



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

**VALIDACION DEL ENSAYO MICROBIOLÓGICO
PARA AMOXICILINA EN SUSPENSION
POR DIFUSION EN PLACA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

JOSE LUIS CAMACHO GUZMAN

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES TEORICOS	3
A. Definición y Clasificación de los Antibióticos ..	3
B. Monografía de la Amoxicilina	6
C. Suspensiones	16
D. Ensayo Microbiológico	18
E. Validación de Métodos Analíticos	32
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
IV. OBJETIVOS	46
V. HIPOTESIS	47
VI. PARTE EXPERIMENTAL	48
A. Material, Equipo y Reactivos	48
B. Metodología General	50
C. Validación del Método	58

VII. RESULTADOS	63
A. Validez del Ensayo Microbiológico	63
B. Evaluación Estadística del Método	65
VIII. ANALISIS DE RESULTADOS	77
A. Validez del Ensayo	77
B. Validación del Método	78
IX. CONCLUSIONES	82
X. ANEXOS	84
XI. REFERENCIAS	91

I. INTRODUCCION

En los Laboratorios Smith Kline Beecham Farmacéutica se elaboran productos antibióticos (β -lactámicos) derivados de la penicilina, los cuales se valoran microbiológicamente para determinar la actividad que poseen cuando se aplican en forma diluida sobre microorganismos específicos.

Debido a la falta de evidencia documentada que requiere un análisis de este tipo para amoxicilina en nuestro país y considerando la similitud de estructuras químicas con la ampicilina, se adaptó un método de análisis microbiológico utilizando las condiciones analíticas reportadas para ésta última.

Se demostró la validez del ensayo a través de la relación lineal que existe entre el logaritmo de la dosis y la respuesta obtenida por el método (modelo de líneas paralelas). Para estimar la potencia relativa de las muestras con respecto a la del patrón se utilizó un procedimiento de 5+1 dosis, y una vez lograda la adaptación del método, se procedió a la validación del mismo evaluando diversos parámetros analíticos tales como precisión, exactitud, linealidad, reproducibilidad, repetibilidad, estabilidad de la muestra analítica y especificidad.

Con la validación de nuestro método se cumple con los nuevos lineamientos de la Ley General de Salud, se asegura la eficacia terapéutica de los productos (garantía de calidad) y además se tiene una alternativa para la reducción de costos durante el análisis de los mismos.

Con este estudio se concluye que antibióticos con el mismo núcleo químico (ácido 6-aminopenicilínico) pueden ser cuantificados microbiológicamente usando similares factores de análisis.

II. ANTECEDENTES TEORICOS

A. Definición y Clasificación de los Antibióticos

Uno de los acontecimientos más trascendentales de los hallazgos científicos, lo constituye sin duda alguna el descubrimiento de los antibióticos. Etimológicamente, la palabra antibiótico significa destruir la vida, y de acuerdo a esta definición, cualquier agente físico, químico o mecánico podría ser un antibiótico, sin embargo, el concepto de que las sustancias producidas por un microorganismo vivo pueden matar a otros, es casi tan antiguo como la misma ciencia microbiológica, más aún la aplicación de la terapéutica antibiótica, sin saber que era tal, es mucha más antigua, ya que los chinos conocían hace poco más de 2500 años las propiedades de la cáscara enmohecida de la soya, la cual aplicaban a las infecciones como antibiótico (1).

En forma general, los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes tipos de microorganismos, que suprimen a su vez el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente pueden destruirlos (2)(3).

Para clasificar y agrupar a los antibióticos se han utilizado diferentes métodos, pero todos ellos tienen excepciones y superposiciones, sin embargo, existe uno más específico que toma en cuenta la estructura química y el me-

canismo de acción y los clasifica de la siguiente forma:

1. Antibióticos que inhiben o activan enzimas que rompen las paredes celulares bacterianas, causando pérdida de la viabilidad y a menudo lisis celular; entre ellos se encuentran las penicilinas y cefalosporinas.

2. Antibióticos que actúan directamente sobre la membrana celular, afectando la permeabilidad de la membrana, produciendo filtración de compuestos intracelulares; entre ellos se encuentran las polimixinas y agentes antifúngicos de nistatina y anfotericina B, que se unen a los esteroides de la pared celular bacteriana.

3. Antibióticos que afectan la función de los ribosomas bacterianos, causando inhibición irreversible de la síntesis de proteínas; estos bacteriostáticos incluyen cloramfenicol, tetraciclinas, eritromicina y lincomicina.

4. Antibióticos que se unen a la unidad ribosomal 30S y causan acumulación de complejos iniciales en la síntesis de proteínas, lectura errónea del RNAm y producción de polipéptidos anormales; estos pertenecen al grupo de los aminoglucósidos, que son bactericidas.

5. Antibióticos que afectan el metabolismo del ácido nucleico, como la rifampicina, que inhibe la RNA-polimerasa dependiente del DNA.

6. Antimetabolitos, incluyen el trimetoprim y las

sulfonamidas, que bloquean pasos metabólicos específicos, esenciales para el microorganismo.

Con el tiempo, al dilucidarse mecanismos de acción más complejos, surgirán categorías adicionales, sin embargo, en la actualidad el mecanismo de acción de muchos antibióticos es desconocido (4).

Este trabajo toma en cuenta solo antibióticos que destruyen la pared celular bacteriana mediante reacciones enzimáticas (antibióticos β -lactámicos), incluyendo una monografía completa del antibiótico en cuestión (amoxicilina).

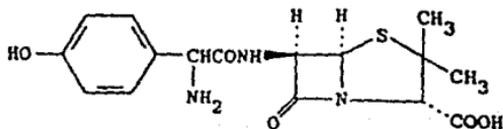
B. Monografía de la Amoxicilina

1. Descripción

a) Sinónimos. Ácido 6 - [D-(-)-alfa-amino-p-hidroxifenil-acetamido] penicilínico; p-hidroxiampicilina; amoxicilina; alfa-amino-p-phidroxibencilpenicilina; ácido 6-(p-hidroxialfa-aminofenilacetanida) penicilínico.

Trihidrato : A-Gram, Amodeк, Amoxibiotic, Amoxidal, Amoxil, Moxipen, Clamoxil, Moxal, Moxaline, Pamocil, Ренамок, Robamок, Utimок, Wumок.

b) Fórmula y peso molecular.



419.46 g/mol

Figura 1. Estructura Química de la Amoxicilina (5).

c) Apariencia, color y olor. La amoxicilina trihidrato es un polvo cristalino blanco. La amoxicilina, similar a otros antibióticos semisintéticos, posee el olor característico de las penicilinas descrito como de tipo sulfuroso.

2. Propiedades Físicoquímicas

a) Absorción Ultravioleta (UV). UV máxima (HCl 0.1N): 229 nm (ϵ 9500), 272 nm (ϵ 1080); (KOH 0.1N): 291 nm (ϵ 3000), 248 nm (ϵ 2200) (Figura 2); (Etanol): 274 nm (ϵ 1400), 230 nm (ϵ 10850) (Figura 3).

b) Espectro Infrarrojo (IR). (Figura 4).

c) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). (Figura 5).

3. Estabilidad de la Amoxicilina

La amoxicilina es degradable en presencia de penicilino hidrolasas. En bases fuertes descompone por apertura del anillo lactámico a ácido penicilóico, siendo esta la base para su análisis por yodometría. La amoxicilina en ácido se hidroliza para formar ácido penicilínico de amoxicilina, el

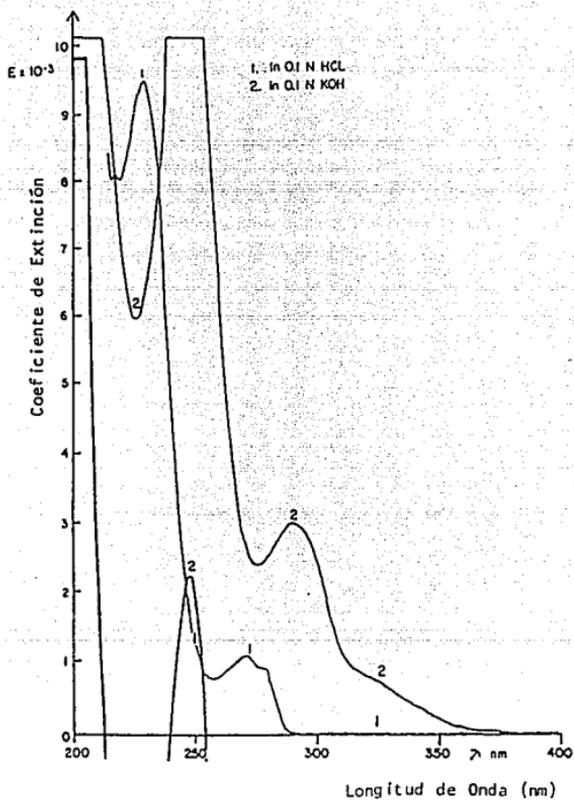


Figura 2. Espectro de Absorción Ultravioleta de amoxicilina trihidrato usando una solución de ácido clorhídrico 0.1 N e hidróxido de sodio 0.1 N.

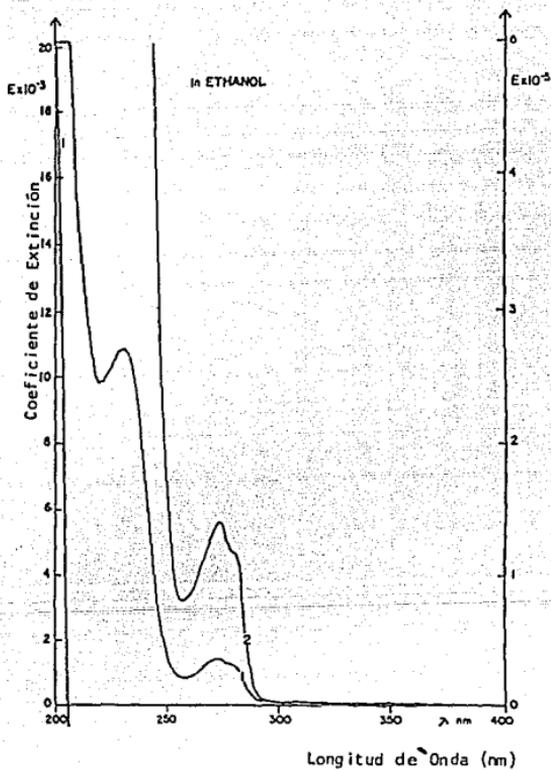


Figura 3. Espectro de Absorción Ultravioleta de amoxicilina trihidrato utilizando etanol.

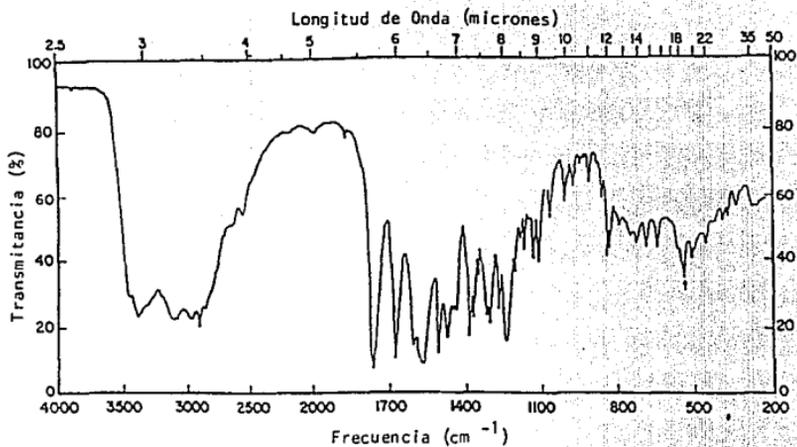


Figura 4. Espectro Infrarojo de amoxicilina trihidrato utilizando una pastilla de bromuro de potasio.

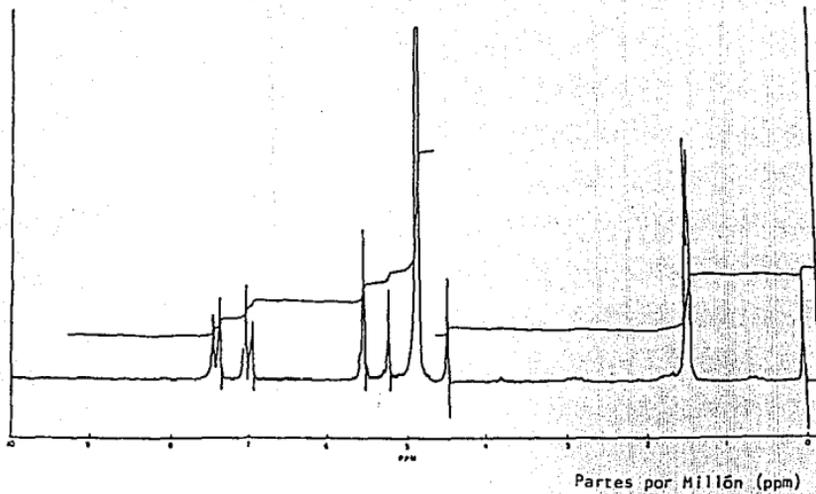


Figura 5. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de amoxicilina trihidrato.

cual absorbe a 320 nm. Esta hidrólisis ácida es la base para la determinación de ampicilina y amoxicilina.

Todas las penicilinas semisintéticas son elaboradas a partir del ácido 6-aminopenicilínico, el cual no ha sido encontrado como un producto de degradación.

La amoxicilina, en formas de dosificación oral, es una emulsión insoluble a 125 mg/5 ml y tiene la capacidad de retener en un 90 % su actividad por 2 semanas a temperatura ambiente o a 4°C. De las soluciones guardadas durante 7 días a temperatura ambiente, sólo el 50% de la amoxicilina permaneció intacta, pero a 4°C se mantuvo el 100%.

La amoxicilina en polvo seco: cápsulas y polvos para su dosificación oral pueden retener su actividad por un periodo de 5 años, sin embargo, las fechas de caducidad son generalmente de 3 años (6).

4. Solubilidad

Solvente	mg / ml
Agua	4.0
Metanol	7.5
Etanol (absoluto)	3.4
Acetona	1.3
Dioxano	0.8
Acetato de etilo	Insoluble

Tabla I. Datos de solubilidad de amoxicilina en diferentes solventes.

La solubilidad en agua depende del pH, sin embargo, a pH 4-8, esta varía de 4.2 - 9.0 mg/ml.

5. Métodos de Análisis

Las pruebas requeridas para la certificación de amoxicilina incluyen: potencia (950-1050 mcg/ml) en base anhidra humedad (11.5-14 %, por Karl Fisher); pH (3.5-6); cumplir con pruebas de seguridad; ser cristalina; dar una identificación positiva en IR; la titulación con ácido y base (metóxido de litio y ácido perclórico) no debe ser menor al 90% sobre la base seca. El ensayo puede ser efectuado yodométricamente, colorimétricamente o microbiológicamente usando Sarcina lutea en un procedimiento de difusión en placa.

Las formas de dosificación fabricadas, cápsulas, tabletas y suspensiones orales requieren de amoxicilina certificada y los lotes elaborados cumplir con ciertas pruebas del laboratorio de control de calidad que incluyen pruebas físicas, humedad, ensayo e identificación por cromatografía en capa fina; para las suspensiones orales incluyen las mismas pruebas más el pH.

Existen otros procedimientos analíticos para amoxicilina que incluyen la medición de la absorción a 320 nm del

del ácido penicilínico formado en presencia de ácido y cobre. Un método usando Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP) ha sido publicado para ampicilina; CLAP parece ser un excelente procedimiento cromatográfico cuantitativo para amoxicilina ya que no requiere calentamiento (no destructivo) y es cuantificado realmente por medición de la intensidad del pico (7).

6. Evidencia Farmacológica

La amoxicilina fué sintetizada y protegida por una patente varios años después que la ampicilina, la cual es una de las penicilinas más comunes.

New y Winshel demostraron que la amoxicilina y la ampicilina poseen un espectro antibacteriano similar, de igual forma, reportaron que la amoxicilina fue absorbida mejor y produce mejores niveles en suero que la ampicilina. Sutherland et. al. amplió este panorama cuando comparó ambas penicilinas encontrando una mayor actividad de la amoxicilina contra Staphylococcus aureus, estreptococos β -hemolíticos, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus faecalis, Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae, E. coli, Serratia marcescens, klebsiella y salmonella.

Inguld demostró que la amoxicilina tiene mayor penetración que la ampilina hacia la pared celular bacteriana y es más efectiva contra infecciones causadas por microorganismos Gram negativos, posee una mayor penetración hacia las secreciones respiratorias obteniéndose niveles tisulares más altos.

Los niveles en suero son el doble que los de ampilina y más prolongados. La amoxicilina es más estable en ácido gástrico y los niveles en esputo, mucosa sinusa y fluido intersticial son más altos que con ampilina.

Se reportó el uso de amoxicilina contra diversas infecciones que incluyen infecciones biliares, ginecológicas y de los huesos. En cientos de pacientes fué un efectivo agente antibacteriano del tracto urinario, infecciones del tracto respiratorio, piel y algunos tejidos e infecciones del tracto gastrointestinal (8).

Como se observa en la discusión anterior, la amoxicilina parece poseer un espectro antibacteriano más amplio que la ampilina, lo cual hace a la primera un antibiótico de mayor elección para combatir un gran número de microorganismos patógenos.

C. Suspensiones

Una suspensión farmacéutica se define como una dispersión heterogénea que contiene material insoluble finamente dividido, suspendido en un medio líquido.

Se administran por vía oral, se inyectan por vía intramuscular o subcutánea o se aplican en piel en tópicos y se usan oftálmicamente. Como algunos productos se preparan ocasionalmente en forma seca para colocarlos en suspensión al dispersarlos mediante la adición de un vehículo apropiado, esta definición se extiende para incluir dichos productos (9).

Una suspensión de fórmula adecuada debe cumplir con ciertos criterios. Las partículas dispersas deben tener un tamaño tal que no las haga sedimentar rápidamente en el recipiente, pero si hay sedimentación, el sedimento no debe ser una pasta dura si no que debe ser capaz de redispersión con un esfuerzo mínimo por parte del paciente. Además el producto debe ser fácil fluidez, de sabor agradable y resistente al ataque microbiano.

Parámetros a controlar durante el proceso de fabricación de una suspensión:

- a) Tamaño de la partícula
- b) Adición correcta de las materias primas
- c) Velocidad y tiempo de mezclado

Componente	Dòsis
Principio activo	Dòsis terapèutica
Agente suspensor	0.5-1.0 %
Dispersante	1.0 %
Coloide protector	3.0-5.0 %
Edulcorante	+/-30.0 %
Espesante	= 1.0 %
Conservadores	0.1-0.5 %
Buffer (sistema amortiguador)	regular pH
Aromatizante	0.1 %
Colorante	0.1 %
Vehiculo	cbp
Antioxidante (en algunos casos)	= 1.0 %

Tabla II. Componentes minimos de una suspensión como producto terminado.

Controles de calidad necesarios para una suspensión (10):

Organolépticas

Valoración del principio activo

Redispersabilidad

Humedad (Karl Fisher) (en caso de polvo p/reconstituir)

Velocidad de sedimentación

Volumen de sedimentación

Ensayo Microbiológico (en caso de antibióticos)

Densidad y pH

D. ENSAYO MICROBIOLÓGICO

1. Teoría de la Formación de las Zonas de Inhibición

El método de difusión en agar empezó a emplearse cuantitativamente a partir de los trabajos hechos por Chain y colaboradores en 1940 al introducir estos ensayos en los procesos de purificación de la penicilina.

El sistema en general comprende: un medio de agar nutritivo inoculado con una suspensión del microorganismo de prueba en la forma vegetativa (o de espora), la suspensión se hará a partir de un microorganismo incubado para lograr la fase lag (fase de adaptación del microorganismo en el medio de cultivo) (o en el caso de utilizar microorganismos esporulados, más allá de la fase lag). El límite de la zona de inhibición será donde haya suficientes células que absorban todo el antibiótico impidiendo la difusión adicional del mismo (11).

a. Las leyes de difusión. La difusión puede definirse como el proceso por el cual los movimientos que producen al azar las moléculas, transfieren material de una posición a otra.

La velocidad de difusión a través del agar depende de la concentración en el depósito, el tamaño y la forma de la molécula del antibiótico, la viscosidad del medio, la

temperatura y de otros agentes como el contenido iónico del medio.

Para un antibiótico determinado, la velocidad de difusión en un medio definido bajo condiciones de prueba controladas, puede determinarse experimentalmente y expresarse como una constante (coeficiente de difusión) (12).

En condiciones de prueba óptimas, la distancia alcanzada por una concentración particular de un antibiótico en un periodo de tiempo dado es proporcional a la cantidad de antibiótico en el depósito.

Una vez que la difusión ha empezado, se inician dos procesos simultáneamente, en el primero, la difusión del antibiótico en forma radial a partir del depósito, produce un gradiente de concentración que cambia gradualmente. Al mismo tiempo, el microorganismo empieza a metabolizar y después de la fase lag inicial, el crecimiento prosigue a una velocidad logarítmica.

b. **Concentración crítica (m').** La concentración crítica es una medida de la sensibilidad del microorganismo de prueba bajo las condiciones particulares del ensayo. La concentración del antibiótico llega a la posición de la futura zona limitante a un cierto tiempo (tiempo crítico), durante el cual la concentración crítica inhibitoria puede difundir en

el agar antes que alcance una densidad particular de células. Esto depende del coeficiente de difusión del antibiótico y la concentración del mismo que haya en el depósito.

c. Tiempo crítico (T_0). El tiempo crítico es el periodo de crecimiento del microorganismo al cual llega la población crítica (N'). Es el tiempo donde se fija el borde de la zona y puede determinarse por preincubación del medio inoculado variando periodos antes de la adición de la solución del antibiótico en el depósito.

El tiempo crítico depende de la fase lag (L) y del tiempo de generación (G), por lo tanto, depende de la temperatura y del inóculo (N_0) (población del inóculo). Es independiente de la concentración del antibiótico.

d. Población del inóculo (N_0). Es la población existente al tiempo de inocular el agar base con el microorganismo de prueba.

e. Población crítica (N'). Es la población al tiempo T_0 (un incremento adicional en la población más allá de este límite da como resultado un exceso de microorganismos capaces de absorber completamente el antibiótico y así impedir su difusión adicional; la difusión del antibiótico

durante la fase lag de crecimiento puede dar como resultado zonas de inhibición pequeñas, más aún cuando se usa un inóculo grande tal como $N_0=N'$.

Después de la inoculación, el microorganismo inmediatamente empieza a crecer. A partir de la fase lag, que es la inicial, el microorganismo pasa a la fase logarítmica y la multiplicación prosigue rápidamente. El punto máximo se alcanza cuando la masa celular es lo bastante grande para no ser inhibida por la concentración crítica del antibiótico. Este crecimiento sigue hasta llegar a ser visible, limitando el borde de la zona de inhibición.

La velocidad de crecimiento de las cepas de prueba es influenciada por el tamaño del inóculo y por la capacidad nutritiva del medio de cultivo. Un medio que ofrece un crecimiento rápido del microorganismo no es deseable debido a que las zonas de inhibición son reducidas. Por otra parte, un medio con nutrimentos mínimos exhibe un crecimiento lento que tiende a dar grandes zonas de inhibición.

f. Población inhibitoria (N''). Es aquella población suficientemente grande que impide completamente la formación de zonas de inhibición. Los factores que deciden el límite de la zona son la concentración crítica y la población crítica; factores que influyen en la difusión del antibiótico o en el tiempo que es necesario para alcanzar la población crítica.

Debe observarse que de acuerdo con la teoría de la formación de las zonas de inhibición, la pendiente de la línea de respuesta se determina por los factores que a continuación se dan:

- 1) Preincubación
- 2) Predifusión
- 3) Temperatura de Incubación

Con respecto al último punto cabe hacer mención que el coeficiente de difusión aumenta con la temperatura, mientras que la velocidad de crecimiento se incrementa a un óptimo y luego cae.

Un inóculo bajo permite zonas grandes y una pendiente mejor de la línea de respuesta del logaritmo de la concentración. Sin embargo, si la cantidad del inóculo se reduce, el límite de la zona es difuso. Deben hacerse ensayos para seleccionar la cantidad del inóculo que dé zonas con límites claramente definidos y con una buena pendiente de la línea de respuesta del logaritmo de la concentración (13)(14).

g. Naturaleza de la zona de inhibición. Anteriormente se habló de la presencia de un gradiente de concentración del

antibiótico, en donde, el crecimiento microbiano va a presentar dos formas de inhibición, una completa y otra parcial, y de esta forma, el borde de la zona de inhibición se demarca exactamente. En la práctica, la mayoría de los antibióticos producen zonas de inhibición parciales, en donde a veces es difícil visualizar el límite. Para comprenderlo mejor, la siguiente figura muestra en forma exagerada el borde de la zona de inhibición.

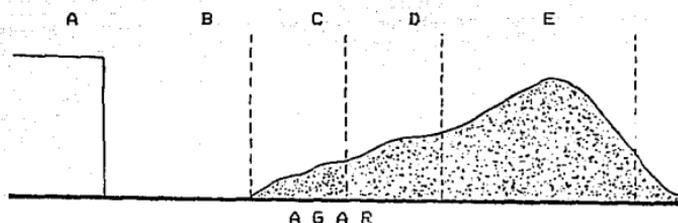


Figura 6. A) Depósito; B) Inhibición completa; C) Inhibición parcial; D) Crecimiento retardado y E) Crecimiento estimulado.

El área de crecimiento estimulado puede atribuirse a un crecimiento disminuido de la parte que esté más cerca del depósito, debido a que los nutrientes que difunden hacia la zona de inhibición son más fácilmente utilizables para las células que se encuentran al borde de la zona y así la masa celular es más grande.

Una banda de inhibición parcial es usualmente muy estrecha y probablemente representa una breve inhibición y un eventual crecimiento que es fácilmente observado con concentraciones subinhibitorias de antibiótico. Uno podría esperar encontrar la concentración inhibitoria dentro de esta banda de inhibición parcial, así el crecimiento sería completamente inhibido.

A veces hay un anillo interno muy débil de crecimiento retardado, que representa células vivas inicialmente inhibidas por la concentración del antibiótico. Este fenómeno puede relacionarse frecuentemente con la degradación o inactivación del antibiótico resultando un crecimiento retardado de estas células vivas capaces de sobrevivir a la concentración inhibitoria inicial.

Esta respuesta es particularmente notable en algunos microorganismos de prueba que producen una enzima extracelular, tal como la penicilinasa o β -lactamasa de Staphylococcus aureus.

Cuando el inóculo contiene una pequeña proporción de variantes resistentes, éstas eventualmente crecen para producir colonias visibles dentro de la zona de inhibición.

La población inicial de células resistentes puede ser relativamente pequeña resultando colonias de menor tamaño y de lenta formación, regularmente es el área cercana al depósito, donde la concentración del antibiótico es alta.

Para distinguir, entre crecimiento secundario de variantes resistentes y crecimiento retardado de sobrevivientes susceptibles, deben subcultivarse colonias del área de inhibición y repetir el ensayo. De esta manera se incrementaría la proporción de variantes resistentes y así el ensayo repetido sería definitivo. Por supuesto, es siempre necesario distinguir microorganismos contaminantes de variantes resistentes a través de una diferenciación microscópica mediante la técnica de Gram.

h. Factores que influyen en el tamaño de las zonas de inhibición. Se han comentado las variables técnicas que influyen en el tamaño de las zonas de inhibición; algunas pueden afectar los resultados en varias formas. Las variables más importantes que son fácilmente sujetas a control experimental son las siguientes:

- 1) Sensibilidad primordial del microorganismo de prueba.

- 2) Condición del microorganismo de prueba. Vegetativo o espora; si es vegetativo en su fase de crecimiento (fase logarítmica).

- 3) Densidad del inóculo. La cantidad es probablemente la variable más importante que influye en las zonas de inhibición. El tamaño de la zona no se determina hasta que se alcanza la población crítica (N').

Con un inóculo pequeño se requiere de más tiempo para alcanzar la concentración crítica y así, el antibiótico puede difundir más y la zona es más grande. El tamaño de la zona de inhibición se relaciona inversamente con la cantidad del inóculo.

4) Composición del medio de cultivo. Este influye en el tamaño de la zona por tres razones:

- a) su efecto en la actividad del antibiótico
- b) su influencia en la velocidad de difusión del antibiótico
- c) su efecto en la velocidad de crecimiento del microorganismo

La capacidad nutritiva del medio puede tener influencia significativa en la duración de la fase lag y el tiempo de generación del microorganismo. Un medio deficiente produce zonas más grandes, probablemente debido a la prolongación de la fase lag que se requiere antes de que pueda iniciarse el crecimiento. El contenido de agua del medio es importante, debido a que la pérdida de la misma, ocasiona que las zonas que se encuentran a los bordes de las placas sean de mayor tamaño que las que se encuentran al centro de la placa.

5) Incremento del grosor del medio. Lo cual ocasiona disminución en el diámetro de las zonas.

6) Concentración de la solución de prueba.

7) Volumen de la solución de prueba que se aplica en las placas. Debe ser grande, para que actúe como depósito con una concentración continua o aplicando un volumen igual.

8) Área de aplicación de la solución de prueba. Debe existir uniformidad en cuando al área de contacto entre depósito y capa inoculada, ya sea que se utilicen cilindros de acero inoxidable, perlas de porcelana o discos de papel. En el caso de perforaciones en el agar, el diámetro debe ser constante.

9) Tiempo de aplicación de la solución de prueba. Las soluciones aplicadas al último tienen menos tiempo para difundir, por lo que la población crítica se alcanza en menos tiempo produciéndose zonas más pequeñas.

10) Temperatura de incubación. Una placa colocada en el entrepaño de la incubadora tarda 1 hr para calentarse 1°C, pero si las placas se colocan en columnas de cinco, la placa del centro tarda cerca de 4 horas para alcanzar esa misma temperatura.

Debido a que la velocidad de crecimiento del microorganismo de prueba es más baja, si no se alcanza la temperatura óptima, el tiempo que se requiere para alcanzar la población crítica será más largo. Consecuentemente, las placas del centro de la columna tendrán zonas más grandes que aquellas que están abajo, debido a que la concentración crítica del antibiótico tiene más tiempo para difundir.

11) Tiempo de incubación. La posición de la zona de inhibición en las placas, se determina en las primeras horas de incubación, las zonas debidas a la solución del antibiótico pueden medirse tan pronto como el crecimiento llegue a ser visible (15).

2. Validez del Ensayo

a. Ensayo Biológico. Un ensayo biológico es un procedimiento para estimar la naturaleza, constitución o potencia de un material (o de un proceso), por medio de la reacción que sigue cuando se aplica sobre la materia prima.

Los métodos biológicos se emplean para ensayar ciertas sustancias cuya potencia no puede ser evaluada con precisión a través de un método químico o físico. El principio aplicado es el de comparación con una preparación de referencia, con el fin de probar en cuanto la preparación muestra produce el mismo efecto biológico que una cantidad conocida de la preparación patrón (unidad) bajo las mismas condiciones de trabajo.

La potencia de un antibiótico se puede definir como la actividad antibacteriana que éste posee sobre un sistema biológico; actividad que se expresa en "unidades" o mcg". En cada caso, la unidad o mcg de actividad antibiótica se

establecen a través de un patrón primario específico para cada antibiótico.

Una preparación patrón contiene el principio activo a una concentración conocida y constante. Esta preparación debe conservarse bajo condiciones que preserven tanto como sea posible su actividad.

Dado que ambas preparaciones (patrón y muestra), deben diluirse, es necesario definir lo que es un ensayo de dilución. Ensayos de dilución son aquellos en los que la preparación muestra por ensayar, contiene el mismo componente activo que la preparación patrón, pero en una razón diferente de componentes activos e inertes.

Para verificar si un ensayo particular puede considerarse como ensayo de dilución, es necesario examinar los efectos de diluir las preparaciones sobre la relación dosis-respuesta debida al principio activo. Cuando el efecto de diluir las preparaciones sobre las relaciones dosis-respuesta en un ensayo, se desvia del efecto de diluir el principio activo, este modelo no es válido para este ensayo en particular. Para hacer aparente el efecto de dilución en el modelo teórico, es útil transformar la relación dosis-respuesta a una relación lineal.

b. Modelo de líneas paralelas. Este modelo se basa en una relación lineal entre la respuesta y el logaritmo de la dosis:

$$y = b + m x$$

donde "y" es la respuesta esperada, "x" es la concentración de la sustancia por analizar, y "b" y "m" son coeficientes.

Si la preparación se diluye, cada valor de x en la relación, disminuye una cantidad igual al logaritmo del factor de dilución. Por ejemplo, si la preparación se diluyera 1:2, la relación se convertiría en :

$$y = b + m (x - \log 2) = b - m \log 2 + mx = b' + mx$$

Toda respuesta disminuiría por una cantidad constante $m \log 2$ y la línea de regresión se desplazaría hacia abajo paralela así misma.

Para verificar si un ensayo cumple con este modelo, debe satisfacer los siguientes requisitos:

a) Que la relación entre el logaritmo de la dosis y la respuesta pueda ser representada por una línea recta, en el intervalo de dosis ensayadas.

b) Para cualquier muestra en el ensayo, la línea recta debe ser paralela a la del patrón.

La característica distintiva de los ensayos biológicos cuantitativos es que la aplicación de estímulos idénticos a la materia viva, da lugar a respuestas no necesariamente iguales. Debido a la variabilidad inherente a las respuestas biológicas, es necesario recurrir a los métodos estadísticos para obtener la mejor estimación de la potencia de un mate-

rial, así como la precisión del método analítico.

El procedimiento estadístico que permite evaluar si un bioensayo satisface las condiciones del modelo de líneas paralelas, es el análisis de varianza. Con base en este análisis se determina:

a) si la relación entre la variable de respuesta o un métámetro de esta y el logaritmo de la dosis, es de tipo lineal (en un bioensayo a tres dosis).

b) si existen desviaciones del paralelismo entre el patrón y las muestras.

Cuando se ha establecido la validez del ensayo, se estima la potencia relativa de la(s) muestra(s) con respecto a la del patrón siguiendo un procedimiento de 5+1 dosis (el cual se describirá con detalle más adelante), pudiéndose expresar el resultado como una razón de potencias o transformarse a las unidades adecuadas. Pueden estimarse, además, límites de confianza de la potencia a partir de cada conjunto de datos del ensayo (16) (17) (18).

E. Validación de Métodos Analíticos

1. Antecedentes

La base del concepto de validación tiene sus orígenes a partir de tres comunicados emitidos por la Food and Drug Administration (FDA). El primero, en 1906, exige el control de medicamentos para evitar su adulteración. El segundo en 1938, convoca a los fabricantes a eliminar de las formulaciones aquellas sustancias que pudieran causar algún efecto tóxico, como consecuencia, se implementa el acta de acondicionamiento de seguridad de los medicamentos. El último de ellos en 1962, pide comprobar la eficacia del producto farmacéutico; debido a los efectos secundarios de la Talidomida y a las intoxicaciones provocadas por una contaminación cruzada durante el acondicionamiento de penicilina, determinan que, a partir de 1963 se permite conceptualizar la no idoneidad de un medicamento si las condiciones de fabricación no son las mínimas aceptables.

A partir de 1967, son elaboradas unas normas de correcta fabricación y de control de la calidad de los productos, llamadas Prácticas Adecuadas de Manufactura (PAM's). Estas normas, consideran todos aquellos factores que contribuyen a la obtención de alta calidad en los procesos de fabricación, así como la reproducibilidad del producto lote a lote.

La demostración de que estos procedimientos son correctos se conoce con el nombre de validación.

Sin embargo, fué hasta 1983, después de una serie de acuerdos entre la FDA y asesores de la industria farmacéutica, que se establecen una serie de reglas aplicando las PMA's. De esta manera se determina el significado de la validación, se establecen criterios de aceptación y limitantes para considerar la validez de un proceso y por ende del método analítico (19).

2. Definición

Los beneficios que aporta la validación de técnicas analíticas son grandes, ya que ésta permite conocer el comportamiento de un proceso bajo diferentes condiciones de operación, y posteriormente utilizarlo en lo posible para procesos rutinarios. Con el objeto de producir los mejores resultados analíticos posibles es importante considerar todas las variables del método analítico: reactivos, equipo, analista, etc.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método, satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

Actualmente, el concepto de validación, es considerado como el procedimiento documentado por el cual se establece la exactitud, variabilidad y especificidad del método analítico.

3. Guía para la Validación de Métodos Analíticos

Existen diversas formas de validar un método analítico, ya que existe una gran variedad de experimentos que pueden ser utilizados para tal fin. El elegir cuales serán los puntos para validario depende, generalmente, de las necesidades de cada laboratorio, de la aplicación que tenga el método, de los requerimientos gubernamentales y algunas veces de la persona que los realiza.

Los parámetros a validar, dependiendo de la aplicación del método, se encuentran en el Anexo (I).

Para la validación del método microbiológico, propuesto en este trabajo, los parámetros analíticos considerados son:

METODO:

- Linealidad
- Exactitud al 100%
- Especificidad
- Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)
- Estabilidad de la Muestra Analítica

SISTEMA:

- Linealidad
- Precisión

4. Conceptos y Determinaciones

a. Linealidad del sistema.

Es la relación que se establece mediante una línea recta entre una propiedad física, química o biológica con la cantidad del fármaco por analizar.

Se evalúa construyendo una curva de calibración a partir del análisis de diferentes soluciones de la sustancia de interés, usualmente 50, 80, 100, 120 y 150 %, preparadas a partir de una misma solución patrón.

Con los datos obtenidos, representar la gráfica de la curva y calcular los siguientes parámetros estadísticos: X, DE, CV, r, r^2 y m.

CV	≤ 1.5 %
r	≥ 0.99
r^2	≥ 0.98
m	= 1

Tabla III. Criterio de aceptación en linealidad del sistema.

NOTA: para métodos microbiológicos $r \geq 0.98$

b. Precisión del sistema.

Es la correlación que existe entre un valor determinado experimentalmente y un valor aceptado como referencia, obte-

nidos por un sólo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

Este parámetro se determina por el análisis de seis soluciones de la sustancia de interés preparadas al 100% del nivel normal del procedimiento.

Con los datos obtenidos calcular: X, DE y CV.

CRITERIO:

CV \leq 1.5%

NOTA: para métodos microbiológicos CV \leq 3%

c. Linearidad del método.

Mide el grado en que la respuesta del método, al trabajar en un rango determinado de concentraciones, se aproxima a una función lineal del tipo $y = mx + b$.

Rango: está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior de la sustancia de interés (incluyéndolos), en el cual se demuestra que el método es preciso, exacto, específico y lineal.

Realizar análisis triplicados de soluciones preparadas por la adición de la sustancia de interés a placebos del producto, usualmente 50, 80, 100, 120 y 150 % de la cantidad especificada en el marbete.

Con los resultados obtener: la gráfica de la curva y la ecuación de la recta; calcular \bar{x} , DE, CV, m , b , r y r^2 .

% de recobro 95 - 105%

$$CV \leq 0.7\%$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

$$m = 1$$

$$b = 0$$

Tabla IV. Criterio de aceptación en linearidad del método.

	% de recobro	CV
METODO		
Cromatográfico	98 - 102 %	$\leq 2 \%$
Titrimétrico	98 - 102 %	$\leq 2 \%$
Químico y espectro- fotométrico	97 - 103 %	$\leq 3 \%$
Microbiológico	95 - 105 %	$\leq 5 \%$

Tabla V. % de recobro experimental y coeficiente de variación (CV), dependiendo del método de análisis.

d. Exactitud y repetibilidad al 100%.

Es la dispersión que existe entre una serie de datos con respecto a un valor central, que es el valor real (100%) obtenido por un mismo analista utilizando idénticas condiciones de análisis.

Se expresa como el % de recobro, obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener una concentración final correspondiente al 100%.

Adicionar a placebos del producto (6 como mínimo) la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, analizarlos independientemente utilizando el método propuesto, en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Calcular % de recobro, X, DE, CV, IC al 95%.

CRITERIOS:

a) El % de recobro y el CV deben estar de acuerdo con la Tabla V.

b) Estadígrafo de contraste t de Student y χ^2 :

$$t \text{ calc} < t \text{ tab}$$

$$\chi^2 \text{ calc} < \chi^2 \text{ tab}$$

e. Reproducibilidad.

Es la correlación entre mediciones repetidas respecto a variaciones en la operación; tales variaciones radican en que las determinaciones son efectuadas por diferentes analistas, en distintos días, en el mismo y/o diferente laboratorio utilizando el mismo y/o diferente equipo.

Analizar tres muestras del producto de un mismo lote cuando menos 2 por analistas en 2 días diferentes. Se debe trabajar de manera independiente partiendo de una muestra homogénea del producto al 100% de la concentración teórica.

La reproducibilidad se maneja en % de recobro.

Con los resultados calcular \bar{X} , DE y CV.

METODO	CV
Cromatográfico	≤ 2 %
Químico y espectrofotométrico	≤ 3 %
Microbiológico	≤ 5 %

Tabla VI. Criterio de aceptación a través del coeficiente de variación dependiendo del método de análisis en la reproducibilidad.

Criterio utilizando el Estadígrafo de contraste: F

$$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$$

Se evalúa utilizando una tabla de análisis de varianza (ANADEVA), utilizando el siguiente modelo matemático que mide el efecto del analista sobre el método en diferentes días y con tres replicaciones cada uno:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j(i) + E_k(ij)$$

f. Especificidad (métodos de control de calidad).

Es un término usado para indicar que la respuesta obte-

nida en el método se debe exclusivamente a la sustancia que se desea determinar y no a otras sustancias que pudieran estar presentes en el material por analizar.

Con el método propuesto analizar placebos del producto e identificar la(s) respuesta(s) del(los) principio(s) activo(s), y si procede, de los excipientes y/u otras sustancias presentes en la formulación.

CRITERIO: La respuesta obtenida por el método debe satisfacer los requisitos de la siguiente tabla:

Muestra	Respuesta
Placebo	No se obtiene respuesta (≤ 2%)
Estándar	Se obtiene respuesta (100%)
Placebo cargado (100%)	Se obtiene respuesta (100%)

Tabla VII. Criterio de aceptación dependiendo de la respuesta obtenida por el método de análisis.

g. Especificidad (métodos indicadores de estabilidad).

Un método analítico posee especificidad en estabilidad cuando ningún producto de degradación formado por el almacenamiento del material de prueba bajo condiciones normales o específicas de temperatura, luz, humedad, etc., interfiere con la determinación de la sustancia de interés.

En caso de contar con los posibles productos de degradación, preparar muestras con placebos cargados de éstos y

la sustancia de interés, y analizarlos con el método propuesto. En caso de no contar con productos de degradación y dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia de interés, establecer un número mínimo de experimentos para obtenerlos; se sugieren los siguientes:

1. Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del producto en un horno a 70°C - 120°C \pm 20°C por debajo del punto de fusión del principio activo durante 2-4 semanas.

2. Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras del producto a la luz UV o luz fluorescente y/o humedad.

3. Si es necesario, hacer soluciones de la sustancia de interés, ajustando el pH a 1-2 y/o 10-12 y colocarlos a 60 - 80°C durante 2-4 semanas.

4. Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semi-sólidas, pueden degradarse por oxidación con peróxido de hidrógeno y permanecer de 2-4 semanas a temperatura ambiente y/o por hidrólisis (pH 1-2 y 10-12), colocando las muestras a 60 - 80°C por 2-4 semanas.

CRITERIO:

Si el experimento demuestra que la respuesta analítica sólo se debe a la sustancia de interés, el método se llamará específico y podrá ser utilizado como indicador de estabilidad. En caso contrario, se deberá estimar el

efecto de las sustancias extrañas sobre la respuesta y se estimará en cuanto y cuando este efecto podría ser importante.

	Interferencia con:	
	Placebo	Placebo Cargado
Forma Farmacéutica: Soluciones, Cápsulas y Tabletas	No detectables	2 %
Suspensiones y Semi- sólidos	2 %	2 %

Tabla VIII. Relación de formas farmacéuticas y la respuesta obtenida por el método de análisis.

B. Estabilidad de la muestra analítica.

Son las condiciones durante las cuales una muestra del producto mantiene su propiedad medible en un lapso de tiempo determinado.

Se determina por la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras del producto terminado con los obtenidos de las muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones; por ejemplo: temperatura, humedad, luz, refrigeración, etc., dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia de interés.

Reanalizarlas bajo las condiciones de trabajo, utilizando una solución patrón recientemente preparada para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico propuesto. Los análisis deben ser efectuados por un sólo analista.

CRITERIO:

La muestra es estable si el IC para la diferencia para la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda a los porcentajes de la tabla IX.

METODO	I
Cromatográficos	98 - 102 %
Titrimétricos	98 - 102 %
Químicos y Espectrofotométricos	97 - 103 %
Microbiológicos	95 - 105 %

Tabla IX. Factor I para la respuesta obtenida dependiendo del método de análisis en estabilidad de la muestra analítica (20) (21) (22) (23).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que no existe evidencia documentada sobre los factores que requiere un ensayo microbiológico para amoxicilina en nuestro país y dada la similitud de estructuras químicas con la ampicilina, se utilizarán los factores ya existentes para esta última.

A través de pruebas estadísticas que demuestren la validez del ensayo quedará de manifiesto que dichas variables pueden ser utilizadas para analizar antibióticos de estructuras químicas similares por el mismo método.

Realizando varias corridas del método como pruebas preliminares, y una vez lograda la adaptación de las condiciones analíticas reportadas para calcular la potencia de la (s) muestra (s), procederemos a la validación de nuestro método a través de la evaluación de parámetros estadísticos específicos.

Con la validación del ensayo microbiológico para amoxicilina en suspensión se pretende obtener información sobre la confiabilidad del mismo, mejorar la calidad de los productos, disminuir tiempo y costos durante el análisis, ayudar a la toma de decisiones y sobre todo obtener una evidencia documentada que permita minimizar los errores cometidos durante la experimentación, ya sean de tipo instrumental, de método, operativo o personales.

Esto es debido a que el método está bien documentado y se basa en principios científicos firmes, los cuales han sido planteados mediante la validación original, lo que provee un fundamento sólido sobre el que puedan basarse los cambios.

La principal razón para validar un método es garantizar la calidad de los productos a un costo reducido, así como la confiabilidad total en el análisis de los mismos.

IV. OBJETIVOS GENERALES

-Determinar la validez del ensayo microbiológico para amoxicilina en suspensión por difusión en placa.

-Llevar a cabo la validación del método microbiológico para amoxicilina en suspensión por difusión en placa.

V. HIPOTESIS

Un ensayo microbiológico es válido si la relación dosis-respuesta obtenida por la muestra es representada por una línea recta y ésta es paralela a la del patrón, consecuentemente y por estudios de laboratorio quedará establecido que nuestro método cumple con los propósitos para los que fué diseñado a través de la evaluación estadística de parámetros analíticos como: linealidad, exactitud, precisión, etc.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

A. Material , Equipo y Reactivos

<u>Material</u>	<u>Descripción</u>
Cajas de Petri (Pyrex y Kimax)	20 x 100 mm
Tubos de ensayo (Pyrex)	20 x 150 mm
Cilindros de acero inoxidable	
-diámetro interno	6 mm +/- 1 mm
-diámetro externo	8 mm +/- 1 mm
-largo	10 mm +/- 1 mm
Matraces volumétricos (Blau Brand)	50, 100 y 1000 ml
Pipetas volumétricas (Pyrex)	1, 5, y 10 ml
Pipetas graduadas (Pyrex)	10 ml
Bureta graduada (Pyrex)	25 ml

<u>Equipo</u>	<u>Descripción</u>
Estufa p/incubación microbiológica	Thermolyne 42000
Colocador de penicilindros	MAYASA s/modelo
Autoclave (119 °C a 1.4 kg/cm ²)	AESA 300
Pipeta semiautomática (200 ml)	Gilson F300
Espectrofotómetro	Perkin Elmer C6180337
Vernier Manual	Rostfrei "Zeus"
Balanza Analítica (200 g)	Sartorius BA110S

Reactivos**Descripción**

Fosfato de potasio monobásico (R.A.)	Merck 4873
Fosfato de potasio dibásico (R.A.)	Merck 5104
Cloruro de sodio (R.A.)	Merck 21578
Amoxicilina estándar secundario (85.5%)	Lote SB Z-412
Medio de cultivo No. 11 p/antibióticos	BIOXON 243-1

Material Biológico**Descripción****Micrococcus luteus**

Código de American Type Culture
Collection 9341

B. Metodología General

1. Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8.

Pesar exactamente 16.73 g de fosfato de potasio dibásico y 0.523 g de fosfato de potasio monobásico y colocarlos en un matraz volumétrico de 1000 ml, que contiene 500 ml de agua deionizada, agitar hasta disolución y aforar con agua. Esterilizar en autoclave.

2. Solución Isotónica.

Pesar aproximadamente 9 g de cloruro de sodio y colocarlos en un matraz de 1000 ml, que contiene 500 ml de agua deionizada, agitar hasta disolución y aforar con agua. Fraccionar en recipientes adecuados y esterilizar en autoclave.

3. Medio de cultivo p/antibióticos No. 11.

Preparar según indicaciones del fabricante una cantidad adecuada de medio, considerando la cantidad de muestras por analizar y el volumen de agar que será inoculado con el microorganismo de prueba.

4. Germen de prueba.

Se utiliza un cultivo fresco de 24 hr de incubación en medio antibiótico No. 11. Resuspender el crecimiento con

solución isotónica y obtener una suspensión tal que al diluirla 1:40 dé 25 % de transmitancia a 580 nm. Esta suspensión puede guardarse bajo refrigeración (4°C) durante 2 semanas y se inoculará el medio semilla con alrededor de 0.5 ml por cada 100 ml de medio de cultivo.

5. Preparación de las cajas.

Preparar una cantidad adecuada de medio de cultivo para antibióticos No. 11, prepararlo según marbete del proveedor; agregar 20 ml de medio fundido estéril a cada caja. Se dejan solidificar sobre una superficie lisa y plana; estas cajas pueden guardarse bajo refrigeración (24-48 hrs. a 4°C) y antes de usarse ambientarlas a la temperatura de trabajo.

Inocular una cantidad suficiente de medio fundido y enfriado entre 48-50°C con la suspensión del microorganismo de prueba agitando con movimientos rotatorios para obtener un inóculo homogéneo. Se depositan 5 ml de este medio en cada caja, extendiéndolo uniformemente sobre toda la superficie; todos los pasos anteriores deben hacerse en condiciones asépticas frente al mechero.

Cuando la superficie del medio inoculado se ha solidificado (aprox. 10-15 min.) se colocan 6 cilindros en cada caja con el colocador de penicilindros, se esperan 15 minutos a que los cilindros se acomoden en el medio y después las cajas están lista para su uso.

1. Determinación de la validez del ensayo (modelo de líneas paralelas)

Preparación de las soluciones del estándar: se pesa el equivalente a 100 mg de amoxicilina estándar secundario y se llevan a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver con agitación magnética y aforar con agua destilada, o en su caso, con agua deionizada. De esta solución patrón con concentración de 1 mg/ml se realizaron las siguientes diluciones: se toma 1 ml y se coloca en un matraz volumétrico de 100 ml y se afora con agua.

De esta solución se toman tres alícuotas de 1 ml y se agregan a matraces volumétricos de 200, 100 y 50 ml; estas últimas diluciones se aforan con solución reguladora de fosfatos 0.1 M pH 8.0 para obtener tres concentraciones finales de 0.05, 0.10 y 0.20 mcg/ml respectivamente.

Preparación de las soluciones de la muestra: se pesan 896.6 mg del producto (equivalentes a 100 mg de principio activo) y se colocan en un matraz volumétrico de 100 ml, disolver con agitación y aforar con agua. De esta solución con una concentración de amoxicilina de 1 mg/ml realizar diluciones de igual manera que se hicieron con el estándar.

Se emplean tres cajas para cada concentración y en cada una de ellas se llenan 3 cilindros con uno de los niveles del estándar y los 3 restantes con el nivel respectivo de la muestra, en forma alternada, para hacer un total de 9 cilindros para cada concentración.

Cuando todos los cilindros de todas las cajas se encuentren llenos, se incuban a 37°C durante 18-24 hrs. Después de llevada a cabo la incubación, se sacan las cajas y se enfrían a temperatura ambiente. Se remueven los cilindros y se miden los diámetros de las zonas de inhibición en mm con el lector de zonas o en su defecto con un vernier.

NOTA: las fórmulas utilizadas en el análisis estadístico de los resultados que permiten evaluar si un ensayo satisface el modelo de líneas paralelas se encuentran en el anexo II.

2. Cálculo de la potencia a través del método 5+1 dosis

(método a validar)

Cuando se ha establecido la validez del ensayo, se estima la potencia de la(s) muestra(s) de la siguiente manera:

Preparación de la curva estándar: se pesa el equivalente a 100 mg de amoxicilina estándar secundario y se depositan en un matraz volumétrico de 100 ml, se agrega agua a la mitad y se agita 15 min., una vez disuelto se afora con agua.

De esta solución con concentración de 1 mg/ml se llevaron a cabo las siguientes diluciones: en un matraz de 100 ml se colocó 1 ml de esta solución se mezcló y se aforó con agua. De esta solución se tomaron 10 ml y se llevaron a un matraz volumétrico de 100 ml se mezcló y aforó con agua. Posteriormente se adicionaron con bureta 6.4, 8.0, 10.0, 12.5 y 15.6 ml a matraces volumétricos de 100 ml, se mezcló y aforo con solución reguladora de fosfatos 0.1 M pH 8.0 para obtener concentraciones finales de 0.064, 0.080, 0.100, 0.125 y 0.156 mcg/ml.

NOTA: la solución de referencia o media corresponde a la solución con concentración de 0.100 mcg/ml.

Cada curva estándar consta de 12 cajas ya listas para su uso. Cada punto de la curva se forma de 3 cajas en las cuales se llenarán los cilindros con la solución del punto en cuestión y con la solución de referencia o media en forma alternada, de manera que del punto de referencia habrá 36 zonas de inhibición y de cada uno de los puntos de la curva 9 zonas de inhibición.

Se recomienda que por cada día de trabajo se elabore una curva estándar para determinar la potencia de las muestras.

Preparación de la solución problema: pesar 896.6 mg de la muestra del producto (equivalentes a 100 mg de principio activo) y colocarlos en un matraz volumétrico de 100 ml, agregar agua a la mitad y agitar mecánicamente durante 15 minutos, aforar con agua. De esta solución se toma 1 ml y se coloca en un matraz de 100 ml, se mezcla y afora con agua. De esta última se toma 1 ml y se coloca en un matraz volumétrico de 100 ml se mezcla y se afora con solución reguladora de fosfatos 0.1 M pH 8.0 obteniéndose una concentración final de 0.10 mcg/ml.

Para cada muestra problema por analizar se utilizan 3 cajas ya listas para su uso, en estas cajas se llenan 3 cilindros de solución problema y 3 de solución de referencia alternadamente.

Cuando los cilindros de todas las cajas se encuentren llenos, éstas se incuban a 35-37°C durante 18-24 hrs.

Después de llevada a cabo la incubación se sacan y se dejan enfriar a temperatura ambiente, se remueven los cilindros y se miden los diámetros de las zonas de inhibición con el lector de zonas o en su defecto con un vernier.

c) Método de mínimos cuadrados.

Para preparar la curva estándar se promedian los diámetros de las zonas de inhibición de cada uno de los 4 puntos que llamaremos a, b, d y e. Se promedian los diámetros de las 4 referencias y al valor resultante se le asigna la letra c, que será la base de corrección.

Se comparan los valores de las referencias de cada uno de los 4 puntos de la curva de referencia con c, si estas son iguales no es necesario hacer correcciones, pero si alguno de los valores es mayor a c, la diferencia se suma al promedio del punto correspondiente y si es menor que c, la diferencia se resta al promedio del punto correspondiente.

Una vez corregidos los valores de los 4 puntos se calcula el punto mínimo y máximo para trazar la curva de referencia usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{mínimo} = 3a + 2b + c - e / 5$$

$$\text{máximo} = 3e + 2d + c - a / 5$$

en donde:

a = promedio corregido de diámetros de zonas de inhibición del punto de concentración mínima (0.064 mcg/ml).

b = promedio corregido de diámetros de zonas de inhibición del punto de concentración directamente inferior al medio o referencia (0.080 mcg/ml).

d = promedio corregido de diámetros de zonas de inhibición del punto de concentración directamente superior al medio o referencia (0.125 mcg/ml).

e = promedio corregido de diámetros de zonas de inhibición del punto de concentración máxima (0.156 mcg/ml).

Con los puntos obtenidos se traza la curva tipo en papel semilogarítmico de 2 ciclos, anotando en las abscisas los diámetros de las zonas de inhibición y en las ordenadas las concentraciones del antibiótico.

Para determinar la potencia de la(s) muestra(s) se promedian los diámetros de las zonas de inhibición tanto los de la solución de referencia como los de la solución problema, si existe diferencia entre ambos promedios esta se suma o se resta dependiendo si es positiva o negativa al valor de c y el resultado se lee en la curva.

NOTA: para encontrar el contenido de antibiótico en la muestra, la concentración encontrada se multiplica por el factor de dilución correspondiente.

C. Validación del Método Analítico

a. Linearidad del Sistema.

Se determinó preparando una solución patrón de amoxicilina estándar secundario a una concentración de 1 mcg/ml. De esta solución se tomaron alícuotas de 3.2, 4.0, 5.0, 6.25 y 7.8 ml y se adicionaron a matraces volumétricos de 50 ml y alícuotas de 3 y 4 ml en matraces de 25 ml, se diluyeron hasta el aforo con solución reguladora de fosfatos para obtener 5 niveles de concentración equivalentes al 64, 80, 100, 125 y 156% del valor normal de análisis.

Se utilizaron dos placas para cada concentración y a cada una se le colocaron 3 cilindros, se llenaron con las soluciones preparadas y se analizaron en forma separada utilizando el método propuesto y por un solo analista obteniéndose 6 lecturas de cada concentración. Con los resultados obtenidos se calculó el CV, r , r^2 , t de Student para la pendiente y se contruyó la curva de calibración correspondiente (respuesta obtenida vs. concentración).

b. Precisión del Sistema.

Este parámetro se evaluó preparando 6 soluciones de amoxicilina estándar secundario correspondientes al 100% del

nivel normal de concentración establecido en la linealidad del sistema.

Su utilizó una placa con 6 cilindros para cada una de las 6 soluciones y se analizaron en forma independiente usando el método propuesto y bajo las mismas condiciones de trabajo para obtener un total de 6 lecturas para cada una de las soluciones al 100%. Con los resultados obtenidos se calculó la X, DE y CV.

c. Linealidad del Método.

Este parámetro se evaluó preparando placebos adicionados con cantidades exactas de amoxicilina materia prima, cada uno de manera independiente, a 5 concentraciones correspondientes al 64, 80, 100, 125 y 156% de la concentración central (0.1 mcg/ml).

Se prepararon soluciones por duplicado para cada uno de la siguiente manera: se pesaron 896.6 mg del placebo cargado (peso equivalente a la concentración de amoxicilina correspondiente) y se colocaron en matraces volumétricos de 100 ml aforándose con agua. De esta solución se realizaron las siguientes diluciones: se tomó 1 ml y se adicionó en un matraz de 100 ml y se diluyó con agua hasta el aforo. De igual forma se tomó 1 ml y se adicionó a un matraz de 100 ml, se diluyó y aforó con solución reguladora de fosfatos 0.1 M pH 8.0.

Para preparar el estándar a las diferentes concentraciones utilizadas se hizo una relación de pesos en base a la cantidad de amoxicilina equivalente al 100% (116.7 mg). Estos pesos se adicionaron en un matraz volumétrico de 100 ml y se realizaron diluciones iguales a las de las muestras.

Se utilizaron 3 cajas para cada concentración y los % recuperados se obtuvieron en base a una curva estándar realizada por cada día de trabajo. El análisis se hizo por duplicado por un mismo analista y bajo las mismas condiciones de operación.

Con los resultados obtenidos se calculó r , r^2 , m y b y se contruyó la curva de calibración además se realizaron pruebas de hipótesis para la pendiente y la ordenada al origen.

d. Exactitud y Repetibilidad al 100%.

Se determinó preparando 6 placebos del producto cada uno con la cantidad necesaria de amoxicilina materia prima para obtener la concentración del 100%. Se pesaron 896.6 mg de cada uno de ellos y se adicionaron en matraces volumétricos de 100 ml. De esta solución se tomó 1 ml y se diluyó en otro matraz de 100 ml con agua hasta el aforo. Por último se tomó 1 ml y se colocó en un matraz de 100 ml, se diluyó y aforó con solución reguladora de fosfatos 0.1 M

pH 8.0. El estándar al 100% se preparó de igual forma que en la linealidad del método.

Se analizaron con el método propuesto utilizando 3 cajas para cada placebo y a través de la curva estándar correspondiente se obtuvieron los % de recobro para realizar los cálculos del CV, t de Student para la exactitud y χ^2 para la repetibilidad.

e. Reproducibilidad.

Se determinó mediante un arreglo experimental de 2 factores realizando el análisis de 6 muestras homogéneas del producto cercana al 100% de la concentración teórica.

Los análisis se realizaron por 2 analistas en 2 días diferentes utilizando el método propuesto con el mismo equipo y en el mismo laboratorio. Los resultados obtenidos se evaluaron utilizando un diseño en bloques al azar midiendo el efecto por analista, día y la interacción entre ambos.

f. Especificidad.

Se determinó sometiendo a análisis las siguientes muestras:

- 1) Dos muestras de amoxicilina materia prima a la con-

centración central (0.1 mcg/ml).

2) Dos muestras de placebo cargado al 100% de amoxicilina estándar secundario.

3) Dos muestras de placebo del producto.

Se utilizó el método propuesto y las muestras se analizaron por el mismo analista en las mismas condiciones de operación.

g. Estabilidad de la Muestra Analítica.

Se determinó por el análisis de 3 muestras del producto sometidas a 2 diferentes condiciones (Temperatura Ambiente y 4°C). Las muestras se analizaron a las 0, 24, 48 y 72 hrs. utilizando una solución patrón recientemente preparada para cada tiempo.

Las muestras se reanalizaron bajo las mismas condiciones de trabajo de acuerdo a lo establecido en el método propuesto. El análisis debe ser efectuado por un mismo analista.

NOTA: las fórmulas utilizadas para la evaluación estadística de los parámetros analíticos utilizados en la validación del método se encuentran en el anexo (III).

VI. RESULTADOS

A. Determinación de la Validez del Ensayo

Caja (Bloque)	Diámetro de la Zona de inhibición en mm (Y)						Totales
	P 1	P 2	P 3	M 1	M 2	M 3	
1	13.3	17.1	22.0	13.1	17.4	21.2	104.3
2	13.2	17.0	20.0	12.9	17.8	19.7	100.6
3	13.0	17.8	20.5	13.2	18.6	21.9	105.0
4	12.5	18.4	20.3	13.4	18.9	21.4	104.9
5	13.5	18.8	21.5	12.0	19.9	21.9	107.6
6	13.3	18.7	21.0	11.9	18.9	21.5	105.3
7	13.2	19.6	22.4	14.0	18.8	20.4	108.9
8	13.9	19.4	20.4	14.2	18.7	21.8	108.4
9	13.8	18.4	20.7	13.5	18.9	20.7	106.0

Tabla I. Resultados para la validez del ensayo utilizando 1 patrón (P), 1 muestra (M), a 3 dosis. La preparación patrón se ensayó a 0.05, 0.10 y 0.20 mcg/ml. Se prepararon dosis equivalentes de la muestra en base a una potencia asignada de 85.6 % en base seca.

	Patrón	Muestra
Totales de Dosis baja	120.2	118.4
Totales de Dosis Intermedia	165.2	167.9
Totales de Dosis Alta	188.8	190.5
Totales	474.2	476.8

Tabla II. Matriz de Totales de Tratamientos

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F Calc.	F* Tablas
Preparaciones	1	16427.039	16427.039		
Regresión	1	549.9025	549.9025	1168.072	4.08
No paralelismo	1	0.340277	0.340277	0.72279	4.08
Error	40	18.8311	0.4707		

Fuente de Variación	Regla de decisión
Regresión Lineal	Ya que $F > F^*$, el logaritmo de la dosis tiene efecto lineal sobre el diámetro de la zona de inhibición.
No Paralelismo	Ya que $F < F^*$, las rectas logaritmicas dosis-diámetro de la zona de inhibición son paralelas.

Tabla III. Tabla de Análisis de Varianza

B. Evaluación Estadística del Método

1. Linearidad del Sistema

<u>Concentración mcg/ml</u>	<u>Diám. de la Zona de Inhibición mm (Y)</u>
0.064	13.6
0.064	13.0
0.064	12.7
0.064	12.9
0.064	13.5
0.064	13.6
0.080	15.8
0.080	15.4
0.080	15.5
0.080	15.8
0.080	15.4
0.080	15.8
0.100	17.5
0.100	18.0
0.100	17.5
0.100	18.1
0.100	17.6
0.100	17.8
0.125	20.4
0.125	20.5
0.125	20.6
0.125	20.0
0.125	20.5
0.125	19.7
0.156	22.5
0.156	22.3
0.156	22.7
0.156	22.8
0.156	22.3
0.156	22.4

Tabla IV. Resultados para Linearidad del Sistema.

Parámetro Evaluado	Valor Teórico	Valor Experimental
Coef. de Correlación (r)	0.98	0.988287
Coef. de determinación (r ²)	0.9604	0.976711
Desv. Est. de Regresión (S _{y/x})		19.90156
Error Est. de regresión (S [^] _{y/x})		20.00071
Pendiente (m)	≠ 0	79.77692
t (0.05), g.l. = 28 para (m)	2.048	0.857820

Tabla V. Criterios de aceptación en linealidad del sistema.

Prueba de Hipótesis para la Pendiente:

$$H_0 : m \neq 0$$

$$H_a : m = 0$$

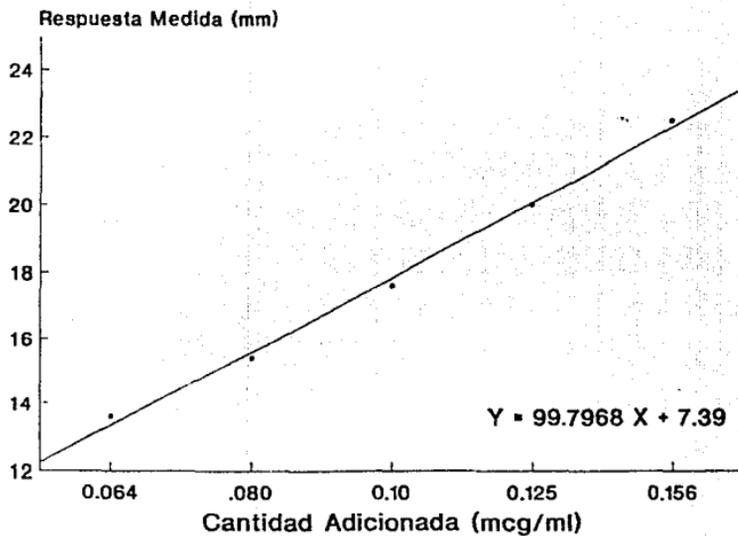
Criterio de Aceptación:

$$\text{Si } t(0.025) < t_{\text{exp}} < t(0.975) \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de Aceptación:

$$-2.048 < .085780566 < 2.048$$

LINEARIDAD DEL SISTEMA



2. Precisión del Sistema

Placebo (100%)	Diámetro de la Zona de Inhibición en mm (Y)					
1	19.7	19.9	19.7	20.1	19.5	19.3
2	19.2	19.7	19.5	20.2	19.5	19.3
3	19.9	19.9	19.7	20.3	19.2	20.0
4	20.0	19.5	20.0	19.6	19.9	19.1
5	19.7	19.5	19.3	20.1	19.9	19.6
6	19.7	19.8	19.8	19.3	19.4	19.9

Tabla VI. Resultados obtenidos para la precisión del sistema utilizando 6 placebos adicionados al 100% de amoxicilina.

Parámetro	Valor calculado
Media (Y)	19.6811
Desviación Estándar (DE)	0.30536
Coefficiente de Variación (CV)	1.55 %

Tabla VII. Parámetros evaluados en precisión del sistema.

Criterio de Aceptación:

$$CV < 3 \%$$

3. Linearidad del Método

Cantidad Adicionada mcg/ml (X)	Cantidad recuperada mcg/ml (Y)	% de Recobro (R)
0.064	0.06701	104.70
0.064	0.06565	102.57
0.080	0.08050	100.62
0.080	0.08220	102.75
0.100	0.10090	100.90
0.100	0.09991	99.91
0.125	0.12640	101.12
0.125	0.12770	102.16
0.156	0.15840	101.53
0.156	0.15680	100.51

Tabla VIII. Resultados obtenidos para la linealidad del método utilizando 5 concentraciones de la solución patrón.

Parámetro Evaluado	Valor Teórico	Valor Experimental
Pendiente de la Recta (m)	~ 1.0	0.998367
Ordenada al origen (b)	~ 0.0	0.001718
Coef. de Correlación (r)	0.99	0.999559
Coef. de determinación (r ²)	0.98	0.999118
Desv. Est. de regresión (Sy/x)		0.244651
Error Est. de regresión (S ² y/x)		0.273528
t (0.05), g.l.= 9 para (m)	2.306	-0.000616
t (0.05), g.l.= 9 para (b)	2.306	0.005815

Tabla IX. Criterios de aceptación en linealidad del método.

Prueba de Hipótesis para la Pendiente:

$$\begin{aligned} H_0 : m &= 1 \\ H_A : m &\neq 1 \end{aligned}$$

Criterio de Aceptación:

$$\text{Si } t(0.05) < t_{\text{exp}} < t(0.975) \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de Aceptación:

$$-2.306 < -0.000616 < 2.306$$

Intervalo de Confianza:

$$-4.993123 < 1 < 6.989858$$

Prueba de Hipótesis para la Ordenada al Origen:

$$\begin{aligned} H_0 : b &= 0 \\ H_A : b &\neq 0 \end{aligned}$$

Criterio de Aceptación:

$$\text{Si } t(0.05) < t_{\text{exp}} < t(0.975) \implies H_0 \text{ se acepta}$$

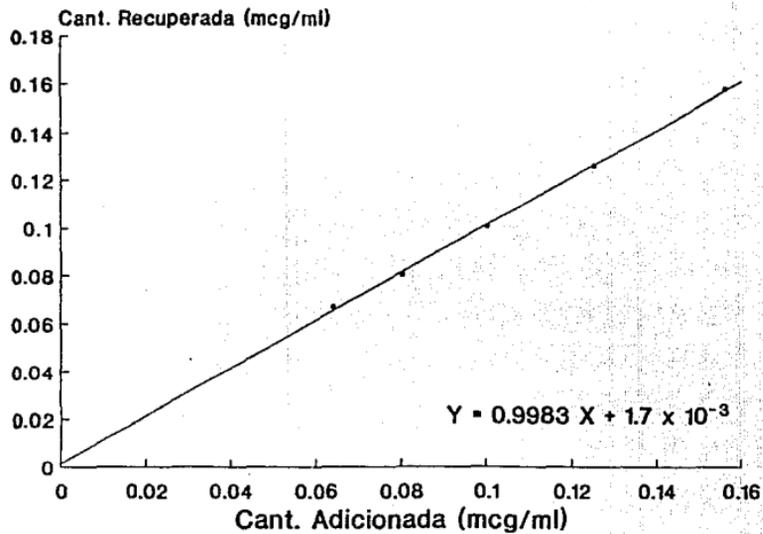
Area de Aceptación:

$$-2.306 < 0.005815 < 2.306$$

Intervalo de Confianza:

$$-0.66669 < 0 < 0.67013305$$

LINEARIDAD DEL METODO



4. Repetibilidad y Exactitud al 100 %

Cantidad Adicionada mcg/ml (X)	Cantidad Recuperada mcg/ml (Y)	% de Recobro (R)
0.1	0.09858	98.58
0.1	0.09725	97.25
0.1	0.10265	102.65
0.1	0.09919	99.91
0.1	0.09919	99.91
0.1	0.09858	98.58

Tabla X. Resultados obtenidos en la repetibilidad y exactitud del método analítico utilizando placebos adicionados al 100% del principio activo.

Parámetro Evaluado	Valor Calculado
Media (X)	99.48
Desviación Estándar (S)	1.844537
Varianza (σ^2)	2.835266
Coefficiente de Variación (CV)	1.851479 %
Repetibilidad:	
Xi ² (0.025), g.l.= 5	0.8310
Xi ² (0.975), g.l.= 5	12.8320
Xi ² experimental	3.40232
Exactitud:	
t (0.025), g.l.= 5	+ 2.571
t experimental	- 0.630

Tabla XI. Criterio de aceptación en repetibilidad y exactitud del método de análisis.

Criterio 1.

$$CV < 5 \%$$

Criterio 2.

Hipótesis de Contraste para Repetibilidad:

$$H_0 : \sigma^2 \leq 5 \%$$

$$H_a : \sigma^2 > 5 \%$$

Criterio de Aceptación:

$$X_i^2 (0.025) < X_i^2 \exp r < X_i^2 (0.975) \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de aceptación:

$$0.831 < 3.40232 < 12.832$$

Intervalo de Confianza al 95 %:

$$0.07793 < 2.835266 < 20.4712$$

Hipótesis de Contraste para Exactitud:

$$H_0 : = 100 \%$$

$$H_a : \neq 100 \%$$

Criterio de Aceptación:

$$\text{Si } \pm t (0.05) \leq t \text{ experimental} \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de Aceptación:

$$- 2.571 < - 0.63 < 2.571$$

Intervalo de Confianza al 95 %:

$$97.35 < 100 < 101.6$$

5. Reproducibilidad

		Analista	
		1	2
Dia	1	102.50	98.04
		99.06	99.91
		100.80	99.91
	2	103.83	100.34
		102.22	102.08
		100.69	98.64

Tabla XII. Resultados obtenidos para la reproducibilidad del método, los cuales se encuentran expresados en % de recobro.

Parámetro Evaluado	Valor Calculado
Media (X)	100.6683
Desviación Estándar (S)	1.722480
Coefficiente de Variación (CV)	1.7110

Tabla XIII. Parámetros evaluados en reproducibilidad.

Criterio 1.

$$CV \leq 5 \%$$

Criterio 2.

Modelo Matemático:

$$Y_{ijk} = A_i + D_j + AD_{ij} + E_{ij}(k)$$

Hipótesis Contrastadas:

- 1) H_0 : las medias para los 2 analistas son iguales
 H_a : las medias para los 2 analistas son diferentes
- 2) H_0 : las medias para los días son iguales
 H_a : las medias para los días son diferentes
- 3) H_0 : no hay efecto de interacción Analista-Día (A-D)
 H_a : existe efecto de interacción Analista-Día (A-D)

Fuente de Variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F Calc.	F* Tablas
Analista (A)	1	8.636067	8.636067	3.6179	5.32
Día (D)	1	4.788067	4.788067	2.00586	5.32
Interacción (A-D)	1	0.115933	0.115933	0.04856	5.32
Error	8	19.09630	2.387037		

Tabla XIV. Tabla de análisis de varianza.

Reglas de Decisión:

- 1) Se acepta H_0 , por lo tanto no existe diferencia significativa entre los analistas.
- 2) Se acepta H_0 , lo cual implica que no existe diferencia significativa entre los días de análisis.
- 3) Se acepta H_0 y se concluye que no hay diferencia significativa entre las medias por la interacción Analista-Día.

6. Especificidad

Sustancia Relacionada	Respuesta	Magnitud
Amoxicilina Materia Prima (100%)	Detectable	99.49 %
Placebo Adicionado (100 %)	Detectable	101.21 %
Blanco del Producto	No Detectable	0.00 %

Tabla 6. Resultados para la especificidad del método el cual muestra ser específico para el principio activo en estudio.

Criterio.

Como se observa en los resultados la respuesta obtenida por el método se debe únicamente a la sustancia de interés, por lo tanto, el método se considera específico para la amoxicilina.

7. Estabilidad de la Muestra Analítica

	Muestra del Producto		
	Lote 16	Lote 17	Lote 18
Condición/Tiempo			
Inicial	98.58	98.31	99.92
T. A. / 24 Hrs	98.05	98.31	100.30
T. A. / 72 Hrs	93.50	93.50	91.70
4°C / 24 Hrs	98.22	98.22	99.50
4°C / 72 Hrs	94.66	93.32	93.32

Tabla XVI. Resultados de la muestra analítica almacenada a Temperatura Ambiente y Refrigeración por 24 y 72 Hrs.

	Intervalo de Confianza	Factor I
T. A. / 24 Hrs	-1.49 a 1.169	99.85 %
4 °C / 24 Hrs	-1.29 a 0.530	99.61 %
T. A. / 72 Hrs	-7.87 a -4.753	93.81 %
4 °C / 72 Hrs	-6.404 a -4.096	94.69 %

Tabla XVII. Intervalo de confianza Y factor I en estabilidad de la muestra analítica

Criterio por Intervalo de Confianza.

a) La muestra es estable en condiciones ambientales y refrigeración (4°C) por 24 hrs, ya que en el intervalo de confianza se incluye el valor de cero.

b) La muestra no es estable en condiciones ambientales y refrigeración (4°C) por 72 hrs, ya que en el intervalo de confianza no se incluye el valor de cero.

Criterio por el Factor I.

a) La muestra es estable en condiciones ambientales y refrigeración por 24 hrs, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 95 - 105 %.

b) La muestra no es estable en condiciones ambientales y refrigeración por 72 hrs, ya que el valor de la media para el factor I no se encuentra entre 95 - 105 %.

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

A. Validez del Ensayo Microbiológico

El valor del estadígrafo de contraste F de Fisher, experimental para la regresión lineal es de 1168.072, mayor que el valor F^* de tablas que es de 0.48, por lo tanto en base a las reglas de decisión establecidas se concluye que el logaritmo de la dosis tiene un efecto lineal sobre el diámetro de la zona de inhibición.

En cuanto al no paralelismo de las rectas, el valor F calculado experimentalmente es de 0.72279 que es menor al valor F^* teórico, por lo tanto, en base a las reglas de decisión, las rectas logaritmo dosis-diámetro de la zona de inhibición son paralelas.

Con base en las reglas de decisión se concluye que el ensayo microbiológico propuesto en este trabajo es válido para la estimación de la potencia de las muestras.

B. Validación del Método

Linearidad del Sistema.

Como se observa en los resultados, el valor del coeficiente de correlación experimental es de 0.988287 que es mayor que el valor establecido teóricamente (0.98), lo que nos indica que existe una gran asociación entre las dos variables (concentración y diámetro de la zona de inhibición); de esta manera queda demostrado que la variación de la variable dependiente (diámetro de la zona de inhibición) está estrechamente relacionada con la variación de la variable independiente (concentración) y tal relación entre ambas es lineal.

El valor t de Student en la inferencia acerca de la pendiente (m) es de 0.8578 que es un valor menor al establecido (± 2.048), por lo cual, la pendiente se considera que tiene un valor de 1.

El valor t de para la ordenada al origen es de 0.3567, siendo este valor menor a 2.048, por lo tanto, se dice que la ordenada al origen tiene un valor de 0.

Precisión del Sistema

El valor del coeficiente de variación experimental es de 1.55 % que es menor al valor establecido teóricamente (3 %), entonces se dice que la respuesta obtenida por el sistema es precisa.

Linealidad del Método

El valor del coeficiente de correlación obtenido a partir de los datos experimentales es mayor que el establecido (0.99), lo que sugiere que el 99.9559 % de la variación de una de las variables es explicada por la variación de la otra.

En lo que se refiere a la inferencia acerca de la ordenada al origen, el valor t de Student experimental es menor que el valor t de tablas ($0.005815 < 2.306$), con respecto a la pendiente la t calculada (-0.000616) se encuentra dentro de los límites (-2.306 a $+2.306$), esto nos sugiere que la variable dependiente (cantidad recuperada) depende linealmente de la variable independiente (cantidad adicionada).

Repetibilidad y Exactitud al 100%

El valor del estadígrafo de contraste χ^2 calculado de 3.40232 se encuentra dentro de los límites establecidos (0.831 a 12.832) por lo que el método se considera repetible por un mismo analista.

En cuanto a la exactitud, el estadígrafo de contraste t de Student calculado de -0.630 es menor que a la t de tablas (± 2.571 , al 95 % de confianza y con 5 grados de libertad), por lo tanto, el método es exacto.

Reproducibilidad

El valor del estadígrafo de contraste F calculado para la fuente de variación analista (3.6179) es menor que la F de tablas (5.32), lo que nos indica que no hay efecto por el analista sobre el método; en cuanto a la fuente de variación día, ya que el valor experimental de F (2.00586) es menor que el valor F teórico (5.32) se concluye que no hay efecto por el día; de igual forma ocurre con la interacción analista-día, ya que la F calculada (0.04856) es menor que la F de tablas (5.32), por lo que se dice que no existe efecto de la interacción analista-día.

Especificidad

Como se observa en los resultados obtenidos, la materia prima y el placebo adicionado al 100%, muestran una respuesta similar en magnitud (99.49 y 101.21 %, respectivamente), no así el placebo del producto, que no da respuesta alguna al método, por lo cual ninguno de los componentes del placebo interfieren con la cuantificación del principio activo, entonces se dice que el método es específico.

Estabilidad de la Muestra Analítica

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron la muestra se considera estable durante 24 hr a temperatura ambiente y refrigeración para su análisis una vez preparada ésta, no así pasando 72 hrs ya que la concentración del principio activo disminuye en aproximadamente un 5 %.

IX. CONCLUSIONES

Se determinó la validez del método y en base a las reglas de decisión se llegó a la conclusión de que el ensayo microbiológico propuesto en este trabajo es válido para estimar la potencia de las muestras analíticas.

Se procedió a validar el método, encontrando que el sistema analítico es lineal en un rango de concentraciones de 64 a 156 % y además, es preciso para analizar muestras con una concentración cercana al 100% (0.01 mcg/ml) establecida en la linealidad del sistema.

En lo que al método se refiere, se demostró que existe una relación lineal en el rango de 0.064 a 0.156 mcg/ml, ya que posee una ordenada al origen considerada como cero, y una pendiente aproximadamente igual a uno.

El método es exacto y repetible a la concentración central (0.01 mcg/ml). Es reproducible, ya que no existe diferencia significativa en que el análisis sea efectuado por uno u otro analista en el mismo o diferente día.

Ya que el placebo no presenta interferencia con el ensayo, se considera específico como método de control de calidad.

Se establece que la muestra preparada para su uso posee una estabilidad de hasta 24 hrs como máximo a 4°C y a temperatura ambiente, por lo que pasado este tiempo las

muestras no podrán ser analizadas o los resultados obtenidos no se consideran como confiables.

Como conclusión general, el método se considera lineal, exacto, reproducible, preciso y específico para el principio activo en estudio; la muestra es estable hasta 24 hrs a temperatura ambiente y refrigeración. Por lo tanto, el ensayo microbiológico propuesto utilizarse como método de rutina para cuantificar amoxicilina en suspensión.

Con este estudio se concluye que antibióticos con el mismo núcleo químico (Acido 6-aminopenicilínico, 6-APA) pueden ser analizados microbiológicamente utilizando similares factores de análisis.

X. ANEXOS

ANEXO I

Parámetros a validar dependiendo del Uso del Método

Parámetro	Control de Calidad	Indicadores de Estabilidad	Biodisponibilidad
Linealidad y precisión	x	x	x
Reproducibilidad	x	x	x
Precisión y exactitud	x	x	x
Límite de detección			x
Especificidad	x	x	x
Especificidad en estabilidad		x	
Tolerancia del sistema		x	
Estabilidad de la muestra	x	x	x

ANEXO II

Evaluación Estadística para la Validez del Ensayo Microbiológico.

Diseño en Bloques al Azar: 1 patron (P), 1 muestra (M) a 3 dosis.

Codificación de Tratamientos:

	Tratamientos						Totales
	p1	p2	p3	m1	m2	m3	
Bloques							
r1	y1	R1
r2	y2	R2
.
.
.
rr	yr	yn	Rr
Totales	P1	P2	P3	M1	M2	M3	Ey

Suma Total: $Ey = y1 + y2 + \dots + yn$

Suma Total de los Cuadrados: $Ey^2 = y1^2 + y2^2 + \dots + yn^2$

Suma de los Totales al Cuadrado: $ET^2 = P1^2 + P2^2 + \dots + M3^2$

$ER^2 = R1^2 + R2^2 + \dots + Rr^2$

	Patrón (P)	Muestra (M)
Totales de Dosis Baja	P1	M1
Totales de Dosis Intermedia	P2	M2
Totales de Dosis Alta	P3	M3
Totales	$P=P1+P2+P3$	$M=M1+M2+M3$
Contraste Lineal	$Lp = P3 - P1$	$Lm = M3 - M1$

Tabla de Análisis de varianza

Fuente de Variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F
Preparaciones	1	$SCp=(P^2+M^2/3r)-((EY^2)/n)$	$MCp=SCp$	
Regresión Lineal	1	$SCR=(Lp + Lm)^2/4r$	$MCR=SCR$	MCR/MCp
No Paralelismo	1	$SCn=((Lp^2+Lm^2)/6r)-SCR$	$Mcn=SCn$	Mcn/MCp
Error	$5(r-1)$	$SCE=Ey^2-ET^2/r-ER^2/6+(E\gamma)^2/n$	$MCE=SCE/5(r-1)$	

ANEXO III

Evaluación Estadística para la Reproducibilidad del Método

Diseño en Bloques al Azar (factores Cruzados)

Modelo Matemático $Y_{ijk} = \mu + A_i + D(j)j + E(ij)k$

	Analista 1 (A1)	Analista 2 (A2)
Día 1 (D1)	Y111	Y211
	Y112	Y212
	Y113	Y213
Día 2 (D2)	Y121	Y221
	Y122	Y222
	Y123	Y223

Combinaciones Analista - Día ($Y_{ij.}$)

$$Y_{11.} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113}$$

$$Y_{12.} = Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{21.} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{22.} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

Analista ($Y_{i..}$)

$$Y_{1..} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{2..} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

Suma Total

$$Y_{...} = Y_{1..} + Y_{2..}$$

Suma al Cuadrado del Analista - Dia

$$EEY_{ij}^2 = (Y_{11})^2 + (Y_{12})^2 + (Y_{21})^2 + (Y_{22})^2$$

Sma al cuadrado del Analista en los dos Dias

$$EY_{i..}^2 = (Y_{i..})^2 + (Y_{2..})^2$$

Suma al Cuadrado de cada dato

$$EEEY_{ijk}^2 = (Y_{111})^2 + \dots + (Y_{223})^2$$

Suma de los Cuadrados para el Analista

$$SCa = EY_{i..}^2 / jk - (Y_{...})^2 / ijk$$

Suma de los Cuadrados para el Dia

$$SCd = EEEY_{ij.}^2 / k - EY_{i..}^2 / jk$$

Suma de los Cuadrados para el Error

$$Sce = EEEY_{ijk}^2 - \Sigma EY_{ij.}^2 / k$$

$$i = 2$$

$$j = 2$$

$$k = 3$$

ANEXO IV

Evaluación Estadística de los Parámetros Analíticos en la Validación del método Analítico.

1) Media $\bar{x} = \Sigma x / n$

2) Desviación Estándar $DE = \sqrt{[n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2 / n(n-1)]}$

3) Coeficiente de Variación $CV = (DE/\bar{x}) (100)$

4) Coeficiente de Correlación

$$r = \sqrt{[(n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y))^2 / (n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2)(n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2)]}$$

5) Coeficiente de Determinación r^2

6) Pendiente $m = [n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)] / [n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2]$

7) Ordenada al Origen $b = \Sigma y - m(\Sigma x) / n$

8) Error Estándar de Regresión $S_{y/x} = \sqrt{[\Sigma y^2 - m \Sigma xy - b \Sigma y] / n}$

$$S_{\hat{y}/x} = \sqrt{(n/n-2)}$$

9) Factor de Confianza para (b)

$$FC = [t(0.975)] [S_{\hat{y}/x}] [\sqrt{(\Sigma x_i^2 / n \Sigma (x_i - \bar{x})^2)}]$$

10) Estadígrafo de Contraste (b)

$$t = (b - b_0) / (S_{\hat{y}/x}) [\sqrt{(\Sigma x_i^2 / n \Sigma (x_i - \bar{x})^2)}]$$

11) Intervalo de Confianza al 95% para (b)

$$IC = b - FC < b < b + FC$$

12) Factor de Confianza para (m)

$$FC = [t(0.975)] [S_{\hat{y}/x} / DE] (\sqrt{n-1})$$

13) Estadígrafo de Contraste para (m)

$$t = (m - m_0) DE \sqrt{(n-1)} / S_{\hat{y}/x}$$

- 14) Intervalo de Confianza al 95% para (m)

$$IC = m - FC < m < m + FC$$

- 15) Porcentaje Recuperado

$$\% \text{ de Recobro} = \text{mg adicionales} / \text{mg recuperados} \times 100$$

- 16) Coeficiente de Variación $CV = (DE/x) \times 100$

- 17) Factor de Confianza para la Exactitud

$$FC = t(0.975) DE / \sqrt{n}$$

- 18) Estadígrafo de Contraste para la Exactitud

$$t = (x - \bar{x}) / (DE / \sqrt{n})$$

- 19) Intervalo de Confianza al 95% para la Exactitud

$$x - FC < x < x + FC$$

- 20) Estadígrafo de Contraste para la Repetibilidad

$$X_i^2 = (n-1) DE^2 / \sigma^2$$

- 21) Estadígrafo de Contraste para la Estabilidad de la Muestra Analítica

$$t^* = C(\text{comparaciones}), \text{ g.l.} = 2(C+1)$$

- 22) Intervalo de Confianza para la estabilidad de la Muestra Analítica

$$IC = \bar{x}_i + x_0 \pm \sqrt{[S_{pi}^2 (2/3)]}$$

- 23) Factor para la Estabilidad de la Muestra Analítica

$$I = \frac{(\text{Análisis Muestra/Condición/Tiempo})}{(\text{Análisis Inicial})} \quad (100)$$

- 24) Media para el Factor I $I = \Sigma I / N$

XI. REFERENCIAS

1. Remington's Pharmaceutical Sciences, 13 ed., Mack Publishing Co., U.S.A., (1985).
2. Hammud, S.M., Lambert, P.A., Antibiotics and Antimicrobial Action, The Camelot Press Ltd, Southampton, Great Britain, (1978).
3. Brock, T.D., Biología de los Microorganismos, Omega, S.A., Barcelona, (1976).
4. Sutherland, R., et. al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 407 (1971).
5. The Merck Index, 11 th ed., U.S.A., (1989).
6. Toome, V., Hoffman-La Roche, Private Communication.
7. Wilson, W.H., et.al., J. Assoc. of Anal. Chem. 57 (6), 1300 (1974).
8. New, H.C., y Whinshell, E.B., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 407 (1971).
9. Hellman, J., Farmacotecnica Teórica y Práctica, 3a ed., Vol. VII, Edit. Continental, S.A. de C.V., México, (1982).
10. Remington, J. P., Farmacia, 17a. ed., Médica Panamericana, Buenos Aires, (1987).
11. Barry, A.L., The Antimicrobial Susceptibility Test, Lea and Febiger, Great Britain, (1976).
12. Martín, A. N., Principios de Fisicoquímica para farmacia y Biología, 3a. ed., ALHAMBRA, S.A., Madrid, (1982).
13. Kavanagh, F., Analytical Microbiology, Vol. I., Academic Press, New York, (1973).
14. Kavanagh, F., Analytical Microbiology, Vol. II, Academic Press, New York, (1973).
15. Hewitt, W., Microbiological Assay, Academic Press, New York, (1973).

16. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 8a. ed., (1988).
17. The United States Pharmacopeia, 22th ed., (1990).
18. Code of Federal Regulations, 21th, (1985).
19. Why Validation?, Sterling Drug Inc., 67 (4), (1978).
20. Un Acercamiento a la Validación de Métodos Analíticos, Pharma News, 1 (5), (1990).
21. Un Acercamiento a la Validación de Métodos Analíticos, Pharma News, 1 (6), (1990).
22. Norma Técnica: Guías Generales de Validación, Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud, México, (1988).
23. Métodos Microbiológico y HPLC para determinar Amoxicilina en Tabletas, Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 15 (2), 1975.