

201



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

## DESARROLLO Y VALIDACION DEL ENSAYO TURBIDIMETRICO PARA CUANTIFICAR AMPICILINA INYECTABLE

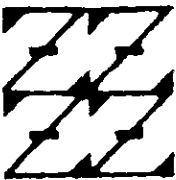
T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:  
VELIA SANCHEZ PINEDA

DIRECTOR DE TESIS:  
QFB IDALIA LETICIA FLORES GOMEZ

ASESOR DE TESIS:  
QBP DORA ALICIA PEREZ GONZALEZ

FES  
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D.F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

268009



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 esta 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.

## AGRADECIMIENTOS

### A MIS PADRES :

Raquel y Alvaro por ser lo más hermoso que Dios me dio. Por su amor, apoyo y comprensión brindada a lo largo de estos años y que hicieron posible la realización de una meta más.

### A MIS HERMANOS:

Cristina, Víctor y Alvaro. Por todo lo vivido juntos, por su cariño y apoyo brindado siempre.

### A MIS SOBRINAS :

Yeraldín y Karina. Por su inocencia, alegría y cariño brindado sin esperar nada a cambio.

*A Teresa por su apoyo y comprensión.*

### A MIS TIOS :

Rosa y Eduardo y primos Rosalba, Tania, Fabián y Mario.

Por el cariño y comprensión que siempre me han brindado.

### A MIS AMIGOS :

Rocío, Veronica, Leonor, Lys, Fabiola, Lourdes, Angel, Gaudencio gracias por su amistad, cariño, comprensión y apoyo incondicional, esperando que la amistad que nos une perdure por siempre.

Pablo por tu amistad y apoyo para la realización de este trabajo.

## DEDICATORIAS

QFB Idalia Leticia Flores Gomez.

Por su amistad, apoyo y tiempo brindado a lo largo de la carrera, así como sus asesoría para la realización de este proyecto.

QBP Dora Alicia Perez Gonzalez.

Por su apoyo, asesoría y tiempo brindado.

QFB Mauro Arrieta Sánchez.

Por su amistad, consejos y tiempo.

Quim. Vicente Bolaños Chombo.

Por su amistad, consejos y apoyo brindado siempre.

A todos y cada uno de los Sinodales asignados por las sugerencias aportadas para la terminación de esta tesis.

GRACIAS

## INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	i
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	1
2.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS	1
2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA AMPICILINA	3
2.2.1. NOMBRE	3
2.2.2. DESCRIPCIÓN	3
2.2.3. ESTABILIDAD DE LA AMPICILINA	4
2.2.4. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	5
2.2.4.1. INDICACIONES TERAPÉUTICAS	6
2.2.4.2. DOSIFICACIÓN MEDIA	6
2.2.4.3. PRESENTACIONES COMERCIALES	7
2.2.4.4. EFECTOS SECUNDARIOS	7
2.3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN	8
2.3.1. ENSAYO MICROBIOLÓGICO	8
2.3.2. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA	9
2.3.3. MÉTODO TURBIDIMÉTRICO	9
2.3.3.1. MEDIDA DE LA RESPUESTA	13
2.4. MICROORGANISMO DE PRUEBA ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	15
2.5. GENERALIDADES DE FORMAS FARMACÉUTICAS	19
INYECTABLES	
2.6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	21
2.6.1. PARAMÉTROS A VALIDAR PARA UN MÉTODO	22
ANALÍTICO EN CONTROL DE CALIDAD	
2.6.1.1. LINEALIDAD	22
2.6.1.2. PRECISIÓN	24
2.6.1.3. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%	26
2.6.1.4. ESPECIFICIDAD PARA MÉTODOS DE	26
CONTROL DE CALIDAD	
2.6.1.5. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	27

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
IV. OBJETIVOS	31
4.1. OBJETIVO GENERAL	31
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
V. HIPÓTESIS	32
VI. PARTE EXPERIMENTAL	33
6.1. MATERIAL	33
6.1.1. EQUIPO	33
6.1.2. MATERIAL DE VIDRIO	33
6.1.3. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	34
6.1.4. MUESTRA A ANALIZAR	34
6.1.5. MATERIAL BIOLÓGICO	34
6.2. DIAGRAMA DE FLUJO	35
6.3. PROCEDIMIENTO	36
6.3.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO	36
6.3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA	36
6.3.3. DISEÑO DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO	36
6.3.3.1. CANTIDAD DE INÓCULO	36
6.3.3.2. DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA Y PERÍODO DE INCUBACIÓN	37
6.3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AMPICILINA	37
6.3.4. PLANTEAMIENTO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS	38
6.3.4.1. PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE AMPICILINA	38
6.3.4.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA	38
6.3.4.3. PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS	39

6.3.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO	41
6.3.5.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA	41
6.3.5.2. PRESICIÓN DEL SISTEMA	41
6.3.5.3. LINEALIDAD DEL MÉTODO	41
6.3.5.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100 %	42
6.3.5.5. REPRODUCIBILIDAD	42
6.3.5.6. ESPECIFICIDAD	43
6.3.5.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	44
VII. RESULTADOS	45
7.1. DISEÑO DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO	45
7.1.1. CANTIDAD DE INÓCULO	45
7.1.2. TEMPERATURA Y PERÍODO DE INCUBACIÓN	45
7.1.3. CONCENTRACIÓN DE AMPICILINA	46
7.1.4. CONDICIONES UTILIZADAS PARA EL MÉTODO DE ANÁLISIS	46
7.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	47
7.2.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA	47
7.2.2. PRESICIÓN DEL SISTEMA	50
7.2.3. LINEALIDAD DEL MÉTODO	51
7.2.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100 %	56
7.2.5. REPRODUCIBILIDAD	59
7.2.6. ESPECIFICIDAD	61
7.2.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	62
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	64
8.1. DISEÑO DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO	64
8.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	65

IX. CONCLUSIÓN	68
X. PROPUESTAS Y SUGERENCIAS	70
XI. ANEXOS	71
11.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS A ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	71
11.2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	72
11.3. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	73
XII. BIBLIOGRAFIA	78



## I. INTRODUCCIÓN

La microbiología representa una de las disciplinas importantes dentro de la Industria Farmacéutica, debido no solo a los numerosos productos comerciales cuya elaboración es de origen microbiano y al estricto control que se establece diariamente de los diversos contaminantes, sino también a la cada vez más amplia gama de bioensayos que utilizan microorganismos para comprobar la calidad de los medicamentos y sus respectivas materias primas.

Aunque existen numerosos métodos de análisis químico de antibióticos y vitaminas, la mayoría no proporcionan la sensibilidad y especificidad que se alcanza con los métodos microbiológicos, sobre todo cuando se trata de valorar antibióticos en medios biológicos (suero, sangre, alimentos, etc.).

Está fuera de toda duda las ventajas de los métodos biológicos en cuanto a especificidad y sensibilidad, pero se ha criticado, quizás exageradamente, su precisión y reproducibilidad. Aunque la gran complejidad de los microorganismos influye en la variabilidad de los ensayos microbiológicos, un buen diseño experimental y una manipulación cuidadosa pueden eliminar en gran medida este tipo de variaciones en los ensayos microbiológicos.

La ampicilina en nuestro país es muy vendida en distintas concentraciones y formas farmacéuticas, esto es debido a que se le considera un antibiótico bactericida de amplio espectro.

Para el análisis cuantitativo de la ampicilina se cuenta con métodos químicos y microbiológicos. El método microbiológico reportado por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (Feum 6a ed.) es en placa.

En el presente trabajo se describen los principales aspectos asociados a la determinación de la potencia de antibióticos, para el posterior desarrollo de un método turbidimétrico alternativo para la cuantificación de ampicilina inyectable, posteriormente se realizó la validación del mismo evaluando diversos parámetros analíticos como son la linealidad y precisión del sistema, linealidad del método, exactitud, precisión, especificidad y estabilidad de la muestra.

Con la validación del método, se comprobó que es un método alternativo confiable para evaluar la potencia de la ampicilina inyectable, además de que es más sencillo, rápido y económico de realizar que el método en placa.

## II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 2.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Un antibiótico se define, como una sustancia química, que es capaz de matar o inhibir el desarrollo de microorganismos, aún en soluciones diluidas, el cual puede ser obtenido como el resultado del metabolismo secundario de un microorganismo o por síntesis química.<sup>7, 12, 13, 25</sup>

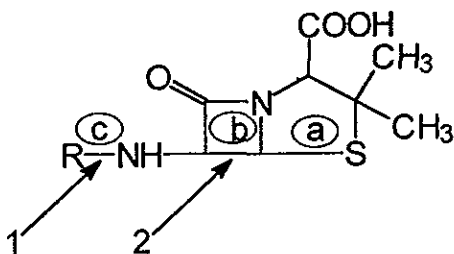
Un antibiótico ideal presenta toxicidad selectiva. Este término implica que el medicamento es nocivo para el parásito, pero no lo es para el huésped. En muchos casos, la toxicidad selectiva es relativa, más que absoluta, e implica que el fármaco puede dañar al parásito en concentraciones tales que pueden ser toleradas por el huésped.<sup>21</sup>

La toxicidad selectiva puede ser la función de un receptor específico que se requiere para interactuar con el medicamento, o depender de la inhibición de los fenómenos bioquímicos que se llevan a cabo en el parásito y son esenciales para éste, pero no para el huésped. Aún no se ha comprendido del todo el mecanismo de acción de la mayoría de los antibióticos. Sin embargo, pueden agruparse de acuerdo al sitio de la célula que atacan; los principales mecanismos de acción son:

1. Inhibición de la síntesis de la pared celular.
2. Alteración de la permeabilidad de la membrana celular o en el transporte activo a través de dicha membrana.
3. Inhibición de la síntesis proteica (inhibición o translación del material genético).
4. Inhibición de la síntesis del ácido nucleico.

Las penicilinas comparten una estructura básica que se muestra en la fig. 1 donde hay un anillo de tiazolidina (a) enlazado a un anillo  $\beta$ -lactámico (b) que lleva un grupo amigénico secundario (R-NH-) (c). Se pueden agregar radicales ácidos (R) al grupo amigénico y separados de él por las amidasas bacterianas y otras. La integridad estructural del núcleo del ácido 6-aminopenicilánico es esencial para la actividad biológica de las moléculas, si el anillo  $\beta$ -

lactámico es desdoblado enzimáticamente por las  $\beta$ -lactamasas (penicilinasas) bacterianas, el producto resultante, el ácido peniciloico, está desprovisto de actividad antibacteriana. Sin embargo, lleva un determinante antigénico de las penicilinas, actúa como una estructura sensibilizante enlazada a las proteínas séricas, y puede usarse como material para dermorreacción cuando esta enlazada a cadenas peptídicas. Los productos de la hidrólisis alcalina de las penicilinas también contribuyen a la sensibilización.<sup>21,25,28</sup>



1. Sitio de acción de la amidasa
2. Sitio de acción de la penicilinasas ( $\beta$ -lactamasas)  
(ruptura del anillo  $\beta$ -lactámico)

**Figura 1. Estructura del anillo 6-aminopenicilánico.<sup>21</sup>**

Las penicilinas ejercen un mecanismo de acción antibacteriana que implica el deterioro de la pared celular de las bacterias.

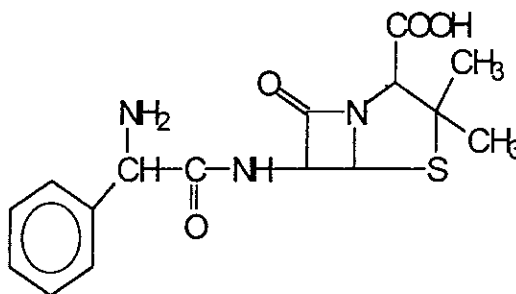
El paso inicial de la acción antibacteriana es la unión del medicamento con los receptores celulares. Estas penicilinas de unión de proteínas son en número de 3-8, y algunas son enzimas de transpeptidación. Los diversos receptores tienen diferente afinidad para determinado fármaco y cada uno puede mediar un efecto distinto, por ejemplo, elongación anormal de la célula contra defecto periférico de la pared celular.<sup>21</sup>

## 2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA AMPICILINA

### 2.2.1. NOMBRE

Ampicilina. 6-D-(2-amino-2-fenilacetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azobicyclo (3,2,0)-Heptano-2-ácido carboxílico. 6- [ D (-) -  $\alpha$  - aminofenilacetamido ] penicilánico ácido. D(-) -  $\alpha$  - aminobenzilpenicilina y  $\alpha$  - aminobencilpenicilina.<sup>14</sup>

### 2.2.2. DESCRIPCIÓN



$C_{16}H_{19}N_3O_4S$

PM 349.41 g/mol

Figura 2. Estructura química de la ampicilina.<sup>14</sup>

Se encuentra disponible como ácido libre (ampicilina anhidra); sal de sodio y ampicilina trihidrato.<sup>14</sup>

Ampicilina anhidra: Polvo cristalino blanco inodoro con sabor amargo, higroscópico, contiene no menos de 900  $\mu\text{g}/\text{mg}$  y no más 1050  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de ampicilina, calculado sobre la sustancia seca. Soluble a 20 °C en 170 partes de agua, muy ligeramente soluble en alcohol, éter, cloroformo, acetona y aceites fijos.

Ampicilina sódica: Polvo cristalino blanco, muy higroscópico, contiene no menos de 845  $\mu\text{g}/\text{mg}$  y no más de 988  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de ampicilina, calculado sobre la sustancia seca. Muy soluble en agua y en soluciones isotónicas de glucosa y cloruro de sodio; ligeramente soluble en acetona y en cloroformo; insoluble en éter, parafina líquida y aceites fijos.

Ampicilina trihidrato: Polvo cristalino blanco, sabor amargo. Contiene no menos de 900  $\mu\text{g}/\text{mg}$  y no más de 1050  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de ampicilina, calculado sobre la sustancia seca. Soluble a 20  $^{\circ}\text{C}$  en 150 partes de agua; muy ligeramente soluble en alcohol, éter, cloroformo, acetona y aceites fijos.

### 2.2.3. ESTABILIDAD DE LA AMPICILINA

La ampicilina es susceptible de hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico. Sus perfiles de pH muestran una catálisis ácida y básica. Generalmente la catálisis ácida y básica ocurren en soluciones amortiguadoras de citratos y fosfatos. El pH de máxima estabilidad es de 5.8, el mecanismo de degradación de la penicilina se muestra en la fig. No 3. Debido a la dimerización, la degradación aumenta substancialmente al aumentar la concentración inicial. La adición de alcohol a soluciones de ampicilina aumenta su estabilidad. La descomposición de ampicilina aumenta al incrementar la concentración de dextrosa y otros carbohidratos en solución.<sup>9,14,35,39</sup>

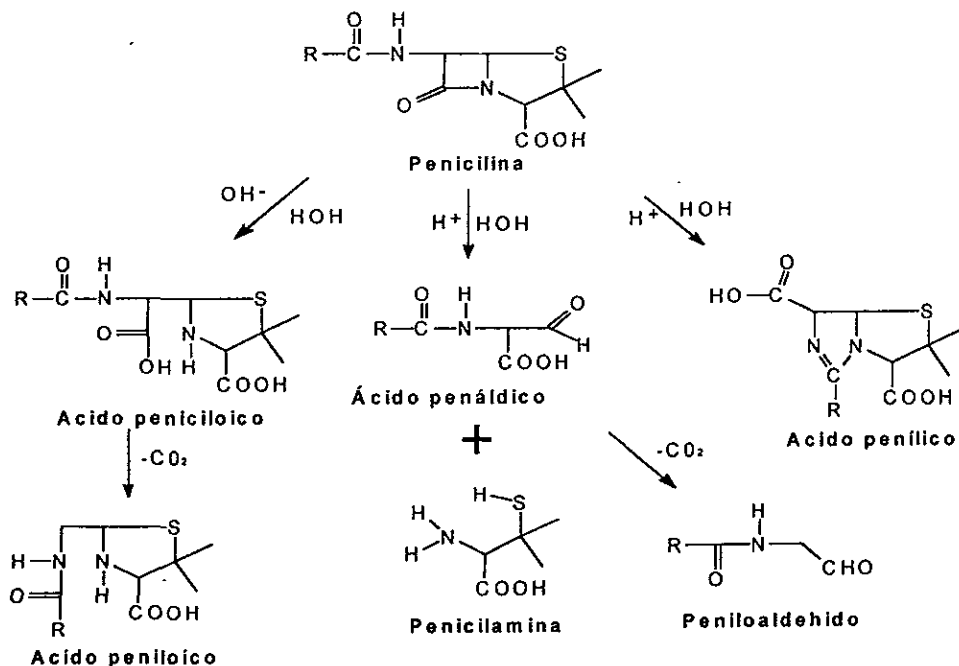


Figura 3. Mecanismo de degradación de la penicilina.<sup>14</sup>

## 2.2.4. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

La ampicilina es una penicilina semisintética, su espectro antibacteriano es más amplio que el de las penicilinas naturales, es destruida por la  $\beta$ -lactamasa producida por bacterias Gram (+) y (-) y, por lo tanto, es inefectiva en la mayoría de las infecciones producidas por estafilococos. Cabe subrayar que in vivo es altamente efectiva contra *H. influenzae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *N. meningitidis* y *S. typhi*. Tiene efecto bactericida e interfiere con la síntesis de la pared bacteriana y facilita su destrucción, esta acción es producto de inhibir la síntesis de peptidoglucano, componente heteropolímero de la pared celular que provee su estabilidad mecánica y rigidez. La ampicilina no debe administrarse conjuntamente con agentes bacteriostáticos (cloramfenicol, tetraciclinas, eritromicina o sulfonamidas) ya que estos inhiben su acción bactericida.<sup>10,21,24,32</sup>

La penicilina es estable en medio ácido y se absorbe bien en el tracto gastrointestinal, esto es en la administración oral. Una dosis oral de 500 mg produce concentraciones plasmáticas máximas de 3  $\mu\text{g/ml}$  en 2 horas y persisten en el plasma por 4 horas. La ingesta previa de alimentos produce una absorción menos completa. Se obtienen concentraciones plasmáticas de 7 a 10  $\mu\text{g/ml}$  con la inyección intramuscular de 500 mg a 1000 mg de ampicilina sódica, respectivamente, en 1 hora; declinan de forma exponencial, con un tiempo medio de alrededor de 80 minutos. La mitad de una dosis oral se depura en el riñón durante las primeras 6 horas que siguen a la ingestión. A diferencia de la anterior, el 80% de las dosis intramusculares o intravenosas de 500 mg se eliminan por la orina en este tiempo. El deterioro renal severo prolonga marcadamente la persistencia de la ampicilina en el plasma. La diálisis peritoneal es ineficaz para eliminar la droga de la sangre, pero la hemodiálisis elimina aproximadamente el 40% de la reserva corporal en 7 horas. La ampicilina aparece en la bilis, experimenta circulación enterohepática y se excreta en cantidades apreciables por las heces; su concentración biliar depende notablemente de la integridad de la vesícula biliar y sus conductos, y cuando el conducto biliar común está obstruido, la ampicilina no es detectable en la bilis. Otras características de este antibiótico son: buena tolerancia gastrointestinal, resistencia a la acidez gástrica, rápida absorción en las porciones altas del intestino y la rápida difusión tisular.

### 2.2.4.1. INDICACIONES TERAPÉUTICAS

La ampicilina está indicada para el tratamiento de las siguientes infecciones debidas a cepas susceptibles de bacterias gram-negativas y gram-positivas:<sup>10,32</sup>

- Infecciones del tracto respiratorio
- Meningitis bacteriana
- Septicemia y endocarditis
- Infecciones del tracto urinario
- Infecciones gastrointestinales

Se ha demostrado que las siguientes bacterias son susceptibles a la ampicilina:

Gram positivas: *Streptococcus sp.* hemolítico y no hemolítico, *S. pneumoniae*, *Staphylococcus* no productores de  $\beta$ -lactamasa, *Clostridium sp.*, *B. anthracis*, *L. manocytoenes* y la mayoría de las cepas de enterococos.

Gram negativas: *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *P. mirabilis* y diversas cepas de *Salmonellas*, *Shigellas* y *E. coli*.

### 2.2.4.2. DOSIFICACIÓN MEDIA

Va a depender de la edad; para adultos y niños de más de 20 Kg de peso, la dosis oral de ampicilina trihidratada o anhidra es de 250-500 mg cada 6 horas; en niños de menor peso, 50-100 mg/Kg de peso, dividida en 4 tomas.<sup>10,32</sup>

En el caso de ampicilina sódica, la dosis intramuscular para adultos y niños de más de 20 Kg de peso es de 250-500 mg 4 veces al día en intervalos de 6 horas; en menores de 7 días, 75 mg/Kg al día, dividida en 3 dosis cada 8 horas.<sup>10,32</sup>



Por vía endovenosa, en adultos y niños con más de 20 Kg de peso, 250-500 mg 4 veces al día, en intervalos de 6 horas.<sup>10,32</sup>

En infecciones severas se pueden emplear 2 g cada 6 horas.<sup>10,32</sup>

#### **2.2.4.3. PRESENTACIONES COMERCIALES**

- Suspensión oral: 1.5 g/60 ml, 3 g/60 ml y 6 g/60 ml
- Tabletas de 1000 mg
- Cápsulas de 250 y 500 mg
- Gotas pediátricas 100 mg /1 ml
- Inyectables: Frasco ampula con 1 g en 3 ml de agua inyectable; Frasco ampula con 500, 250 y 125 mg en 2 ml de agua inyectable.<sup>10,32</sup>

#### **2.2.4.4. EFECTOS SECUNDARIOS**

Puede ocasionar algunos efectos como trastornos gastrointestinales como glositis, estomatitis, glosofitia, vómito, enterocolitis y diarrea. Reacciones de hipersensibilidad como exantemas cutáneos y urticaria. Entre los efectos que se presentan con poca frecuencia destacan las alteraciones de la función hepática y las hematológicas, fiebre por medicamentos, nefritis intersticial aguda, reacciones anafilácticas (incluyendo choque, convulsiones) en cuyo caso debe de reducirse la dosis. Cuando se sospecha de colitis pseudomembranosa (diarrea grave persistente), la medicación debe suspenderse de inmediato.<sup>10,32</sup>

## 2.3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

Dentro de los métodos con los que se cuenta para cuantificar ampicilina en un medicamento incluyen los métodos químicos y microbiológicos. Los métodos químicos son: <sup>29,30,38</sup>

- A) Espectrofotometría ultravioleta
- B) Determinación fluorométrica
- C) Determinación polarográfica
- D) Titulación yodométrica
- E) Acido hidroxámico
- F) Titulación amperométrica
- G) Ensayo microbiológico

### 2.3.1. ENSAYO MICROBIOLÓGICO

Los principios de las valoraciones microbiológicas fueron descubiertos y usados por muchos investigadores antiguos incluyendo Fleming en los años veinte para la valoración de la enzima lisozima y de penicilina, no obstante sólo fueron utilizados hasta la manufactura de penicilina en 1940, a partir de la cual el método ha tenido aplicaciones.<sup>21</sup>

Los métodos microbiológicos pueden conducir a un mayor error que los métodos químicos, pero si a los primeros se les dan las condiciones óptimas para que tanto el microorganismo como el antibiótico y sus factores inherentes al ensayo sean los más idóneos, se logrará una mayor sensibilidad que la que se obtiene por el método químico, por lo que el resultado microbiológico es concluyente.

La potencia de los antibióticos se determina comparando la dosis a la cual se inhibe el crecimiento de un microorganismo adecuado y susceptible frente a un antibiótico de referencia de actividad conocida, bajo las mismas condiciones de trabajo. <sup>6,8,12,13,37</sup>

La potencia se expresa en unidades internacionales o  $\mu\text{g}$  que se encuentran en cada mg de peso.

Para la valoración de la potencia se emplean dos métodos generales: el de cilindros sobre placa o “difusión en placa” y el “turbidimétrico”.

### 2.3.2. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA

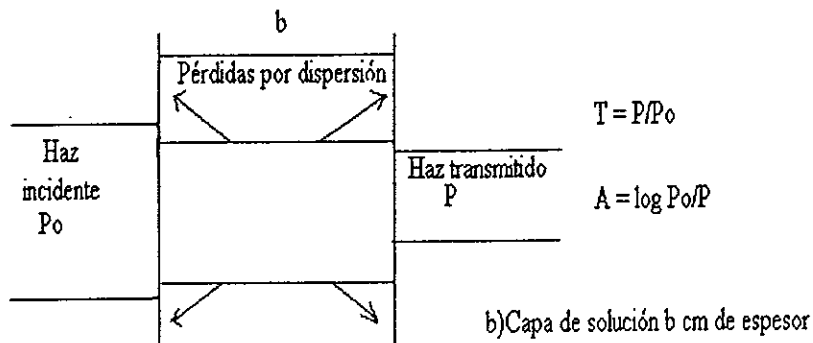
El método por difusión en placa se basa en la difusión del antibiótico contenido en un cilindro que sirve como reservorio desde donde difunde la solución del antibiótico al medio de agar inoculado con un microorganismo específico para la muestra analizada.<sup>8,13,22,25,37</sup>

La difusión del antibiótico y el crecimiento del microorganismo que se encuentra inoculado en la capa semilla provoca la formación de zonas de inhibición, cuyo tamaño (diámetro) está en relación con la concentración del antibiótico.

### 2.3.3. MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

Se llama turbidez a la propiedad óptica de una muestra que hace que la radiación sea dispersada más que transmitida en línea recta a través de la muestra.<sup>34,40</sup>

La luz se dispersa en todas direcciones cuando atraviesa un medio transparente que contiene una segunda fase formada por partículas. Como consecuencia, la mezcla tiene un aspecto turbio; además, el haz sufre una pérdida de potencia a lo largo de su eje de trayectoria, el grado de esta pérdida puede relacionarse con la concentración en peso de las partículas que producen la dispersión. El análisis turbidimétrico se basa en la medición de la disminución de potencia en un haz colimado como resultado de la dispersión, como se muestra en la figura 4.



**Figura 4. Atenuación de un haz de radiación como resultado de una dispersión.<sup>34</sup>**

Es importante apreciar que la dispersión asociada a la turbidimetría no supone pérdida neta de potencia radiante; solo es afectada la dirección de la propagación. La intensidad de la radiación que aparece en cualquier ángulo depende del número de partículas, de su tamaño y su forma, de los índices de refracción relativos de las partículas y del medio, y de las longitudes de onda de la radiación.

El método turbidimétrico se basa, en la determinación de la turbiedad desarrollada por el microorganismo de prueba en presencia del antibiótico, en tubos con medio líquido de cultivo inoculados a la temperatura óptima. Una gráfica patrón de la turbiedad de distintas concentraciones del antibiótico es necesaria para la determinación de la potencia de éste.

La base de la estimación de la potencia esta relacionado con la dosis de antibiótico usada y la inhibición de crecimiento de un microorganismo específico en un medio de cultivo líquido adecuado.

La respuesta exacta es tomada por el número de células que están presentes en cada tubo al final del período de incubación.

La naturaleza de la respuesta es de dirección opuesta, ya que incrementando la dosis de antibiótico causa una reducción en el número final de células en cada tubo comparada con un blanco de dosis cero de antibiótico.

Aparte de la interacción entre el antibiótico y el microorganismo de prueba, existen otros factores que influyen en el número final de células bacterianas.

Dentro de los factores que pueden influir en la estimación de la potencia se incluyen los siguientes: <sup>22,25,26</sup>

**1) Tiempo y temperatura de incubación.** Para una valoración ideal el período de incubación es largo ya que permite una completa utilización de los nutrientes del medio de cultivo, con lo cual se obtiene una respuesta directamente proporcional a la dosis.

Una pequeña diferencia por arriba o abajo de la temperatura óptima puede ejercer un efecto significativo sobre la proporción de crecimiento. Si el período de incubación es lo suficientemente largo para permitir la utilización completa de nutrientes, pequeñas diferencias en temperatura no son significativas. Por el contrario períodos cortos de incubación pueden influir en la proporción de crecimiento si la temperatura óptima no es cuidadosamente controlada.

Las siguientes recomendaciones ayudan a la obtención de condiciones de incubación uniformes en una valoración:

**A) Uso de caldo inoculado frío (homogenizado y transferido inmediatamente a tubos),** el crecimiento no empieza hasta que los tubos son sumergidos en un baño de incubación.

B) Uso de tubos de forma y densidad de vidrio uniforme, ya que de esta manera la transferencia de calor puede ser uniforme.

C) Uso de un baño de incubación con capacidad para agitar los tubos durante períodos largos con la misma fuerza, sin interferir la posición que tengan los tubos en el baño.

El balance de diferencias residuales de condiciones de incubación se efectúa colocando en cada gradilla tubos representativos de muestra y estándar en una colocación y evaluación al azar.

2) **Tamaño y fase de crecimiento del inóculo.** Con un inóculo grande el período de incubación puede ser menor de 3 horas. Un inóculo en fase logarítmica de crecimiento acorta el período de incubación por lo que una valoración con un período de incubación prolongado representa un factor crítico.

3) **Naturaleza del medio.** Diferencias en cantidades de medio aparentemente idénticas pueden contribuir en variaciones de resultados. Estas diferencias pueden ser en pH, puede existir una descomposición parcial de nutrientes, sobrecalentamiento, concentración del medio al reconstituirlo o esterilizarlo.

4) **Naturaleza del microorganismo de prueba.** Hasta el momento es posible que el microorganismo pueda ser elegido en base a su selectividad de sustancias de crecimiento y no presentar respuesta ante sustancias extrañas.

5) **Posible presencia de otras sustancias inhibitorias.** Esto ocurre en mezclas de más de dos componentes en una forma farmacéutica en el caso de la muestra, sin embargo no se presenta en el estándar.

6) **Posible presencia de nutrientes en la muestra.** Los cuales por enriquecimiento del medio pueden incrementar la proporción de crecimiento llevando a resultados erróneos.

7) **Inadecuada limpieza del material.** Principalmente de tubos ya que con la presencia de trazas de detergente o ácido crómico puede causar disminución en la respuesta, sin embargo, el efecto no es considerable.

8) **Concentración del antibiótico.** Se utiliza la concentración del antibiótico que es capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo (Concentración Mínima Inhibitoria) y es utilizada en la muestra y en el estándar.

De todos estos factores, el último es esencialmente básico en la valoración; las demás condiciones pueden ser controladas para minimizar las variaciones no deseadas. Idealmente el límite de crecimiento puede ser en función directa de la dosis y no ser afectado por los factores anteriormente mencionados.

### 2.3.3.1. MEDIDA DE LA RESPUESTA

La respuesta en valoraciones en tubo es más comúnmente medida en término de las propiedades ópticas resultantes por la suspensión celular.<sup>6,12,25,37</sup>

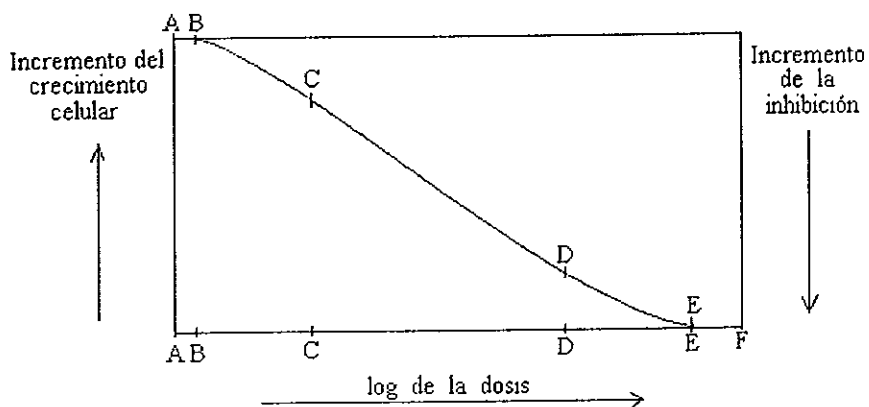
La concentración de la suspensión celular puede ser estimada de dos maneras:

1) Por la medida de la cantidad de la luz que es dispersada por la suspensión celular a una longitud de onda seleccionada (Nefelometría).

2) Por la medida de la cantidad de luz que es transmitida directamente por la suspensión celular hasta un detector a una longitud de onda seleccionada (Espectrofotometría).

La forma general de respuesta se representa gráficamente en la figura 5, donde la respuesta (concentración celular) se encuentra en escala lineal contra el logaritmo de la dosis. Todas las dosis menores a B son sin efecto, mientras que todas las dosis mayores a E ejercen el mismo efecto, completa inhibición de crecimiento. La parte útil de la relación entre dosis y

respuesta para la valoración propuesta, es la región correspondiente a las dosis entre C y D, donde la respuesta es lineal.



**Figura 5. Forma cualitativa de una curva de respuesta para la valoración turbidimétrica de antibióticos.**<sup>22</sup>

La forma más comúnmente utilizada para evaluar experimentalmente la potencia de antibióticos turbidiméricamente son basados en una interpolación sobre una curva estándar.



## 2.4. MICROORGANISMO DE PRUEBA (*Staphylococcus aureus*)

Los estafilococos son bacterias esféricas cuyo diámetro fluctúa entre 0.8 y 1.0 micras (alrededor de un décimo de diámetro del eritrocito humano); no poseen flagelos ni esporas y sólo algunas cepas son capsuladas; además, se tiñen fácilmente reteniendo el colorante de Gram de manera tenaz, aunque esta propiedad varía en los cultivos viejos y los que se obtienen bajo condiciones adversas (como en presencia de antibióticos, etc.).<sup>7,11,29,38</sup>

Su agrupación característica en acúmulos parecidos a racimos de uvas es la más evidente, aunque sólo se observa en las preparaciones provenientes de muestras biológicas y de cultivos sólidos; su pared celular consta de una capa externa rica en proteínas y de una capa interna de mucopéptido y, aunque su estructura antigénica ya se ha definido, los diversos antígenos tienen poco valor en su identificación, exceptuando a la proteína A de los estafilococos coagulasa positiva (ECP), la cual se utiliza para diferenciar a este grupo mediante la reacción pseudoinmune.

Los estafilococos figuran entre las bacterias no esporuladas más resistentes, ya que pueden sobrevivir a varias condiciones ambientales desfavorables durante su camino de un huésped a otro; son muy resistentes a la luz, temperaturas externas extremas y desecación, por lo cual estos microorganismos se pueden transmitir aún por medio del polvo. Además sobreviven de días a semanas en el pus desecado y en el esputo, y pueden resistir calor húmedo hasta de 60°C durante 30 minutos.

Adicionalmente, los estafilococos resisten la acción de los fenoles y la de muchos otros desinfectantes empleados en los laboratorios (cloruro de magnesio, cloruro de benzalconio, etc.). La incorporación de 7 a 8 % de cloruro sódico a los medios de cultivo permite su desarrollo, a la vez que inhibe el de casi todas las demás bacterias. De hecho, el diseño de

medios selectivos para su aislamiento se basa en esta propiedad y/o en su capacidad para soportar la oxidación por teluritos.

Finalmente, su resistencia a la penicilina suele depender de su capacidad para producir  $\beta$ -lactamasas, propiedad transmitida por conjugación o transducción y que implica la presencia de plásmidos de resistencia, de los cuales cada vez se genera mayor información.

Aunque estos microorganismos se reproducen fácilmente en el laboratorio previa siembra en caldo o agar nutritivo, los medios de cultivo que carecen de tiamina y ácido nicotínico no favorecen su desarrollo, sin embargo, en los medios corrientes suelen existir cantidades pequeñas de estas vitaminas. Su crecimiento en sangre es más abundante y esto hace posible poner de manifiesto hemolisinas estafilocócicas de acción enérgica, tales como la  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$  presentes con cierta regularidad en los ECP.

Independientemente de que en el laboratorio se emplea gelosa sangre para lograr el aislamiento de estos microorganismos, se suelen incorporar al análisis otros de naturaleza selectiva, tales como el S110 y el agar sal y manitol, que deben su selectividad a su alto contenido en NaCl, así como Baird Parker y Vogel Jhonson cuyo agente inhibidor es el  $K_2TeO_3$  al 1 %.

Estos microorganismos se desarrollan dentro de límites muy amplios de temperatura (10 a 40°C), aunque su crecimiento óptimo se obtiene entre los 30 y 37°C. Es importante precisar que su pigmentación característica, la cual sólo es producida por ciertas especies, se produce mejor entre los 19 y 25°C.

A la presión atmosférica normal de aerobiosis se logra un desarrollo más abundante, pero muchas cepas se reproducen aceptablemente en ausencia de oxígeno; adicionalmente, se ha observado que el exceso de bióxido carbónico aumenta la producción de enterotoxinas por *Staphylococcus aureus*, sobre todo cuando el medio posee almidón.

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* produce un pigmento dorado amarillento, a diferencia de varios ECN que presentan pigmentaciones que varían del blanco al amarillo limón. En general, las colonias estafilocócicas guardan semejanza con manchas redondas de pintura y, de acuerdo a la composición de los medios, su diámetro fluctúa entre los 3 y 5 mm y su coloración varía desde el blanco (en gelosa sangre) hasta el negro (en las formulaciones que contienen teluritos).

Los estafilococos son microorganismos ubicuos. Casi todas las personas muestran estafilococos coagulasa-negativos en la piel y es frecuente la colonización transitoria por *S. aureus*, sobre todo en los pliegues cutáneos húmedos y calientes. *S. aureus* y los estafilococos coagulasa negativos también se localizan en la orofaringe, tracto gastrointestinal y tracto urogenital. La colonización de los neonatos es frecuente en el muñón umbilical, superficie cutánea y área perineal. La colonización en los niños mayores y adultos es más frecuente en la parte anterior de la nasofaringe. La adhesión al epitelio mucoso depende de receptores de los ácidos teicoicos estafilocócicos. Aproximadamente el 15 % de los adultos sanos son portadores nasofaríngeos crónicos de *S. aureus*. Se ha descrito una mayor incidencia de portadores entre los pacientes hospitalizados, personal médico, sujetos con enfermedades eccematosas de la piel, drogadictos por vía intravenosa o pacientes que utilizan habitualmente jeringas por razones médicas (por ejemplo diabéticos insulínodpendientes, pacientes que reciben inyecciones alérgicas o sometidos a hemodiálisis).

Las principales características de diagnóstico para *Staphylococcus aureus* son enlistados en la tabla I.

Prueba	<i>Staphylococcus aureus</i>
Catalasa	+1
Oxidasa	-
Reducción de nitrato	+
Motilidad	-
Hemólisis. ASC 5%	+2
Hidrólisis de la gelatina	+
Reacción de leche tornasol	3
Coagulasa	+
Acido sulfhídrico	+
Voges - Proskauer	+
Glucosa	A
Lactosa	A
Sucrosa	A
Manitol	A
Indol	-
Almidón	-

1. Intensa
  2.  $\beta$ -hemólisis
  3. Formación del cuajo, ácido
- A. ácido

Tabla I. Características de diagnóstico para *Staphylococcus aureus*.<sup>11</sup>

## 2.5. GENERALIDADES DE FORMAS FARMACÉUTICAS INYECTABLES

Los medicamentos inyectables se pueden presentar en soluciones, suspensiones o emulsiones de fármacos estériles, libres de pirógenos, envasados en recipientes que conservan la estabilidad del contenido, destinados a inyectarse en el cuerpo a través de una o más capas de piel o membrana mucosa. Como con esta vía se soslayan las barreras protectoras del cuerpo humano, los medicamentos inyectables deben tener una pureza excepcional.<sup>20,31</sup>

Las inyecciones pueden clasificarse en cinco categorías generales:

- 1) Soluciones listas para inyectar.
- 2) Productos solubles secos listos para combinar con un disolvente justo antes de usar.
- 3) Suspensiones listas para inyectar.
- 4) Productos insolubles secos listos para combinar con un vehículo en el momento de usarse.
- 5) Emulsiones.

Estas inyecciones pueden administrarse por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intrarraquídea, epidural e intraarticular.<sup>20,31</sup>

Su presentación comercial puede ser de dosis única o dosis múltiple y sus volúmenes de aplicación pueden variar de décimas de ml a volúmenes tan grandes como un litro. La vía intravenosa, es la única por la cual, volúmenes mayores de 10 ml pueden ser administrados, aunque la velocidad de administración debe ser controlada cuidadosamente; la administración intramuscular está limitada a 3 ml; la subcutánea a 2 ml y la intradérmica a 0.2 ml.

Con objeto de proporcionar eficacia y seguridad a los medicamentos inyectables, se incorporan aditivos a la formulación, que mantienen la estabilidad física y química, o ayudan a su administración.

Los aditivos se clasifican en antioxidantes, conservadores, estabilizadores de pH, vehículos, agentes quelantes, gases inertes, agentes solubilizantes y sustancias para ajuste de isotonicidad, los cuales son mostrados en la tabla II.

Tipo de aditivo	Concentración (%)
Conservadores	0.01 – 2.0
Antioxidantes	0.01 – 1.0
Estabilizadores de pH	0.8 – 5.0
Agentes quelantes	0.01 – 0.05
Vehículos	1.0 – 60.0
Tensoactivos	0.1 – 0.5
Agentes para ajuste de isotonicidad	0.5 – 5.0

TABLA II. Clases de aditivos parenterales.<sup>31</sup>

## 2.6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad; además proporciona una medida del comportamiento del método. El propósito del método analítico debe ser establecido con claridad, ya que en función de este, se establecen los parámetros a evaluar.<sup>1,19,23</sup>

Parámetro	Control de calidad	Indicadores de estabilidad bajas concentraciones	Biodisponibilidad
Linealidad y precisión	X	X	X
Límite de detección		X	X
Límite de cuantificación		X	X
Exactitud y repetibilidad al 100 %	X	X	X
Reproducibilidad	X	X	X
Especificidad (Control de calidad)	X	X	X
Especificidad (Estabilidad)		X	
Tolerancia del sistema		X	X
Estabilidad de la muestra	X	X	X

TABLA III. Parámetros a evaluar dependiendo de la aplicación del método.<sup>19</sup>

## 2.6.1. PARAMÉTROS A VALIDAR PARA UN MÉTODO ANALÍTICO EN CONTROL DE CALIDAD

### 2.6.1.1. LINEALIDAD

La linealidad de un sistema o un método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.<sup>1,2,19,23</sup>

Con esta determinación se espera que dichos resultados se ajusten a una línea de respuesta expresada por la ecuación de la recta.

$$Y = m X + b$$

### LINEALIDAD DEL SISTEMA

La determinación de la sustancia de interés en una muestra involucra en casi todos los métodos el empleo de un sistema de medición. El sistema se basa en determinar la respuesta analítica ya sea física, química o biológica de la sustancia.<sup>1,2,19,23</sup>

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis cuando menos por duplicado por cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones para analizar dependerá del propósito del método, para control de calidad y/o seguimiento de estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100 % (donde ésta es la concentración de la muestra en la solución final a analizar), que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación.



**Criterio de aceptación:**

Cantidad adicionada vs Respuesta medida

$$CV \leq 1.5 \%$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

Nota: Para métodos microbiológicos  $r \geq 0.98$  <sup>19</sup>**LINEALIDAD DEL MÉTODO**

Por su parte, el método también debe ser lineal, pues así medirá sin error la cantidad de la sustancia de interés presente en una muestra, no solo a una cantidad constante sino también a una cantidad variable. <sup>1,2,3,19</sup>

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), cada uno de manera independiente haciendo los análisis por triplicado. Se realiza construyendo una curva de calibración (cantidad adicionada vs cantidad recuperada).

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%.

**Criterio de aceptación:**

Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada

$$m = 1$$

$$b = 0$$

$$r^2 \geq 0.98$$
 <sup>19</sup>

Los porcentajes recuperados y los coeficientes de variación a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo a la tabla IV.

Método	Porcentaje de recobro	CV
Cromatográficos	98 - 102 %	$\leq 2 \%$
Titrimétricos	97 - 103 %	$\leq 3 \%$
Químico y espectrofotométricos	98 - 102 %	$\leq 2 \%$
Microbiológicos	95 - 105 %	$\leq 5 \%$

TABLA IV. Intervalo de linealidad del método.<sup>19</sup>

### 2.6.1.2. PRECISIÓN

Un requisito esencial de un método que tenga aplicaciones cuantitativas, es su capacidad para repetir y reproducir la medición.<sup>1,2,5,19</sup>

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

A) Repetibilidad. Es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

B) Reproducibilidad. Se expresa como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferente analista, día, laboratorio, etc.).

## PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

**Criterio de aceptación:**

$$CV \leq 1.5 \%$$

NOTA: Para métodos microbiológicos  $CV \leq 3 \%$  <sup>19</sup>

## PRECISIÓN DEL MÉTODO (Reproducibilidad)

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado. Se debe trabajar de manera independiente cada muestra. <sup>1,5,19,23</sup>

La reproducibilidad se maneja en porciento de recobro y el CV global debe estar de acuerdo a la tabla V.

Método	CV
Cromatográficos	$\leq 2 \%$
Químicos y espectrofotométricos	$\leq 3 \%$
Microbiológicos	$\leq 5 \%$

Tabla V. Criterio de aceptación a través del coeficiente de variación para evaluar reproducibilidad. <sup>19</sup>

### 2.6.1.3. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

La exactitud se define como la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia. <sup>1,19,23</sup>

La exactitud y repetibilidad al 100 % se determina de, cuando menos, 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración de 100 %, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

#### Criterio de aceptación :

El porcentaje recuperado y el CV deberán de estar de acuerdo con la tabla IV. <sup>19</sup>

### 2.6.1.4. ESPECIFICIDAD PARA MÉTODOS DE CONTROL DE CALIDAD

Especificidad es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra (excipientes, productos de degradación, impurezas, etc.). <sup>1,19,23</sup>

Determinación: Con el método propuesto se analizan placebos del producto, identificando la respuesta del principio activo, y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

#### Criterio de aceptación :

Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes. <sup>19</sup>

### 2.6.1.5. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad físicoquímica y la concentración de la *sustancia de interés*, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas. <sup>1,19,23</sup>

**Determinación:** Se efectúa mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Las muestras analizadas se almacenan bajo distintas condiciones (temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades físicoquímicas de la sustancia. Pasado el tiempo preestablecido se analizan bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser realizada por un mismo analista.

#### **Criterio de aceptación :**

La muestra es estable si el intervalo de confianza para la diferencia de 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 lo especificado. Además, el coeficiente de variación para cada condición / tiempo / muestra (factor I promedio) se encuentran dentro del especificado en la tabla VI. <sup>19</sup>

Método	IC	I
Cromatográfico	$\pm 2 \%$	98 - 102 %
Titrimétrico	$\pm 2 \%$	97 - 103 %
Químico y espectrofotométrico	$\pm 3 \%$	98 - 102 %
Microbiológico	$\pm 5 \%$	95 - 105 %

TABLA VI. Criterios de aceptación a través de IC y I promedio para evaluar la estabilidad de la muestra. <sup>19</sup>

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ampicilina en nuestro país es muy vendida en distintas concentraciones y formas farmacéuticas, esto es debido a que se le considera un antibiótico bactericida de amplio espectro.

Para el análisis cuantitativo de la ampicilina se cuenta con métodos químicos y microbiológicos. Los ensayos microbiológicos pueden conducir a un mayor error que los métodos químicos, pero si a los primeros se les proporcionan las condiciones óptimas para que tanto el microorganismo como el antibiótico y los factores inherentes al ensayo sean los más adecuados, se logrará una mayor respuesta específica que la que se obtiene por métodos químicos, por lo que el resultado microbiológico es evidentemente más confiable.

El método microbiológico reportado por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM 6a ed.) es en placa, dicho método presenta una serie de inconvenientes que hacen difícil su realización de una manera práctica, adecuada y económica, ya que requiere de tiempos largos en el período de incubación (18-24 horas) y en la preparación de muestras de análisis, además, de que se utilizan grandes cantidades de reactivos, con lo cual la determinación es costosa, sin contar que la experiencia del analista es determinante para la obtención de buenos resultados.

El método turbidimétrico presenta varias ventajas sobre el método en placa, como son: que requiere menos pasos en su realización, con lo cual el porcentaje de error disminuye considerablemente; se utiliza una menor cantidad de reactivos (aproximadamente 50 % menos); el período de incubación de las muestras es de 3-4 horas; lo que produce una reducción de costos y tiempo de análisis, razón por la cual resulta óptimo utilizar dicho método, ya que en la Industria Farmacéutica el tiempo es primordial para comprobar la calidad de los medicamentos y sus respectivas materias primas.

Con base a lo anterior en el presente trabajo se propone desarrollar un método turbidimétrico alternativo para la cuantificación de ampicilina inyectable , que optimice dicha determinación, ya que el método será sencillo, económico y rápido de realizar. Una vez desarrollado el método se procederá a realizar la validación del mismo para asegurar que el método funciona adecuadamente para lo que fue diseñado.



## IV. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método turbidimétrico para determinar la potencia de ampicilina inyectable en control de calidad, así como la validación del mismo.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar un método turbidimétrico para cuantificar ampicilina inyectable.
2. Determinar las condiciones óptimas del método.
3. Validar el método turbidimétrico propuesto para ampicilina inyectable en control de calidad, evaluando los siguientes parámetros: linealidad y precisión del sistema, linealidad del método, exactitud, precisión, especificidad, y estabilidad de la muestra.

## V. HIPÓTESIS

Si se logran establecer las condiciones analíticas adecuadas en un método turbidimétrico para ampicilina inyectable, se podrá conocer la potencia de la misma, además, validando dicho método quedará comprobado que cumple con los requisitos para un método de control de calidad.

## VI. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1 MATERIAL

#### 6.1.1. EQUIPO

	DESCRIPCIÓN
Balanza analítica	OHAUS Mod. AS120 Serie: 1564
Baño maría	RIOSSA Mod. BM Serie: BM.MI
Espectrofotómetro (Bausch & Lomb)	Spectronic Mod. 20 d Serie: 0909649
Estufa para incubación microbiológica	J.M. Ortiz Mod. HS Serie: HSML
Olla de presión (121 °C, 15 lb p)	Presto Mod.: 21 lts.
Potenciómetro	Coming Mod. 7 Serie: 12453

#### 6.1.2. MATERIAL DE VIDRIO

	DESCRIPCIÓN
Botella Roux (pyrex)	1000 ml
Bureta (pyrex)	10 ml
Matraz erlenmeyer (pyrex)	250,500,1000 ml
Matraz volumétrico (pyrex)	10, 25,100 ml
Pipeta graduada (pyrex)	10 ml
Pipeta volumétrica (pyrex)	1, 2 ml
Tubos de ensaye (pyrex)	18mm X 150 mm

### 6.1.3. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

	DESCRIPCIÓN
Agar soya tripticaseína	Bioxon 06B10871
Caldo de infusión cerebro corazón	Bioxon 08B72435
Medio para antibióticos No 1	Bioxon 11B28702
Medio para antibióticos No 3	Bioxon 02F24651
Acido clorhídrico	J. T. Baker L30458
Acido fosfórico	J. T. Baker L35480
Cloruro de sodio (R.A.)	J. T. Baker 39916
Formaldehído (R.A.)	Merck L03457
Fosfato dibásico de potasio (R.A.)	J. T. Baker F30455
Fosfato monobásico de potasio (R.A.)	J. T. Baker G08451
Hidróxido de sodio (R.A.)	J. T. Baker K52477
Ampicilina sódica estándar secundario(1004 µg/mg)	Lote 77-05-AA-01

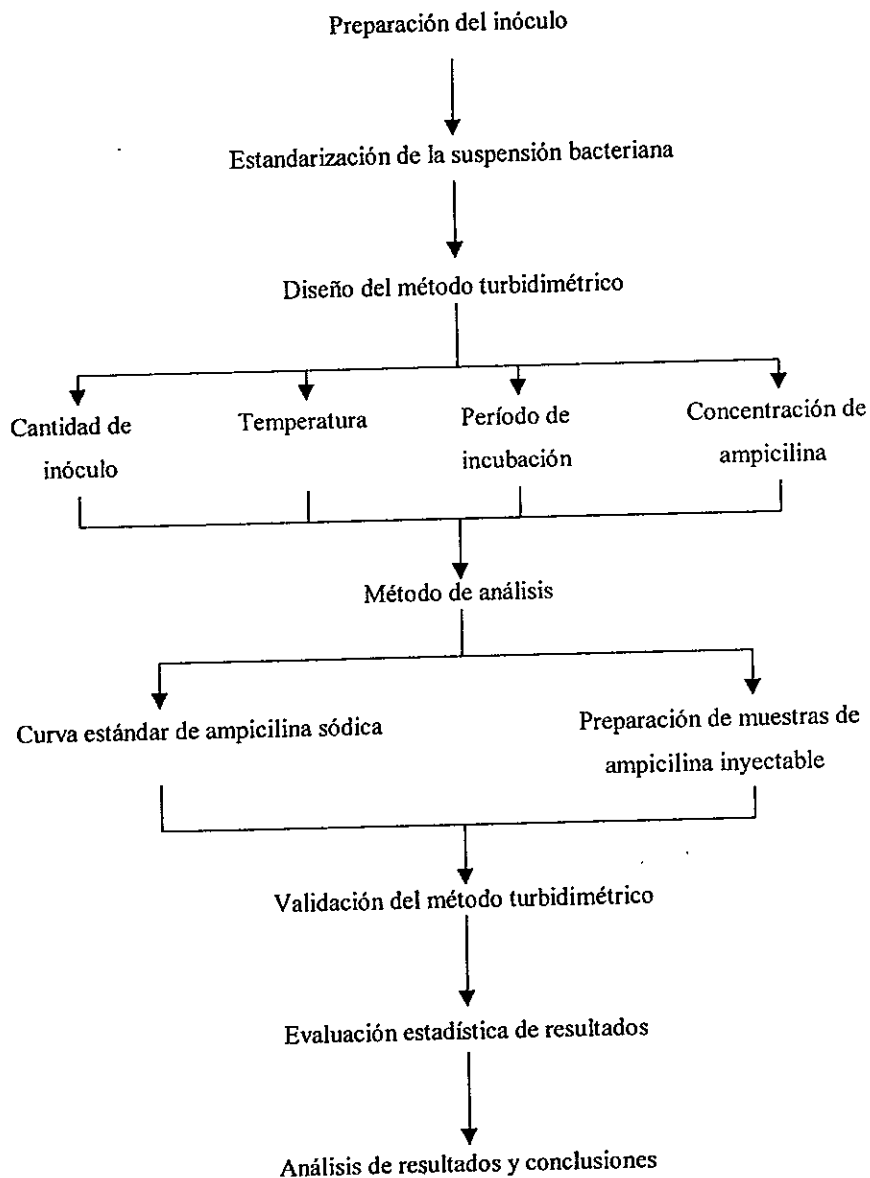
### 6.1.4. MUESTRA A ANALIZAR

	DESCRIPCIÓN
Ampicilina inyectable	Bristol - Myers Squibb de Mexico ED615

### 6.1.5. MATERIAL BIOLÓGICO

	DESCRIPCIÓN
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923

## 6.2. DIAGRAMA DE FLUJO



### **6.3. PROCEDIMIENTO**

#### **6.3.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

Se lavaron con 3 ml de solución salina isotónica estéril el desarrollo de un cultivo de 24 horas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 obtenido a partir de tubos inclinados con medio de cultivo para antibióticos No 1, posteriormente se suspendió el crecimiento con perlas de vidrio y se adicionó 1 ml de dicha suspensión en 100 ml de caldo de infusión cerebro corazón e incubó a 37 °C por 24 horas, se distribuyeron 2 ml de este cultivo en una botella Roux que contenía 250 ml de medio de cultivo para antibiótico No 1, se incubó a 37 °C por 24 horas y se suspendió el desarrollo bacteriano con 30 ml de solución salina isotónica estéril.

Nota : La preparación de reactivos es indicada en el anexo 11.2.

#### **6.3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA**

Se determinó la dilución de la suspensión bacteriana obtenida en el punto anterior que presente un 25 % de transmitancia a 580 nm. Esta suspensión puede guardarse en refrigeración ( 4 °C) por un lapso de 2 semanas.

#### **6.3.3. DISEÑO DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO**

##### **6.3.3.1 CANTIDAD DE INÓCULO**

Se adicionó 1.0 ml del inóculo estandarizado a 25 % de transmitancia a un matraz con 100 ml de medio de cultivo para antibióticos No 3, el cual debe encontrarse aproximadamente a 45°C. A partir de este momento se le llamará medio de cultivo inoculado.

### 6.3.3.2. DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA Y PERÍODO DE INCUBACIÓN

Se colocó 1 ml de solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6 en 3 tubos de ensaye de 18x150 mm, posteriormente se les agregó a cada tubo 9 ml del medio de cultivo inoculado, se agitaron e incubaron en un baño maría a la temperatura y período de tiempo indicado en la tabla VII, pasado el período de incubación especificado se retiraron los tubos del baño y se les agregó inmediatamente 0.5 ml de una solución de formaldehído 1:3, posteriormente se determinó el valor de transmitancia para cada tubo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm.

Temperatura (°C)	Período de incubación ( horas )			
	2.5	3.0	3.5	4.0
36.0	A1	B1	C1	D1
36.5	A2	B2	C2	D2
37.0	A3	B3	C3	D3
37.5	A4	B4	C4	D4

Tabla VII. Se indica la temperatura y período de incubación evaluados para obtener la temperatura y período de incubación óptimos.

### 6.3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AMPICILINA

Se prepararon 5 soluciones de ampicilina inyectable a las siguientes concentraciones 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 y 0.50  $\mu\text{g/ml}$  , utilizando como diluyente solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6.

Se colocó 1 ml de cada solución anterior a 3 tubos de ensaye de 18x150 mm y 9ml del medio de cultivo inoculado, se incubaron en un baño maría a 37 °C por 3 horas, pasado este tiempo se retiraron los tubos del baño, se les adicionaron 0.5 ml de una solución de

formaldehído 1:3 y se determinó el valor de transmitancia para cada tubo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm.

#### 6.3.4. PLANTEAMIENTO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

##### 6.3.4.1. PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE AMPICILINA

Se pesó con exactitud el equivalente a 25 mg del patrón de referencia de ampicilina sódica, se colocó en un matraz volumétrico de 25 ml y se llevó al volumen con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6 (Solución A). Se transfirieron con exactitud 2 ml de la solución A a un matraz volumétrico de 100 ml y se llevó al volumen con solución amortiguadora 1% de fosfatos pH 6 (Solución B).

A partir de la solución B se prepararon las siguientes diluciones como se indica en la tabla VIII.

Dilución	ml de solución B	Aforo con sol. Amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6	Concentración de ampicilina µg/ml
1	1.0	100	0.20
2	1.5	100	0.30
3	2.0	100	0.40
4	2.5	100	0.50
5	3.0	100	0.60

Tabla VIII. Serie de diluciones preparadas para la curva estándar.



#### 6.3.4.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA

Se pesó con exactitud una cantidad de polvo equivalente a 25 mg de ampicilina inyectable, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 ml, se llevó al volumen con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6 (Solución C). Se transfirieron con exactitud 2 ml de la solución C a un matraz volumétrico de 100 ml y se llevó al volumen con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6 (Solución D). Se transfirieron con exactitud 2 ml de la solución D a un matraz volumétrico de 100 ml y se llevó al volumen con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6 (Solución E) obteniéndose una concentración final de 0.4 µg/ml.

#### 6.3.4.3. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

Se emplearon 15 tubos para los 5 puntos de la línea dosis respuesta (curva estándar) y 3 para cada muestra.

Se colocó 1.0 ml de cada concentración de la solución de referencia y de la muestra a la concentración media en cada conjunto de 3 tubos, posteriormente se le agregó a cada tubo 9 ml del medio de cultivo inoculado e incubaron en un baño maría a 37 °C por 3 horas.

Pasadas las 3 horas los tubos se retiraron del baño maría y se les adicionaron inmediatamente 0.5 ml de una solución de formaldehído 1:3.

Se determinó el valor de transmitancia para cada tubo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm.

El instrumento se justó a 100 por ciento de transmitancia con un blanco del medio de cultivo sin inocular y 0.5 ml de formaldehído 1:3.

La línea dosis respuesta se realiza utilizando el método de mínimos cuadrados. Se trazó la línea dosis-respuesta en papel semilogarítmico de un ciclo colocando los valores de la concentración en la escala logarítmica y los valores de transmitancia en la escala aritmética.

La línea dosis-respuesta se puede trazar a través de todos los puntos, o bien utilizando los valores alto (H) y bajo (L) obtenidos mediante las siguientes fórmulas :

$$L = (3a + 2b + c - e) / 5 \quad \text{Ec. ( 1 )}$$

$$H = (3e + 2d + c - a) / 5 \quad \text{Ec. ( 2 )}$$

en donde:

L =Es el valor de transmitancia calculado para la concentración más baja de la solución de referencia.

H =Es el valor de transmitancia calculado para la concentración más alta de la solución de referencia.

a, b, c, d, e = son los promedios de los valores de transmitancia para cada concentración de la solución de referencia, del más bajo al más alto respectivamente.

La concentración de ampicilina se calculó utilizando la fórmula ( 3 ).

$$\% \text{ ampicilina} = [ ( C \times D ) / \mu\text{g pesados de la muestra} ] \times 100 \quad \text{Ec. ( 3 )}$$

donde :

C = Concentración de ampicilina interpolada en la curva de referencia.

D = Factor de dilución.

## **6.3.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS**

### **6.3.5.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA**

Se realizó construyendo una curva de calibración basada en la tabla VIII con 5 niveles de concentración, correspondientes al 50, 75, 100, 125, y 150 % del valor normal de análisis.

El análisis se realizó por triplicado para cada concentración, con el método propuesto, por un solo analista en un mismo día.

### **6.3.5.2. PRECISIÓN DEL SISTEMA**

Se realizó con el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% de concentración establecido en la linealidad del sistema.

Se preparó una solución de ampicilina sódica estándar secundario a una concentración de 0.4  $\mu\text{g/ml}$  correspondiente al 100 %. Se utilizaron 6 tubos, a los cuales se le adicionó 1.0 ml de la solución anterior y se analizaron con el método propuesto bajo las mismas condiciones de trabajo.

### **6.3.5.3. LINEALIDAD DEL MÉTODO**

Se realizó a partir de 3 diferentes concentraciones de ampicilina inyectable correspondiente al 75, 100 y 125 %, cada una pesada de manera independiente, haciendo el análisis por triplicado.

Se pesaron 18.75, 25.00 y 31.25 mg de ampicilina inyectable, se colocaron en matraces volumétricos de 25 ml y se aforaron con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6. De

estas soluciones se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml alícuotas de 2.0 ml y se aforaron con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6, posteriormente de estas soluciones se tomaron alícuotas de 2 ml que se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml y se aforaron con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6, estas últimas soluciones presentan las concentraciones de 0.30, 0.40 y 0.50 µg/ml.

Se utilizaron 3 tubos para cada concentración, a los cuales se le adicionó 1.0 ml de las soluciones anteriormente preparadas y se analizaron con el método propuesto bajo las mismas condiciones de trabajo.

#### **6.3.5.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100 %**

Se pesaron 6 veces de manera independiente 25.0 mg de ampicilina inyectable y se colocaron en matraces volumétricos de 25 ml y se aforaron con solución amortiguadora de fosfatos pH 6. De estas soluciones se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml alícuotas de 2.0 ml y se aforaron con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6, posteriormente de estas soluciones se tomaron alícuotas de 2 ml que se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml y se aforaron con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6, estas últimas soluciones presentan la concentración de 0.40 µg/ml correspondiente al 100 %.

Se utilizaron 3 tubos para cada solución, a los cuales se le adicionó 1.0 ml de las soluciones anteriormente preparadas y se analizaron con el método propuesto bajo las mismas condiciones de trabajo.

#### **6.3.5.5. REPRODUCIBILIDAD**

Este parámetro se realizó por 2 analistas en 2 días diferentes realizando el análisis por triplicado. Cada analista pesó de manera independiente una cantidad cercana al 100 % (25 mg de ampicilina inyectable) y se colocaron en matraces volumétricos de 25 ml y se aforaron con

solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6. De estas soluciones se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml alícuotas de 2.0 ml y se aforaron con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6, posteriormente de estas soluciones se tomaron alícuotas de 2 ml que se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml y se aforaron con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6, estas últimas soluciones presentan la concentración de 0.4 µg/ml correspondiente al 100 %.

Se utilizaron 3 tubos para cada solución, a los cuales se le adicionó 1.0 ml de las soluciones anteriormente preparadas y se analizaron con el método propuesto bajo las mismas condiciones de trabajo.

#### 6.3.5.6. ESPECIFICIDAD

Se determinó mediante el siguiente estudio :

1. Se analizó la respuesta de los productos de degradación de la ampicilina.
2. Se identificó la respuesta del principio activo.

Se pesaron de manera independiente 3 veces 25.0 mg de ampicilina inyectable y se colocaron en matraces volumétricos de 25 ml, se les adicionaron:

- A) Llevar al aforo con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6.0.
- B) 10 ml de NaOH 6 N y se llevó al aforo con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6.0.
- C) 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 N y se llevó al aforo con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6.0.

De estas soluciones se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml alícuotas de 2 ml y se aforaron con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6, posteriormente de estas soluciones se tomaron alícuotas de 2 ml que se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml y se aforaron con solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6.

Se determinó la respuesta analítica de la muestra A el mismo día de su preparación, las muestras B y C se almacenaron durante 2 semanas a 60 °C, pasado este tiempo se analizaron con el método propuesto.

Se utilizaron 3 tubos para cada concentración, a los cuales se le adicionó 1.0 ml de las soluciones A, B y C preparadas anteriormente, 9.0 ml del medio de cultivo inoculado y se colocaron en un baño de agua a 37°C por 3.0 horas. Pasadas al 3 horas de incubación se retiraron los tubos del baño maria y se le agregó a cada tubo 0.5 ml de una solución de formaldehído al 1:3.

Se determinó el valor de transmitancia para cada tubo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm.

#### **6.3.5.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA**

Se realizó mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con el análisis de la mismas muestras después de permanecer 24 y 72 horas en diferentes condiciones (temperatura ambiente y refrigeración).

El estudio se realizó bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada para cada tiempo. La determinación se efectuó por un mismo analista.

## VII. RESULTADOS

### 7.1. DISEÑO DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

#### 7.1.1. CANTIDAD DE INÓCULO

La cantidad de inóculo utilizada fue de 1 ml del inóculo estandarizado a 25 % de transmitancia a una longitud de onda de 580 nm por cada 100 ml de medio de antibióticos No 3.

#### 7.1.2. TEMPERATURA Y PERÍODO DE INCUBACIÓN

Temperatura (°C)	Período de incubación (horas)			
	2.5	3.0	3.5	4.0
36.0	-	-	-	-
36.5	-	+	++	+++
37.0	++	+++	+++	+++
37.5	+	++	++	++

- (-) No hay crecimiento
- (+) Crecimiento escaso
- (++) Crecimiento moderado
- (+++) Crecimiento óptimo

Tabla IX. Resultados del crecimiento de *Staphylococcus aureus* con respecto a la temperatura y el período de incubación.

### 7.1.3. CONCENTRACIÓN DE AMPICILINA

Concentración de ampicilina ( $\mu\text{g/ml}$ )	% de inhibición del crecimiento
0.10	-
0.20	+
0.30	++
0.40	+++
0.50	++++

- (-) No hay crecimiento
- (+) Crecimiento escaso
- (++) Crecimiento moderado
- (+++ ) Crecimiento óptimo
- (++++) Crecimiento abundante

Tabla X. Resultados del crecimiento de *Staphylococcus aureus* con respecto a las diferentes concentraciones de ampicilina evaluadas.

### 7.1.4. CONDICIONES UTILIZADAS PARA EL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

Cantidad de inóculo : 1 ml del inóculo estandarizado a 25 % de transmitancia por cada 100 ml de medio de cultivo para antibióticos No 3.

Temperatura : 37 °C.

Periodo de incubación : 3 horas.

Concentración de ampicilina : 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 y 0.60  $\mu\text{g/ml}$ .



## 7.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

### 7.2.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ )	% Transmitancia
0.2	72.5
0.2	72.5
0.2	73.0
0.3	75.5
0.3	76.5
0.3	76.0
0.4	80.0
0.4	78.0
0.4	79.0
0.4	79.5
0.4	80.0
0.4	79.0
0.5	81.0
0.5	82.0
0.5	81.0
0.6	84.0
0.6	84.5
0.6	83.5

Tabla XI. Resultados de % de transmitancia/Concentración obtenidos en la evaluación de la linealidad y precisión del sistema.

Parámetro	Resultado	Criterio
Intercepto (b)	67.4	-
Pendiente (m)	28.0	$\neq 0$
Coefficiente de correlación (r)	0.9897	0.98
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9795	0.9604

Tabla XII. Resultados de los parámetros estadísticos evaluados en la determinación de la linealidad del sistema.

\* Análisis de varianza para la linealidad del sistema

Hipótesis contrastadas:

$H_0$  : Y no depende linealmente de X

$H_a$  : Y depende linealmente de X

Fuente	g. l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F teo
Regresión	1	239.7550	239.7550	7684.4551	4.67
Error	13	0.4064	0.0312		
Total	14	240.1614			

Tabla XIII. Análisis de varianza para la linealidad del sistema.

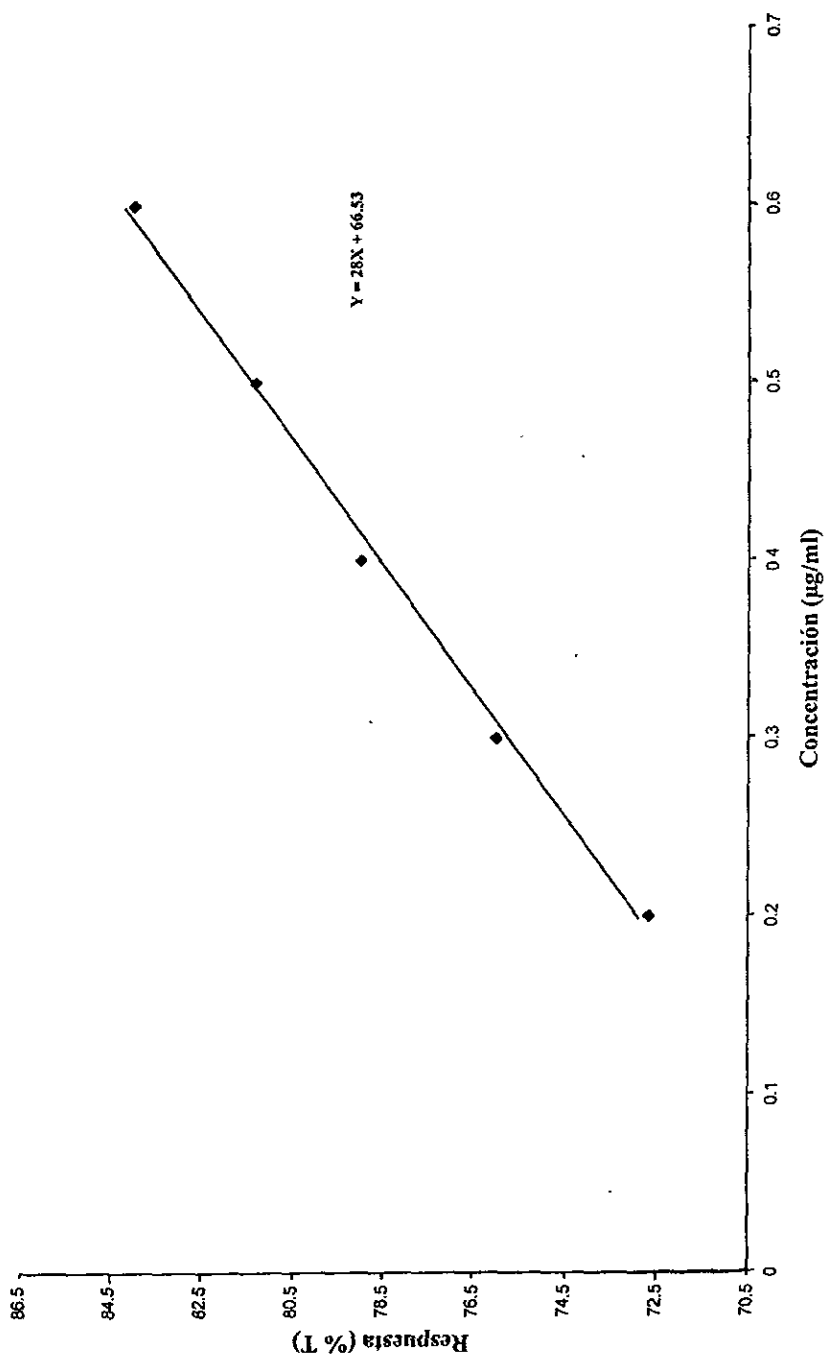
Criterio de aceptación

$$F_{cal} \leq F_{teo}$$

Regla de decisión

Se rechaza  $H_0$ , por lo que Y depende linealmente de X

Figura 6. Linealidad del sistema



### 7.2.2. PRECISIÓN DEL SISTEMA

Parámetro	Resultado
Media ( $\bar{X}$ )	79.2500
Desviación estándar (DE)	0.7582
Coefficiente de variación (CV)	0.9568 %

Tabla XIV. Resultados de los parámetros estadísticos evaluados en la determinación de la precisión del sistema.

\* Prueba de hipótesis para la precisión

$$H_0: \sigma \leq 3\%$$

$$H_a: \sigma > 3\%$$

$$X^2_{\text{cal}} = 5.9989$$

$$X^2_{(0.975,5)} = 12.832$$

Criterio de aceptación

$$X^2_{\text{cal}} \leq X^2_{(0.975,5)}$$

Regla de decisión

Se acepta  $H_0$  por lo que la desviación estándar es menor o igual al 3 %

Intervalo de confianza

$$0.4732 < \sigma < 1.8598$$

## 7.2.3. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Cantidad adicionada ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cantidad recuperada ( $\mu\text{g/ml}$ )
0.30	0.3035
0.30	0.3023
0.30	0.2987
0.40	0.4075
0.40	0.4024
0.40	0.4041
0.50	0.5038
0.50	0.5050
0.50	0.4989

Tabla XV. Resultados de Cantidad recuperada/Cantidad adicionada obtenidos en la evaluación de la linealidad del método.

Parámetro	Resultado	Criterio
Intercepto (b)	0.00077	0.0
Pendiente (m)	1.0053	1.0
Coefficiente correlación (r)	0.9994	0.99
Coefficiente determinación ( $r^2$ )	0.9989	0.98

Tabla XVI. Resultados de los parámetros estadísticos evaluados en la determinación de la linealidad del método.

\* Análisis de varianza para la linealidad del método

Hipótesis contrastadas:

Ho: Y no depende linealmente de X

Ha: Y depende linealmente de X

Fuente	g. l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F teo
Regresión	1	0.06060	0.06060	10615.8888	5.59
Error	7	$3.996 \times 10^{-5}$	$5.7085 \times 10^{-6}$		
Total	8	0.06064			

Tabla XVII. Análisis de varianza para la linealidad del método.

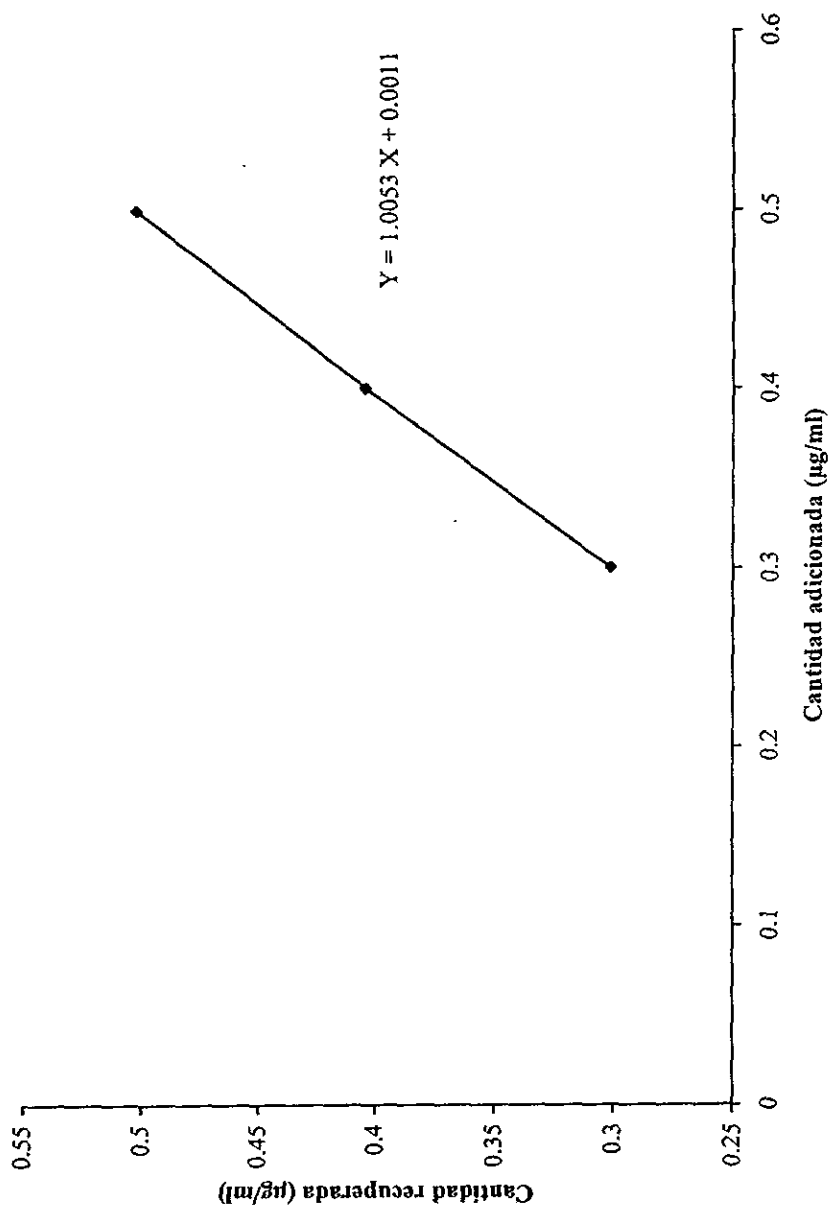
Criterio de aceptación

$$F_{\text{cal}} \leq F_{\text{teo}}$$

Regla de decisión

Se rechaza Ho, por lo tanto Y depende linealmente de X

Figura 7. Linealidad del método.



\* Prueba de hipótesis para la pendiente

$$H_0 : m = 1$$

$$H_a : m \neq 1$$

$$t_{\text{cal}} = 0.4408$$

$$t_{\text{teo}} = 2.3646$$

Criterio de aceptación

$$t_{\text{cal}} \leq t_{\text{teo}}$$

Regla de decisión

Se acepta  $H_0$ , por lo tanto la pendiente es igual a 1

Intervalo de confianza

$$0.9768 < 1 < 1.0337$$



**\*Prueba de hipótesis para el intercepto**

$$H_0: b = 0$$

$$H_a: b \neq 0$$

$$t_{\text{cal}} = 0.1584$$

$$t_{\text{teo}} = 2.3646$$

Criterio de aceptación

$$t_{\text{cal}} \leq t_{\text{teo}}$$

Regla de decisión

Se acepta  $H_0$ , por lo tanto el intercepto es igual a 0

Intervalo de confianza

$$-0.0108 < 0 < 0.0123$$

## 7.2.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100 %

Cantidad adicionada ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cantidad recuperada ( $\mu\text{g/ml}$ )	Porcentaje de recobro
0.4	0.4077	101.94
0.4	0.4026	100.66
0.4	0.4042	101.06
0.4	0.3994	99.86
0.4	0.3979	99.49
0.4	0.4146	103.65

Tabla XVIII. Resultados de Cantidad recuperada/Cantidad adicionada obtenidos en la evaluación de la exactitud y repetibilidad al 100 %.

Parámetro	Resultado
Media (X)	101.11
Desviación estándar (DE)	1.5187
Coefficiente de variación (CV)	1.5020 %

Tabla XIX. Resultados de los parámetros estadísticos evaluados para la exactitud y repetibilidad al 100 %.

\*Prueba de hipótesis para la exactitud

$$H_0 : \mu = 100$$

$$H_a : \mu \neq 100$$

$$t_{\text{cal}} = 1.9612$$

$$t_{\text{teo}} = 2.5700$$

Criterio de aceptación

$$t_{\text{cal}} \leq t_{\text{teo}}$$

Regla de decisión

Se acepta  $H_0$ , por lo tanto  $\mu$  es igual a 100

Intervalo de confianza

$$99.5165 < 100 < 102.7034$$

\*Prueba de hipótesis para la repetibilidad al 100%

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

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

$$X^2 \text{ cal} = 6.0005$$

$$X^2 \text{ teo} = 12.832$$

Criterio de aceptación

$$X^2 \text{ cal} \leq X^2 \text{ teo}$$

Regla de decisión.

Se acepta  $H_0$ , por lo tanto  $\sigma$  es menor o igual al 5 %

Intervalo de confianza

$$0.9479 < \sigma < 3.7252$$

## 7.2.5. REPRODUCIBILIDAD

		Día	
		1	2
1	Analista	101.94	100.66
		99.86	101.06
		99.49	99.10
2	Analista	101.47	102.75
		100.66	99.47
		99.10	100.66

Tabla XX. Resultados obtenidos para la reproducibilidad del método, expresados en porcentaje de recobro.

Parámetro	Resultado
Media (X)	100.5183
Desviación estándar (DE)	1.1628
Coefficiente de variación (CV)	1.1568 %

Tabla XXI. Resultados de los parámetros estadísticos evaluados en la determinación de la reproducibilidad.

\* Análisis de varianza para la reproducibilidad

Modelo de factores cruzados

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

Hipótesis contrastadas :

- 1)  $H_0$  : No hay efecto del analista  
 $H_a$  : Si hay efecto del analista
- 2)  $H_0$  : El día no afecta el resultado del método  
 $H_a$  : El día si afecta el resultado del método
- 3)  $H_0$  : La interacción analista-día no afecta el resultado  
 $H_a$  : La interacción analista-día si afecta el resultado

Fuente de error	g. l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F teo
Analista	1	0.3333	0.3333	0.8902	5.32
Día	1	0.1160	0.1160	0.3098	5.32
Analista-Día	1	0.3744	0.3744	0.2131	5.32
Error exp.	8	14.0500	1.7562		

Tabla XXII. Análisis de varianza para la reproducibilidad.

Criterio de aceptación

$$F_{cal} \leq F_{teo}$$

Reglas de decisión

- 1) Se acepta  $H_0$ , no existe diferencia significativa entre los analistas
- 2) Se acepta  $H_0$ , no existe diferencia significativa entre los días de análisis
- 3) Se acepta  $H_0$ , no existe diferencia significativa entre la interacción analista-

día

Se concluye: El método es reproducible

**7.2.6. ESPECIFICIDAD**

Sustancia relacionada	Respuesta	Magnitud
Ampicilina inyectable	Detectable	101.05 %
Producto de degradación (HCl 6 N)	No detectable	0.0 %
Producto de degradación (NaOH 6 N)	No detectable	0.0 %

Tabla XXIII. Resultados obtenidos en la evaluación de la especificidad del método.

## 7.2.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Condición / Tiempo.				
Inicial	T. A. / 24 horas	T.A. / 72 horas	4° C/ 24 horas	4° C / 72 horas
100.66	99.53	94.83	99.86	95.49
99.86	99.32	93.70	99.25	94.22
99.49	99.22	93.92	99.25	94.13

Tabla XXIV. Resultados obtenidos en la evaluación de la estabilidad de la muestra analítica almacenada a temperatura ambiente y refrigeración por 24 y 72 horas, expresados en porcentaje de recobro.

Condición	Intervalo de confianza	Factor I
T. A. / 24 horas	1.4785 a 0.1891	99.3550 %
T. A. / 72 horas	-6.9944 a -4.7121	94.1469 %
4° C/ 24 horas	-1.4855 a 0.3855	99.4510 %
4° C / 72 horas	-6.6943 a -4.0856	94.6094 %

Tabla XXV . Intervalo de confianza y factor I en estabilidad de la muestra analítica.

\*Criterio de aceptación por intervalo de confianza

- A) La muestra es estable en condiciones ambientales y refrigeración (4° C) por 24 horas, 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 horas, 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 horas, 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 horas, ya que el valor de la media para el factor I no se encuentra entre 95-105 %.

## VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 8.1. DISEÑO DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

El tamaño del inóculo y la fase de crecimiento del microorganismo son algunos de los factores más importantes para la obtención de resultados representativos.

El tamaño de inóculo usado en este estudio para *Staphylococcus aureus* fue de 1.0 ml de la suspensión estandarizada a 25 % de transmitancia a 580 nm por cada 100 ml de medio de cultivo para antibióticos No 3. El medio de cultivo le proporcionó al microorganismo los nutrientes necesarios para que se desarrollara adecuadamente, para de esta manera poder tener la seguridad de que los resultados obtenidos se debían únicamente al antibiótico evaluado.

Para una valoración microbiológica ideal, la temperatura y el período de incubación son muy importantes, ya que deben ser lo suficientemente adecuados para permitir que el crecimiento del microorganismo de prueba proporcione una respuesta proporcional a la dosis, además de que el período de incubación debe ser lo más corto posible. En el presente estudio se observó que la temperatura a la cual se presentó el mayor crecimiento en un menor tiempo (3 horas) fue a 37 °C por lo que estas fueron las condiciones utilizadas en el presente trabajo.

En el estudio realizado se evaluaron 5 concentraciones diferentes de ampicilina inyectable para determinar aquellas que producían una inhibición en el crecimiento microbiano que fuera proporcional a la dosis utilizada, se observó que a medida que se aumenta la dosis el crecimiento microbiano era menor, encontrado que la concentración 0.40 µg/ml proporcionaba un crecimiento moderado que podía considerarse como óptimo para el estudio, por lo que está fue la dosis considerada como del 100 %.

## 8.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

### LINEALIDAD DEL SISTEMA

Como se puede observar en los resultados, el sistema es lineal ya que los parámetros analizados se encuentran dentro de los establecidos, presenta un coeficiente de correlación experimental de 0.9897 que es mayor al establecido teóricamente 0.9800. Al realizar el análisis de varianza de la linealidad del sistema se obtuvo una F experimental de 7684.4551 que es mayor que la F teórica 4.67 por lo que Y depende linealmente de X, esto indica que existe una gran asociación entre las dos variables (concentración y % de transmitancia), de esta manera se comprobó que la variación de la variable dependiente (% T) está íntimamente relacionada con la variación de la variable independiente (concentración de ampicilina) y que dicha relación es lineal.

### PRECISIÓN DEL SISTEMA

La respuesta obtenida por el sistema es precisa ya que presentó un coeficiente de variación de 0.9568 % que es menor al establecido teóricamente 3 %, además de que al realizar la prueba de hipótesis para la precisión se obtuvo un  $X^2$  experimental de 5.9989 que es menor a la  $X^2$  teórica 12.832.

### LINEALIDAD DEL MÉTODO

El coeficiente de correlación obtenido experimentalmente fue de 0.9994 que es mayor al establecido teóricamente 0.9900, al realizar el análisis de varianza de la regresión lineal simple se obtuvo una F experimental de 10615.8888 que es mayor a la F teórica 5.59 por lo que Y depende linealmente de X, estos resultados indican que el método es lineal y que cuando ocurre una variación en el % de transmitancia este se debe a la cantidad de ampicilina presente en la muestra.

Al realizar el análisis estadístico de la pendiente se obtuvo una  $t$  experimental de 0.4408 que es menor a la  $t$  teórica 2.3646, en lo que respecta al análisis estadístico para el intercepto presentó una  $t$  experimental de 0.1584 que es menor a  $t$  teórica, ambos resultados indican que al ser la pendiente igual a 1 y el intercepto igual a cero existe una gran relación entre la concentración de ampicilina y el % de transmitancia obtenido por las muestras y que la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada se describe mediante un modelo de regresión simple.

### **EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100 %**

El coeficiente de variación experimental obtenido fue de 1.5020 % que es menor al establecido teóricamente 5 %. En lo que respecta a la exactitud, al realizar la prueba de hipótesis el valor de  $t$  experimental obtenido fue de 1.9612 menor al valor teórico 2.5700, lo que indica que el método es exacto y por consiguiente que existe una gran concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. En lo que respecta a la repetibilidad, presentó una  $X^2$  experimental de 6.0005 menor a la  $X^2$  teórica 12.32 por lo que el método es repetible al ser realizado a una concentración de 0.04  $\mu\text{g/ml}$ .

### **REPRODUCIBILIDAD**

El método es reproducible ya que al realizar el análisis de varianza se obtuvo una  $F$  experimental para la fuente de variación de analista de 0.8902 menor que la  $F$  teórica 5.32, lo que indica que no hay efecto del analista sobre el método; la  $F$  experimental para la fuente de variación día fue de 0.3098 menor a la  $F$  teórica 5.32, lo que indica que no afecta el día en los resultados obtenidos por el método; en lo que respecta a la fuente de variación analista-día la  $F$  experimental fue de 0.2131 menor a la  $F$  teórica 5.32 por lo que no hay efecto de la interacción analista-día sobre los resultados obtenidos por el método.

## **ESPECIFICIDAD**

En los resultados obtenidos se pudo observar que el método es específico ya que solamente responde a la sustancia de interés; al analizar los productos de degradación no hay respuesta del método, se puede concluir que no hay interferencia por parte de los productos de degradación en la cuantificación de la sustancia de interés en este caso ampicilina inyectable.

## **ESTABILIDAD DE LA MUESTRA**

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron la muestra se considera estable por 24 horas en condiciones ambientales y refrigeración para su análisis una vez preparada la muestra, no así pasando 72 horas ya que la concentración de ampicilina disminuye en un 5.5 %, por lo que se le considera no estable.

## IX. CONCLUSIÓN

Se diseñó un método turbidimétrico alternativo para determinar la potencia de ampicilina inyectable, encontrando que dicho método es adecuado para cuantificar ampicilina inyectable, además de que es más rápido, fácil y menos costoso que el método en placa. Para asegurar que el método diseñado funcionaba adecuadamente se realizó la validación del mismo.

Al realizar la validación del método se encontró que el sistema analítico es lineal en un rango de concentración de 50 a 150 %, además de que es preciso para analizar muestras con una concentración cercana al 100% (0.40  $\mu\text{g/ml}$ ) establecido en la linealidad del sistema.

Con respecto al método se encontró que existe una respuesta lineal entre la concentración de ampicilina inyectable y el grado de inhibición en un rango de 0.20 a 0.60  $\mu\text{g/ml}$ , además de que es reproducible ya que no existe diferencia significativa entre el análisis realizado en días diferentes por diferentes analistas.

El método es específico, ya que no se observa respuesta debido a los productos de degradación de la ampicilina.

La muestra preparada para su uso presenta una estabilidad de 24 horas conservada en refrigeración y a temperatura ambiente, período en el cual los resultados son confiables.

El método diseñado es lineal, exacto, preciso y específico para determinar la potencia de ampicilina inyectable, además de que la muestra una vez preparada es estable durante 24 horas cuando es almacenada a temperatura ambiente y refrigeración.

De acuerdo a lo antes mencionado se puede concluir que el método turbidimétrico desarrollado puede utilizarse como un método alternativo para cuantificar ampicilina inyectable en control de calidad.

## X. PROPUESTAS Y SUGERENCIAS

1. Realizar el método diseñado para determinar la potencia utilizando como microorganismo de prueba *Sarcina lutea*.
2. Realizar una comparación del método turbidimétrico y el método en placa reportado en la FEUM 6a ed.



## XI. ANEXOS

### 11.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Prueba	Reportado	Inicio del estudio	3 meses	6 meses
Catalasa	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
Oxidasa	-	-	-	-
Reducción de nitrato	+	+	+	+
Motilidad	-	-	-	-
Hemólisis. ASC 5 %	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2
Hidrólisis de la gelatina	+	+	+	+
Reacción de leche tornasol	3	3	3	3
Coagulasa	+	+	+	+
Acido sulfhídrico	+	+	+	+
Voges - Proskauer	+	+	+	+
Glucosa	A	A	A	A
Lactosa	A	A	A	A
Sucrosa	A	A	A	A
Manitol	A	A	A	A
Indol	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-

1. Intensa

2.  $\beta$ -hemólisis

3. Formación del cuajo, ácido

A. ácido

Tabla XXVI. Pruebas bioquímicas realizadas a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

## 11.2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### Medio para antibióticos No 1

Preparar como indica el fabricante la cantidad requerida para el estudio, verificar que presente pH 6.5, en caso de ser necesario adicionar solución 0.5 M de HCl ó NaOH para controlarlo, posteriormente esterilizarla en autoclave.

### Medio para antibióticos No 3

Preparar como indica el fabricante la cantidad requerida para el estudio, verificar que presente pH 7.0, en caso de ser necesario adicionar solución 0.5 M de HCl ó NaOH para controlarlo, posteriormente esterilizarla en autoclave.

### Caldo de infusión cerebro corazón

Preparar como indica el fabricante la cantidad requerida para el estudio, verificar que presente pH 7.4, en caso de ser necesario adicionar solución 0.5 M de HCl ó NaOH para controlarlo, posteriormente esterilizarla en autoclave.

### Solución salina isotónica

Pesar 8.5 g de cloruro de sodio y colocarlos en un matraz volumétrico de 1000 ml, que contiene 500 ml de agua destilada, agitar hasta completa disolución y aforar con agua destilada, posteriormente esterilizarla en autoclave.

### Solución amortiguadora 1 % de fosfatos pH 6

Pesar 2.0 g de fosfato dibásico de potasio y 8.0 g de fosfato monobásico de potasio y colocarlos en un matraz erlenmeyer de 2 litros que contiene aproximadamente 500 ml de agua destilada, agitar hasta disolución y llevar a un volumen de 1 litro con agua destilada, verificar que presente pH 6 con un potenciómetro adicionando en caso de ser necesario solución de ácido fosfórico 18 N ó hidróxido de potasio 10 N.

### 11.3. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

#### ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA REGRESIÓN LINEAL SIMPLE DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO

Fuente	g. l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal
Regresión	2 - 1 = 1	SCexpl	$S^2_{expl} = SC_{expl} / 1$	$F = S^2_{expl} / S^2_{inexpl}$
Error	n - 2	SCinexpl	$S^2_{inexpl} = SC_{inexpl} / n - 2$	
Total	n - 1	SCtotal		

Tabla XXVII. Análisis de varianza para la regresión lineal simple del sistema y del método.

Ecuación de la recta:

$$Y = mx + b$$

Suma de cuadrados total:

$$SC_{total} = \sum (y_i - \bar{y})^2$$

Suma de cuadrados explicada :

$$SC_{expl} = \sum (y_i - \bar{y})^2$$

Suma de cuadrados inexplícada

$$SC_{inexpl} = SC_{total} - SC_{expl}$$

F teórica

$$F_{1 - \alpha (g) R) (g) E} \quad \alpha = 0.05$$

## EVALUACIÓN ESTADÍSTICA PARA LA REPRODUCIBILIDAD

Modelo de factores cruzados

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

Desviación estándar :

$$DE = [ N (\Sigma y^2) - (y \dots)^2 / N (N - 1) ]^{1/2}$$

N = número total de determinaciones (en este caso específico N = 12)

Coefficiente de variación :

$$CV = ( DE / y ) 100$$

Calcular la suma de las combinaciones analista - día (y<sub>ij</sub>) :

$$y_{11.} = y_{111} + y_{112} + y_{113} \qquad y_{12.} = y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{21.} = y_{211} + y_{212} + y_{213} \qquad y_{22.} = y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

Calcular la suma para cada analista (y<sub>i.</sub>) :

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

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

Calcular la suma total (y...):

$$y \dots = y_{1..} + y_{2..}$$

Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día ( $\Sigma \Sigma y_{ij}^2$ ) :

$$\Sigma \Sigma y_{ij}^2 = (y_{11.})^2 + (y_{12.})^2 + (y_{21.})^2 + (y_{22.})^2$$

Calcular las sumas del cuadrado de cada analista en los dos días ( $\Sigma y_{i.}^2$ ) :

$$\Sigma y_{i.}^2 = (y_{1..})^2 + (y_{2..})^2$$

Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado ( $\Sigma \Sigma \Sigma y_{ijk}^2$ ) :

$$\Sigma \Sigma \Sigma y_{ijk}^2 = (y_{111})^2 + (y_{112})^2 + (y_{113})^2 + \dots + (y_{221})^2 + (y_{222})^2 + (y_{223})^2$$

Calcular la suma de cuadrados del analista, efecto del factor analista (SCa):

$$SCa = \Sigma y_{i.}^2 / dr - y \dots^2 / adr$$

Calcular la suma de cuadrados del día que trabajo el analista (SCd) :

$$SCd = \Sigma \Sigma y_{ij}^2 / r - \Sigma y_{i.}^2 / dr$$

Calcular la suma de cuadrados del error (SCe) :

$$Sce = \sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \sum \sum y_{ij}^2 / r$$

Con los datos anteriores construir la tabla de análisis de varianza ( ANDEVA ) :

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F teo
Analista	$a - 1 = X$	SCa	SCa / a-1	MCa / MCad	X / Y
Día	$(d - 1) = Y$	SCd	SCd / b-1	MCd / MCad	Y / Z
Analista-Día	$(a-1)(d-1) = Z$	SCad	SCad / Z	MCad / MCE	Z / W
Error	$ad(c - 1) = W$	SCe	SCe / W		

c = Número de muestra por analista

$\alpha = 0.05$

F teórica  $F_{1-\alpha, g}$

Tabla XXVIII. Análisis de varianza para la reproducibilidad.

## ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

Se evalúa mediante los intervalos de confianza para cada condición / tiempo

Tabular los resultados :

Condición / Tiempo			
Inicial	1	2	m
y1	y4	y7	y n-1
y2	y5	y8	y n-2
y3	y6	y9	y n

Tabla XXIX. Estabilidad de la muestra analítica.

a) Cálculos preliminares :

Media	y0	y1	y2	yM
Varianza	S0 <sup>2</sup>	S1 <sup>2</sup>	S2 <sup>2</sup>	Sm <sup>2</sup>

Varianza ponderada

$$Sp1^2 = 2S0^2 + 2S1^2 / 2 (c + 1)$$

$$Sp2^2 = 2S0^2 + 2S2^2 / 2 (c + 1)$$

$$Spm^2 = 2S0^2 + 2Sm^2 / 2 (c + 1)$$

Intervalo de confianza para cada condición / tiempo :

$$IC = (y_i + y_0) \pm t^* [Sp_i^2 (2/3)]^{1/2}$$

Donde : t\* es el valor de la t de Dunnett con C comparaciones y 2(C + 1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

Cálculos preliminares para el coeficiente de variación : Para cada condición / tiempo / Muestra, calcular el factor I :

$$I = [ (\text{análisis muestra} / \text{condición} / \text{tiempo} ) i / (\text{análisis inicial} ) i ] \times 100$$

$$I1 = \frac{y4}{y1} \times 100$$

$$I_2 = \frac{y_5}{y_2} \times 100$$

$$I_3 = \frac{y_6}{y_3} \times 100$$

$$I_4 = \frac{y_7}{y_1} \times 100$$

$$I_5 = \frac{y_8}{y_2} \times 100$$

$$I_6 = \frac{y_9}{y_3} \times 100$$

$$I_7 = \frac{y_{n-2}}{y_1} \times 100$$

$$I_8 = \frac{y_{n-1}}{y_2} \times 100$$

$$I_9 = \frac{y_n}{y_3} \times 100$$

Para cada condición / tiempo calcular la media del factor I :

$$I = \frac{\sum I (\text{condición / tiempo})}{N}$$

Donde :

N = Número de muestras para cada condición / tiempo

$$I_1 = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{3}$$

$$I_2 = \frac{I_4 + I_5 + I_6}{3}$$

$$I_3 = \frac{I_7 + I_8 + I_9}{3}$$

## XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcantara A. Componentes para un programa de validación de métodos analíticos. *Pharma News* 1993; 4(5): 39-40.
2. Alcantara A. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos (I). *Pharma News* 1993; 4(7): 93-98.
3. Alcantara A. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos (II). *Pharma News* 1993; 4(9): 24-25.
4. Alcantara A. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos (III). *Pharma News* 1993; 4(10): 16-19.
5. Alcantara A. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos (IV). *Pharma News* 1993; 4(11): 26-28.
6. *British Pharmacopoeia*. London: 1993; vol. 2.
7. Buchanan R. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8 th ed. Baltimore: The *Williams Wilkins Company*, 1975.
8. *Code of Federal Regulations Food and Drugs*. Washington: U.S. Government printing office, 1992.
9. Connors K. *Chemical stability of pharmaceutical*. 2 th ed. USA: *Wiley-Interscience Publication*, 1986.
10. *Diccionario de especialidades farmacéuticas*, 40a ed., México: PLM, 1994.
11. Faddin M. *Pruebas bioquímicas para la cuantificación de bacterias de importancia clínica*. México: *Médica Panamericana*, 1990.
12. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 6a ed. México: *Secretaria de salud*, 1994.
13. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (1 Suplemento)*. 6a ed. México: *Secretaria de salud*, 1995.
14. Florey K. *Analytical profiles of drug substances*. Florida: *Academic Press*, 1973: vol. 2.
15. García C. *Bacteriología médica diagnóstica*. México: *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN*, 1993.



16. García J, Aguilar G, Román G. Métodos microbiológico y de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para la determinación de amoxicilina en tabletas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 1988; 18(6): 12-17.
17. Guía de validación de medios de cultivo. México: dirección General de Control de Insumos para la Salud SSA, 1990
18. Guía para el control microbiológico de medicamentos. Monografía técnica No. 4. México: CIPAM, 1992.
19. Guías generales de validación. Monografía técnica. México: Secretaria de Salud, 1988.
20. Grafton D. Remington farmacia. 17 th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1987: tomo 2.
21. Goodman, Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9a ed. México: Mc Graw-Hill. Interamericana, 1996: vol. 2.
22. Hewitt W. Microbiological assay and introduction to quantitative principles and evaluation. New York: Academic Press, 1977.
23. Inman E, Frischmann J, Jimenez P, Winkel G, Persinger M, Rutherford B. General method validation guidelines for pharmaceutical samples. *Journal of Chromatographic Science* 1987 June ; 25: 252-256.
24. Katzung B. Farmacología básica y clínica. 2a ed. México: El Manual Moderno, 1986.
25. Kavanagh F. Analytical microbiology. New York: Academic Press, 1972: vol. 1.
26. Kavanagh F. Analytical microbiology. New York: Academic Press, 1972: vol. 2.
27. Kenneth A, Connors. A textbook of pharmaceutical analysis. 3 th ed. USA: John Wiley & Sons, 1982.
28. Lennette, Balows. Manual de microbiología clínica. 4a ed. Argentina: Médica Panamericana, 1991.
29. Murray P. Manual of clinical microbiology. 6 th ed. Washington: ASM Press, 1995.
30. Murray P. Microbiología médica. España: Wolf Publishing Limited, 1992.
31. Rhodes C. Modern pharmaceuticals drugs and the pharmaceutical sciences. New York: Marcel Dekker INC, 1979: vol 7.
32. Rodríguez R. Vademécum académico de medicamentos. México: UNAM, 1984: Tomo I.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

33. Russell A. *Pharmaceutical microbiology*. 2 th ed. Gran Bretaña: Blackwell Scientific Publications, 1981.
34. Skoog. *Análisis instrumental*. 2a ed. México: Mc Graw-Hill, 1992.
35. Solomons T. *Química orgánica*. 2a ed. México: Limusa, 1982.
36. Stecher. *The merck index*. 11 th ed. USA: Merck Company, 1989.
37. *The United States Pharmacopeia*. 23 th ed. New York: Rand McNally, 1995.
38. Todd, Sanford. *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio*. 7a ed. Barcelona: Salvat, 1985: Tomo II.
39. Wade L. *Química orgánica*. 2a ed. México: Prentice-Hall Hispanoamericana, 1993.
40. Willard, Merritt. *Métodos instrumentales de análisis*. Mexico: Gpo. Editorial Iberoamérica, 1991.