

302927
6
2ej

Universidad femenina de México
U.F.M.

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

**ESCUELA: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U. N. A. M.**

FALLA DE ORIGEN

**IMPLEMENTACION Y VALIDACION DEL METODO MICRO-
BIOLOGICO POR DIFUSION EN PLACA, EMPLEANDO EL
DISEÑO POR CUADRADO LATINO 8X8, PARA VALORAR
VITAMINA B12 EN UN JARABE POLIVITAMINICO**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a**

MARIA SOLEDAD HERNANDEZ PEREZ

México, D. F.

1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A TODA MI FAMILIA.

Gracias les doy por todo lo que me han dado y representan en mi vida, son quienes me han estimulado siempre:

MA. TERESA

LEONEL

ESPERANZA

ANA LIDIA

JUAN JOSE

A TODOS MIS AMIGOS:

Gracias por su amistad y apoyo.

Dedico esta Tesis a ABBOTT Laboratories de México y a todo el personal que lo conforma, en particular a las personas que me orientaron en el desarrollo de la misma:

M. en C. LUIS ALFONSO ARJONA

Q.F.B. LAURA BORBOLLA

Agradezco especialmente al Profesor
ANTONIO MUÑOZ ARIZA y AL Q.F.B.
RAMON RODRIGUEZ, su valioso tiempo
y dedicación, sin los cuales no se
hubiera podido concluir el presente
trabajo.

Y A TI POR TODO TU AMOR.

INDICE

CAPITULO I	ANTECEDENTES	PAG.
1.1	Vitamina B12	1
1.2	<u>Escherichia coli</u>	4
1.3	Ensayos fisicoquimicos de identificación	5
1.4	Método de Valoración: Fisicoquímicos y Microbiológicos	6
1.5	Diseño de Cuadrado Latino	6
CAPITULO II		
1.-	Justificación	10
2.-	Objetivo	10
CAPITULO III DEFINICION DE CONCEPTOS		
1.-	Conceptos del Método Microbiológico empleando el Diseño por Cuadrado Latino	11
2.-	Conceptos de Validación y de sus parámetros.	12
3.-	Conceptos de Placebo y Placebo adicionado.	14
CAPITULO IV PLANTEAMIENTO DEL METODO MICROBIOLOGICO POR DIFUSION EN PLACA. EMPLEANDO EL DISEÑO POR CUADRADO LATINO PARA VALORAR VITAMINA B12.		
1.-	Equipo	15
2.-	Materia:	15
3.-	Microorganismo de ensayo	16

4.- Reactivos y Medios bacteriológicos	16
5.- Preparar placas de ensayo	18
6.- Preparar estándar y muestras	18
7.- Procedimiento del ensayo	20
8.- Validez de los resultados y Cálculos de potencia	21
CAPITULO V VALIDACION DEL METODO	
1.- Especificidad	23
2.- Linealidad	23
3.- Exactitud	27
4.- Precisión:	
4.1- Repetibilidad	30
4.2- Reproducibilidad	31
5.- Límite de detección	32
CAPITULO VI RESULTADOS DE LA VALIDACION DEL METODO	
1.- Especificidad del Método	33
2.- Linealidad del Método	34
3.- Exactitud del Método	36
4.- Repetibilidad del Método	43
5.- Reproducibilidad del Método	46
6.- Límite de Detección del metodo	51
CAPITULO VII DISCUSION DE RESULTADOS	
1.- Especificidad	52
2.- Linealidad	52

3.- Exactitud	52
4.- Precisión	
4.1- Repetibilidad	53
4.2- Reproducibilidad	53
5.- Límite de Detección	53
CAPITULO VIII RECOMENDACIONES	54
CAPITULO IX CONCLUSION	55
BIBLIOGRAFIA	56
CAPITULO X ANEXOS	58

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1 VITAMINA B12

Los factores más importantes en la nutrición humana son la ingestión de vitaminas, proteínas, carbonhidratos, grasas, y varios aminoácidos.

Las vitaminas se requieren para muchos procesos de la vida en el área del metabolismo general, en donde funcionan como coenzimas. (1) La deficiencia de cada vitamina se manifiesta comúnmente por un complejo grupo de síntomas.

La última vitamina del grupo B descubierta, fue la vitamina B12, aislada en 1948 en forma cristalina a partir de fracciones de hígado y poco después se demostró su especificidad para el tratamiento de la anemia perniciosa.

La vitamina B12 corresponde a una serie de sustancias denominadas cobalaminas, poseen cobalto en su molécula en proporción del 4 por ciento. Las cobalaminas derivan de la cobamida, que tiene un núcleo central denominado corrina con 4 anillos pirrólicos con cadenas laterales amídicas y que contiene el cobalto trivalente unido a través de una cadena de aminopropanol y fosfato a la D-ribosa. Para formar la vitamina B12, la cobamida se une al dimetilbenzimidazol dando lugar a las cobalaminas. La vitamina B12 es la cianocob

balamina y posee un grupo cianuro unido al cobalto. mientras que la vitamina B12a semisintética. es la hidroxocobalamina. que tiene un grupo hidroxilo en vez de cianuro. (2) La fórmula de la cianocobalamina es: $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$. con peso molecular de 1355.38 (3)

La vitamina B12. se presenta en forma de cristales rojo oscuros y amorfos. y también como polvo cristalino rojo. es una sustancia anhidra altamente higroscópica y cuando se expone al aire puede absorber alrededor del 12 por ciento de agua. Otra de sus características es su solubilidad en alcohol é insolubilidad en acetona. cloroformo. éter y su poca solubilidad en agua. (3,4) Las vitaminas B12 son termoestables. sobre todo la cianocobalamina y resisten las temperaturas habituales del autoclave. (2)

En las anemias macrocíticas megaloblásticas. actúan la vitamina B12 o cabalaminas aportando un factor que falta. el principio anti anémico o hematinico necesario para una eritropoiesis normal. En la anemia perniciosa. la médula ósea hiperplásica. por acción de la vitamina B12. vuelve a su estado normal. no hiperplásico. En este caso. favorece la división y maduración de las células primitivas de la médula ósea y las hace seguir la serie normal llamada normoblástica de dicho desarrollo. produciendo en si aumento del volumen corpuscular medio o MCV. de la hemoglobina corpuscular media o MCH y del valor globular o índice colorimétrico. También constituye un factor necesario para el conjunto de funciones orgánicas relacionadas con la nutrición del sistema nervioso y células

epiteliales. y bucales.(2.3)

La anemia perniciosa provocada por una deficiencia prolongada de vitamina B12 trae consigo la falta de producción del factor intrínseco considerado como un defecto bioquímico.

El factor intrínseco. es una mezcla de mucoproteína esencial para la absorción de la vitamina a través de la pared intestinal. En la anemia perniciosa la vitamina es administrada por vía oral acompañada del factor intrínseco. a falta de éste la vitamina es inefectiva. también puede inyectarse por vía parenteral en cantidades de microgramos(4). Hoy prácticamente no existen casos de muerte por anemia perniciosa si es bien tratada.

En el organismo, las vitaminas B12, la cianocobalamina y la hidroxocobalamina. se transforman en 5'-desoxiadenosilcobalamina denominada coenzima B12 - unión de la desoxiadenosina con el cobalto y en metilcobalamina, también una coenzima B12; estas dos coenzimas se encuentran en la sangre y en el hígado.(2)

Cabe señalar que la Cianocobalamina no existe en estado natural y se forma durante la extracción de las fuentes naturales.

En cambio la hidroxocobalamina, aunque generalmente se obtiene a partir de la cianocobalamina. representa la forma natural de la vitamina B12 y así se encuentra normalmente en sangre y en hígado transformada en coenzima.(2)

Es probable que las bacterias naturales de los alimentos de origen vegetal sintetizen suficiente vitamina B12 como para satisfacer -- los requerimientos de aquellas personas cuyos hábitos dietéticos -- no incluyen alimentos de origen animal.

El contenido en el hígado de vitamina B12, es muy escaso y comercialmente se obtiene mediante la fermentación del Streptomyces oriseus.

La vitamina es precipitada de las soluciones acuosas con sulfato -- de amonio mediante el agregado de n-butanol. la purificación se -- realiza por cromatografía usando bentonita como adsorbente. en el -- cromatograma las bandas rojas que indican a la vitamina se separan mecánicamente y se eluye con agua. Por agregado de acetona a la solución acuosa se cristaliza y es purificada por recristalización -- con acetona. (4)

1.2 Escherichia coli

La Escherichia coli forma parte de la flora normal del intestino -- del hombre y de los animales. (5) predominando en el intestino grueso por ello se denomina también colibacilo. estos bacilos poseen -- un bajo grado de patogenicidad para el hombre: sin embargo, causan más infecciones en las vías urinarias que cualquier otro grupo de -- microorganismos. (6)

La Escherichia coli forma parte de los organismos entéricos que -- son un grupo heterogéneo de bacilos gramnegativos, no esporulados.

estas bacterias son aerobias. fermentan una gran variedad de carbohidratos y poseen una estructura antigénica compleja. (5) Este microorganismo tiene una característica importante por lo que se le menciona y es como se señaló anteriormente que requiere para su crecimiento a la vitamina B12. esto se observó por ejemplo en un ensayo para la utilización de etanolamina. Al poner varias cepas en un medio de glicerol y etanolamina. con NH_4^+ como vía de nitrógeno. no se produjo ningún crecimiento al no haber cobalaminas agregadas externamente o en la presencia de cobinamida. Las cepas crecieron en etanolamina al agregarse al medio cianocobalamina. metilcobalamina o adenosincobalamina. (7)

1.3 Ensayos fisicoquímicos de identificación

Dentro de esta serie de cobalaminas. se encuentra la cianocobalamina la cual se puede identificar por medio de algunos ensayos fisicoquímicos como son:

A) Transferir 1 gramo de muestra a un matraz volumétrico de 100ml y diluir con agua a volumen. Usar una celda de 1 cm. y agua como blanco. Por medio del espectro de absorción en la región ultravioleta-visible. medir la absorbancia en la valoración a longitudes de onda de máxima absorción de 278. 361. 550 nm. La relación A_{361}/A_{278} es entre 1.70 y 1.90 y la relación A_{361}/A_{550} es entre 3.15 y 3.40.

B) En una cápsula de porcelana fundir 1 mg de cianocobalamina. con 50 mg de piro-sulfato de potasio; desmenuzar con agitador de vidrio agregar 3 ml de agua y disolver por ebullición. Agregar 1 gota de

fenolftaleína y solución de hidróxido de sodio hasta color rosa. Agregar 500 mg de acetato de sodio, 0.5 ml de solución 1N de ácido acético y 0.5 ml de solución (1 en 500) de sal nitroso R(1 -Nitroso-2-naftol-3,6 disulfonato disódico); aparece coloración anaranjada rosiza. Agregar 0.5 ml de ácido clorhídrico y hervir durante 1-minuto. Si esta presente la cianocobalamina, debe persistir la coloración rosiza.

1.4 Métodos de Valoración: Fisicoquímicos y Microbiológicos

Método Fisicoquímico:

a) Transferir 30 mg de muestra de cianocobalamina, a un matraz volumétrico de 1 litro, aforar con agua y mezclar.

Disolver en agua una porción calculada de la sustancia de referencia de cianocobalamina y diluir cuantitativamente con agua hasta obtener una solución de referencia de 30 ug/ml.

En un espectrofotómetro, determinar concomitadamente las absorbancias de ambas soluciones, en celdillas de 1 cm a la longitud de onda máxima absorbancia a cerca de 361 nm, utilizando agua como blanco.

Calcular la cantidad en mg de $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ en la muestra de Cianocobalamina utilizada por la fórmula: $C(A_m/A_{ref})$; en la cual C es la concentración en ug por ml de la solución de referencia de cianocobalamina, A_m y A_{ref} son las absorbancias de la solución de la muestra y de la solución de referencia, respectivamente.

Métodos Microbiológicos

En los procedimientos microbiológicos, el requerimiento fundamental para la medición de la actividad de vitamina B12 es la incapacidad del microorganismo de ensayo para sintetizar a la vitamina, - debe requerir de ella para su crecimiento y ser sensible a muy pequeñas cantidades de la vitamina.

Para tales ensayos microbianos se preparan medios nutricionalmente completos salvo en la vitamina que esta en estudio los medios son inoculados y muestran crecimiento mínimo o ninguno de acuerdo a la cantidad de vitamina agregada al medio. El grado de respuesta de crecimiento se determina por turbidimetría, espectrofotometría, titulación del ácido producido (4) o por medición de halos de crecimiento.

Los Métodos Microbiológicos son los siguientes:

a) Método Turbidimétrico: se basa en el crecimiento del microorganismo Lactobacillus leichmannii por la presencia de la vitamina -- B12. A una serie de tubos que contienen caldo de ensayo de vitamina B12, se les agrega cantidades medidas de la vitamina, se inoculan los tubos con el microorganismo y se incuban a $32\text{ C} \pm 0.5\text{ C}$ de 16 a 24 horas. El grado de crecimiento, se mide por la determinación de la transmitancia por medio de un espectrofotómetro que se ajusta a 600 nm. (4)

b) El Método por difusión en placa: en este método se observa el crecimiento de la Escherichia coli ATCC 10799, debido a la presen-

cia de la vitamina B12, nutriente esencial del microorganismo, el crecimiento se manifiesta en halos delimitados en forma circular, en las cuales se mide el diámetro en unidades milimétricas con un vernier digital.

El crecimiento de la Escherichia coli en el método de valoración de la vitamina B12, tiene un planteamiento de acuerdo al diseño del Cuadrado Latino.(8)

1.5 Diseño de Cuadrado Latino

El diseño del Cuadrado Latino consiste en disponer los tratamientos de dos maneras diferentes, por filas y columnas. Los tratamientos son las unidades de prueba(3). Cada tratamiento se presenta una vez en cada fila y columna: cada fila como cada columna, es un dig que completo. En el Cuadrado Latino el número de filas, columnas y tratamientos debe ser el mismo. Los cuadrados más comunes van de 5x5 a 8x8: cuadrados mayores de 12x12 se usan muy rara vez.(9)

El Cuadrado Latino 8x8, es el que se ocupa en este Método Microbiológico. Las concentraciones de vitamina B12 que se obtienen en el ensayo de las muestras y el estándar, son los tratamientos. Los tratamientos son representados en este caso por números que van del 1 al 8. En la tabla de Cuadrado Latino cada uno de los números aparecen una sola vez en cada una de las 8 filas y las 8 columnas, en forma aleatoria.

La colocación de los tratamientos en el medio con inóculo de Esche

ricnia coli contenidos en la caja, se hace de acuerdo a la Tabla de Cuadrado Latino. la caja se incuba y se mide el diametro de los halos de crecimiento. a las lecturas obtenidas se les hace un análisis estadístico y se obtiene la cantidad de vitamina B12 contenida en las muestras. (8)

Una parte integral del Método Microbiológico por el Cuadrado Latino. es la Validación del mismo. debe probarse para determinar su efectividad.

CAPITULO II

1.- Justificación

La mayoría de los Laboratorios Farmacéuticos que fabrican productos con Vitamina B12, realizan la valoración de esta vitamina por el Método Microbiológico Turbidimétrico. El cual se ha observado, presenta limitación en la confiabilidad de los resultados que se obtienen. Por este motivo la Implementación del Método Microbiológico empleando el diseño del Cuadrado Latino 8×8 , al analizarse muestras y estándares en las mismas condiciones de prueba y bajo un arreglo aleatorio. Con la Validación se tiene la seguridad que este Método satisface los requisitos necesarios para poder aplicarlo.

2.- Objetivo

"Implementar y Validar el Método Microbiológico por difusión en placa empleando el Diseño por Cuadrado Latino 8×8 , para valorar Vitamina B12 en un Jarabe Polivitamínico"

CAPITULO III

DEFINICION DE CONCEPTOS

1.- CONCEPTOS DEL METODO MICROBIOLOGICO EMPLEANDO EL DISEÑO POR --
CUADRADO LATINO.

1.1- Diseño del Cuadrado Latino: Consiste en disponer los trata --
mientos de dos maneras diferentes, por filas y columnas. Cada trata --
miento se presenta una vez en cada fila y columna. Este diseño --
incrementa la precisión, eliminando los efectos de las diferencias --
entre las unidades de prueba y balanceando los efectos de la ordeña --
ción y las dosis. Los cuadrados latinos más comunes van de 5x5 a --
8x8. (3.9)

1.2- Tratamiento: Es la característica que se desea valorar en una --
prueba. (3)

1.3- Bloque de Fila y Columna: Representación de la unión de va --
rios cuadros en dirección horizontal (Fila) y en dirección verti --
cal (Columna).

1.4- Tabla de Cuadrado Latino: Superficie plana en la que están es --
critos los tratamientos representados con números, aparecen en for --
ma aleatoria en las 8 Filas y en las 8 Columnas.

1.5- Halo de Crecimiento: Extensión de una superficie, delimitada --
circularmente por el aumento de microorganismos.

1.6- Vernier Digital: Reglilla graduada móvil con sensibilidad límite de mm y centésimas de mm. Tiene una pequeña pantalla donde aparecen las lecturas que se toman de los diámetros de los talos de crecimiento.

2.- CONCEPTOS DE VALIDACION Y DE SUS PARAMETROS

2.1- Validación: Documento escrito que establece através de estudios de laboratorio, que la capacidad del metodo satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros analíticos.(10)

2.2- Linealidad: La linealidad de un sistema o metodo 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 rango determinado. tambien puede definirse como la medición del grado al cual la curva de calibración analítica se aproxima a una línea recta.(10)

2.2.1- Linealidad del Sistema: Se determina, construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando cuando menos 5 diluciones y haciendo analisis por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del objetivo del método para propósitos de control de calidad y de

seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica. Deberá estar incluido el 100% de la dosis.

2.3- Exactitud: Es 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 han adicionado cantidades conocidas de la sustancia. (10)

2.4- Precisión: La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. La Precisión es una medida del grado de reproducibilidad y repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación. (10)

2.4.1- Repetibilidad: Es la Precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas. (10)

2.4.2- Reproducibilidad: Es la Precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días en el mismo y/o diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos. (10)

2.5- Especificidad: Es la medida del grado de interferencia (o ausencia de), en el análisis de mezclas complejas. Es la habilidad -

de un método analítico para obtener una respuesta debida unicamerite a la substancia de interes y no a otros componentes de la muestra.

2.6- Limite de Detección: Es la minima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. (10)

3.- CONCEPTOS DE PLACEBO Y PLACEBO ADICIONADO

Comprender para fines de la Valioación los terminos de Placebo y Placebo Adicionado, como se definen a continuación:

3.1 Placebo: Jarabe Polivitaminico que no contiene a la Vitamina B12, substancia de interes que se tiene que determinar, conformado dicho Jarabe de excipientes y otras diversas vitaminas.

3.2- Placebo Adicionado: Jarabe Polivitaminico que contiene a la Vitamina B12, substancia de interes que se determina, ademas de estar conformado el Jarabe de excipientes y otras diversas vitaminas.

CAPÍTULO IV

PLANTEAMIENTO DEL METODO MICROBIOLÓGICO POR DIFUSION EN PLACA EMPLEANDO EL DISEÑO POR CUADRADO LATINO PARA VALORAR VITAMINA B12.

1.- Equipo

- 1.1 Vernier digital
- 1.2 Cajas de ensayo (230mmx230mmx20mm)
- 1.3 Incubador
- 1.4 Centrifuga
- 1.5 Calculadora
- 1.6 Autoclave
- 1.7 Balanza Analítica
- 1.8 Discos absorbentes de 13 mm (Schleicher & Schuell)

2.- Material

- 2.1 Pipetas graduadas de 5 ml
- 2.2 Pipetas graduadas de 10 ml
- 2.3 Matraces volumétricos de 100 ml
- 2.4 Matraces Erlenmeyer de 250 ml
- 2.5 Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- 2.6 Vasos de precipitados de 50 ml
- 2.7 Pipetor
- 2.8 Puntillas
- 2.9 Tubos

Nota: Lavar el material con limpiador líquido para material de vidrio. enjuagar 6 veces con agua corriente y 6 veces con agua desti

lada. Sanitizar con permicioa las cajas antes de ser lavadas. po -
ner suficiente permicida para toda la superficie de la caja y su -
tada. dejar así durante todo un dia.

3.- Microorganismo de ensayo

3.1 Escherichia coli (ATTC 10799, NCIB 8134)

4.- Reactivos y medios Bacteriológicos

4.1 Stock del medio de cultivo con agar

4.2 En el medio de cultivo para el ensayo; es necesario prepa-
rar tres soluciones.

4.2.1 Solución A (medio de agar para el ensayo)

4.2.2 Solución B (Solución de reactivos)

4.2.3 Solución C (Solución de glucosa)

4.3 Medio de crecimiento

4.4 Estándar de cianocobalamina (ver página 18)

4.5 Solución de cloruro 2,3,5 trifeniltetrazolium

4.6 Solución extractora

(ver Anexo 1. Preparación de Reactivos y Medios Bacterioló-
gicos)

5.- Preparar placas de ensayo:

5.1 Preparar el inóculo

5.1.1 Realizar una resiembra del microorganismo en el me -
dio de agar para el ensayo. Incubar a 37 C - 1 C ou -
rante 20 horas.

5.1.2 Sembrar los microorganismos del medio de cultivo al

medio de crecimiento. Incubar $37^{\circ} \text{C} - 1^{\circ} \text{C}$ de 20 a 24 horas.

5.1.3 Centrifugar el medio de crecimiento 10 minutos a 3000 rpm. Se decanta el medio y se resuspende el conglomero de organismos en 10 ml de solución salina.

5.1.4 Centrifugar 5 minutos y resuspender 2 veces más para producir el inóculo.

5.2 Preparar la caja de ensayo en condiciones de asepsia.

5.2.1 Colocar la caja de ensayo en un sitio nivelado y plano.

5.2.2 Mezclar las soluciones A y B. Este es el medio para el ensayo.

5.2.3 Añadir al medio de ensayo 10 ml del inóculo y mezclar perfectamente evitando la formación de burbujas.

5.2.4 Vaciar el medio de ensayo inoculado en la caja haciendo un movimiento circular para distribuir uniformemente el medio.

5.2.5 Dejar enfriar la caja y secar en caso de ser necesario en una incubadora.

5.2.6 Colocar la caja en el refrigerador por 60 minutos para asegurar que estén perfectamente cubiertas.

5.2.7 Mantener la caja a temperatura ambiente por 10 minutos antes de usarla. (Ver Anexo 2. Preparar placas de ensayo).

6.- Preparar estándar y muestr@s

6.1 Preparar estándar de Cianocobalamina.

6.1.1 Secar el estándar de referencia sobre sílica gel durante 4 horas y de manera directa.

6.1.2 Calcular el peso del estándar, para 1000 mcg de Cianocobalamina con la siguiente fórmula:

$$mp = \frac{1000 \text{ mcg de Cianocobalamina}}{7.8 \text{ mcg/mg (concentración de Cianocobalamina)}} = 128.2051 \text{ mg}$$

6.1.3 Colocar 128.2051 mg. en matraz volumétrico de 100 ml. Añadir 40 ml de solución extractora y esterilizar a 121 °C durante 6 minutos, enfriar y aforar a 100 ml con solución extractora. Esta es la dilución estándar 1: concentración 10 mcg/ml de cianocobalamina. se puede almacenar a 4 °C durante 6 meses.

6.1.4 Tomar 2 ml y colocar en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con solución extractora. Esta es la dilución estándar, representarla con la letra S; tiene una concentración de cianocobalamina de 0.2 mcg/ml, concentración de cianocobalamina de 0.2 mcg/ml. esta es la concentración alta y se representa con las letras S.

6.1.5 Diluir en proporción de 1.0 ml de S y 3 ml de solución extractora. esta es la dilución a la concentración de 0.05 mcg/ml. considerarla como la concentración baja y se representa con las letras S.

B

6.2 Preparar muestras para el ensayo

- 6.2.1 Preparar una muestra representativa, con una concentración similar a la del estándar S (0.2 mcg/ml). Diluir posteriormente con solución extractora y obtener una concentración más baja de 0.05 mcg/ml. Realizar para tres muestras.
- 6.2.2 Ocupar el cuadrado latino 3x3, desiona en este método el acomodar 4 preparaciones, una corresponde al estándar y las tres a las muestras.
- 6.2.3 Jarabe, especificado en unidad de dosis. (ver Anexo 3 Fórmula para calcular la cantidad de muestra)

6.3 Extraer y diluir

- 6.3.1 Colocar q (20 mcg de cianocobalamina) de muestra en un matraz volumétrico de 100 ml, agregar 50 ml de solución extractora.
- 6.3.2 Esterilizar a 121 C durante 6 minutos y enfriar a temperatura ambiente.
- 6.3.3 Aforar a 100 ml con solución extractora y filtrar a través de papel filtro (Whatman No.4). La solución resultante de cada una de las muestras de ensayo, se representan con las letras: U.V.W. tienen una concentración de cianocobalamina de 0.2 mcg/ml. se considera como la concentración alta y se representa con -- las letras: U . V . W .

A A A

6.3.4 Diluir en proporción 1 ml de las diluciones U .V .W
 y 3 ml de solución extractora y se obtienen las dilu-
 ciones con una concentración de cianocobalamina de -
 0.05 mco/ml. considerada como la concentración baja.
 y se representa con las letras: U .V .W .
 B B B

7.- Procedimiento del ensayo

7.1 Identificar a los tratamientos. los tratamientos son las -
 dos concentraciones A(alta) y B(baja) que se obtienen del
 estándar y de cada una de las tres muestras. En la tabla -
 de cuadrado latino para este método son representados los
 tratamientos con números que van del 1 al 8. A continua --
 ción se representan:

Muestras

Concentración	estandar	U	V	W
A 0.2 mco/ml	S = 1 A	U = 3 A	V = 5 A	W = 7 A
B 0.05 mco/ml	S = 2 B	U = 4 B	V = 6 B	W = 8 B

7.2 Nota: Estos números del 1 al 8 aparecen en diferente orden
 en cada tabla de cuadrado latino. Debe cambiarse de
 tabla cada día de análisis. (ver Anexo 4. Ejemplos -
 de tablas de cuadrado latino)

7.3 En los discos puestos sobre el agar de la caja. colocar --
 en ellos con un pipetor 10 mcl de las diluciones alta y ba-
 ja del estándar y las tres muestras. debajo de la caja de-
 be estar la tabla de cuadrado latino.

- Empezar con las primeras cuatro filas con este orden 1.2.3
4.5.6.7.8. y para las filas 5 a la 8 el orden es inverso.
- 7.4 Los límites de los halos de crecimiento se distinguen mejor, al dejar la caja a temperatura ambiente por hora y media.
- 7.5 Incubar las placas de ensayo de 37 C a 39 C. de 16 a 20^o horas.
- 7.6 Después de incubar, medir el diámetro de los halos de crecimiento con el vernier digital.

8.- Validez de los resultados y Cálculos de Potencia

Nota: A las lecturas obtenidas se les realiza un Análisis Estadístico. se tiene de referencia a la Farmacopea Europea.

(11)

8.1 Colocar en la Tabla 1 las lecturas obtenidas en mm y realizar lo que a continuación se pide:

8.1.1 Obtener el total de cada Fila (F1.F2...FB)

8.1.2 Obtener el total de cada Columna (C1.C2...CB)

8.1.3 Elevar al cuadrado el total de cada columna y de cada Fila (F1.F2....FB) (C1.C2...CB)

8.1.4 Obtener la suma total de los valores de cada Columna y Fila que se elevan al cuadrado.

$$F1 + \dots + FB \quad (Fn) \qquad C1 + \dots + CB \quad (Cn)$$

8.2 Organizar las lecturas obtenidas de acuerdo a las tablas: 2.0 a la 2.3 (Ver Anexo 5. Las Tablas)

- 8.3 Hacer el Análisis de varianza y poner los resultados en la Tabla de Validez. (Ver Anexo 6. Analisis de varianza)
- 8.4 Obtener el Coeficiente de Potencia. (Ver Anexo 7. Coeficiente de Potencia de las muestras)
- 8.5 Reportar resultados en mcg/o, mcg/ml y en %. (Ver Anexo 8. Fórmulas para calcular resultados).

CAPITULO V

VALIDACION DEL METODO

1.- ESPECIFICIDAD

En la especificidad se tiene como objetivo, probar que el método microbiológico mide a la vitamina B12 y el que no se tengan interferencias debidas a otras sustancias presentes en el placebo.

Para la determinación de la Especificidad es necesario llevar a cabo analisis en placebos y estándar o placebos adicionados de vitamina B12 que sirven de control positivo.

Para probar la Especificidad en el Método Microbiológico por difusión en placa empleando el diseño por Cuadrado Latino, se debe analizar la Cianocobalamina en estándar, en la que debe únicamente haber respuesta al presentarse crecimiento de la Escherichia coli debido a la presencia de la vitamina B12, lo que no debe suceder en el placebo el cual no contiene a la vitamina.

2.- LINEARIDAD

Para probar la Linearidad del Método realizar lo siguiente:

Preparar la solución stock de cianocobalamina.

Llevar a volumen con solución extractora.

Estándar (mg)	Concentración de Cianocobalamina (mcg/mg)	Volumen (ml)	Concentración de Cianocobalamina (mcg/ml)
128.2051	7.8	100	10

Hacer las siguientes diluciones, llevar a volumen con solución extractora.

Alicuotas (ml)	Volumen (ml)	Concentración de Cianocobalamina (mcg/ml)
6	100	0.6
9	100	0.9
25	100	2.5
8	50	1.6
19	100	1.9

Continuar con la siguiente dilución para la concentración de 2.5 - mcg/ml y aforar con solución extractora.

Alicuota (ml)	Volumen (ml)	Concentración de Cianocobalamina (mcg/ml)
50	100	1.25

Hacer diluciones de cada concentración obtenida, y llevar a volumen con solución extractora.

Concentración de Cianocobalamina	Alicuotas (ml)	Volumen (ml)	Últimas Concentra- ciones de Cianoco- balamina (mcg/ml)
0.6	1	6	0.1
	1	25	0.024
0.9	1	6	0.15
	1	25	0.036
1.25	1	6	0.20
	1	25	0.05
1.6	1	6	0.266
	1	25	0.064
1.9	1	6	0.316
	1	25	0.076

Analizar las últimas concentraciones obtenidas de acuerdo al Método Microbiológico por cuadrado latino y verificar lo siguiente:

- Medir el diámetro de los halos de crecimiento para determinar su diferencia de acuerdo a las concentraciones.

- Preparar la curva estandar.

Gráficar las medias en mm del diámetro de los talos de crecimiento en el eje de las ordenadas contra la concentración en mcg/ml en el eje de las abscisas.

Criterio de aceptación (10)

Coefficiente de correlación (r) = 0.99

3.- EXACTITUD

Para determinar este parámetro, se definió utilizar porcentajes al rededor de más y menos el 50% en relación al 100% correspondiente a la concentración de 1.25 mcg/ml de Cianocobalamina. para tener un intervalo aceptable de control de la vitamina B12 en el Jarabe Polivitaminico.

Analizar placebos adicionados de vitamina B12 que se encuentra a diferentes concentraciones en mcg/ml.

Las concentraciones de los placebos adicionados son las siguientes:

1)	-----	48%	-----	0.6 mcg/ml
2)	-----	72%	-----	0.9 mcg/ml
3)	-----	100%	-----	1.25 mcg/ml
4)	-----	128%	-----	1.6 mcg/ml
5)	-----	152%	-----	1.9 mcg/ml

De acuerdo al Método Microbiológico. analizar a los placebos adicionados.

Preparar las diluciones de cada uno de los placebos adicionados de diferentes concentraciones. de la siguiente manera:

Pesar la cantidad de 20.4081 g (16 ml) de placebo adicionado. agregar 50 ml de solución extractora. esterilizar y llevar a 100 ml con solución extractora. se obtiene la concentración Alta que corresponde a la 1ra. dilución. tomar 1 ml de esta dilución y 3 ml de solución extractora y se obtiene la concentración Baja que corresponde a la 2da. dilución.

NOTA: Hacer tres pesadas independientes de placebo adicionados de cada una de las concentraciones.

De las diluciones de los placebo adicionados, obtener las concentraciones siguientes:

Placebo adicionados con concentración de 0.6 mcg/ml de Cianocobalamina.

Concentración	Concentración
<u>Alta</u>	<u>Baja</u>
(mcg/ml)	(mcg/ml)
0.096	0.024

Placebo adicionados con concentración de 0.9 mcg/ml de Cianocobalamina.

0.144	0.036
-------	-------

Placebo adicionados con concentración de 1.25 mcg/ml de Cianocobalamina

0.2	0.05
-----	------

Placebo adicionados con concentración de 1.6 mcg/ml de Cianocobalamina.

0.256	0.064
-------	-------

Placebo adicionados con concentración de 1.9 mcg/ml de Cianocobalamina.

0.304	0.076
-------	-------

Preparación de las diluciones del Estándar de Cianocobalamina.

Ocupar la dilución Stock con concentración de 10 mcg/ml utilizada en la linealidad. Llevar a volumen con solución extractora las siguientes diluciones:

Alicuota (ml)	Volumen (ml)	Concentración Alta de Cianocobalamina (mcg/ml)
2 -----	100 -----	0.2

De la solución de concentración 0.2 mcg/ml de Cianocobalamina, se toma 1 ml y se adicionan 3 ml de solución extractora, para un total de 4 ml considerando el ml de la alicuota.

Se representa como sigue:

Alicuota (ml)	Volumen (ml)	Concentración Baja de Cianocobalamina (mcg/ml)
1 -----	4 -----	0.05

En cada caja analizar el estándar y las tres muestras de placebos adicionados de una misma concentración.

Criterio de aceptación (10)

- La Pendiente $(m) = 1$
- El Intercepto $(b) = 0$
- El Coeficiente de correlación $(r) = 0.99$

4.- PRECISION

4.1 REPETIBILIDAD

Para determinar este parámetro, analizar placebos adicionados a una sola concentración de Cianocobalamina de 1.25 mcg/ml que corresponde al 100%.

Utilizar la misma metodología que se siguió en el parámetro de Exactitud para los placebos adicionados de 1.25 mcg/ml de Cianocobalamina.

Para la Repetibilidad se realizaron dos análisis independientes, y de los resultados se debe obtener los siguiente:

Criterio de aceptación (10)

- Coeficiente de variación (CV) 5

4.2 REPRODUCIBILIDAD

Para cumplir con este parámetro, se requiere del trabajo de dos -- analistas. Cada uno de los analistas realiza dos análisis en diferentes días.

Analizar placebos adicionados al 100% de 1.25 mcg/ml de Cianocobalamina.

Utilizar la misma metodología que se siguió en el parámetro de -- Exactitud para los placebos adicionados de 1.25 mcg/ml de Cianocobalamina.

Criterio de aceptación (10)

- Coeficiente de variación (CV) 5

5.- LIMITE DE DETECCION

Para cumplir con este parámetro, llevar a cabo diluciones de la Vitamina B12 para obtener concentraciones menores de 0.024 mcg/ml. - concentración de Vitamina B12 más baja analizada de la cual se tiene respuesta.

Hacer diluciones de la solución con concentración de 0.2 mcg/ml correspondiente al placebo adicionado al 100%.

Llevar a volumen con solución extractora.

Concentración de Cianocobalamina (mcg/ml)	Alicuotas (ml)	Volumen (ml)	Concentración de Cianocobalamina (mcg/ml)
0.2	1	100	0.002
0.2	2.5	100	0.005
0.2	5.0	100	0.01
0.2	7.5	100	0.015

Analizar las concentraciones obtenidas de acuerdo al Método Microbiológico que se evalúa.

De acuerdo a los resultados obtenidos:

- Determinar la mínima concentración de Vitamina B12 en la que se observe crecimiento de Escherichia coli.

CAPITULO VI

RESULTADOS DE LA VALIDACION DEL METODO

1.- ESPECIFICIDAD DEL METODO

Al aplicar el Método al placebo se observó que no hubo halos de crecimiento de la Escherichia coli, a diferencia del control positivo el cual tenía Vitamina B12, y si presentó halos de crecimiento.

Esto nos permite determinar, que unicamente se obtuvo respuesta en presencia de la Vitamina B12 y que no se observo interferencia de las sustancias del placebo.

2.- LINEARIDAD DEL METODO

Para la Linealidad del Método se obtuvieron los siguientes datos:

Concentración Vitamina B12 (mcg/ml)	Lecturas de los halos de crecimiento de <u>Es</u> <u>cherichia coli</u> (mm)
0.024	21.25
0.036	21.85
0.05	22.59
0.064	22.74
0.076	23.30
0.1	23.73
0.15	25.00
0.2	25.64
0.266	26.87
0.316	28.52

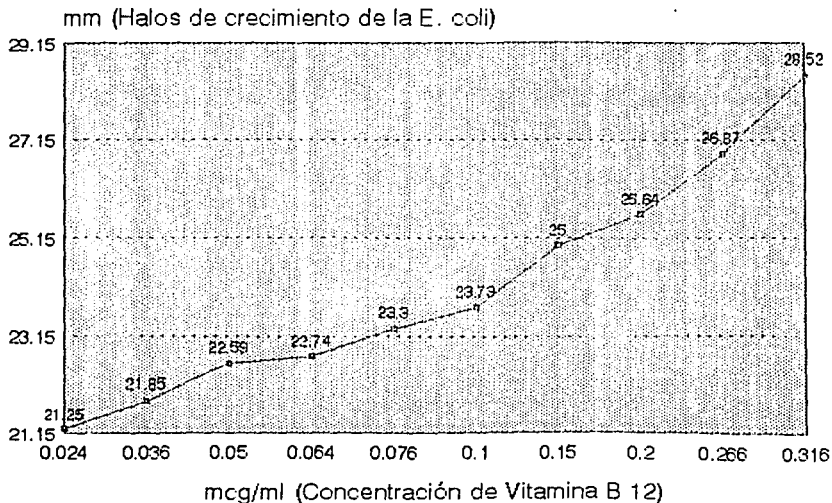
Coefficiente de correlación de la curva:

$$r = 0.9910$$

LINEARIDAD DEL METODO

CURVA DE LOS RESULTADOS DE LINEARIDAD DEL METODO

CONCENTRACION DE VITAMINA B 12



□ Muestra Stock

3.- EXACTITUD DEL METODO

Datos obtenidos para la determinación de Exactitud en las diferentes concentraciones analizadas.

3.1- Concentración de 0.6 mcg/ml de Cianocobalamina (48%).

Lecturas en mm

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
F1	25.67	26.53	28.60	23.58	26.17	26.19	23.56	23.13
F2	26.63	29.41	26.34	24.59	23.65	23.49	23.54	26.46
F3	23.30	23.64	24.75	26.17	27.99	22.86	26.48	26.61
F4	23.33	23.65	23.77	27.87	25.58	26.14	26.54	24.93
F5	23.38	26.19	26.29	23.98	24.95	23.77	26.48	29.02
F6	26.39	24.74	26.39	26.86	23.64	28.08	23.32	23.70
F7	27.53	26.38	23.75	23.50	26.28	26.69	24.56	23.10
F8	25.58	23.38	23.51	26.76	23.46	25.33	29.01	26.68

Tabla de validez

Tipos de variación	GL	\sum de cuadrados	Cuadros Promedio	Factor (F)	Condicion	Validez Si/No
Preparaciones	3	17.1080	5.7027	39.6572	-	-
Regresion	1	146.3495	146.3495	1017.7295	> 7.31	Si
Tratamientos	7	184.7699	26.3957	183.5584	-	-
Filas	7	0.9140	0.1306	0.9082	-	-
Columnas	7	0.6320	0.0903	0.6280	-	-
Error Residual	42	6.0400	0.1438	-	-	-
Total	63	355.8134	178.8126	1242.4813	-	-

3.2- Concentración de 0.9 mcg/ml de Cianocobalamina (7%)

Lecturas en mm

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
F1	23.44	26.45	27.89	26.17	24.04	26.60	23.51	24.00
F2	24.59	23.76	26.65	26.76	23.59	26.82	27.01	23.82
F3	27.72	26.63	23.48	24.31	26.71	24.04	24.02	27.25
F4	26.76	23.24	24.15	23.23	26.76	23.78	26.83	27.21
F5	26.66	26.64	23.51	27.40	23.36	24.42	27.17	23.46
F6	23.14	23.37	26.54	26.41	26.76	27.56	23.83	24.32
F7	27.15	24.27	23.46	23.64	27.54	23.42	26.87	26.44
F8	23.57	27.49	26.55	23.58	23.46	26.52	24.22	26.64

Tabla de validez

Tipos de variación	GL	Σ de cuadrados	Cuadros Promedio	Factor (F)	Condición	Validez Si/No
Preparaciones	3	6.7410	2.247	37.7013	-	-
Regresión	1	157.8792	157.8792	2648.9799	≥ 7.31	Si
Tratamientos	7	168.1520	24.0217	403.0487	-	-
Filas	7	0.5083	0.0726	1.2181	-	-
Columnas	7	0.4480	0.064	1.0738	-	-
Error Residual	42	2.5030	0.0596		-	-
Total	63	336.2314	184.3683	3092.4278	-	-

3.3- Concentración de 1.25 mcg/ml de Cianocobalamina (100%).

Lecturas en mm

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
F1	13.67	17.31	17.21	13.32	17.31	17.21	13.33	13.67
F2	17.18	13.11	17.55	13.57	17.55	13.57	13.11	17.18
F3	13.40	13.32	13.40	13.32	17.00	17.80	17.80	17.00
F4	13.67	17.24	17.00	17.24	13.42	13.67	17.00	13.42
F5	17.15	17.30	12.24	16.90	12.24	13.50	13.50	17.30
F6	17.21	13.90	17.13	17.12	13.30	13.30	17.13	17.90
F7	13.47	16.93	13.47	13.50	17.30	16.93	13.50	17.30
F8	17.19	13.33	13.15	17.30	13.33	17.30	17.19	13.15

Tabla de validez

Tipos de variación	GL	Σ de cuadrados	Cuadros Promedio	Factor (F)	Condición	Validez Si/No
Preparaciones	3	0.0020	0.0006	0.0104	-	-
Regresión	1	238.4322	238.4322	4153.8711	>7.31	Si
Tratamientos	7	239.3510	34.1930	595.6969	-	-
Filas	7	1.4564	0.2080	3.6237	-	-
Columnas	7	1.0968	0.1567	2.7300	-	-
Error Residual	42	2.4128	0.0574		-	-
Total	63	462.7512	273.0479	4751.9186	-	-

3.4- Concentración de 1.6 mcg/ml de Cianocobalamina (128%)

Lecturas en mm

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
F1	25.11	27.77	28.35	25.02	28.16	28.37	24.71	25.63
F2	28.27	25.66	28.66	24.72	28.70	25.52	25.17	28.21
F3	25.29	25.55	25.04	25.37	28.30	28.66	28.75	28.73
F4	25.51	28.54	28.99	28.62	25.31	25.74	28.57	24.62
F5	27.77	28.80	25.48	28.89	25.80	24.84	25.70	28.42
F6	28.22	24.73	28.79	29.19	25.46	25.59	28.63	25.52
F7	24.86	28.47	25.82	26.04	28.60	28.29	25.69	28.63
F8	28.25	25.21	25.73	28.46	25.02	28.21	28.21	25.66

Tabla de validez

Tipos de variación	GL	Σ de cuadrados	Cuadros Promedio	Factor (F)	Condición	Validez Si/No
Preparaciones	3	2.8070	0.9357	18.4325	-	-
Regresión	1	157.3770	157.3770	3100.2980	>7.31	Si
Tratamientos	7	160.9242	22.9892	452.8826	-	-
Filas	7	0.9712	0.1387	2.7333	-	-
Columnas	7	0.9880	0.1411	2.7784	-	-
Error Residual	42	2.1320	0.0508		-	-
Total	63	325.1994	181.6325	3577.1248	-	-

3.5- Concentración 1.9 mcg/ml de Cianocobalamina (152%)

Lecturas en mm

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
F1	28.48	28.62	23.92	25.55	25.49	28.54	25.27	27.94
F2	25.29	24.14	27.95	25.55	28.49	25.34	28.49	28.03
F3	25.33	25.71	28.56	27.48	28.35	28.18	25.80	24.34
F4	28.71	28.36	25.60	28.47	24.25	25.60	28.02	25.86
F5	25.32	28.12	28.56	25.56	25.67	27.89	24.33	28.52
F6	28.68	25.69	25.69	28.50	27.96	24.42	28.52	25.53
F7	27.68	25.71	28.40	24.13	28.23	28.08	25.65	25.59
F8	24.51	27.72	25.59	28.43	25.85	25.74	28.73	28.58

Tabla de validez

Tipos de variación	GL	\sum de cuadrados	Cuadros Promedio	Factor (F)	Condición	Validez Si/No
Preparaciones	3	11.3292	3.7764	459.9900	-	-
Regresión	1	147.7136	147.7136	17796.81	>7.31	Si
Tratamientos	7	160.8200	22.9457	2764.5400	-	-
Filas	7	2.7400	0.3914	47.1600	-	-
Columnas	7	1.1853	0.1693	20.3976	-	-
Error Residual	42	0.3488	0.0083		-	-
Total	63	323.6230	175.0047	21088.90	-	-

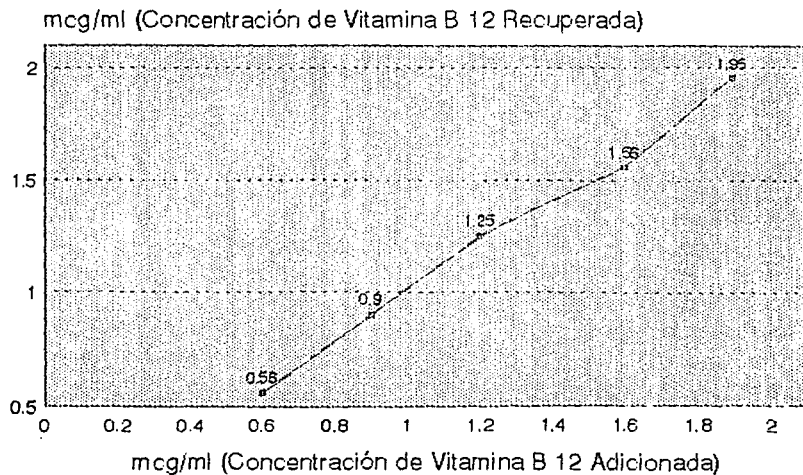
CUADRO DE RESULTADOS DE LA EXACTITUD DEL METODO

Concentración Adicionada de Cianocobalamina mcg/ml	Concentración Recuperada de Cianocobalamina mcg/ml					
	C1	C2	C3	\bar{x}	DS	%CV
0.6	0.5718	0.5455	0.5679	0.5617	0.0142	2.5280
0.9	0.9115	0.8996	0.8952	0.9021	0.0084	0.9312
1.25	1.2494	1.2489	1.2517	1.2500	0.0015	0.1200
1.6	1.5660	1.5035	1.5772	1.5489	0.0397	2.5631
1.9	1.9664	1.9457	1.9483	1.9535	0.0113	0.5784
r	0.9981	0.9952	0.9992			
b	-0.0492	-0.0575	-0.0547			
m	1.0418	1.0289	1.0422			

- 1.- Coeficiente de correlación (r) = 0.99
- 2.- Pendiente (m) = 1
- 3.- Intercepto (b) = 0
- 4.- Coeficiente de variación (CV) < 5%

EXACTITUD DEL METODO

CURVA DE LOS RESULTADOS DE LA EXACTITUD DEL METODO
CONCENTRACION DE VITAMINA B 12



PROMEDIO DE TRES ENSAYOS

-□- Placebos Adicionados

4.1 REPETIBILIDAD DEL METODO

Datos obtenidos para la determinación de la Repetibilidad del Método para la concentración de 1.25 mcg/ml de Cianocobalamina, analizada en determinaciones independientes.

1er. Análisis

Lecturas en mm

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
F1	24.69	28.44	27.84	25.04	27.97	27.81	24.46	24.77
F2	28.09	25.15	27.95	24.61	27.84	24.97	25.09	28.57
F3	24.81	24.90	24.92	24.74	28.21	27.48	28.26	27.69
F4	25.02	28.35	28.86	28.32	25.59	24.65	27.92	24.58
F5	28.19	28.40	24.79	28.00	25.05	24.66	24.88	27.69
F6	27.83	24.58	28.37	27.70	24.87	24.92	28.50	25.04
F7	24.43	28.37	24.99	24.96	28.21	27.28	24.69	28.00
F8	27.72	25.21	24.94	28.23	24.55	27.81	28.16	24.73

Tabla de validez

Tipos de variación	GL	\sum de cuadrados	Cuadros Promedio	Factor (F)	Condición	Validez Si/No
Preparaciones	3	0.2428	0.0809	1.618	-	-
Regresión	1	165.0582	165.0582	3301.165	> 7.31	Si
Tratamientos	7	166.594	23.7991	475.982	-	-
Filas	7	0.564	0.0806	1.612	-	-
Columnas	7	1.245	0.1779	3.558	-	-
Error Residual	42	2.1	0.05		-	-
Total	63	335.804	189.2467	3783.9350	-	-

4.1- 2do. Análisis

Lecturas en mm

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
F1	13.67	17.31	17.21	13.32	17.31	17.21	13.33	13.67
F2	17.18	13.11	17.55	13.57	17.55	13.57	13.11	17.18
F3	13.40	13.32	13.40	13.32	17.00	17.80	17.80	17.00
F4	13.67	17.24	17.00	17.24	13.42	13.67	17.00	13.42
F5	17.15	17.30	12.24	16.90	12.24	13.50	13.50	17.30
F6	17.21	13.90	17.13	17.12	13.30	13.30	17.13	17.90
F7	13.47	16.93	13.47	13.50	17.30	16.93	13.50	17.30
F8	17.19	13.33	13.15	17.30	13.33	17.30	17.19	13.15

Tabla de validez

Tipos de variación	GL	\sum de cuadrados	Cuadros Promedio	Factor (F)	Condición	Validez Si/No
Preparaciones	3	0.0020	0.0006	0.0104	-	-
Regresión	1	238.4322	238.4322	4153.8711	>7.31	Si
Tratamientos	7	239.3510	34.1930	595.6969	-	-
Filas	7	1.4564	0.2080	3.6237	-	-
Columnas	7	1.0968	0.1567	2.7300	-	-
Error Residual	42	2.4128	0.0574		-	-
Total	63	482.7512	273.0479	4751.9188	-	-

CUADRO DE RESULTADOS DE LA REPETIBILIDAD DEL METODO

	Concentración adicionada de Cianocobalamina (mcg/ml)	Concentración recuperada de Cianocobalamina (mcg/ml)
1er. Análisis	1.25	1.2494
	1.25	1.2489
	1.25	1.2517
2do. Análisis	1.25	1.2202
	1.25	1.3140
	1.25	1.2710
	\bar{x}	1.2592
	DS	0.0314
	%CV	2.4936

4.2- REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Datos obtenidos en el análisis de Vitamina B12 a la concentración 1.25 mcg/ml, utilizando el método de forma independiente, dos analistas y en días diferentes.

4.2.1- 1er Analista.

1er. Analisis

Lecturas en mm

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
F1	23.63	26.90	26.99	27.17	23.81	27.16	23.57	24.00
F2	23.74	27.07	24.00	26.95	23.99	27.01	26.59	23.90
F3	26.91	23.81	26.97	23.95	23.54	23.29	26.93	27.19
F4	23.65	26.99	23.59	23.55	27.00	23.55	26.76	27.16
F5	23.88	23.62	26.76	23.75	26.70	26.83	23.83	27.03
F6	27.10	23.68	26.86	27.07	23.61	26.91	23.83	24.01
F7	26.97	27.00	23.82	23.54	26.87	23.64	26.84	23.30
F8	27.05	23.49	23.67	26.88	26.68	23.52	23.59	26.72

Tabla de validez

Tipos de variación	GL	de cuadrados	Cuadros Promedio	Factor (F)	Condición	Validez Si/No
Preparaciones	3	0.0564	0.0188	0.6643	-	-
Regresión	1	167.9292	167.9292	5933.8900	>7.31	Si
Tratamientos	7	168.0594	24.0085	848.3569	-	-
Filas	7	0.3170	0.0453	1.6007	-	-
Columnas	7	0.2170	0.0310	1.0954	-	-
Error Residual	42	1.1685	0.0283		-	-
Total	63	337.7675	192.0611	6785.6073	-	-

4.2.1 – 1er. Analista.

2do. Análisis

Lecturas en mm

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
F1	25.06	22.50	23.33	25.06	25.08	25.16	22.53	22.52
F2	24.97	22.54	22.45	25.13	22.45	25.13	22.45	22.40
F3	25.20	22.73	25.08	25.10	22.51	25.14	22.65	22.74
F4	22.63	25.16	22.52	22.97	24.91	22.63	25.00	25.18
F5	22.32	25.08	22.35	22.01	25.05	22.57	25.07	25.19
F6	24.80	22.63	25.01	22.12	22.59	22.74	25.16	24.90
F7	22.57	25.08	25.26	24.90	22.61	22.54	22.70	25.20
F8	22.57	24.90	25.09	22.35	25.05	25.21	22.51	22.23

Tabla de validez

Tipos de variación	GL	Σ de cuadrados	Cuadros Promedio	Factor (F)	Condicion	Validez Si/No
Preparaciones	3	0.0540	0.0180	0.8451	-	-
Regresion	1	105.2933	105.2933	4943.3500	≥ 7.31	Si
Tratamientos	7	105.4300	15.0614	707.1100	-	-
Filas	7	0.2600	0.0384	1.8020	-	-
Columnas	7	0.2013	0.0298	1.3498	-	-
Error Residual	42	0.8925	0.0213		-	-
Total	53	212.1312	120.4612	5854.4577	-	-

4.2.2- 2do. Analista.

1er. Análisis

Lecturas en mm

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
F1	22.65	25.74	25.31	22.50	22.30	25.99	22.25	25.60
F2	22.64	22.59	22.63	25.62	26.00	25.48	26.10	22.60
F3	22.70	25.82	22.50	25.78	25.51	23.00	25.75	22.30
F4	25.34	22.95	25.50	22.78	22.54	25.24	22.33	25.45
F5	25.78	25.65	25.56	25.59	22.55	22.45	22.51	22.67
F6	25.55	22.46	22.20	22.49	25.46	25.45	22.66	25.64
F7	25.69	25.92	22.43	23.00	25.50	22.62	25.60	22.81
F8	22.45	22.39	25.48	25.37	22.75	22.15	25.40	25.71

Tabla de validez

Tipos de variación	GL	Σ de cuadrados	Cuadros Promedio	Factor (F)	Condicion	Validez Si/No
Preparaciones	3	0.1910	0.0637	1.6005	-	-
Regresion	1	149.5423	149.5423	3757.3442	> 7.31	Si
Tratamientos	7	149.8260	21.4037	537.7814	-	-
Filas	7	0.5360	0.0766	1.9246	-	-
Columnas	7	0.2710	0.0387	0.9724	-	-
Error Residual	42	1.6707	0.0398	-	-	-
Total	63	302.0370	171.1648	4299.6231	-	-

4.2.2- 2do. Analista.

2do. Análisis

Lecturas en mm

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
F1	21.33	21.16	24.13	21.08	0.00	23.93	20.93	23.92
F2	24.11	21.35	24.03	20.48	24.28	21.11	23.92	21.02
F3	23.93	21.27	21.32	21.05	21.15	21.83	23.77	23.89
F4	21.75	21.44	24.26	23.50	20.76	24.20	23.97	21.50
F5	21.92	23.79	21.87	20.99	23.56	23.71	24.02	20.92
F6	24.17	24.07	20.74	23.89	23.78	21.39	20.67	20.90
F7	20.94	24.28	24.05	23.86	21.27	20.69	21.52	24.01
F8	24.50	23.46	21.22	24.01	21.15	21.28	21.08	23.99

Tabla de validez

Tiempo de variación	GL	\sum de cuadros	Cuadros Promedio	Factor (F)	Condición	Validez Si/No
Preparaciones	3	0.3320	0.1107	1.4013	-	-
Regresión	1	125.5000	125.5000	1588.6100	>7.31	Si
Tratamientos	7	125.8700	17.9814	227.6100	-	-
Filas	7	0.2213	0.0316	0.4000	-	-
Columnas	7	1.1900	0.1700	2.1519	-	-
Error Residual	42	3.3200	0.0790		-	-
Total	63	256.4333	143.8727	1820.1732	-	-

CUADRO DE RESULTADOS DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

		Concentración adicionada de Cianocobalamina (mcg/ml)	Concentración recuperada de Cianocobalamina (mcg/ml)
Resultados del	1er. Análisis	1.25	1.3000
		1.25	1.2859
		1.25	1.2831
1er. Analista.	2do. Análisis	1.25	1.2579
		1.25	1.2435
		1.25	1.2986
Resultados del	1er. Análisis	1.25	1.3419
		1.25	1.2936
		1.25	1.3409
2do. Analista.	2do. Análisis	1.25	1.1574
		1.25	1.1996
		1.25	1.2644
		\bar{x}	1.2722
		DS	0.0534
		%CV	4.1974

5.- LIMITE DE DETECCION

De acuerdo al análisis realizado a las concentraciones de Cianocobalamina, se obtuvo lo siguiente:

Concentración de Cianocobalamina mcg/ml	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> SI/No
0.015	SI
0.01	SI
0.005	SI
0.002	No

CAPITULO VI:

DISCUSION DE RESULTADOS

1.- ESPECIFICIDAD

Los resultados que se obtuvieron, al observarse unicamente crecimiento de la Escherichia coli en presencia de Vitamina B12 nos permite concluir que: El método es Especifico, ya que solo se obtiene respuesta en presencia de la Vitamina B12 y que al analizar el placebo no se observa interferencia de las sustancias que lo componen.

2.- LINEARIDAD

Se obtuvo un coeficiente de correlación (r) = 0.9910, siendo el criterio de aceptación de (r) = 0.99, por lo que se concluye: El Método es Lineal, ya que se cumple satisfactoriamente con el criterio de aceptación.

3.- EXACTITUD

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir: El Método es Exacto, ya que cumple con el criterio de aceptación, se tiene una relación proporcional entre la Cianocobalamina adicionada y la recuperada, teniendo una pendiente (m) = 1, un intercepto (b) = 0, y un coeficiente de variación entre la cianocobalamina recuperada de cada concentración en un porcentaje menor del establecido (CV) 5%

4.- PRECISION

4.1 REPETIBILIDAD

El coeficiente de variación de los resultados de los dos análisis, es menor del 5% cumpliendo con el criterio de aceptación que establece (CV) 5%. por lo tanto se concluye: El Método es Repetible - al analizar a la Cianocobalamina a una concentración de 1.25 mcg/ml.

4.2 REPRODUCIBILIDAD

El coeficiente de variación de los resultados de los dos analistas es menor del 5%, cumpliendo con el criterio de aceptación que establece (CV) 5%. por lo tanto se concluye: El Método es Reproducible, ya que no hay diferencia significativa en los resultados obtenidos por diferentes analistas y en diferentes días, los cuales no tienen efecto importante en la dispersión de datos.

5.- LIMITE DE DETECCION

De acuerdo a los resultados, en la concentración de 0.002 mcg/ml de Cianocobalamina ya no se observó crecimiento de Escherichia coli, por lo tanto: El Limite de Detección del Método es a 0.005 - mcg/ml de Cianocobalamina, en la que se observa el crecimiento del Microorganismo, y en donde ya no es posible cuantificar a la Vitamina B12 .

CAPITULO VIII:

RECOMENDACIONES

LAS SIGUIENTES RECOMENDACIONES SON DE ACUERDO A LO QUE SE DEBE CONSIDERAR EN LO PRACTICO.

1.- Es importante señalar que en el trabajo realizado en microbiología, el analista debe observar lo siguiente:

El comportamiento no uniforme o el que no crezca el microorganismo, son un ejemplo en donde el analista debe ir considerando conforme a la práctica, los puntos críticos del Método, de los cuales algunos fueron identificados y se mencionan en el Anexo 2.

2.- Para una mayor visibilidad y que las lecturas sean lo mas exactas posibles, se debe tener fondo blanco debajo de la caja, para la medición de los halos de crecimiento.

3.- Realizar el análisis estadístico de las lecturas obtenidas en un paquete programado en computadora, para tener con mayor rapidez los resultados.

4.- No se recomienda llevar a cabo el Método de análisis de Vitamina B12 por cuadrado latino 8x8 en cualquier producto polivitamínico, si no se realiza una previa verificación de este.

CAPITULO IX

CONCLUSIONES

Como se observa en lo realizado en la Implementación y en los resultados obtenidos en la Validación del Método, para la Valoración de Vitamina B12 utilizando el diseño de Cuadrado Latino 8x8 en un Jarabe Polivitaminico, los resultados son confiables al comprobar:

- 1.- El método es Especifico, hay unicamente crecimiento de Escheria chia coli en presencia de Vitamina B12.
- 2.- El método es Lineal, tiene un coeficiente de correlación $(r) = 0.9910$.
- 3.- El método es Exacto, tiene una pendiente $(m) = 1$, un intercepto $(b) = 0$, y un coeficiente de variación (CV) 5%.
- 4.- El método es Preciso: en la Repetibilidad, el coeficiente de variación (CV) 5% en los análisis realizados a la Cianocobalamina en 1.25 mcg/ml, en la Reproducibilidad el coeficiente de variación (CV) 5% en los resultados obtenidos de los dos analistas.
- 5.- El Limite de Detección del método es a 0.005 mcg/ml de Cianocobalamina.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bohinski Roberto C.. Bioquímica. versión en español de la 2oa ed. en inglés. Fondo Educativo Interamericano. México. 1986. Págs. 536.537.
- 2.- Litter Manuel, Farmacología Experimental y Clínica. 7a. ed. - El Ateneo. Argentina. 1986. Págs. 1250.1251.1255.
- 3.- Farmacopea Mexicana, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 5a. ed.. 1988. Págs. 759
- 4.- Remington, Farmacia 1 y 2, 17a ed., Editorial Medica Panamericana. México. 1987, Págs. 757-759, 1394,1395. 1397.
- 5.- Jawetz Ernest, Microbiología Aspectos Fundamentales. Manual - de Microbiología Medica. 5a. ed.. México. 1973. Pág. 236.
- 6.- Bernard D. Davis M.D.. Tratado de Microbiología, 2da. Edición Medical Department Harper & Row Publishers. Pág. 787.
- 7.- D. Lundrigan Michael and J. Kadner Robert. Altered Cobalamin Metabolism en Escherichia coli btuR Mutants Affects btuB Gene Regulation, Journal of Bacteriology, Jan. 1989, Págs.158,159.
- 8.- Método Microbiológico por difusión en placa, empleando el Diseño por Cuadrado Latino para determinar Vitamina B12, MC0081 pertenece a Abbott Laboratories de México.

- 9.- Steel G., D y Torrie Robert. H. James. Bioestadística Principios y Procedimientos. Mc Graw Hill. México. 1985.
- 10.- Requisitos mínimos para la Validación de Métodos Analíticos.- elaborado por el Colegio Nacional de G.F.B. México. A.C.
- 11.- Farmacopea Europea. Análisis Estadístico de resultados de Ensayos Biológicos. 1971. Vol. II. Pág. 441.

CAPITULO X

ANEXOS DEL PLANTEAMIENTO DEL METODO MICROBIOLOGICO

ANEXO 1

PREPARACION DE REACTIVOS Y MEDIOS BACTERIOLOGICOS

4.1- Stock del Medio de cultivo con agar

Preparar 10 ml para cada tubo

Cloruro de sodio	0.05 g
Extracto de carne	0.05 g
Bacto peptona	0.1 g
Agar bacteriológico	0.2 g
Agua destilada	10 ml

4.2.1- Solución A (Medio de agar para el ensayo)

Agar bacteriológico	5.4 g
Agua destilada	150 ml
Solución C	2 ml

4.2.2- Solución B (Solución de reactivos)

Ortofosfato de potasio dihidrógeno	0.6 g
Ortofosfato de dipotasio de hidrógeno	1.4 g
Citrato trisódico anhidratado	0.1 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.02 g
Sulfato de amonio	0.2 g
Agua destilada	100 ml

Solución de cloruro de 2,3,5, tri-

feniltetrazolium 2 ml

4.2.3- Solución C (Solución de glucosa)

Glucosa 0.6 g

Aqua destilada 2 ml

4.3- Medio de Crecimiento

Preparar 10 ml para cada tubo

Extracto de carne 0.05 g

Bacto peptona 0.1 g

Cloruro de sodio 0.05 g

Aqua destilada 10 ml

Esterilizar todas las preparaciones anteriores 15 minutos a 121 C.

4.5- Solución de cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolium

2,3,4 trifeniltetrazolium 0.04 g

Aqua destilada 2 ml

Esterilizar 5 minutos a 121 C. colocar en lugar obscuro y a 4 C.

4.6- Solución extractora

Ortofosfato disódico hidrógeno 6.45 g

Metabisulfito de sodio 5.0 g

Acido cítrico anhidro 5.5 g

ANEXO 2

PREPARAR PLACAS DE ENSAYO

5.1.1- Utilizar un tubo de cultivo con microorganismos, para dos tubos de medio de crecimiento (dos análisis).

5.2.2- Al preparar la solución A con anterioridad al día del ensayo debe estar contenida en un matraz de mucho mayor capacidad de 250 ml. para un deslizamiento mayor del agar en la agitación constante al estar derritiendola. de lo contrario el agar se quema y hay merma.

5.2.2- Mantener la temperatura arriba de 50 C de la solución A antes de ocuparse. Al mezclar las soluciones A Y B la temperatura puede disminuir por debajo de 50 C.

5.2.3- Realizar la mezcla del medio de ensayo con el inóculo con una temperatura de 35 C a 40 C adecuada para el microorganismo, mezclar y vaciar con rapidez ya que a esta temperatura el medio tiende fácilmente a solidificarse.

ANEXO 3

FORMULAS PARA CALCULAR LA CANTIDAD DE MUESTRA

6.2.3- Calcular:

$$\text{Especificación, mcg/ml} = \frac{\text{especificación mcg/unidad-dosis}}{\text{ml} \times \text{cada unidad de dosis}}$$

$$\text{Especificación, mcg/g} = \frac{\text{especificación, mcg/ml}}{\text{densidad, g/ml}}$$

$$q = \frac{20 \text{ mcg de cianocobalamina}}{\text{especificación, mcg/g}} \times \frac{100}{100}$$

ANEXO 4

EJEMPLOS DE TABLAS DE CUADRADO LATINO

Tabla 1

	C	O	L	U	M	N	A	S
	8	5	7	3	4	1	2	6
F	5	7	6	1	2	4	3	8
I	1	8	4	7	6	3	5	2
L	4	3	8	6	5	2	1	7
A	6	2	5	4	1	8	7	3
S	7	6	3	2	8	5	4	1
	3	1	2	5	7	6	8	4
	2	4	1	8	3	7	6	5

Tabla 2

	C	O	L	U	M	N	A	S
	7	2	1	6	8	5	3	4
F	3	8	4	5	6	1	7	2
I	8	6	5	1	7	4	2	3
L	6	5	2	8	1	3	4	7
A	5	1	3	2	4	7	8	6
S	4	3	8	7	2	6	1	6
	1	4	7	3	5	2	6	8
	2	7	6	4	3	8	5	1

Tabla 3

	C	O	L	U	M	N	A	S
	3	5	2	8	4	7	6	1
F	8	2	1	4	3	6	5	7
I	6	4	7	1	5	3	8	2
L	7	3	6	5	2	8	1	4
A	4	7	5	6	8	1	2	3
S	5	8	4	7	1	2	3	6
	1	6	3	2	7	5	4	8
	2	1	8	3	6	4	7	5

Tabla 4

	C	O	L	U	M	N	A	S
	2	8	7	1	3	4	6	5
F	4	5	3	6	1	7	8	2
I	3	4	6	2	8	5	1	7
L	8	3	2	7	6	1	5	4
A	1	2	8	4	5	3	7	6
S	5	6	4	3	7	8	2	1
	7	1	5	8	2	6	4	3
	6	7	1	5	4	2	3	8

ANEXO 5

LAS TABLAS

Tabla 1

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	Total Filas	Total elevado al cuadrado
F1									$\Sigma F1$	$\Sigma F1^2$
F2									$\Sigma F2$	$\Sigma F2^2$
F3									$\Sigma F3$	$\Sigma F3^2$
F4									$\Sigma F4$	$\Sigma F4^2$
F5									$\Sigma F5$	$\Sigma F5^2$
F6									$\Sigma F6$	$\Sigma F6^2$
F7									$\Sigma F7$	$\Sigma F7^2$
F8									$\Sigma F8$	$\Sigma F8^2$

Total Filas	Total elevado al cuadrado	Total Filas	Total elevado al cuadrado	Sumatoria del Total elevado al cuadrado de Filas y Columnas
$\Sigma C1$	$\Sigma C1^2$	$\Sigma C5$	$\Sigma C5^2$	$F1^2 + \dots + F8^2 (\Sigma F^2)$ n
$\Sigma C2$	$\Sigma C2^2$	$\Sigma C6$	$\Sigma C6^2$	
$\Sigma C3$	$\Sigma C3^2$	$\Sigma C7$	$\Sigma C7^2$	$C1^2 + \dots + C8^2 (\Sigma C^2)$ n
$\Sigma C4$	$\Sigma C4^2$	$\Sigma C8$	$\Sigma C8^2$	

Tabla 2.0

Filas	S 0.05 mcg/ml B		S 0.2 mcg/ml A	
	Respuesta		Respuesta	
	Y	Y ²	Y	Y ²
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
Total	S1	S3	S2	S4

Estadísticas

1	$S = S1 + S2 = (y_s)$
2	$L_s = S2 - S1$
3	$\sum (y_s)^2 = S3 + S4$
4	$S1^2 + S2^2$
5	$\bar{y}_s = S/16$

Tabla 2.1

Filas	U 0.05 mcg/ml B		U 0.2 mcg/ml A	
	Respuesta		Respuesta	
	Y	2 Y	Y	2 Y
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
Total	U1	U3	U2	U4

Estadísticas

1	$U = U1 + U2 = \sum (y_u)$
2	$Lu = U2 - U1$
3	$\sum (y_u) = U3 + U4$
4	$U1 + U2$
5	$\bar{y}_u = U/16$

Tabla 2.2

	V 0.05 B mcg/ml		V 0.2 A mcg/ml	
	Respuesta		Respuesta	
Filas	Y	Y ²	Y	Y ²
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
Total	V1	V3	V2	V4

Estadísticas

1	$V = V1 + V2 = \sum(yv)$
2	$Lv = V2 - V1$
3	$\sum(yv)^2 = V3 + V4$
4	$V1 + V2$
5	$\bar{yv} = V/16$

Tabla 2.3

	W 0.05 B	mcg/ml	W 0.2 A	mcg/ml
	Respuesta		Respuesta	
Filas	Y	² Y	Y	² Y
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
Total	W1	W3	W2	W4

Estadísticas

1	$W = W1 + W2 = \sum(yw)$
2	$Lw = W2 - W1$
3	$\sum_{2}^{2} (yw) = W3 + W4$
4	$\frac{W1 + W2}{2} = \bar{y}$
5	$\bar{yw} = W/16$

ANALISIS DE VARIANZA

8.3.1- Corrección del termino (K)

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N}$$

$y = S + U + V + W$ de las tablas 2.0, 2.1, 2.2, 2.3

$N =$ número de respuesta = 64

8.3.2- Preparaciones

Grados de libertad (f) = $h - 1$ $f = 3$

$h = 4$ preparaciones

$$\text{Suma de cuadrados (RSS)} = \frac{S^2 + U^2 + V^2 + W^2}{2n} - K$$

$n = 8$ repeticiones

8.3.3- Regresión

Grados de libertad (f) = 1

$$\text{Suma de cuadrados (RSS)} = \frac{(L_s + L_u + L_v + L_w)^2}{2nh} = E$$

Donde L_s, L_u, L_v, L_w de las tablas 2.0, 2.1, 2.2, 2.3

$n = 8$ repeticiones

$h = 4$ preparaciones

8.3.4- Total de todas las respuestas

Grados de libertad (f) = $N - 1$ $f = 63$

$N = 64$ respuestas

$$\text{Suma de cuadrados (RSS)} = \frac{v^2}{v} - K$$

Donde k ha estado calculado en 8.3.1 y

$$y = (vs)^2 + (vu)^2 + (yv)^2 + (yw)^2$$

de las tablas 2.0, 2.1, 2.2, 2.3

8.3.5- Tratamientos

$$\text{Grados de libertad (f)} = k - 1 \quad f = 7$$

$$k = d \cdot n$$

$$= 2 \text{ dosis} \times 4 \text{ preparaciones}$$

Suma de cuadrados (RSS) =

$$\frac{S_1^2 + S_2^2 + U_1^2 + U_2^2 + V_1^2 + V_2^2 + W_1^2 + W_2^2}{n} - k$$

$$n = 8 \text{ repeticiones}$$

Donde en las tablas 2.0 a la 2.3 es calculado así:

$$S_1^2 + S_2^2 \quad U_1^2 + U_2^2 \quad V_1^2 + V_2^2 \quad W_1^2 + W_2^2$$

8.3.6- Filas

$$\text{Grados de libertad (f)} = r - 1 \quad f = 7$$

$$r = 8 \text{ filas}$$

$$\text{Suma de cuadrados (RSS)} = \frac{F_1^2 + F_2^2 + \dots + F_8^2}{8} - k$$

Donde F_n ha estado calculado en la tabla 1.

8.3.7- Columnas

$$\text{Grados de libertad (f)} = c - 1 \quad f = 7$$

$$c = 8 \text{ columnas}$$

$$\text{Suma de cuadrados (RSS)} = \frac{C_1^2 + C_2^2 + \dots + C_B^2}{B} - n$$

Donde C_n ha estado calculado en la tabla 1

8.3.8- Error Residual

Para ambos suma de cuadrados (RSS) y grados de libertad.

$$f = 42$$

$$\text{Residual} = \text{Total} - (\text{Tratamientos} + \text{Filas} + \text{Columnas})$$

8.3.4 8.3.5 8.3.6 8.3.7

8.3.9- Prueba de validez del ensayo

8.3.9.1 Coefficiente F, Probabilidad y Valor Estadístico de los resultados.

$$\text{Coefficiente F} = \frac{\text{Cuadrados promedio}}{\text{Error residual del Cuadrado Promedio}} \cdot \frac{2}{(s)}$$

Donde el cuadrado promedio = $\frac{\text{suma de cuadrados}}{\text{Grados de libertad}}$

El ensayo es válido estadísticamente si el coeficiente F para la regresión de términos es tan alta ó más que 7.31.

8.3.9.2- Tabla de validez

Tipos de variación	GL	de cuadrados	Cuadrados Promedio	Factor (F)	Condición	Validez Si/No
Preparaciones	3				-	-
Regresión	1				7.31	-
Tratamientos	7				-	-
Filas	7				-	-
Columnas	7				-	-

Tipos de variación	GL	\sum de cuadrados	Cuadrados Promedio	Factor (F)	Condición	Validez Si/No
Error residual	42		(s ²)		-	-
Total	63				-	-

NOTA: Si F por Columnas ó Filas es significativo (2.25) y el ensayo tiene un gran error, entonces el medio no se distribuyo de manera uniforme, se debe checar la nivelación y el vaciado en las placas. En un ensayo con error residual muy alto, una F altamente significativa en las preparaciones puede indicar que la potencia asumida no es buena.

ANEXO 7

COEFICIENTE DE POTENCIA DE LAS MUESTRAS

8.4.1- Decremento Común (b)

$$b = \frac{L_s + L_u + L_v + L_w}{Inh}$$

Donde L_s , L_u , L_v , L_w de las Tablas 2.0, 2.1, 2.2, 2.3

$Inh = 19.2672$

8.4.2- Prueba de Preparación U

8.4.2.1- Logaritmo del coeficiente de potencia para U

El logaritmo del coeficiente de potencia M_u

$$M_u = \frac{\bar{y}_u - \bar{y}_s}{b}$$

Seleccione \bar{y}_u de la tabla 2.1

Seleccione \bar{y}_s de la tabla 2.0

Seleccione b de la sección 8.4.1

8.4.3 Prueba de Preparación V

8.4.3.1- Logaritmo del coeficiente de potencia para V

El logaritmo del coeficiente de potencia M_v

$$M_v = \frac{\bar{y}_v - \bar{y}_s}{b}$$

Seleccione \bar{y}_v de la tabla 2.2

Seleccione \bar{y}_s de la tabla 2.0

Seleccione b de la sección 8.4.1

8.4.4- Prueba de Preparación w

8.4.4.1- Logaritmo del coeficiente de potencia para w

El logaritmo del coeficiente de potencia Mw

$$Mw = \frac{\bar{y}_w - \bar{y}_s}{b}$$

Seleccione \bar{y}_w de la tabla 2.3

Seleccione \bar{y}_s de la tabla 2.0

Seleccione b de la sección 8.4.1

ANEXO 8

FORMULAS PARA CALCULAR RESULTADOS

8.5.1- Reporte de los resultados

$$\text{Cianocobalamina, mcg/g} = \frac{20}{g} \times \text{antilog Mu, Mv, Mw}$$

8.5.2- Productos Liquidos especificados en unidad de dosis

$$\text{Cianocobalamina, mcg/ml} = \frac{\text{Cianocobalamina}}{\text{mcg/g}} \times \frac{\text{densidad}}{\text{g/ml}}$$

$$\text{Cianocobalamina, mcg/ unidad de dosis}$$

$$= \text{Cianocobalamina mcg/ ml} \times \text{ml en cada unidad de dosis}$$

% de la cantidad marcada

$$= \frac{\text{Cianocobalamina mcg/ unidad de dosis}}{\text{Especificación, mcg/ unidad de dosis}} \times 100$$