llevado a cabo todo el proceso, y que servirá como referencia para establecer la metodología analítica que seguirá siendo aplicada.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar la validación de la técnica de análisis aplicada para la cuantificación microbiológica de Neomicina en crema tópica triconjugada (Betametazona 0.04%- Clotrimazol 1.0%- Neomicina 0.5%).

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la técnica para la determinación de potencia microbiológica de neomicina según especificaciones de la USP 38 en crema tópica triconjugada.
- Determinar la validez del método de análisis microbiológico Cilindro en Placa, mediante el cálculo de los parámetros de desempeño: linealidad, selectividad, precisión, exactitud, repetibilidad y reproducibilidad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

Los medicamentos constituyen uno de los principales compuestos xenobioticos de importancia médica, y son esenciales para el ser humano ya que se utilizan para diagnosticar, prevenir, curar o aliviar enfermedades, y en general para proteger y preservar la salud. A pesar de sus características benéficas y el propósito para el que son elaborados, su uso no está exento de riesgos, entre ellos los relacionados con la dosificación, el incumplimiento de condiciones durante el diseño, procesamiento, almacenamiento, distribución, prescripción, dispensación y modalidades de conservación y uso por los pacientes.⁴

Por todo lo anterior, para todos los medicamentos, especialmente los antibióticos, es indispensable garantizar su eficacia y calidad, pues de lo contrario se pondría en riesgo la salud del paciente. En este sentido se debe evaluar el comportamiento de estas sustancias tanto in vivo como in vitro, para así certificar la idoneidad de los productos empleados para las terapias. Por eso a pesar de que la industria farmacéutica es la que ha desarrollado una de las mayores experiencias en lo relacionado al aseguramiento y control de calidad, en la actualidad, dichas organizaciones necesitan establecer sistemas de garantía de calidad cada vez más eficientes para ser competitivas y de esta manera satisfacer las necesidades de los clientes y de la propia empresa, además de sostener la comercialización de los productos.

Dentro de este marco de aseguramiento de la calidad se encuentran las Buenas Prácticas de Manufactura, normas referentes al muestreo, especificaciones y ensayo, así como a los procedimientos de organización, documentación y autorización que aseguran que los ensayos necesarios y pertinentes realmente se efectúen, y que no se permita la circulación de materiales, ni se autorice la venta o suministro de productos, hasta que su calidad no haya sido aprobada como satisfactoria.⁵

Otro concepto a considerar cuando se habla de aseguramiento de la calidad en industria farmacéutica, es el de la Validación de Procesos, definida por la OMS

⁴ MORA MEZA, José David. Implementación y desarrollo de la técnica de potencia microbiológica de antibióticos y su impacto económico en la empresa Calox de Costa Rica, S.A.

⁵ ARTEGAGA CARVAJAL, Manuel. Controles, evaluaciones y valoraciones microbiológicas. Revista colombiana de ciencias químico-farmacéuticas, No. 20. Bogotá: Departamento de farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, p. 55-58.

ORTIZ GOMEZ, Diana Sofía. Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una industria farmacéutica. (Tesis de grado). Bogotá: Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, 2008

como el acto documentado para probar que los procedimientos, procesos, equipos, materiales o sistemas aplicados producen efectivamente los resultados esperados.

Los análisis fisicoquímicos empleados para determinar identidad, pureza, eficacia, estabilidad, entre otros, manifiestan si los valores obtenidos están en concordancia con las especificaciones preestablecidas por los distintos organismos de control. Generalmente, dicho control es aplicado a los productos producidos y utilizados por una empresa, ya se trate de productos finales, intermediarios o materias primas. De igual manera, los análisis microbiológicos permiten comprobar la ausencia de contaminaciones, o determinar presencia de microorganismos patógenos, en productos estériles o no estériles, además de evaluar la eficacia de preservantes y en el caso de las valoraciones de antibióticos, determinar la potencia de dichas sustancias en materia prima y producto terminado. Por tanto, los laboratorios de control de calidad junto con las BPM y los procesos de validación constituyen las “piedras angulares” del sistema de aseguramiento de la calidad.

2.2. VALORACIÓN DE ANTIBIÓTICOS POR MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Para la valoración de antibióticos se encuentran varias metodologías referenciadas en las distintas farmacopeas, estas pueden ser técnicas instrumentales o bien mediante bioensayos en los cuales se emplean células vivas para la determinación de una característica de calidad en los medicamentos. Los ensayos biológicos o bioensayos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos o químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, y se evalúan por las reacciones de los organismos de prueba (muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos).

Al emplear un bio-ensayo deben tenerse en cuenta una serie de factores como la selección del organismo vivo (microorganismos en este caso), la concentración, el medio de cultivo donde se pone a crecer, la temperatura y el tiempo de incubación entre otros que pueden influir en el resultado final.⁶

2.2.1 Definición. La valoración microbiológica de antibióticos, consiste en un bioensayo donde se emplean microorganismos unicelulares, en este caso cepas bacterianas susceptibles al antibiótico a evaluar, para demostrar la actividad de la sustancia en condiciones convenientes, por su efecto inhibitorio sobre los microorganismos.

Se cuantifica la potencia o actividad del antibiótico, comparando en idénticas condiciones de ensayo, la inhibición de la multiplicación de microorganismos

⁶ MORA MEZA, Op.Cit.

sensibles producida por concentraciones conocidas de una Sustancia de Referencia o Patrón, frente a la inhibición producida por la muestra que contiene el antibiótico que se está valorando. Se utilizan estándares de Referencia de medicamentos de alta pureza que se comparan contra la potencia de la preparación de prueba, con el fin de minimizar las fuentes de error resultante de la variación biológica durante los análisis, y obteniendo así un valor de potencia relativo del estándar empleado. De esta manera se determina la verdadera actividad antimicrobiana del producto, permitiendo detectar cambios sutiles que no son demostrables por métodos químicos.

Las valoraciones de antibióticos por métodos microbiológicos están indicadas cuando así lo especifiquen las farmacopeas, o cuando es el único método aplicable debido a la naturaleza química del antibiótico. Muchos antibióticos pueden cuantificarse por otros métodos físicos o químicos, pero aún en estos casos el método microbiológico puede constituir una alternativa de elección por su elevada sensibilidad y especificidad, además de permitir la confirmación de su actividad dentro de las especificaciones requeridas.

La farmacopea americana USP 38, establece dos metodologías aplicables para la determinación de la potencia de antibióticos, un método de valoración microbiológica por turbidimetría en tubos (que no se abordará en el desarrollo del presente trabajo), y la técnica en placas o de difusión en medios gelificados (Cilindro Placa). En ambos casos los principios son los mismos: 1). La comparación del efecto de una muestra (actividad desconocida) con el de un patrón de referencia (actividad conocida). 2). La medición del efecto inhibitor sobre el crecimiento del microorganismo de ensayo. 3). La existencia de alguna forma de relación cuantitativa entre las concentraciones de la sustancia activa y las respuestas, y 4). Que la relación cuantitativa sea la misma para el patrón y la muestra (condiciones de similitud).

La Farmacopea Americana indica el método a utilizar para cada antibiótico y el microorganismo de prueba.

2.2.2 Técnica cilindro en placa. Esta técnica es la más utilizada dada su exactitud y sensibilidad; se fundamenta en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical (o desde una perforación circular en el agar) a través de una capa de agar solidificada en una placa de Petri hasta inhibir totalmente el crecimiento del microorganismo añadido en el medio de cultivo, en un área circular o zona de inhibición entorno al cilindro que contiene una solución del antibiótico. Las distintas respuestas obtenidas (diámetros de los halos de inhibición) son proporcionales a las dosis de antibiótico utilizadas.

Una vez estandarizada la suspensión del microorganismo de ensayo, esta se inocula en el medio de cultivo adecuado, previamente fundido y enfriado a una temperatura compatible con la viabilidad microbiana (42°C- 45°C). Luego de

homogenizarlo por agitación, se sirven volúmenes medidos del medio en cajas de Petri de 100 x 20 mm que pueden contener o no una capa base de medio sin inocular ya gelificado. Una vez gelificado el medio inoculado, se insertan los reservorios para dispensar las soluciones del patrón y la muestra. Estos reservorios en el caso del presente estudio corresponden a cilindros de acero inoxidable de 8 mm de diámetro externo y 6 mm de diámetro interno. La cantidad de reservorios por placa, de soluciones patrón y de la muestra y la distribución de cada uno dependerán del diseño del ensayo microbiológico. Las placas finalmente se llevan a incubar en las condiciones establecidas según el microorganismo empleado. Después del periodo de incubación durante el cual el antibiótico difunde y crea un gradiente de concentración alcanzando la concentración inhibitoria mínima a cierta distancia, se registra el diámetro de los halos de inhibición que se observan alrededor de cada reservorio. El tamaño de dicha zona queda determinado por la sensibilidad del microorganismo, su estado fisiológico, y número de células viables; el tipo de medio de cultivo (incluyendo el espesor del medio en la Placa), las condiciones de incubación, especialmente la temperatura, la velocidad de difusión de la sustancia y su concentración.⁷

Debido a que estos factores pueden modificar la magnitud de la respuesta para una misma concentración de la sustancia a evaluar, es indispensable controlarlos para garantizar la reproducibilidad de la técnica, por ello se realiza la estandarización del inóculo y se establecen condiciones específicas de incubación, y volúmenes del medio a emplear. (Ver Materiales y Métodos)

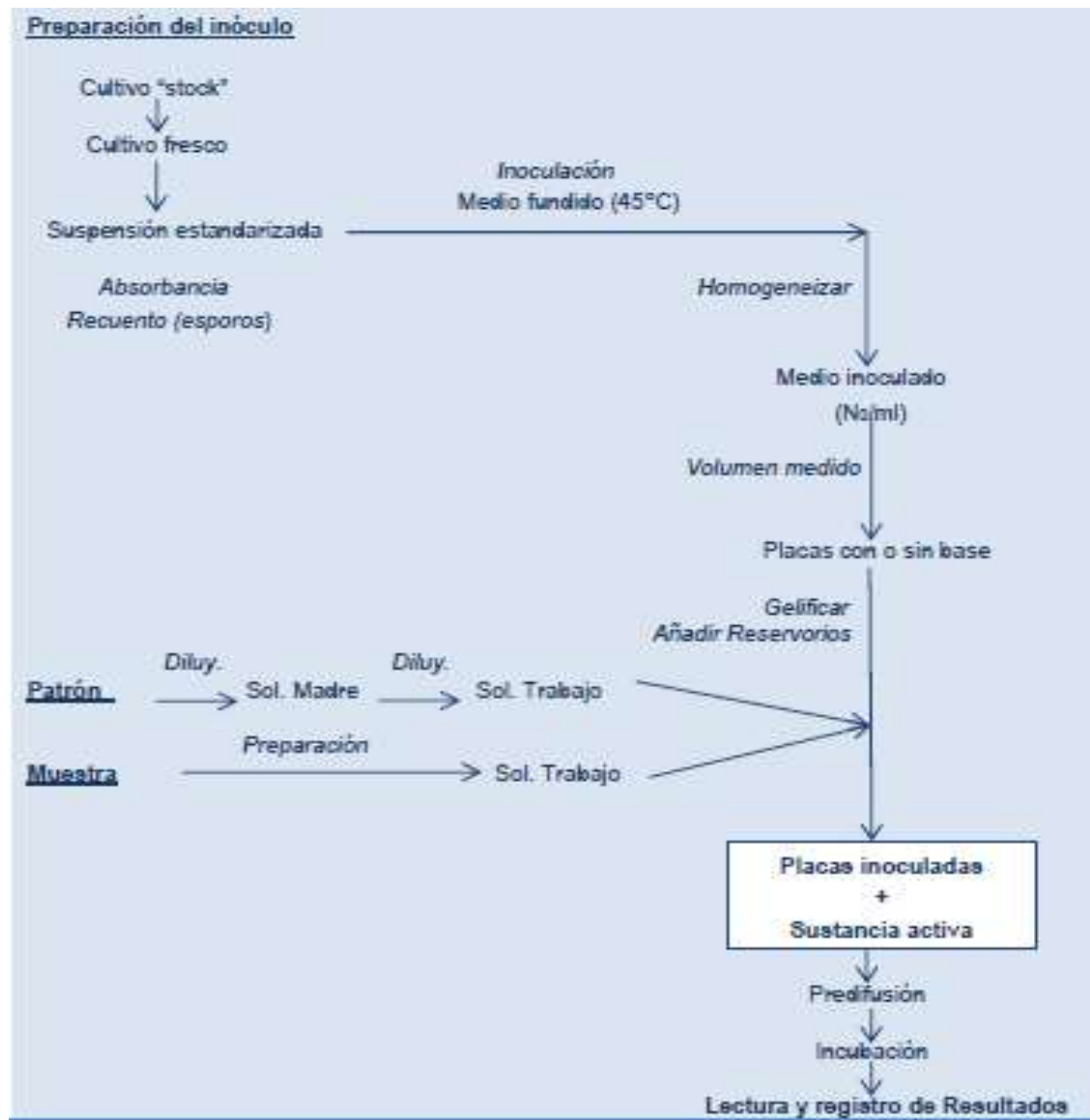
En la figura 1. Se observa un esquema simplificado de la técnica.⁸

⁷ NACIONES UNIDAS. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. New York: Sección de laboratorio y asuntos científicos, oficina de las naciones unidas contra la droga y el delito, 2010

⁸ CERRA, Héctor; FERNÁNDEZ, María Cristina; HORAK, Celina; LAGOMARSINO, Mónica; TORNÓ, Graciela; ZARANKIN, Esteban. Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires - Argentina: Asociación argentina de microbiología, (s.f.).

Ibid

Figura 1. Preparación del inóculo



Fuente: CERRA, Ibid.

2.2.3 Elección del diseño experimental. El ensayo debe diseñarse de tal forma que permita examinar la validez del modelo matemático en el que se basa la ecuación de la potencia, para una probabilidad dada ($p=0,05$), y además permita calcular el error y estimar el intervalo de confianza de la potencia calculada.

Los diseños experimentales más empleados en los ensayos microbiológicos de antibióticos son los diseños factoriales con separación en bloques (Placas), donde las variables que afectan a todas las unidades de un mismo bloque se eliminan en el análisis estadístico.

El diseño más simple para esta prueba es un ensayo con una curva estándar, para ello se prepara el Patrón a cinco concentraciones o dosis (A, B, C, D, E) que mantengan entre si una relación logarítmica y una solución de la preparación a ensayar a una concentración teórica equivalente a la intermedia del patrón (C), por lo cual el modelo experimental es 5×1 , cinco concentraciones diferentes del estándar y una sola correspondiente a la muestra a evaluar.

Para esta técnica cada placa incluye únicamente dos tratamientos, el tratamiento de referencia (mediana de los niveles del estándar, es decir C) y una de las otras cuatro concentraciones del estándar (A,B, D y E) o la muestra. La concentración de la muestra es una estimación basada en la concentración deseada. La muestra se debe diluir para proporcionar una concentración nominal que se estima es equivalente a la mediana de la concentración de referencia del estándar (C), esto con el propósito de asegurar que el resultado de la muestra caerá dentro de la porción lineal de la curva. De esta muestra debe tener una potencia relativa de aproximadamente 100%.⁹

Se considera el ensayo como preliminar si la potencia de la muestra una vez interpolada en la curva construida con las respuestas del patrón es inferior al 80% o superior al 120%. En tal caso se debe preparar la muestra a una concentración teórica más centrada a la del patrón y repetir el ensayo.

2.2.4 Curva Dosis-Respuesta. Como se mencionó anteriormente, previo al ensayo microbiológico de un antibiótico es necesario realizar una curva Dosis-Respuesta, que se desarrolla bajo las mismas condiciones del ensayo de la muestra, a diferencia de que esta se realiza a partir de una sola preparación: el patrón de referencia; a partir del cual se preparan varias concentraciones de estándares en un rango de concentraciones por encima y por debajo de la concentración teórica de la muestra a analizar. Para la construcción de la curva es necesario realizar la transformación de datos en los que la relación cuantitativa entre la dosis y la respuesta sea lineal (desviación de la linealidad no significativa) y muestre una regresión significativa. De esta curva se obtendrá la ecuación que sirve de base para el cálculo de la potencia.¹⁰

En el caso del presente estudio se realiza el grafico de las respuestas (halos de inhibición) en función del logaritmo de las dosis de los estándares, esta

⁹ Farmacopea de los Estados Unidos, USP 38. Antibióticos. Valoraciones microbiológicas 81, p. 94 – 110

¹⁰ CERRA, Op.Cit.

transformación de los valores de concentración de los estándares deben tenerse en cuenta para el análisis posterior de los resultados.

2.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

La validación de un método microbiológico es un proceso importante para la implementación de una técnica analítica microbiológica, ya que por medio de la validación de dicho método se logra establecer de forma experimental que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para la aplicación prevista y que la valoración es, por lo tanto, adecuada para su uso.¹¹

En el caso de los métodos normalizados adoptados de la Farmacopea, requieren validación cuando se aplican en matrices diferentes para garantizar un adecuado funcionamiento de la técnica en las condiciones propias del producto y en el entorno en que se realizan. La validación de un método normalizado permite dejar evidencia documentada, del óptimo desempeño de la técnica, garantizando la reproducibilidad de los resultados y por tanto aportando solidez y confianza en los análisis.¹² Por otro lado, para el cumplimiento del Sistema de Garantía de la Calidad la validación es un requisito imprescindible que está establecido por los entes reguladores en Colombia (INVIMA e ICA), y por comisiones de Farmacopeas.¹³

No existe un procedimiento específico para llevar a cabo una validación. Dependiendo de los alcances requeridos de la misma, se incluirán o no y analizarán a diferentes grados de profundidad los parámetros característicos, teniendo en cuenta el tiempo y los costos. Considerando el tipo de técnica o método de análisis, la Farmacopea Americana clasifica los ensayos en las siguientes categorías cada una con los parámetros o características de desempeño a evaluar:

¹¹ Farmacopea de los Estados Unidos, USP 38. Validación de procedimientos farmacopeicos. 1033, p. 849- 852. Disponible en Internet; <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/n013.html>

¹² MORA HUERTAS, Op.Cit.

¹³ HOYOS MARTINEZ, Maritza. Guía validación de métodos. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2010.

Tabla 1. Parámetros a evaluar según la categoría de la técnica

Categoría de prueba Parámetro de desempeño	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
	Principio(s) activo(s)	Prueba de límite Cuantitativa	Prueba de límite Cualitativa	Físico químico desempeño	Identificación
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de Detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

* Puede requerirse dependiendo de la naturaleza del ensayo.

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos, USP 38. Validación de procedimientos farmacopeicos. <1225> p. 1581-1587

La determinación de la potencia antibiótica corresponde a la cuantificación de un principio activo, por lo cual el ensayo correspondería a la categoría I.

En conclusión la validación de valoraciones biológicas cuantitativas requieren la evaluación de las características de desempeño (parámetros) de exactitud, linealidad, especificidad, precisión (en condiciones de Repetibilidad y Reproducibilidad), y el intervalo del método. Otros parámetros tales como el límite de detección y el límite de cuantificación no son incluidos debido a que por lo general, no son relevantes para una valoración biológica que informa la potencia relativa.¹⁴

Para el desarrollo de la validación es indispensable realizar el Protocolo de Validación que debe incluir los objetivos, la metodología aplicada adoptada de la USP en este caso, el número y los tipos de muestras que se estudiarán en la validación, los parámetros de validación predeterminados y los criterios de aceptación diana justificados para cada parámetro y el plan propuesto para el análisis de los datos.

¹⁴ Farmacopea, Op.Cit.

2.3.1 Tipos de validación

2.3.1.1. Validación prospectiva. Este tipo de validación se basa en información obtenida antes de implementar los procesos de validación. Se realiza durante la etapa de desarrollo, mediante un análisis de riesgos del proceso, que se divide en pasos individuales, estos se evalúan entonces a la luz de la experiencia para determinar si podría concluir a situaciones críticas; se investigan posibles causas y se determina la probabilidad de que suceda y su magnitud, se trazan los planes de ensayo y se fijan las prioridades; a continuación se efectúa y se evalúan los ensayos y se hace una valoración general; si los resultados son aceptables al final, el proceso es satisfactorio. Los procesos no satisfactorios se deben modificar y mejorar hasta que una nueva validación demuestre su carácter satisfactorio.¹⁵

2.3.1.2. Validación concurrente. La información requerida en este tipo de validación se obtiene durante la implementación del mismo. Se debe tener en cuenta el monitoreo en proceso de las variables críticas que demuestren que el proceso está bajo control y el registro de datos sobre la marcha de los procesos.

Para otros autores la validación concurrente es el establecimiento de evidencia documentada para demostrar que un proceso cumple con su propósito, basados en información obtenida durante la implementación del mismo. Este es el tipo de validación aplicado al trabajo en curso.

2.3.1.3. Validación retrospectiva. Este tipo de validación se lleva a cabo por medio de la revisión y análisis de la información histórica del proceso. Se deben tomar como mínimo 20 a 30 lotes que cuenten con reportes analíticos sólidos y confiables, documentación que muestre condiciones de los procesos y estudios de reclamos de los productos, entre otros. Dentro de este tipo de validación es necesario tener en cuenta el control de la materia prima, controles ambientales, controles microbiológicos, equipos, procedimientos, métodos analíticos y especificaciones; es aplicada para productos que se encuentran en el mercado y cuyo proceso de manufactura se considera estable, además cuando por las características del producto, económicamente no se justifica hacer una validación prospectiva. La validación retrospectiva también puede ser útil en el establecimiento de las prioridades en un programa de validación.

2.3.1.4. Revalidación. Es la repetición de un procedimiento de validación o en parte del mismo. Se aplica cuando se presentan cambios de algunos de los componentes críticos de la formulación, cambio o reemplazo de una pieza crítica en un sistema

¹⁵ ORTIZ GOMEZ, Op.Cit.

o equipo, cambio de instalaciones, cambio del tamaño del lote de fabricación y por unidades producidas fuera de especificaciones.¹⁶

2.3.2. Parámetros a validar en una prueba cuantitativa

2.3.2.1. Especificidad (Selectividad):

Este parámetro se relaciona con el grado en que otras sustancias interfieren en la identificación y, si procede, en la cuantificación de los analitos de que se trate. Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, con el fin de asegurar que el resultado obtenido del método analítico proceda únicamente del analito sin interferencias de excipientes, productos de degradación y/o impurezas.

La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en que grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con él de una u otra forma.¹⁷

2.3.2.2. Precisión. (En condiciones de repetibilidad y reproducibilidad). La precisión de un método analítico es usualmente expresada por una desviación estándar o una desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones donde la media aritmética es el valor central y la desviación estándar es la dispersión de los resultados.¹⁸

Dentro del término “precisión de un método” se dan tres tipos de estudios:

2.3.2.3. Repetibilidad: referida a la **precisión del método** efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos, en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente en un corto intervalo de tiempo. Su determinación se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea, que se analizan independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo analista y el mismo instrumento. El número de repeticiones del análisis deberá ser superior a cinco y la concentración del analito en la muestra problema suele ser similar a lo declarado.

Se requiere calcular el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los resultados.

¹⁶ MUÑOZ FRANCÉS, Silvia Carolina. Validación del método microbiológico cilindro-placa para la potencia del antibiótico Lineomicina clorhidrato. (Tesis de grado). San Salvador: Universidad del Salvador, 2006.

¹⁷ VELANDIA CASTELLANOS, Johanna Carolina. Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria. Bogotá: Facultad de ciencias básicas, 2008.

¹⁸ MUÑOZ FRANCÉS, Op. Cit.

Para afirmar que el método es preciso, el coeficiente de variación hallado debe estar dentro del límite de aceptación según el tipo de técnica, como indica la tabla 2.

Tabla 2. Tipo de método

TIPO DE METODO	COEFICIENTE DE VARIACION ACEPTADO
Cromatograficos(HPLC,GC)	≤ 2%
Espectrofotometricos, titrimetrico automatico	≤ 3%
Titrimetrico manual, biologicos y microbiologicos	≤ 5%

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos, USP 38. Validación de procedimientos farmacopeicos.

2.3.2.4. Reproducibilidad: medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes. Su ensayo debe estudiar las principales condiciones de variabilidad del método analítico: tiempo (diferentes días), analista e instrumentos.

La reproducibilidad global se determina por el coeficiente de variación. Si se desea estudiar el efecto de cada una de las tres variables por separado (tiempo, analista e instrumentos), deberá realizarse un análisis de varianza. Muchas veces solo es suficiente realizar un ensayo de reproducibilidad teniendo en cuenta únicamente el tiempo.

Robustez: evalúa los efectos de pequeños cambios en las condiciones operacionales del análisis sobre la fiabilidad del método analítico.

Esta se recomienda cuando se precisa un estudio completo de reproducibilidad como en estudios colaborativos y comparativos interlaboratorios. Detecta factores que originan variaciones menores y los que necesitan de una atención especial debido a que dan origen a variaciones significativas. Por tanto se introducen deliberadamente variaciones razonables en las condiciones experimentales y se observa su influencia¹⁹

¹⁹ ORTIZ GOMEZ, Op. Cit

El valor aceptable de precisión de un método va a depender de la concentración del analito y del número de repeticiones del análisis.

2.3.2.5. Exactitud. Medición de la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, debido a un error sistemático del método y del laboratorio. La exactitud y la precisión determinan por tanto el error total del análisis. La exactitud expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero, y la capacidad del método analítico para dar los resultados lo más próximo posibles a dicho valor. Si la diferencia entre el valor encontrado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. En cambio una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores que deben corregirse. Normalmente se expresa como porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra. O en forma de la diferencia entre el valor hallado y el verdadero. Estadísticamente suele expresarse por el resultado de realizar un test de t de Student para determinar si el valor hallado y el valor considerado como verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado. Si t experimental es menor a t de tablas para el riesgo escogido (en este caso de $p = 0.05$) y n-1 grados de libertad, significa que ambos valores no son estadísticamente diferentes, comprobándose que el método analítico tiene la exactitud requerida. En cambio si t experimental es mayor a t de tablas significa que el método analítico no es exacto y existe un error sistémico.²⁰

Para determinar la exactitud se realiza un análisis repetitivo de una muestra de concentración conocida. La muestra generalmente será un blanco al que se le añade una concentración conocida de analito patrón (matriz). Lo normal es estimar la exactitud analizando muestras añadidas con tres concentraciones distintas (baja, media y alta) que abarquen la totalidad del rango de trabajo, que corresponda a los posibles resultados que se obtendrán en el producto (en el caso de este estudio se emplearon cinco niveles de concentración). La concentración de estas adiciones estándar debe ser distinta de la utilizada para preparar las curvas de calibración y debe prepararse con una solución estándar de trabajo distinta. Se realiza tres análisis independientes por cada concentración de analito, y se evalúa la exactitud expresado en forma de porcentaje respecto al teórico (porcentaje de recuperación) y se efectúa un test t de Student. Los criterios de aceptación de la exactitud deben ser similares a los utilizados para medir la precisión.²¹

²⁰ MUÑOZ FRANCES, Op. Cit.

ORTIZ GOMEZ, Op. Cit.

CASTILLO AGUILAR, Beatriz & GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, Rolando. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Revista cubana de farmacia, 30(1). Habana: Centro de química farmacéutica, 1996. ISSN 1561-2988

²¹ NACIONES UNIDAS. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. New York: Sección de laboratorio y asuntos científicos, oficina de las naciones unidas contra la droga y el delito, 2010

2.3.2.6. Linealidad. La farmacopea la define como la habilidad de obtener resultados de las pruebas de forma directa o por una transformación matemática bien definida, proporcional a la concentración del analito en muestras dentro de un rango dado. De lo anterior se entiende que es la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado. Se define como la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta. Se debe demostrar que la recta de regresión constituida con el logaritmo de la dosis de antibiótico patrón y la respuesta cumple con los parámetros de regresión lineal y análisis de la varianza.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se parte de la metodología definida en la USP 38 para determinación de la potencia de antibióticos por técnica Cilindro Placa, para la realización de los ensayos de las diferentes muestras. La evaluación de los parámetros de desempeño se realizó conforme se especifica en la farmacopea en su capítulo de Validación de métodos farmacopeicos, y también se empleó el protocolo para Validaciones expresado en el Procedimiento Operativo Estándar de Fabrifarma S.A.

Se realizó una validación de tipo concurrente teniendo en cuenta que se empleó la información recopilada de los análisis en producto terminado realizados durante el desarrollo de la validación, empleando muestras de dos lotes (L366; L350).

3.1 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN (Parte experimental)

3.1.1. Estandarización del inóculo del microorganismo de ensayo. A partir de una cepa preservada en criobank se preparó el inóculo del microorganismo recomendado por la USP 38 para la valoración de neomicina sulfato, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 debido a su sensibilidad comprobada al antibiótico a evaluar. Este se sembró en tubos con Agar Tripticasa Soya para obtener un cultivo de 24 hrs de incubación, con el fin de obtener células en fase de crecimiento exponencial.

Se disolvió 0,9 g de NaCl en 100ml de agua purificada y se dispensó en tubos de ensayo colocando aproximadamente 10 ml por tubo. Se autoclavó durante 15 min a 121 C°. Transcurrido el tiempo de incubación de la cepa, se recolectó por arrastre en aproximadamente 10 ml de solución salina estéril al 0.9%. Después de homogenizar la suspensión, se determinó el porcentaje de transmitancia en el espectrofotómetro a 580 nm (empleando solución salina como blanco). Se ajustó dicho valor a un $25 \pm 1\%$ de transmitancia concentrando o diluyendo la preparación según fuese necesario.

De esta suspensión se tomó 1mL para inocular cada 100mL de Agar No 11 que se iba a emplear y que se encontraba a una temperatura de 40-45 °C. El criterio para la escogencia de la cantidad de inóculo por cada 100mL de medio, se definió según el volumen que se observó, permitía el desarrollo de una película de crecimiento y halos uniformes sobre el agar Antibiótico No.11, pues la USP recomienda estandarizar la prueba para la obtención de halos con diámetros entre 14 y 16 mm para la media de las concentraciones empleadas.

3.1.2. Preparación de solución Buffer No.3. Se pesaron 16.73 g de fosfato de potasio dibásico y 0.523 g de fosfato de potasio monobásico. Se colocaron ambos reactivos en un balón aforado de 1000 ml. Se disolvieron en agua purificada y se llevó hasta la marca de aforo. Se ajustó el pH a $8,0 \pm 0,1$ y se autoclavó.

3.1.3. Preparación de medio de cultivo y cajas de Petri. El Agar antibiótico No. 11 se preparó según indicaciones de la USP 38, de la siguiente manera:

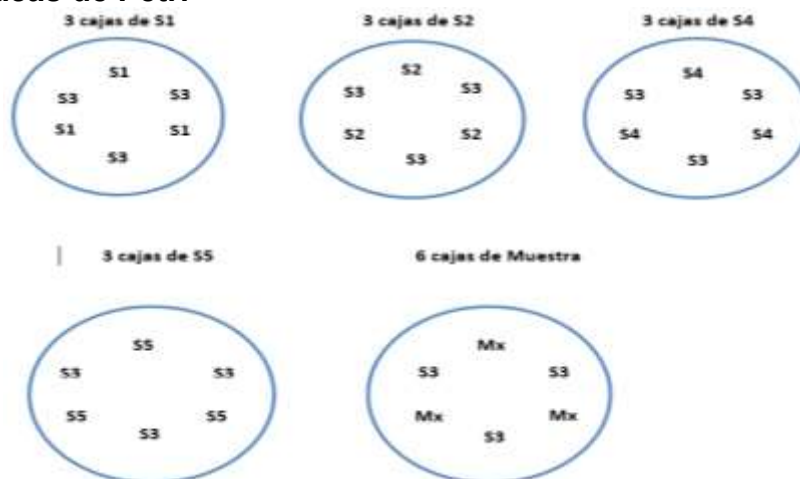
Peptona.....	6,0 g
Digerido pancreático de caseína.....	4,0 g
Extracto de levadura.....	3,0 g
Extracto de carne.....	1,5 g
Dextrosa.....	1,0 g
Agar.....	15,0 g
Agua purificada.....	1000 ml

Llevando el pH a final a $8,3 \pm 0,1$.

Se utilizaron placas Petri de vidrio con un diámetro de 100 mm y aproximadamente 20 mm de altura. Se sirvieron en cada placa 20mL de Agar No. 11 sin inocular para formar la base. Después de dejar solidificar, se sirvió una segunda capa de 5mL de medio inoculado con la suspensión de la cepa de *Staphylococcus epidermidis* y se dejó solidificar. Se realizó un control positivo de la cepa en una caja de Petri con agar inoculado y un control negativo del medio en una caja con medio sin inocular.

Una vez solidificadas las dos capas, se colocaron 6 cilindros de acero inoxidable por caja con la ayuda de una pinza estéril, de forma equidistante para posteriormente llenar cada uno de ellos con 180 µl de las diferentes soluciones como se muestra a continuación:

Figura 2. Placas de Petri



Fuente: Autor

Las placas se incubaron durante 16-18 horas a 37.5 °C. Después del tiempo de incubación se retiraron los cilindros del agar y se midieron los diámetros en milímetros de las zonas de inhibición utilizando un equipo medidor de halos Caliper.

3.1.4. Preparación de estándares. SUSTANCIAS DE REFERENCIA: La potencia de los antibióticos se expresa en Unidades o μg de actividad. En cada caso, la Unidad o μg de actividad antibiótica se establece y define internacionalmente. [NOTA: no se debe asumir que la Unidad debe necesariamente corresponder a los μg (peso) del antibiótico].

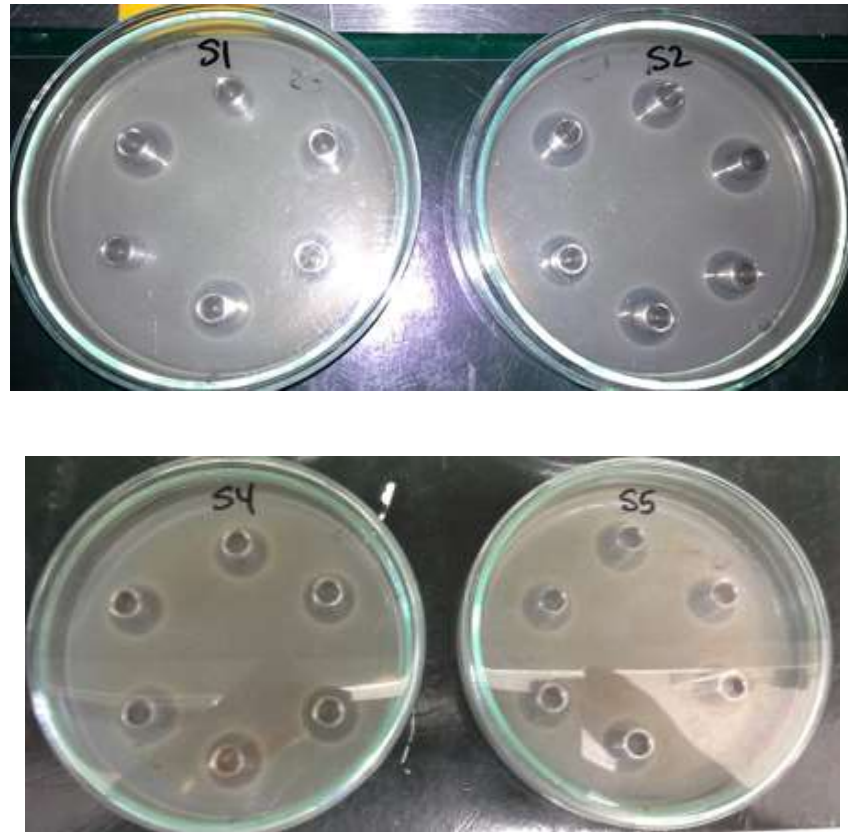
Los patrones necesarios para la realización de la curva de calibración para los distintos ensayos se realizaron a partir de un estándar secundario de neomicina sulfato de potencia 682 $\mu\text{g}/\text{mg}$, calibrado a partir de un estándar primario internacional.

Para preparar la Solución Stock del estándar, se pesó el equivalente de Neomicina de acuerdo a la potencia, para preparar una solución madre de concentración final 1mg/mL, llevando a 50mL en balón aforado con Buffer No 3. En el caso del estándar empleado para este estudio, se pesaron 73,3 mg. De esta solución madre se preparó una de Referencia tomando 2mL de esta y llevándolos a un balón aforado de 100mL, completando el volumen con Buffer No 3, (concentración 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), esta solución fue la utilizada para realizar las diferentes concentraciones de cada uno de los estándares: S1, S2, S3, S4 y S5, tomando los siguientes volúmenes y llevándolos a balones aforados de la siguiente manera:

S1: 1mL en balón de 50mL	Concentración de 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$
S2: 1mL en balón de 10mL	Concentración de 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
S3: 5mL en balón de 25mL	Concentración de 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
S4: 3mL en balón de 10ml	Concentración de 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
S5: 4mL en balón de 10mL	Concentración de 8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Por medio de la medición de los halos de inhibición en cada uno de los estándares (Figura No. 1), se obtuvo la curva de calibración para cada ensayo realizado, de manera que se verificó la linealidad del método en cada corrida de las diferentes muestras.

Figura 3. Halos de inhibición de los estándares



Fuente: Autor

3.1.5. Preparación de la muestra. A partir de la concentración rotulada de Neomicina en el producto NEOTRISONA (0,5g de Neomicina en 100g de crema), se pesó una cantidad equivalente a 5 mg de Neomicina, realizando posteriormente la extracción de la Neomicina de acuerdo a la USP de la siguiente manera: se disolvió 1g de la crema en 30mL de Buffer No.3 en embudo de decantación, se adicionaron 50mL de éter y se mezcló manualmente. Al obtener las dos fases en el embudo (fase acuosa y orgánica), se descartó la fase orgánica y se conservó la fase acuosa, dado que la molécula de neomicina sulfato es completamente soluble en agua y prácticamente insoluble en cloroformo, acetona y éter. La separación del principio activo se ve favorecida ya que la betametasona y el clotrimazol presentes en el producto son completamente insolubles en agua ²², y solubles en éter, de

²² The Merck Index An Encyclopedia of Chemicals, drugs and biologicals. NJ, USA.: Merck Research Laboratories. Whitehouse Station, 2006. p. 1116, 1117.

CAMACHO, Andrea & ARIAS, Janeth. Implementación y estandarización de la técnica para la determinación de potencia microbiológica de neomicina en crema tópica fabricada en una planta

manera que se obtiene una fase acuosa con el principio activo a determinar y la fase orgánica retiene los demás activos.

Se realizaron 3 lavados con 20mL de Buffer No.3 cada uno recuperando al final de estos la totalidad del volumen obtenido en balón de 100mL y aforando con Buffer No.3. A partir de esta solución se tomaron 2mL y se llevaron a balón de 25mL, completando el volumen con Buffer No.3, para obtener una solución de concentración teórica 4 µg/mL de Neomicina que fue la empleada para los análisis.

Para los casos en que se debía correr un blanco, se preparó un placebo o matriz del producto que contenía todos los demás principios activos y excipientes, pero en ausencia del analito en estudio (Neomicina). Para preparar 200g de la matriz Neotrisona crema se emplearon las siguientes cantidades calculadas a partir de lo que define el instructivo de fabricación del producto para 200Kg.

Tabla 3. Matriz c.s.p

MATERIA PRIMA	CANTIDAD
Clotrimazol 100%	2
Betametasona Valerato 100%	0,1
Metilparabeno puro 100%	0,36
Propilparabeno puro 100%	0,04
Alcohol cetilico	7
Alcohol estearilico	10
EDTA disodico	0,4
Miristrato de Isopropilo	20
Polisorbato 60	2
Propilenglicol	14
Mono estearato sorbitan/Span 60	2
Agua purificada	138,12

Fuente: Autor

Para la preparación de los productos a diferentes concentraciones se pesaron las cantidades correspondientes del principio activo ajustada al 100% y se midieron las cantidades de matriz para cada preparación, homogenizando muy bien la mezcla.

productora de medicamentos. Revista de la Facultad de Ciencias, 8(1), 39-46. Bogotá: Departamento de microbiología, Pontificia Universidad Javeriana. 2003. Disponible en Internet; jdcarias@javeriana.edu.co ; andrea_camacho_duarte@hotmail.com

Tabla 4. Esquema de ensayos a realizar

Parámetros	SDT	Matriz	Producto degradado	Producto				
				60%	80%	100%	120%	125%
Selectividad	-	3	12	-	-	3	-	-
Precisión del sistema	6	-	-	-	-	-	-	-
Exactitud y Linealidad	-	-	-	3	3	3	3	3
Repetibilidad	-	-	-	-	-	6	-	-
Reproducibilidad	-	-	-	-	-	6	-	-

Fuente: Autor

3.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

3.2.1. Selectividad (especificidad). Se verificó la especificidad o selectividad del método analítico observando la capacidad de este, de detectar el analito de forma inequívoca sin interferencias de otras sustancias y/o compuestos de degradación que pueden estar presentes en una misma muestra. Se analizaron 3 muestras de la matriz o placebo que no contenía el analito en estudio y se realizaron 3 preparaciones independientes de muestras al 100% de un producto, que fueron sometidas a condiciones extremas de temperatura, condiciones ácidas, condiciones alcalinas y a fotólisis por luz UV. Cada una de las degradaciones se evaluó en tres análisis de tres muestras independientes. Para someterlas a condiciones ácidas se adicionó 1ml de HCL 1N a 2ml de la muestra en balón de 25mL y se dejaron en ultrasonido por 30 minutos, después de los cuales se adicionó 1mL de NaOH 1N para neutralizar el pH, y se aforó con Buffer No.3.

Para evaluar hidrólisis básica se adicionó 1mL de NaOH 1N a 2mL de las muestras en balón de 25mL, se dejaron por 30 minutos en ultrasonido y finalizado el tiempo se adicionó 1mL de HCL 1N para neutralizar el pH, y se aforó con Buffer No.3.

Para evaluar el efecto de altas temperaturas, 2mL de cada una de las muestras se sometieron a 121°C en autoclave durante 30 minutos. Transcurrido el periodo de tiempo se aforó el balón de 25mL con Buffer No.3 y se procedió a realizar el ensayo. Para observar la degradación por acción de la luz las muestras se colocaron durante 24 horas bajo luz UV, transcurrido el periodo de tiempo se aforó el balón de 25mL y se procedió a realizar el ensayo.

Además se realizaron corridas de tres muestras de la matriz, y de tres muestras de producto al 100% sin tratamiento de ningún tipo.

Por último por medio de un análisis estadístico se determinó el porcentaje de recuperación del analito tanto para la matriz, como para las muestras sin tratamiento y para las muestras sometidas a las diferentes degradaciones, de forma que se pueda identificar si alguno de estos procesos de degradación afecta el principio activo y por ende la metodología aplicada.

El rango especificado para los %R de neomicina en los diferentes procesos de degradación es de 80% a 120%.

3.2.2. Precisión del sistema: para determinación de precisión del sistema se corren seis muestras del estándar S3 por el mismo analista, y se calcula el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados.

3.2.3. Precisión del método (Repetibilidad): se realiza aplicando el método a seis muestras al 100,0% de la cantidad teórica declarada en el producto, individuales e independientes, realizadas por el mismo analista, en las mismas condiciones de ensayo.

3.2.4. Precisión intermedia (Reproducibilidad): se evalúa realizando el ensayo en seis muestras del producto al 100%, individuales e independientes, corridas por un analista diferente (Analista B), en días diferentes.

Se calcula el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación, que se designa CVb. Para su cálculo puede emplearse el método de relación de coeficientes que determina la relación existente entre CVa (Coeficiente de Variación obtenido en Precisión del Método) y CVb, mediante la siguiente formula:

Relación de Coeficientes = CVa / CVb

El valor de esta relación debe estar entre 0,5 y 2 ($0,5 < \text{Relación} < 2$) para afirmar que el método es reproducible.

3.2.5. Exactitud: se emplean cuatro concentraciones del producto a analizar que incluyan el límite inferior y superior de la especificación del producto con respecto al declarado, se realizan preparaciones a diferentes concentraciones al 60%, 80%, 100% 120% y 125%.

Se realizan 3 análisis de forma independiente por cada concentración del analito. Los datos obtenidos se relacionan con el contenido real de la muestra, mediante el cálculo denominado porcentaje de recuperación:

% R = (Obtenido / Real) x 100

Obtenido = Valor obtenido en la cuantificación realizada mediante el análisis.

Real = Contenido real del analito, según los cálculos realizados durante la preparación de las muestras.

La exactitud del método se determina empleando el valor promedio del porcentaje de recuperación, mediante la siguiente fórmula:

$$R_p = \Sigma \%R / n$$

R_p= Promedio de % de recuperación calculado con los datos individuales de todas las series.

Σ %R= Sumatoria de los % de recuperación.

n= Numero de datos

Con el **R_p** se realiza la prueba t, calculando un valor T así:

$$T_{OB} = |100\% - R_p| / RSD \times n^{1/2}$$

T_{OB} = Valor T obtenido de los datos del análisis.

100% = Medida del valor esperado.

R_p = Promedio de % de recuperación.

n = Numero de datos (Cantidad de datos de porcentajes de recuperación)

RSD = Desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV), de los % de recuperación.

Si el **T_{OB}** es menor que el **T_{Teor}** para el nivel de significancia elegido, en este caso ($\alpha = 0,05$) y n-1 grados de libertad, significa que ambos valores (valor obtenido y valor teórico) no son estadísticamente diferentes y por lo tanto el método analítico tiene la exactitud requerida para el rango de concentraciones incluidas en el análisis.

3.2.6. Linealidad: para el estudio de la linealidad se utilizó un rango de concentraciones más amplio que el intervalo de concentraciones a establecer; se preparó la matriz del producto y concentraciones crecientes del analito así: al 60%, 80%, 100%, 120% y 125%. El análisis se realizó por triplicado en cada concentración.

A partir de los datos obtenidos de la prueba, se realizó un análisis estadístico determinando las siguientes especificaciones: ecuación de la recta de regresión ($Y = bx + a$), representación gráfica de la recta de regresión, graficando la respuesta (Halos de inhibición en mm) en el eje "Y" contra logaritmo de la concentración en eje "X", coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y análisis de varianza (ANOVA) para la regresión lineal. Se considera aceptado el parámetro de linealidad para el rango de concentraciones evaluado, si $F_{exp} > F_{teórico}$ para un grado de incertidumbre de $\alpha = 0.05$, pues significa que se infiere la no aceptación de la hipótesis nula que establece que no existe relación entre las variables.

3.3 CALCULO DE LA POTENCIA

Para calcular la potencia a partir de los datos obtenidos de la medición de halos se procedió a interpolar con la curva de estandarización. Con ayuda del programa Microsoft Excel se trazó la curva empleando los promedios de todas las mediciones y una transformación logarítmica de las concentraciones con respecto a la medición de los halos de inhibición. Además se aplicó el método de línea recta mediante el procedimiento de mínimos cuadrados y se hizo una prueba de linealidad para comprobar la relación entre las concentraciones y los valores obtenidos.

Para los cálculos iniciales y la verificación de aptitud de variabilidad se promedian los diámetros de los halos de las concentraciones de los estándares S1, S2, S4, S5 y de la concentración de referencia (S3). Para cada conjunto de tres pacas se determinaron desviación estándar (D) de los nueve valores de referencia y la desviación estándar de los nueve valores del estándar (S3). Para cada desviación estándar calculada, se determinó la desviación estándar relativa (RSD), la cual no debía superar el 10%.

Se realizó una corrección de variación entre placas con la siguiente fórmula adoptada de la USP 38:

$$\bar{X}_C = \bar{X}_S - (\bar{X}_R - p)$$

\bar{X}_C = media corregida del estándar

\bar{X}_S = media original del estándar

\bar{X}_R = Media de la referencia

p = Punto de corrección

Entendiendo como punto de corrección el promedio de los promedios calculados para los halos de S3 de cada una de las cajas.

Para generar la curva estándar, se grafican las mediciones corregidas de los halos en función del logaritmo de los valores de concentración de los estándares. Una vez se grafica la línea y se determina el coeficiente de determinación (R^2) para el cual el límite sugerido es no menos de 0,95.

Una vez se han corregido los halos de las lecturas de las muestras, y se ha obtenido la ecuación de la línea recta, se emplean los datos del intercepto y la pendiente para calcular el logaritmo de las concentraciones correspondientes a los halos medidos y obtener los datos de potencia, teniendo en cuenta que para ello se graficó en la variable dependiente (X) los halos de inhibición Vrs. El logaritmo de la concentración de los estándares en eje Y. Para la realización de estos cálculos se creó una plantilla de Microsoft Excel ²³ que permite verificar la linealidad del método para cada ensayo.

Los análisis estadísticos para determinación de la linealidad, exactitud, selectividad y precisión también se evaluaron empleando el programa de Office Microsoft Excel 2013.

²³ Desarrollo analítico informe potencia microbiológica. Disponible en Internet:
<https://es.scribd.com/doc/106525301/JONATHAN-URBINA-SOTO-DESARROLLO-ANALITICO-INFORME-POTENCIA-MICROBIOLOGICA>

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Precisión del sistema: se determinó analizando 6 muestras del estándar S3 (concentración teórica 4,0 µg/mL) dilución intermedia del rango de concentraciones estudiado, preparadas a partir de la misma solución madre. Con los resultados obtenidos se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (**CV**) (Tabla 5.). Estos resultados al ser <5% indican que la precisión del sistema cumple con los parámetros establecidos por la USP.

Precisión del método: (Repetibilidad). Se determinó analizando 6 muestras del producto al 100% preparadas a partir de la misma solución de trabajo y procesadas por un mismo analista (Analista A). De igual manera se halló el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. (Tabla 6.).

Tabla 5. Precisión del sistema

No. Ensayo	Halos de inhibición (mm)	Log de la concentración µg/mL	Concentración µg/mL	Resultado de potencia %
1	15,04	0,5886	3,878	96
2	15,16	0,6175	4,144	103,6
3	15,14	0,6123	4,096	101,4
4	15,15	0,6150	4,121	103
5	15,16	0,6175	4,144	102,6
6	15,11	0,6043	4,021	100,5
PROM				101,18
CV				2,7%

Fuente: Autor

Tabla 6. Precisión del método (repetibilidad)

No. Ensayo	Halos de inhibición (mm)	Log de la concentración $\mu\text{g/mL}$	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Resultado de potencia %
1	15,34	0,659	4,565	113
2	15,23	0,633	4,297	107,4
3	15,20	0,6253	4,220	104,5
4	15,16	0,6175	4,144	103,6
5	15,21	0,6279	4,246	105,1
6	15,10	0,6017	3,997	99,9
PROM				105,58
CV				4,15%

Fuente: Autor

Los resultados indican que el método fue repetitivo.

Precisión intermedia (reproducibilidad). Un analista diferente aplicó el método a 6 muestras individuales e independientes del producto al 100% de concentración del analito de interés (neomicina). Se calcularon el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de analista B (**CVb**).

Tabla 7. Precisión intermedia (reproductividad)

No. Ensayo	Halos de inhibición (mm)	Log de la concentración $\mu\text{g/mL}$	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Resultado de potencia %
1	15,86	0,6251	4,218	105,4
2	15,76	0,6073	4,048	101,2
3	15,86	0,62	4,14	101,6
4	15,90	0,62	4,20	105
5	14,17	0,63	4,25	99,4
6	14,26	0,65	4,42	110,5
PROM				103,85
CVb				3,8%

Fuente: Autor

La reproducibilidad se calculó por el método de relación de coeficientes, relacionando el CVa (obtenido en la precisión del método) con el CVb.

Tabla 8. Resumen de precisión

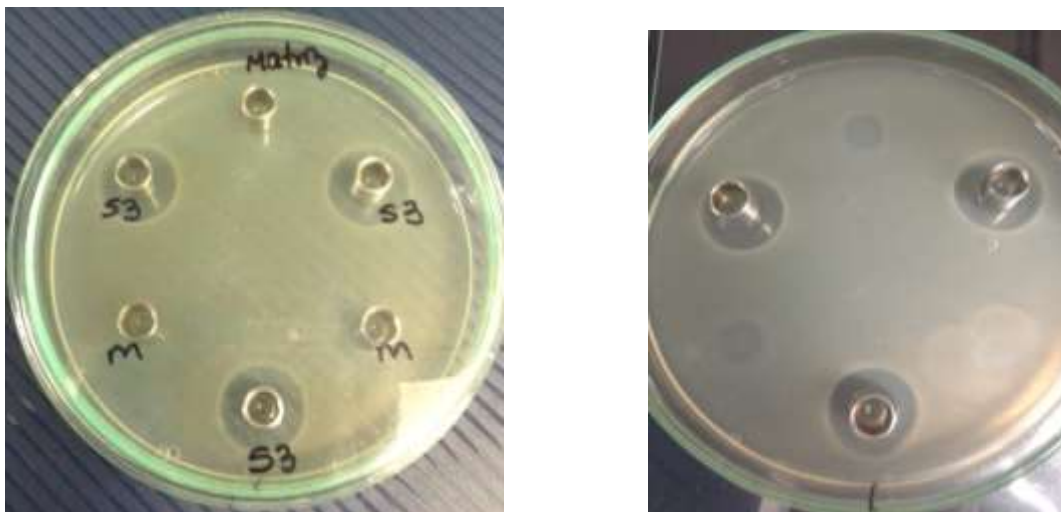
CV (Sistema)	Cva (Método)	CVb (Analista B)	Cociente Cva/CVb
3,90	4,15	3,80	1,09

Fuente: Autor

El cociente calculado a partir de los coeficientes de variación muestra un valor comprendido entre 0,5 y 2,0 por lo cual se comprueba que el método es reproducible.

Selectividad: se realizó una valoración microbiológica de cada una de las muestras de matriz o placebo, muestras al 100% y muestras al 100% sometidas a diferentes procesos de degradación. En el caso de las muestras placebo, no se observó difusión de la sustancia en el medio de cultivo, es decir no se observó halo de inhibición de crecimiento bacteriano por lo tanto no hubo respuesta cuantificable.

Figura 4. Halos de inhibición del placebo



Fuente: Autor

Para cada una de las demás muestras, con la potencia obtenida de neomicina se calculó el porcentaje de recuperación de neomicina y se halló el promedio para cada una de las degradaciones realizadas, obteniendo el valor más bajo de % de recuperación del analito (78,98%) en las muestras sometidas a pH ácidos (hidrólisis ácida de la muestra).

Los demás procesos de degradación mostraron porcentajes de recuperación entre el 80% y 120% (Dentro del rango especificado).

Tabla 9. Muestra al 100% y muestras de degradación

MUESTRA	Concentración real	Potencia Obtenida Neomicina (%)	% R Neomicina	PROMEDIO % R Neomicina
Matriz	n.a	n.a	n.a	n.a
	n.a	n.a	n.a	
	n.a	n.a	n.a	
Muestra al 100%	4,144	102,6	98,78%	100,00%
	4,349	108,7	104,65%	
	4,292	100,3	96,57%	
Hidrólisis ácida	3,270	80,1	77,12%	78,98%
	3,325	83,1	80,01%	
	3,381	82,9	79,81%	
Hidrólisis básica	3,947	96,7	93,10%	91,30%
	3,817	95,4	91,85%	
	3,770	92,4	88,96%	
Fotólisis	3,866	92,0	88,58%	90,79%
	4,292	107,3	103,31%	
	3,511	83,6	80,49%	
Termólisis	3,754	89,4	86,07%	87,58%
	3,615	90,4	87,03%	
	3,723	93,1	89,63%	

Fuente: Autor

Exactitud y Linealidad: para determinar la exactitud se prepararon muestras de placebo a las que se añadió una cantidad conocida de neomicina, de manera que se prepararon muestras al 60%, 80%, 100%, 120% y 125% del analito, con las concentraciones teóricas de 2,4 - 3,2 - 4,0 - 4,8 - 5,0 µg/ml respectivamente. Se realizaron 3 ensayos independientes por nivel de concentración, y con los halos medidos se determinaron las concentraciones obtenidas o concentraciones reales para cada uno de ellos.

Al calcular los porcentajes de recuperación para cada nivel se obtuvieron datos entre el 95,66% y 103,98% (Tabla 10.), con un promedio de %R de neomicina de 99,21%, el cual se encuentra dentro del criterio de aceptación establecido (95% - 105%).

Para estimar el grado con que se ajustan los puntos experimentales a la línea recta obtenida en la regresión, se calcularon los coeficientes de correlación para la linealidad y la exactitud, obteniendo datos aceptables para los dos casos con un $r^2 > 0,90$. (Tabla 11.). Lo que indica que existe una correlación positiva entre variables.

Tabla 10. Exactitud y Linealidad

NIVEL	Halos de inhibición (mm)	Log.Conc. Teórica Neomicina (µg/mL)	Conc. Teórica Neomicina (µg/mL)	Conc. Obtenida Neomicina (µg/mL)	%R
60%	14,2304	0,3802	2,4000	2,4955	103,98
60%	14,1526	0,3802	2,4000	2,3922	99,68
60%	14,1859	0,3802	2,4000	2,4360	101,50
80%	16,7305	0,5051	3,2000	3,1737	99,18
80%	16,8639	0,5051	3,2000	3,3224	103,83
80%	16,7639	0,5051	3,2000	3,2102	100,32
100%	17,2750	0,6021	4,0000	3,8264	95,66
100%	17,3639	0,6021	4,0000	3,9451	98,63
100%	17,3194	0,6021	4,0000	3,8853	97,13
120%	17,8754	0,6812	4,8000	4,7028	97,97
120%	17,8976	0,6812	4,8000	4,7388	98,73
120%	17,8643	0,6812	4,8000	4,6849	97,60
125%	17,9643	0,6990	5,0000	4,8487	96,97
125%	18,0087	0,6990	5,0000	4,9234	98,47
125%	18,0087	0,6990	5,0000	4,9234	98,47

Fuente: Autor

Tabla 11. Parámetros de regresión para linealidad y exactitud

	LINEALIDAD	EXACTITUD
Intercepto	10,4087	0,195
Pendiente	11,2024	0,938
r²	0,9106	0,9963
r	0,9543	0,9982

Fuente: Autor

El coeficiente de variación o desviación estándar relativa (RSD) obtenido fue de 2,39 (Tabla 12.), por lo cual cumple con la especificación para métodos microbiológicos (< 5%).

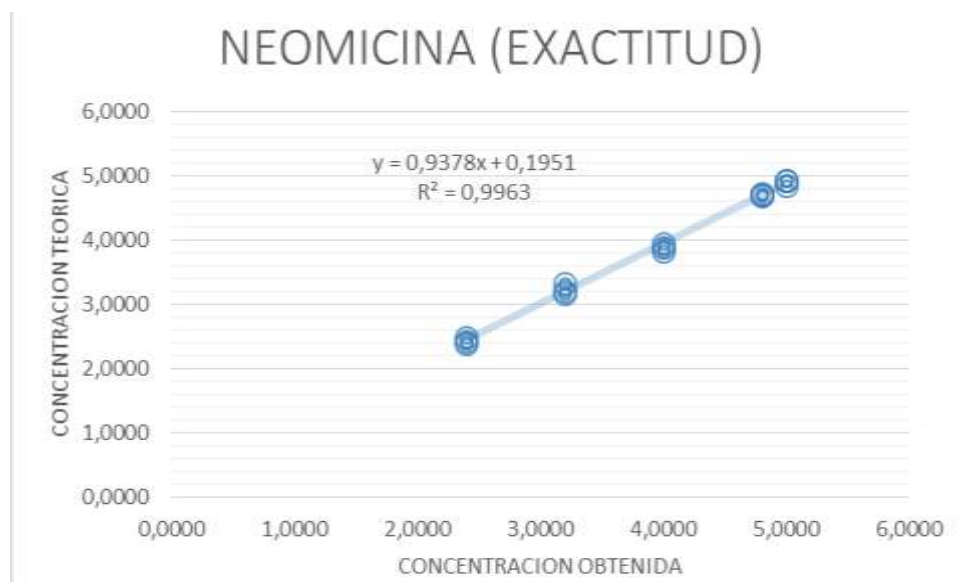
Tabla 12. Prueba T de Student

%R PROMEDIO	99,21
RSD	2,39
n	15
T_{ob}	1,2872
T_{teórico}	1,7613

Fuente: Autor

La prueba T arrojó un $T_{obs} = 1,2872 < T_{teor} (t_{tab}) = 1,7613$ Para $g_L = 15$; $\alpha = 0,05$.

Gráfica 1. Exactitud (Neomicina)



Fuente: Autor

Linealidad del sistema: para generar la representación gráfica de la linealidad se transformaron los datos de concentración teórica mediante el logaritmo de dicha concentración. Se graficó la curva que relaciona Halos de inhibición (mm) Vrs. Logaritmo de la concentración teórica, obteniendo un $r^2 = 0,9106$ (Gráfica No.1). Para confirmar si el coeficiente de correlación obtenido es realmente significativo, se emplea un contraste estadístico realizando una prueba t para r^2 empleando la siguiente ecuación:

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Obteniendo un valor de $t_{obs} = 11,507$.

El valor de t calculado se compara con el valor de $t_{teorico}$ utilizando un contraste t de dos colas y (n-2) grados de libertad, que para el caso corresponde a 1,7709 (gl = 13; $\alpha=0,05$). Entonces como $t_{obs} = 11,505 > t_{teorico} = 1,7709$, se rechaza la hipótesis nula que establece que no existe correlación entre las variables, por tanto se concluye que existe una correlación significativa.²⁴

Realizando el análisis de varianza ANOVA en Excel, se obtienen:

- **Prueba F:**

-

$F_{calculado} = 132,4218 > F_{critico} = 3,44902E-08$

- **Prueba t de Student para la pendiente:** Donde $t_{tabla} = 1,7709$

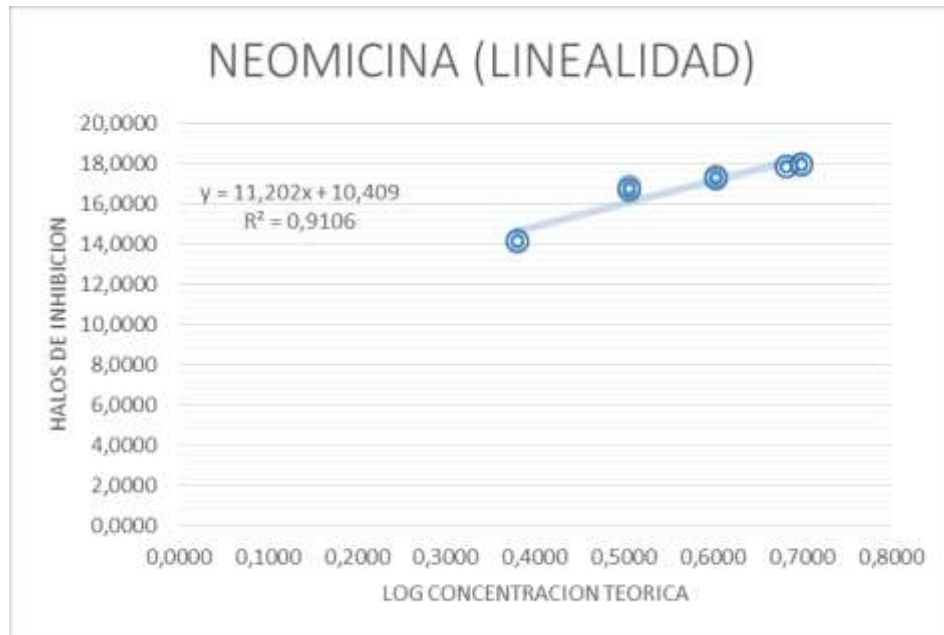
$T_{calculado} = 11,5075 > T_{tabla}$

Lo que indica que la pendiente es estadísticamente diferente de cero, cumpliendo con la linealidad entre variables.

- **P-valor** = 3,44902E-08

²⁴ MILLER, James & MILLER, Jane. Estadística y quimiometría para química analítica. 4 ed. Madrid: Prentice Hall, 2002

Gráfica 2. Linealidad (Neomicina)



Fuente: Autor

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Precisión: en la precisión del método los coeficientes de variación para la repetibilidad y para la reproducibilidad no fueron mayores que 5 %, (4,15% y 3,8% respectivamente) lo cual demuestra que el método cumple con los parámetros establecidos, siendo el ensayo repetitivo y reproducible por ambos analistas, y reproducible en distintos días por un mismo analista.

Selectividad: en el ensayo de selectividad y/o especificidad se observó que el procedimiento no resulta afectado por la presencia del diluyente o excipientes, ya que las placas de valoración sembradas con placebo y diluyente no presentaron formación de halo al cuantificar el principio activo.

Con respecto a los %R de neomicina obtenidos para los diferentes procesos de degradación, se observó degradación química apreciable en condiciones ácidas (hidrólisis ácida: %R = 78,98%) mostrando que el principio activo es susceptible a la degradación cuando se somete o se encuentra expuesto a pH ácidos. Estas condiciones resultan siendo un interferente que se debe tener en cuenta a la hora de su fabricación, almacenamiento y al realizarle los análisis de calidad (prueba de potencia). Este hallazgo concuerda con lo reportado en la literatura, pues se ha definido que la molécula del sulfato de Neomicina es más activa a pH alcalinos, y a pH ácidos tiende a perder su actividad.²⁵ De hecho, este es el motivo por el cual el buffer empleado para realizar los diferentes estándares se debe ajustar a pH 8,0 ±0,1, en el cual la molécula es estable y puede difundirse en el medio de cultivo.

En consecuencia, para la correcta cuantificación del analito de interés se requiere la ausencia de interferencias de compuestos de degradación ácidos que puedan estar presentes en la muestra, en su preparación, condiciones instrumentales y/o en el material de trabajo.

Los demás %R de neomicina obtenidos en los otros tipos de degradación cumplieron con la especificación indicando que no causan interferencia significativa con el análisis de la potencia, sin embargo sería interesante poder evaluar la robustez del método evaluando el efecto del cambio de temperaturas.

Linealidad: en el estudio de la linealidad del método, el coeficiente de correlación obtenido fue cercano a la unidad existiendo una correlación positiva entre las variables Halos de inhibición Vrs. Logaritmo de la concentración. El r^2 indica que

²⁵ The Merck Index An Encyclopedia of Chemicals, drugs and biologicals. NJ, USA.: Merck Research Laboratories. Whitehouse Station, 2006. p. 1116, 1117.

existe una dependencia entre las 2 variables, denominada relación directa: cuando el halo tiene un mayor diámetro (mm) la concentración ($\mu\text{g/mL}$) del principio activo es mayor, existiendo una relación directamente proporcional. Por los datos obtenidos en la prueba t realizada al coeficiente de correlación, la linealidad se considera válida. Adicionalmente se comprobó que existe una pendiente significativamente distinta de cero ya que $T_{\text{obs}} > T_{\text{teorico}}$.²⁶

En conclusión, una vez aplicadas las herramientas estadísticas para el cálculo de la linealidad, se encontró que cumple con los parámetros recomendados por la USP para métodos microbiológicos, lo que indica que en el rango escogido de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ a 5,0 $\mu\text{g/mL}$ las respuestas fueron lineales.

El P-valor obtenido en el análisis de varianza (ANOVA) es menor a 0.05, lo que muestra evidencia estadísticamente significativa de la relación entre el logaritmo de la concentración y el diámetro del halo con un nivel de confianza del 95%. De esta forma cumple con los criterios de aceptación.

Exactitud: la exactitud es la capacidad que tiene el método para generar mediciones que se acerquen al valor verdadero²⁷, por esta razón se analizan cinco concentraciones diferentes del analito para observar su porcentaje de recuperación (%R) de recuperación en cada una de ellas. El %R esperado de acuerdo con la experiencia experimental debe encontrarse entre un 90% - 110%. En cada uno de los tratamientos con Neomicina los porcentajes de recuperación se encuentran dentro del rango establecido, ninguno es mayor a 110% o menor de 90%, en cada una de las concentraciones.

²⁶ GARCÉS, Alexandra; RIVAS, Iliana; REGNAULT, Miriam & ROSSI, Luisa. Desarrollo y validación de un método microbiológico para la determinación de la potencia de azitromicina. (Postgrado de Aseguramiento de la calidad). Caracas – Venezuela: Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, (s.f.).

²⁷ ARRIOLA, Lucrecia. Validación de métodos analíticos, fisicoquímicos y microbiológicos. Guatemala: Colegio de farmacéuticos y químicos de Guatemala, 2012.

6. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en el rango de concentraciones ensayadas, indicaron que el método microbiológico cilindro en Placa para valoración de la potencia de neomicina en productos triconjugados (Neomicina + Betametasona + Clotrimazol), cumple con los parámetros de validación recomendados por la USP 38, pues la evaluación estadística de los resultados demostró que el método analítico es específico, selectivo, lineal, preciso y exacto en el intervalo de las concentraciones estudiadas. Por lo tanto el método puede ser empleado como método de análisis en el control de calidad de rutina para determinación de potencia de neomicina en productos con esta composición.
2. El método tiene la capacidad de diferenciar de manera precisa y específicamente el principio activo de neomicina en presencia de los demás componentes y/o sustancias químicas como lo son el diluyente utilizado y el placebo.
3. A la hora de realizar el método analítico para la cuantificación de Neomicina se debe tener presente que no debe realizarse en condiciones que exista la presencia de soluciones acidas, pues este sería un interferente a la hora de realizar la cuantificación de principio activo, pues este pierde actividad en estas condiciones.
4. La exactitud del método analítico cumple con los parámetros y/o criterios de aceptación, concluyendo que los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento establecido bajo condiciones descritas posee una proximidad al valor verdadero.
5. El método analítico para la cuantificación de Neomicina es preciso al ser efectuado cualquier día, por cualquier analista y cualquier muestra. Es un procedimiento analítico preciso ya que posee un grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente en el laboratorio.
6. Los resultados en la precisión mostraron que los coeficientes de variación son aprobados, si el valor aceptable debe ser menor o igual que 5%, los coeficientes de variación resultaron ser menores que 5%, lo cual demuestra la buena repetibilidad del método de cuantificación.
7. Los resultados permiten concluir que el método analítico para la cuantificación de Neomicina presenta resultados de linealidad, especificidad, precisión y exactitud satisfactorios que permiten obtener resultados seguros

y confiables en la detección y cuantificación del activo en las muestras al 60% y 125%.

BIBLIOGRAFIA

ARRIOLA, Lucrecia. Validación de métodos analíticos, fisicoquímicos y microbiológicos. Guatemala: Colegio de farmacéuticos y químicos de Guatemala, 2012.

ARTEGAGA CARVAJAL, Manuel. Controles, evaluaciones y valoraciones microbiológicas. Revista colombiana de ciencias químico-farmacéuticas, No. 20. Bogotá: Departamento de farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, p. 55-58.

CAMACHO, Andrea & ARIAS, Janeth. Implementación y estandarización de la técnica para la determinación de potencia microbiológica de neomicina en crema tópica fabricada en una planta productora de medicamentos. Revista de la Facultad de Ciencias, 8(1), 39-46. Bogotá: Departamento de microbiología, Pontificia Universidad Javeriana. 2003. Disponible en Internet; jdcarias@javeriana.edu.co ; andrea_camacho_duarte@hotmail.com

CASTILLO AGUILAR, Beatriz & GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, Rolando. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Revista cubana de farmacia, 30(1). Habana: Centro de química farmacéutica, 1996. ISSN 1561-2988

CERRA, Héctor; FERNÁNDEZ, María Cristina; HORAK, Celina; LAGOMARSINO, Mónica; TORNO, Graciela; ZARANKIN, Esteban. Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires - Argentina: Asociación argentina de microbiología, (s.f.).

Desarrollo analítico informe potencia microbiológica. Disponible en Internet: <https://es.scribd.com/doc/106525301/JONATHAN-URBINA-SOTO-DESARROLLO-ANALITICO-INFORME-POTENCIA-MICROBIOLOGICA>

Farmacopea de los Estados Unidos, USP 38. Validación de procedimientos farmacopeicos. <1225> p. 1581-1587

Farmacopea de los Estados Unidos, USP 38. Antibióticos. Valoraciones microbiológicas 81, p. 94 – 110

Farmacopea de los Estados Unidos, USP 38. Validación de procedimientos farmacopeicos. 1033, p. 849- 852. Disponible en Internet; <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/n013.html>

GARCÉS, Alexandra; RIVAS, Iliana; REGNAULT, Miriam & ROSSI, Luisa. Desarrollo y validación de un método microbiológico para la determinación de la

potencia de azitromicina. (Postgrado de Aseguramiento de la calidad). Caracas – Venezuela: Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, (s.f.).

HOYOS MARTINEZ, Maritza. Guía validación de métodos. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2010.

MILLER, James & MILLER, Jane. Estadística y quimiometría para química analítica. 4 ed. Madrid: Prentice Hall, 2002

MORA HUERTAS, Claudia Elizabeth. Calidad farmacéutica: Nuevos enfoques de las buenas prácticas de manufactura. Revista Colombia: ciencia, química y farmacéutica, 38(1), 42-58. Bogotá D.C.: Departamento de farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 2009. Disponible en Internet: www.farmacia.unal.edu.com

MORA MEZA, José David. Implementación y desarrollo de la técnica de potencia microbiológica de antibióticos y su impacto económico en la empresa Calox de Costa Rica, S.A.

MUÑOZ FRANCÉS, Silvia Carolina. Validación del método microbiológico cilindro-placa para la potencia del antibiótico Lineomicina clorhidrato. (Tesis de grado). San Salvador: Universidad del Salvador, 2006

NACIONES UNIDAS. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. New York: Sección de laboratorio y asuntos científicos, oficina de las naciones unidas contra la droga y el delito, 2010

ORTIZ GOMEZ, Diana Sofía. Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una industria farmacéutica. (Tesis de gado). Bogotá: Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, 2008

The Merck Index An Encyclopedia or Chemicals, drugs and biologicals. NJ, USA.: Merk Research Laboratories. Whitehouse Station, 2006. p. 1116, 1117.

VELANDIA CASTELLANOS, Johanna Carolina. Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria. Bogotá: Facultad de ciencias básicas, 2008.

VELEZ M. T. Cuadrado B., Control microbiológico a medicamentos, cosméticos y desinfectantes. Cartagena: Universidad de Cartagena, 2005

<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/n013.html>