



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGÍA

TÍTULO DEL TRABAJO:

“VALIDACION DE LA ADECUACIÓN DEL MÉTODO
FARMACOPEICO PARA LA VALORACION DEL
ANTIBIÓTICO NEOMICINA POR DIFUSION EN AGAR,
PARA ASEGURAR LA FIABILIDAD DE LOS RESULTADOS”

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA
MODALIDAD DE ESTANCIA INDUSTRIAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA FARMACEUTICA

PRESENTA:
BECERRA OLVERA WENDY JACQUELINE

DIRECTOR EXTERNO: Q.F.B. ROSA TRIANA JUÁREZ
DIRECTOR INTERNO: Q.B.P. MIRIAM JUÁREZ JUÁREZ
EVALUADOR 1: Q.F.B. MA. ESTHER BAUTISTA RAMÍREZ
EVALUADOR 2: DRA. CARMEN OLIVER SALVADOR

México, D.F. MAYO 2009



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



El jurado designado por el Comité de Proyecto Terminal, para la evaluación y seguimiento del (los) alumno (os) de la carrera de INGENIERÍA FARMACÉUTICA:

Nombre <u>Becerra Olvera Wendy</u>	Número de Boleta <u>2006620207</u>
<u>Jacqueline</u>	

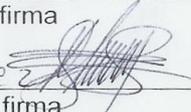
APRUEBAN Y DAN SU CONSENTIMIENTO, para la impresión como versión final del reporte del PROYECTO TERMINAL titulado:

"Validación de la adecuación del método farmacopéico para la valoración del antibiótico Neomicina por difusión en agar, para asegurar la fiabilidad de los resultados"

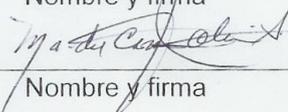
Proyecto que de cubrir los requisitos requeridos, permitirá la titulación de el (los) arriba sustentante (s) mediante la modalidad CURRICULAR, bajo la modalidad de:

Estancia Industrial

ASESOR EXTERNO (si procede): Q.F.B. Rosa Triana Juárez 
Nombre y firma

ASESOR INTERNO: Q.B.P. Miriam Juárez Juárez 
Nombre y firma

EVALUADOR 1: MARIA ESTHER DAUTISTA RAMIREZ 
Nombre y firma

EVALUADOR 2: MA CARMEN OLIVER SA 
Nombre y firma



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



México., D. F., a 31 de octubre de 2008.
Of. No. SA-UPIBI-1087/08

BECERRA OLVERA WENDY JACQUELINE.
7º SEMESTRE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA EN FARMACÉUTICA
Presente.

Comunico a usted, que como resultado de la evaluación del Comité de Proyecto Terminal, con esta fecha queda registrado su proyecto terminal en la modalidad de "ESTANCIA INDUSTRIAL" denominada "VALIDACIÓN DE LA ADECUACIÓN DEL MÉTODO FARMACOPÉICO PARA LA VALORACIÓN DEL ANTIBIÓTICO NEOMICINA, POR DIFUSIÓN EN AGAR, PARA ASEGURAR LA FIABILIDAD DE LOS RESULTADOS" bajo la dirección externa de La QFB. Rosa Triana Juárez, y la dirección interna de la QBP. Miriam Juárez Juárez.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, será acreditada la opción curricular de titulación. Asimismo me permito recordarle que el trabajo experimental deberá concluir en el octavo semestre y entregar el informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin establezca el Comité mencionado.

CONDICIONES

1. Permanecer en la misma opción y actividad en el Proyecto Terminal I, II, III.
2. Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto Terminal II y Proyecto Terminal III.
3. Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas.
4. Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura.

ATENTAMENTE.
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"



ING. YESICA MA. DOMÍNGUEZ GALICIA
SUBDIRECTORA ACADÉMICA

INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGÍA
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA

c.c.p. Departamento de Control Escolar.

México, D.F., a 13 de marzo del 2009.
RH/104/2009

LIC. LUZ ALICIA BALANDRA GARCÍA

Jefa de la Unidad Politécnica de
Integración Social.
Unidad profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.
Del Instituto Politécnico Nacional.
P R E S E N T E

Por este medio informo a Usted que la **C. WENDY JACQUELINE BECERRA OLVERA**, estudiante de la carrera de **INGENIERÍA FARMACÉUTICA**, ha concluido sus **Prácticas Profesionales** en esta Empresa, en el Departamento de Control de Calidad, en el periodo comprendido del 10 de marzo del 2008 al 13 de marzo del 2009, cubriendo un total de 919 hrs.

Por lo que no tenemos inconveniente en extender el presente a petición de la interesada, para los fines legales y administrativos que así convengan.

Sin más por el momento quedo a sus apreciables órdenes para cualquier duda o aclaración al respecto.

A T E N T A M E N T E



LIC. LOURDES SOFÍA MEJÍA LÓPEZ
Gerente de Recursos Humanos



RECIBIDO
UNIDAD POLITÉCNICA DE
INTEGRACION SOCIAL

- C.c.p. - Sr. Juan José Martínez Villela.- Director Administrativo
- QFB. Héctor Hugo Martínez.- Gerente de Control de Calidad y Desarrollo
- QFB. Imay Sepúlveda Toledo.- Jefe de Laboratorio de Análisis y Microbiología
- Expediente
- Consecutivo



“VALIDACION DE LA ADECUACIÓN DEL MÉTODO FARMACOPEICO PARA LA VALORACIÓN DEL ANTIBIÓTICO NEOMICINA, POR DIFUSIÓN EN AGAR, PARA ASEGURAR LA FIABILIDAD DE LOS RESULTADOS”



*Wendy Jacqueline Becerra Olvera, Rosa Triana Juárez, Novag Infancia S.A de C.V. Calz. de Tlalpan Núm. 3417 Col. Sta. Úrsula Coapa-Coyoacán 04650 México, D. F. Coyoacán, México, D.F., wendy_beol@hotmail.com

Área: Microbiología

Palabras clave: Validación, Potencia, Antibiótico, Neomicina, Difusión en agar

Introducción: Para la industria farmacéutica es de suma importancia contar con resultados fiables que demuestren que el producto final es de calidad. Los antibióticos son sustancias químicas producidas por ciertos microorganismos que en bajas concentraciones tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o matar otros microorganismos. Son metabolitos secundarios no esenciales que se sintetizan cuando el microorganismo productor está en fase estacionaria como la Neomicina que es un fármaco de la familia de los aminoglucósidos. Obtenido del *Streptomyces fradiae*. [1] La validación por su parte, se refiere a procesos establecidos, para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de las especificaciones o límites predeterminados. [2]

Metodología: La parte experimental se dividió en 2 etapas, la primera etapa fue la selección del microorganismo realizando una serie de potencias para la valoración del antibiótico con los microorganismos de prueba. La segunda etapa se realizó la validación de la adecuación según los parámetros de desempeño que debe cumplir el método a partir de una muestra tomada de un lote al azar. La Neomicina se va a analizar según la tabla 1 por medio de la Categoría I que nos ayuda a cuantificar el principio activo de interés [2]

Tabla 1: Parámetros de desempeño para una técnica o método.

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

* Puede requerirse dependiendo de la naturaleza del ensayo.

Resultados y Discusión:

Etapa 1: Selección del microorganismo de prueba

Se realizaron 3 potencias con los 2 microorganismos de prueba *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 bajo las mismas condiciones de trabajo. El número de lote a analizar es el 10938, las condiciones de trabajo fueron: Total de horas de incubación: 17h y Temperatura de incubación: 33.5°C-34.5°C. Se obtuvieron una serie de valores en la lectura con el medido de halos y se registraron para tratarlos. Se calculó el punto más alto y el punto más bajo de la curva tipo a partir de las diferentes concentraciones, calcular la pendiente y la ordenada a la origen, obteniendo así una línea de dosis respuesta determinando la valoración en porcentaje, teniendo en cuenta el punto más alto y el punto más bajo en la prueba realizada para así poder conocer la concentración de la muestra analizada interpolando su valor.

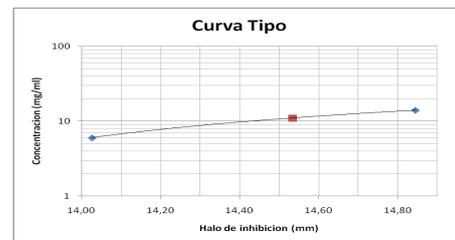


Figura 1.- Línea de dosis respuesta

Etapa 2: Validación de la valoración del antibiótico Neomicina, según los parámetros de desempeño.

La segunda etapa de la validación se determinó midiendo los parámetros de desempeño según la tabla 1, con el microorganismo seleccionado de la etapa 1 que es *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, a los datos obtenidos se les dio el tratamiento matemático indicado para poder obtener valores que nos aseguren que se obtuvieron los resultados que la validación debe cumplir con todos los criterios de aceptación de los parámetros de desempeño, dando así la certeza de que el método farmacopéico se pudo validar según las condiciones establecidas en el laboratorio de microbiología, para esta etapa se necesitó una muestra tomada al azar con número de lote 10919. [3]

Conclusiones y Perspectivas:

Es necesario validar los métodos o técnicas farmacopéicas dentro del laboratorio especificando los parámetros con los que cuenta dicho laboratorio.

Para los laboratorios de análisis microbiológico es importante desarrollar técnicas que produzcan fiabilidad de los resultados, lo cual se logra a través de la validación que implica la determinación y evaluación de los parámetros de desempeño establecidos para dichos métodos, ya que de esta forma se consigue emitir resultados exactos.

El *Staphylococcus aureus* es el mejor microorganismo para llevar a cabo la validación de la técnica según la FEUM MGA-100 para el laboratorio de microbiología.

Referencias:

- [1] Comisión Interinstitucional de prácticas adecuadas de manufactura México, 1992. Guía para el Control Microbiológico de Medicamentos. CIPAM. Páginas consultadas: 32-39
- [2] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2004. 8va. Edición. Páginas consultadas: 343-352. MGA. 0100.
- [3] Farmacopea de los Estados Unidos de América, Formulario Nacional. Compreendida de Normas Oficiales. 1992. Vol.1. Edición en Español. Editorial U.S. Pharmacopeia. Páginas consultadas: 111-117.
- [4] Pradeau Dominique, 1998. Análisis Químicos de los Farmacéuticos de Medicamentos. Primera Edición. México, D.F. Editorial Uteha Noriega Editores. Páginas consultadas: 112-141

DEDICATORIA A MIS PADRES:

*Después de 4 años de gran esfuerzo,
este trabajo es para ustedes, mis padres
a los que más amo en la vida. Este trabajo
es una muestra de la inmensa gratitud
por haber significado el motivo
más grande que necesitaba a lo largo
de mi carrera profesional y convertirse en mis
pilares cuando más los necesitaba.*

*Gracias PAPAS por enseñarme que la
superación y el éxito no tienen límite
ya que el esfuerzo es de todos.*

Wendy



AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer a dios por darme la dicha de ver culminado un sueño que siempre tuve en mente y la disposición para lograrlo, una meta en la cual mis padres me empezaron a guiar por el camino del éxito y a mí me tocó terminarlo con orgullo y satisfacción y por el cual siempre di lo mejor de mí,, ya que el mayor reto que aun falta es ser mejor día con día

A mis padres

Esas personas tan especiales que me apoyaron a lo largo de 4 años sin importar nada, padres este es un triunfo de los 3, ya que ustedes se convirtieron a lo largo de mi carrera en una parte muy esencial y en los cimientos de la persona que soy ahora. Quiero que sepan que los esfuerzos y sacrificios que ustedes han realizando se ven reflejados en una meta alcanzada, no me queda más que decir que soy orgullosamente politécnica gracias a ustedes. Lo que me ayudo a alcanzar esta meta fue su amor, su confianza, su apoyo, pero principalmente la fe que tenían en mí,, el siempre creer que yo podía alcanzar el éxito a pesar de las adversidades, por eso y más los amo, mejores padres que ustedes no puede haber en el mundo

A mi hermano

Alguien muy importante en mi vida, esa persona que siempre estuvo ahí cuando lo necesitaba, y que compartía mis desvelos, esfuerzos y triunfos, es la persona de la cual me siento orgullosa, Gracias Hermano porque junto con mis padres me brindaste el apoyo que necesitaba y tus palabras de aliento, me dieron una razón más para que esta meta alcanzada se culminara de la mejor forma.



A Mario

Parte importante de este logro, gracias por haberme apoyado durante los años de la carrera que estuvimos juntos, por estar ahí dándome palabras de aliento cuando ya no podía mas, siempre estaré agradecida por todo lo que hiciste por mí , por haberme aportado cosas buenas y apoyarme en todo lo que estuvo en tus manos, por haber depositado tu confianza en mí y hacerme sentir que este logro es lo mas importante de una persona y mas porque es con lo que siempre soñé.

A mis amigos

Esas personitas que siempre estuvieron a mí lado durante mi estancia en la escuela, ayudándonos mutuamente durante los años de estudio y que siempre a pesar de todo estuvieron ahí para apoyarme cuando más los necesite compartiendo desvelos y triunfos, gracias a las personas que en especial las considero mis mejores amigas, personas que siempre estuvieron ahí para darme una palabra de aliento y animarme cuando las cosas no estaban bien por levantarme cuando ya no podía por el exceso de trabajo gracia a ellas.

A mis profesores

Por ayudarme y darme el apoyo suficiente para llevar a cabo este sueño que es por lo que eh estado trabajando con tanto entusiasmo y fervor y por haberme enseñado todos los conocimientos que me sirvieron para seguir adelante

Como reconocimiento especial y de gratitud para las siguientes personas que contribuyeron en la realización de este trabajo, con su ayuda, sugerencias y críticas:

*DIRECTOR EXTERNO: Q.F.B. ROSA TRIANA JUÁREZ
DIRECTOR INTERNO: Q.B.P. MIRIAM JUÁREZ JUÁREZ
EVALUADOR 1: Q.F.B. MA. ESTHER BAUTISTA RAMÍREZ
EVALUADOR 2: DRA. CARMEN OLIVER SALVADOR*



A Rosa Triana Juárez

Por haberme brindado una oportunidad de desempeñarme profesionalmente dentro de la industria, estoy eternamente agradecida con ella por todo lo que me enseñó a lo largo de mis prácticas profesionales, ya que sus conocimientos y comentarios me ayudaron en gran cantidad a ser mejor profesionalista día con día, gracias por todos esos conocimientos compartidos y por tu dedicación en el proyecto así como la amistad que surgió.

Por último dar gracias al Instituto Politécnico Nacional, ya que a lo largo de mi vida he llevado los colores blancos y guinda, es especial a UPIBI es que mi segunda casa, mi alma mater y por darme el orgullo de decir “SOY ORGULLOSAMENTE POLITECNICA”

“La técnica al servicio de la patria”

WENDY JACQUELINE BECERRA OLVERA

INGENIERA FARMACEUTICA



ÍNDICE DE CONTENIDO

	PAGINA
1.- DATOS HISTORICOS DE LA EMPRESA	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Descripción técnica de la empresa	2
1.3. Administración de la Empresa.	2
1.4. Giro de la Empresa.	3
1.5. Organigrama de la Empresa.	4
1.6. Misión.	4
1.7. Visión.	4
1.8. Croquis de las instalaciones.	5
2.- INTRODUCCION	7
2.1. Definición de Antibióticos.	7
2.2.1. Pared celular.	7
2.2.2. Acción sobre los ribosomas.	7
2.2. Clasificación de los antibióticos.	8
2.3. Resistencia de los antibióticos.	9
2.4. Que es la Neomicina.	9
2.4.1. Absorción del Fármaco.	9
2.5. Generalidades de la Validación.	10
2.5.1. Definición de Validación.	10
2.5.2. Tipos de Validación.	11
2.5.2.1. Validación Prospectiva.	11
2.5.2.2. Validación Retrospectiva.	11
2.5.2.3. Validación Concurrente	11
2.5.2.4. Revalidación	12
2.5.3. Parámetros para la Validación de una Técnica o Método	12
2.5.3.1. Procedimientos que son Objeto de Validación.	12
2.5.3.1.1. Categoría I	12
2.5.3.1.2. Categoría II	12
2.5.3.1.3. Categoría III	13
2.5.3.1.4. Categoría IV	13
2.5.3.2. Exactitud.	14
2.5.3.3. Precisión.	14
2.5.3.3.1. Repetibilidad.	15
2.5.3.3.2. Reproducibilidad.	15
2.5.3.4. Especificidad	15
2.5.3.5. Linealidad.	16
2.5.3.6. Intervalo.	16
2.6. Valoración Microbiológica de los Antibióticos.	17
2.6.1. Método de difusión en agar.	17
3.- JUSTIFICACIÓN.	18
4.- OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general.	18
4.2. Objetivo particular.	19
5.- MATERIAL Y EQUIPO.	19
6.- METODOLOGÍA	19
6.1. Día 1	20



6.1.1. Solución Salina 1% estéril.	20
6.1.2. Solución Reguladora de Fosfatos de Potasio 0.1M pH 8.0 ± 0.2	20
6.1.3. Preparar Agar para Antibiótico Núm. 1. (A1A)	20
6.2. Día 2	21
6.2.1. Siembra de microorganismos	21
6.2.2. Incubación de Tubos	21
6.2.3. Preparar el material para llevar a cabo la potencia y esterilizarlo	21
6.5.4. Pesar estándar de referencia	21
6.3. Día 3	21
6.3.1. Resuspender crecimiento y volver a inocular	21
6.3.2. Preparación de la curva tipo.	21
6.3.2.1. Para <i>Staphylococcus aureus</i>	21
6.3.2.2. Para <i>Staphylococcus epidermidis</i>	22
6.3.3. Producto Terminado(Suspensión de Sulfato de Nemicina)	22
6.3.3.1. Para <i>Staphylococcus aureus</i>	22
6.3.3.2. Para <i>Staphylococcus epidermidis</i>	22
6.4. Día 4	23
6.4.1. Resuspender crecimiento	23
6.4.2. Aplicación del método de difusión en agar	23
6.4.2. Procedimiento de la técnica.	24
6.5. Día 5	24
6.5.1. Leer la potencia	24
6.5.2. Cálculos	24
6.5.3. Estimación de la potencia de la muestra	25
6.5.4. Validación de la técnica de Valoración de Antibiótico	25
7.- RESULTADOS	27
7.1. Etapa 1: Selección del microorganismo de prueba	27
7.1.1. Primera potencia.	27
7.1.1.1. Para <i>S. epidermidis</i>	27
7.1.1.2. Para <i>S. aureus</i>	28
7.1.2. Segunda potencia.	31
7.1.2.1. Para <i>S. epidermidis</i>	31
7.1.2.2. Para <i>S. aureus</i>	28
7.1.3. Tercera potencia.	35
7.1.3.1. Para <i>S. epidermidis</i>	35
7.1.3.2. Para <i>S. aureus</i>	37
7.2. Etapa 2: Validación de la valoración del antibiótico Neomicina.	35
8.- CAMBIOS REALIZADOS UNA VEZ REALIZADA LA VALIDACION	40
9.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
10.- CONCLUSIONES	45
11.- SUGERENCIAS PARA ESTANCIA FUTURAS	46
10.1. Para la empresa	47
10.2. Para los alumnos	47
12.- BIBLIOGRAFÍA	47
12.1. Libros o Textos Oficiales	47
12.2 Normas Oficiales	47
12.3. Electrónicas	47
13.- GLOSARIO	49



ÍNDICE DE TABLAS

	PAGINA
Tabla 1.-Gama de productos que ofrece la empresa.	3
Tabla 2.- Antibióticos aminoglucosidos	8
Tabla 3.- Parámetros de desempeño para la validación de una técnica o método.	13
Tabla 4.- Datos de la primera potencia con <i>S.epidermidis</i> (mm)	28
Tabla 5.- Datos de la potencia con <i>S. epidermidis</i>	28
Tabla 6.- Punto bajo y alto de la curva tipo para <i>S. epidermidis</i> (mm)	28
Tabla 7.- Valores de la pendiente y ordenada a la origen	29
Tabla 8.-Valores de la valoración del antibiótico Neomicina	29
Tabla 9.- Datos de la primera potencia con <i>S.aureus</i> (mm)	A-2
Tabla 10.- Datos de la potencia con <i>S. aureus</i>	A-2
Tabla 11.- Punto bajo y alto de la curva tipo para <i>S. aureus</i>	30
Tabla 12.- Valores de la pendiente y ordenada a la origen	30
Tabla 13.-Valores de la valoración del antibiótico Neomicina	30
Tabla 14.- Datos de la segunda potencia con <i>S.epidermidis</i> (mm)	A-2
Tabla 15.- Datos de la potencia con <i>S. epidermidis</i>	A-2
Tabla 16.- Punto bajo y alto de la curva tipo para <i>S. epidermidis</i>	31
Tabla 17.- Valores de la pendiente y ordenada a la origen	31
Tabla 18.-Valores de la valoración del antibiótico Neomicina	31
Tabla 20.- Datos de la segunda potencia con <i>S.aureus</i> (mm)	A-2
Tabla 21.- Datos de la potencia con <i>S. aureus</i>	A-2
Tabla 22.- Punto bajo y alto de la curva tipo para <i>S. aureus</i>	32
Tabla 23.- Valores de la pendiente y ordenada a la origen	33
Tabla 24.-Valores de la valoración del antibiótico Neomicina	33
Tabla 25.- Datos de la tercera potencia con <i>S.epidermidis</i> (mm)	A-2
Tabla 26.- Datos de la potencia con <i>S. epidermidis</i>	A-2
Tabla 27.- Punto bajo y alto de la curva tipo para <i>S. epidermidis</i>	34
Tabla 28.- Valores de la pendiente y ordenada a la origen	34
Tabla 29.-Valores de la valoración del antibiótico Neomicina	34
Tabla 30.- Datos de la tercera potencia con <i>S.aureus</i> (mm)	A-2
Tabla 31.- Datos de la potencia con <i>S. aureus</i>	A-2
Tabla 32.- Punto bajo y alto de la curva tipo para <i>S. aureus</i>	35
Tabla 33.- Valores de la pendiente y ordenada a la origen	35
Tabla 34.-Valores de la valoración del antibiótico Neomicina	35
Tabla 36 Datos de las valoraciones del Placebo cargado y muestra del lote	36
10919	
Tabla 37 Ejemplo para determinar la exactitud	36
Tabla 38. Valoración promedio de la muestra	37
Tabla 39 Valores de reproducibilidad	38
Tabla 40 Valores de la linealidad	39
Tabla 41.- Resultados para el tratamiento del microorganismo	41
Tabla 42.- valores de la transmitancia de <i>S. aureus</i>	41
Tabla 43 Resultados de los parámetros de desempeño	42
Tabla 44.- Microorganismo de prueba preparación del inoculo	A-3
Tabla 45.- Método de difusión en agar preparación de placas	A-3
Tabla46 .- Método de difusión en agar curva dosis respuesta	A-3



ÍNDICE DE FIGURAS

	PAGINA
Figura 1.-Ubicación de Novag Infancia S.A. de C.V.	2
Figura 2.- Organigrama de la empresa.	4
Figura 3.-Croquis de las instalaciones de la planta baja.	5
Figura 4.-Croquis de las instalaciones de la planta alta.	6
Figura 5.-Hongo <i>Penicillium</i> productor de antibióticos.	7
Figura 6.-Estructuras de antibióticos	8
Figura 7.-Estructura de la Neomicina	9
Figura 8.- Colocador de Penicilindros	17
Figura 9.- Medición de Halos de inhibición del antibiótico	17
Figura 10 Tubos de ensayo de vidrio	20
Figura 11.- Cajas de petri de virio	20
Figura 12.- Curva tipo de <i>S. epidermidis</i> de la primera potencia.	29
Figura 13.- Curva tipo de <i>S. aureus</i> de la primera potencia.	30
Figura 14.- Curva tipo de <i>S. epidermidis</i> de la segunda potencia.	32
Figura 15.- Curva tipo de <i>S. aureus</i> de la segunda potencia.	33
Figura 16.- Curva tipo de <i>S. epidermidis</i> de la tercera potencia.	34
Figura 17.- Curva tipo de <i>S. aureus</i> de la tercera potencia.	35
Figura 18. Especificidad de Neomicina	39
Figura 19.- Ejemplo de grafica con linealidad	40



ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.- Cálculos para la curva tipo para la valoración de la Neomicina
- Anexo 2.- Valores de las potencias realizadas
- Anexo 3.- Especificaciones de los microorganismos según la FEUM
- Anexo 4.- Cálculos para la valoración
- Anexo 5.- Formulas para la linealidad
- Anexo 6.- Formulas para la exactitud
- Anexo 7.- Monografía del producto Terminado Nineka
- Anexo 8.- Cronograma de actividades



1.- DATOS HISTÓRICOS DE LA EMPRESA

1.1. ANTECEDENTES

La empresa NOVAG INFANCIA S.A de C.V fue constituida en 1978, como resultado de la integración de tres laboratorios farmacéuticos: Productos Infancia, Farmacéutica Walter y Novag Internacional de México.

Productos Infancia

Fue fundada en el año de 1949 con una línea de productos dedicados al mercado pediátrico, iniciando sus actividades en comercio promocional en el año de 1956, en ese mismo año arranco su venta al sector salud manejando los medicamentos como genéricos.

Farmacéutica Walter

Desde 1971 comenzó a fabricar productos para el Instituto Mexicano del Seguro Social e inicia también actividades en el mercado comercial.

Novag Internacional de México

Esta compañía llega a México en 1977 con productos de promoción médica llamada antes Ferrer Laboratorio SL, introduciendo al país productos específicos destinados a médicos especializados en disfunciones nerviosas, tratamientos digestivos y respiratorios. En agosto de 1978 las tres empresas deciden fusionarse en una sola compañía que involucra los mercados de cada una de ellas y da por resultado Novag Infancia S.A de C.V.

Novag Infancia S.A. de C.V.

Es una Compañía Farmacéutica Mexicana. Continúa con la promoción en el mercado privado de algunos productos específicos y participa en ventas del Sector Salud, además ha incluido en su portafolio de negocios, la exportación de todo tipo de medicamentos de uso humano, lo mismo que productos químicos, biológicos, complementarios alimenticios y mercancías de uso similar.



1.2. DESCRIPCIÓN TÉCNICA DE LA EMPRESA

Ubicación exacta:

Novag infancia, S.A. de C.V.

Calz. de Tlalpan Núm. 3417

Col. Sta. Úrsula Coapa-Coyoacán

04650 México, D. F. Coyoacán

Tels.: 5666-4120 con 20 líneas

Página web: www.novag.com.mx

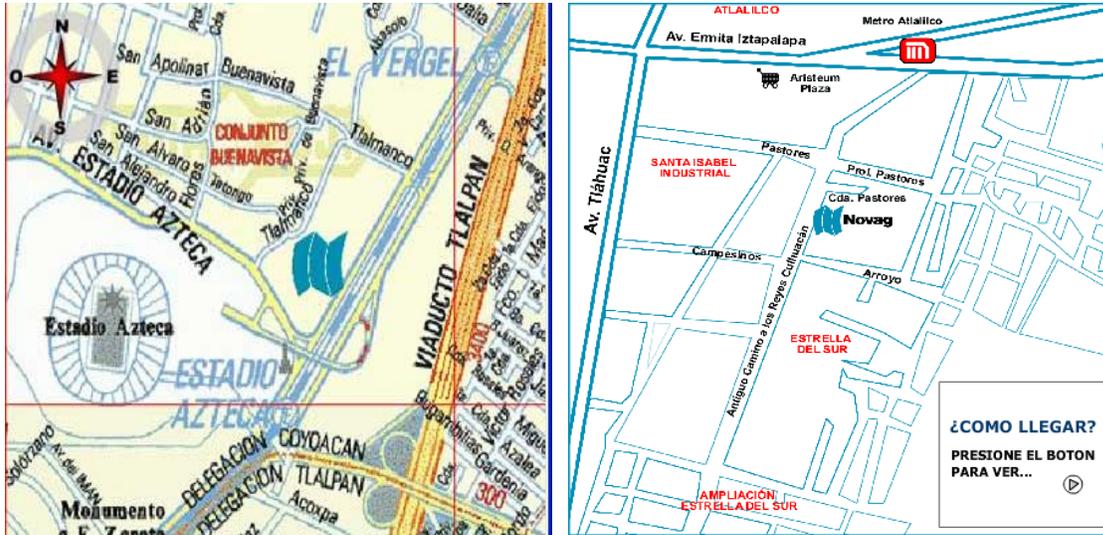


Figura 1.- Ubicación de Novag Infancia S.A. de C.V.

Lema:

“TRABAJANDO POR LA SALUD”

1.3. ADMINISTRACIÓN DE LA EMPRESA

Novag Infancia es un laboratorio cien por ciento mexicano, dedicado a la fabricación y distribución de productos para la salud humana. Su capital es completamente mexicano, sin ingresos extranjeros. NOVAG INFANCIA S.A. de C.V. es una Sociedad Anónima de Capital Variable. Tiene 59 años de EXPERIENCIA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA.



1.4. GIRO DE LA EMPRESA

Su giro es completamente farmacéutico.

Tabla 1.-Gama de productos que ofrece la empresa

Productos de la Empresa		
Analgésicos	Antihipertensivos	Deshidratación
Anorexigénicos	y Cardiovasculares	Diabetes Mellitus
Ansiolíticos	Antiinflamatorio	Diuréticos
Antiácidos	Antimicóticos	Hipocolesterolemiantes
Antiagregantes	Antiparasitarios y	Hipoglucemiantes
Plaquetarios	Antiamibianos	Inhibidores Hormonales
Antialérgicos	Antiparkinsonianos	Insomnio ocasional
Antibióticos	Antisépticos	Laxantes
Antidepresivos	Antituberculosos	Mucolíticos
Antidiarréicos	Antitusígenos	Neuropatías
Antieméticos	Antiulcerosos	Osteoporosis
Antiepilépticos	Antivirales	Queratolíticos
Antigripales	Deficiencia Estrogénica	Suplementos alimenticios
Antihelmínticos	Dermatológicos	Tópicos y Vitamínicos.

Fabricante de productos:

- ✓ Genéricos
- ✓ Genéricos con marca
- ✓ Genéricos intercambiables
- ✓ otc's

Teniendo como clientes a las entidades:

- ✓ Sector Salud
- ✓ Mayoristas
- ✓ Cadenas de Farmacias
- ✓ Distribuidores en toda la República Mexicana.
- ✓ Centros Comerciales.



1.5. ORGANIGRAMA DE LA EMPRESA

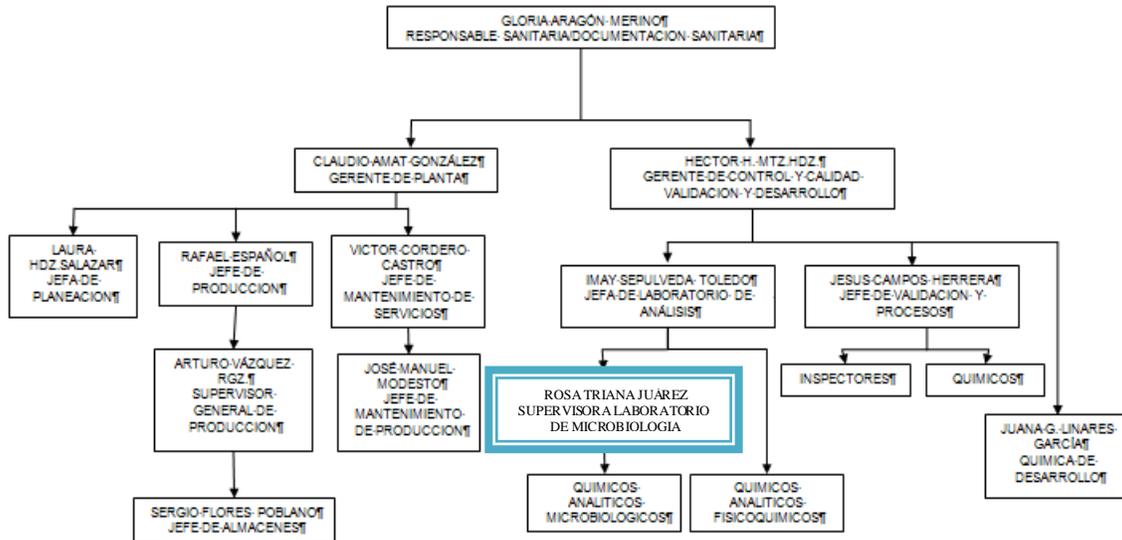


Figura 2.- Organigrama de la empresa

1.6. MISIÓN

Contribuir a la protección de la salud a través de fármacos de alta calidad y a precios accesibles, en base a las exigencias del país

1.7. VISIÓN

Nuestra empresa crece día con día con solidez, porque creemos firmemente en el futuro de México y mejoramiento de la salud de nuestro pueblo. Novag puede adaptarse a la confianza de nuestros clientes, gracias a nuestro capital humano. Seguiremos adoptando las tecnologías e innovaciones disponibles para el mejoramiento aún mayor de nuestros productos



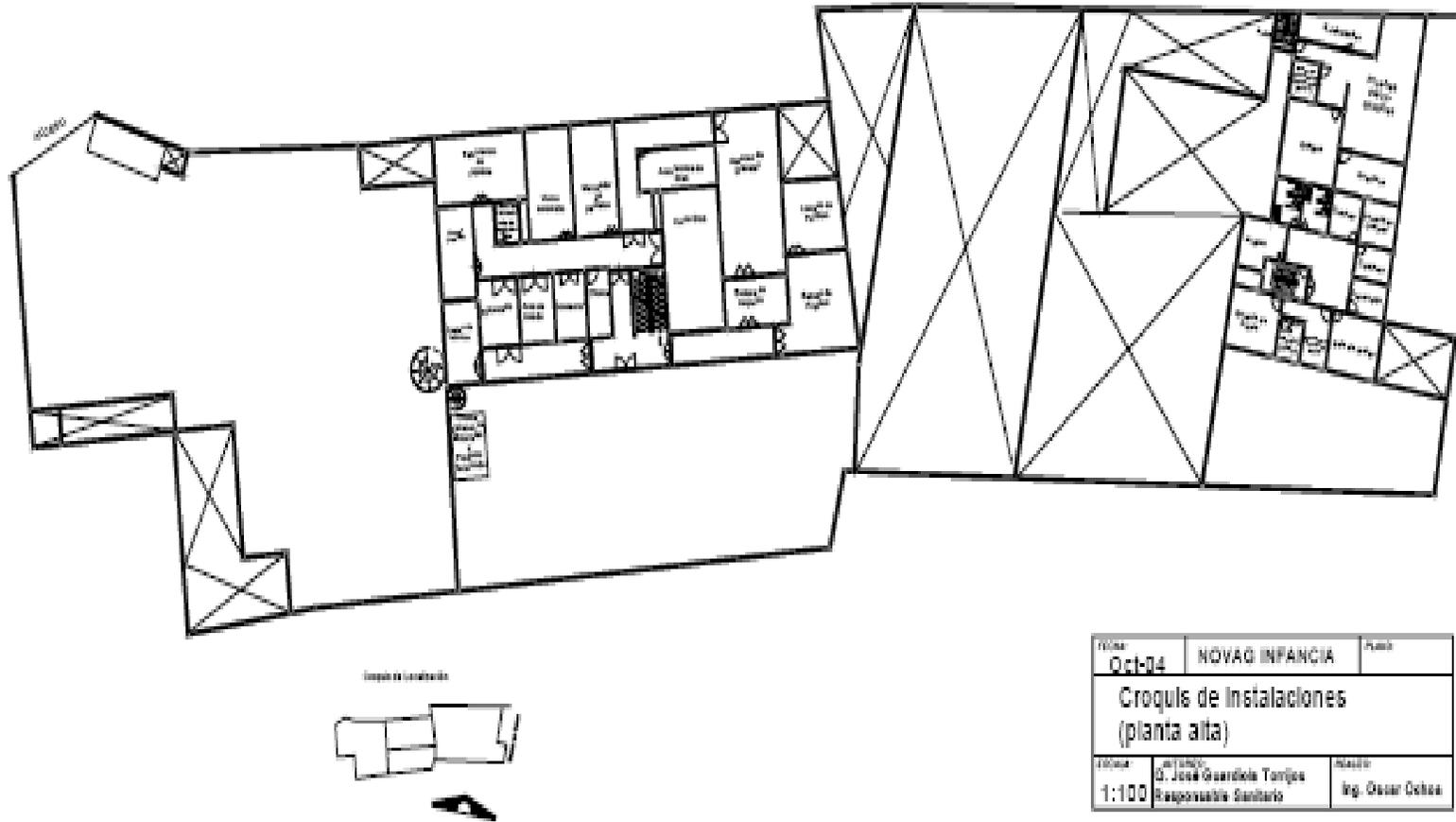
1.8. CROQUIS DE LAS INTALACIONES

Distribución de la planta



FECHA	NOVAG INFANCIA	PLANO
Oct-04		
Croquis de instalaciones (planta baja)		
ESCALA	AUTORIZADO	REVISADO
1:100	Dr. José Guadalupe Tonjes Responsable Sanitario	Ing. Oscar Ochoa

Figura 3 Croquis de las instalaciones de la planta baja.



Fecha:	NOVAG INFANCIA	Plan:
Oct-04		
Croquis de Instalaciones (planta alta)		
Escala:	Elaborado por: G. José Guardado Tarrijas Responsable Sanitario	Revisado por: Ing. Oscar Ochoa
1:100		

Figura 4.-Croquis de las instalaciones de la planta alta.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1. Definición de Antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por ciertos microorganismos que en bajas concentraciones tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o matar otros microorganismos. Son metabolitos secundarios no esenciales que se sintetizan cuando el microorganismo productor está en fase estacionaria. Los principales antibióticos son producidos por bacterias del suelo como *Bacillus*, *actinomicetos* (*Streptomyces*) y hongos (*Penicillium*, *Cephalosporium* y *Aspergillus*. [9][7]



Figura 5: Hongo *Penicillium* productor de antibiótico

2.2.1. Pared celular

Muchos antibióticos van dirigidos a bloquear la síntesis, exportación, organización o formación de la pared celular, específicamente los enlaces cruzados del peptidoglicano, el principal componente de la pared celular, sin interferir con los componentes intracelulares. Esto permite alterar la composición intracelular del microorganismo por medio de la presión osmótica. Como la maquinaria intracelular permanece intacta, ello aumenta la presión interna sobre la membrana hasta el punto en que ésta cede, el contenido celular se libera al exterior, y la bacteria muere. También permiten la entrada de otros agentes antimicrobianos que no pueden atravesar la pared celular. [1][10][5]

2.2.2. Acción sobre los Ribosomas

Aproximadamente la mitad de los antibióticos actúan por inhibición de los ribosomas bacterianos, los organelos responsables de la síntesis de proteínas y que son distintos



en composición de los ribosomas en mamíferos. Algunos ejemplos incluyen los aminoglucósidos (se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma), como la Neomicina.[1] [10][5]

2.2. Clasificación de los antibióticos:

☉ Por su origen

Biológicos, semisintéticos, sintéticos

Un antibiótico semisintéticos contiene un Núcleo *natural* y Cadenas laterales *sintéticas*, un claro ejemplo es la Neomicina. [12][15]

Tabla 2.- Antibióticos aminoglucosidos

Nombre genérico	Nombre comercial	Usos frecuentes ¹⁴	Posibles efectos adversos ¹⁴	Mecanismo de acción
Aminoglucósidos				
Amikacina ¹⁵	Amikin	Infecciones severas causadas por bacterias Gram negativas, como <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella</i> especialmente <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Efectivo contra bacterias anaeróbicas (más no los facultativos). Neomicina se indica para profilaxis de cirugía abdominal.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sordera (especialmente en combinación con diuréticos de asa) ▪ Vértigo ▪ Daño renal (especialmente en combinación con cefalosporinas) 	Se une al ribosoma, unidad 30S por lo que inhibe la síntesis de proteínas.
Gentamicina	Garamicina			
Kanamicina	Kantrex			
Neomicina				
Netilmicina	Netromicina			
Estreptomicina				
Tobramicina	Nebcin			
Paromomicina	Humatin			

☉ Por el espectro de acción

Bacteriostáticos, bactericidas

El sulfato de Neomicina es un antibiótico de amplio espectro de la familia de los aminoglucósidos. Bactericida, inhibe síntesis de proteínas. Activo frente a Gram positivos comunes y Gram negativos. *Pseudomonas aeruginosa* es resistente a Neomicina.[12][16]

☉ Por la estructura química

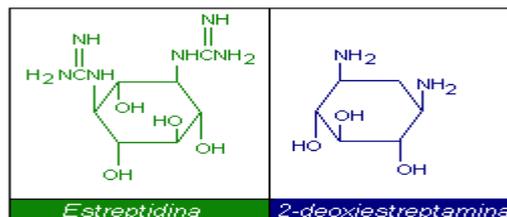


Figura 6.- Estructura de los antibióticos



2.3. Resistencia a los antibióticos

Vías por las cuales los microorganismos desarrollan resistencia:[12][17]

- Mutaciones
- Plásmidos: uno sólo puede llevar múltiples resistencias.
- Altas dosificaciones: Tomar diferentes antibióticos simultáneamente
- Falta de restricciones de uso
- Incorrecto uso del fármaco.

2.4. Que es la Neomicina

La Neomicina es un fármaco de la familia de los aminoglucósidos, que se utiliza en clínica como antibiótico bactericida tanto por vía tópica como oral. Se obtiene del *Streptomyces fradiae*. Está compuesto de Neomicina A, B (la más usada) y C. Es hidrosoluble y más activa a pH alcalino.[18][3]

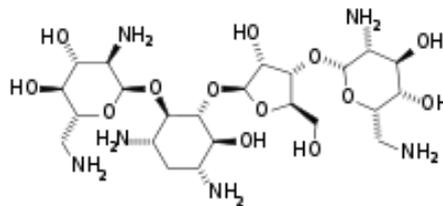


Figura 7.- Estructura de la Neomicina

2.4.1. Absorción del Fármaco

La absorción por vía oral es muy pobre, en torno a un 3%. La unión a proteínas es baja, pero muy variable. En todo caso inferior al 30%. La distribución es muy selectiva, con un alto grado de fijación a tejido renal y oído. Tarda varios días en alcanzar un estado de equilibrio de las concentraciones tisulares, que se mantiene incluso hasta semanas después de la suspensión del mismo. La excreción del fármaco absorbido es renal. El 97% no absorbido se elimina por heces inalterado.[18][19]



2.5. Generalidades de la Validación

Un adecuado proceso de validación debe desarrollarse dentro del marco de Buenas Práctica de Manufactura, ya que garantiza la seguridad de los datos obtenidos para así poder juzgar sobre la seguridad de un producto, permitiendo obtener una documentación confiable y segura, además la validación permitiendo una optimización y estandarización de procesos al reducir el tiempo muerto, costos y errores en el manejo. TODO DEBE SER DOCUMENTADO Y ARCHIVADO.[23]

2.5.1. Definición de Validación

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos. La validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método de análisis y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer. [12]

Es necesario señalar que los métodos descritos en farmacopeas u otros textos oficiales se consideran validados, aunque debe aclararse que ellos se refieren solamente a métodos generales y a materias primas. Estos no precisan de validación, aunque deben ser comprobados antes de su utilización rutinaria con la verificación de la idoneidad en las condiciones de laboratorio de microbiología. Para realizar la validación de un método microbiológico se debe tener en cuenta la evaluación de los medios de cultivo a utilizar para la recuperación de la microflora bacteriana presente en el producto; debe llevarse a acabo la calibración y verificación de los equipos que se van a utilizar, tales como balanzas, micropipetas, incubadoras, autoclaves, etc.[23]

La validación corresponde a un estudio científico de los criterios de confiabilidad que son los siguientes: [8][11]

- ✓ La exactitud.
- ✓ La sensibilidad
- ✓ El límite de detección
- ✓ La especificidad y selectividad
- ✓ La linealidad
- ✓ Rendimiento de extracto.



2.5.2. Tipos de Validación.

2.5.2.1. Validación Prospectiva.

Se basa en información obtenida antes de implantar el proceso de validación. Utilizar un análisis de riesgo para determinar si podrían conducir a situaciones críticas, se investigan posibles causas y determinan la probabilidad de que suceda. Luego se hacen los ensayos y una valoración general; si los resultados son aceptables al final, el proceso es satisfactorio. [4][8][11]

2.5.2.2. Validación Retrospectiva.

Involucra la revisión y análisis de la información histórica del proceso para proceder la evidencia documentada necesaria que el proceso está haciendo lo que debe hacer. Los pasos involucrados en este tipo de validación requiere la preparación de un protocolo específico, el reporte de los resultados analizados que conlleven a unas conclusiones. Esta solo es aceptable para procesos bien establecidos, Puede ser útil en un establecimiento de las prioridades en un programa de validación. Es necesario tener en cuenta el control de la materia prima, controles ambientales, CONTROLES MICROBIOLÓGICOS, equipos, procedimientos, especificaciones, etc. [4][8][11]

2.5.2.3. Validación Concurrente.

Sirve para demostrar y establecer evidencia documentada que un proceso hace lo que debe hacer basado en información generada durante una implementación real del proceso. Utilizada cuando se ha variado alguna etapa del proceso. Esta información puede ser muy valiosa para modificar y corregir el proceso. Se deben tomar en cuenta las variables críticas que demuestre que el proceso está bajo control y el registro de datos sobre la marcha del proceso. Este es el tipo de validación que se va a llevar a cabo para la validación del método de la valoración del antibiótico de Neomicina. [4][8][11]



2.5.2.4. Revalidación.

Se aplica cuando se presenta el cambio de uno de los componentes críticos de la formulación, cambio o reemplazo de una pieza crítica en un sistema o equipo o cambio de instalaciones. La revalidación periódica se presenta cuando los procesos experimentan cambios graduales. Es la repetición de un procedimiento de validación o un procedimiento del mismo. Esto no significa que el programa original se ha repetido. Se llevó a cabo la validación del método de la valoración del antibiótico Neomicina es la validación concurrente. [4][8][11]

2.5.3. Parámetros para la Validación de una Técnica o Método

Son las propiedades, características o capacidades del método que indican su grado de calidad en cuanto exactitud, exactitud relativa, desviación, desviación positiva, desviación negativa, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad especificidad, limite de detección, limite de cuantificación, linealidad, rango de sensibilidad, fortaleza y solidez y robustez.[13][26]

2.5.3.1. Procedimientos que son Objeto de Validación.

Se deben validar los procedimientos analíticos químicos, físicos y microbiológicos, según las siguientes categorías: [11][23]

2.5.3.1.1. Categoría I

Pruebas cuantitativas del contenido del (los) principio(s) activo(s), constituyen procedimientos químicos o microbiológicos que miden el (los) analito(s) presente(s) en una muestra determinada. Como se va a analizar el principio activo que es Sulfato de Neomicina por medio de pruebas cuantitativas se va a realizar midiendo los parámetros de la categoría I. que se muestran en la Tabla 3.

2.5.3.1.2. Categoría II

Pruebas para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas. Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un



valor límite especificado. Cualquiera de los dos pretende reflejar con exactitud las características de pureza de la muestra. Los parámetros de validación requeridos por una prueba cuantitativa son diferentes a los de una prueba cualitativa de cumplimiento de límite.

2.5.3.1.3. Categoría III

Pruebas físico químicas de desempeño. Constituyen procedimientos de ensayo que miden características propias del desempeño del medicamento, por ejemplo la prueba de disolución. Las características de la validación son diferentes a las de las otras pruebas, aunque las pueden incluir

2.5.3.1.4. Categoría IV

Pruebas de identificación. Aquellas que se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra. Esto normalmente se realiza por comparación de una propiedad de la muestra, contra la de un estándar de referencia, por ejemplo espectros, comportamiento cromatográfico, reactividad química y pruebas microcristalinas.

Tabla 3.- Parámetros de desempeño para la validación de una técnica o método.

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

* Puede requerirse dependiendo de la naturaleza del ensayo.



2.5.3.2. Exactitud

Representa la cualidad de concordancia entre un valor determinado y el valor real o convencionalmente verdadero. Se puede aproximar el valor real mediante una distribución de valores. El "método convencionalmente exacto" debe usarse en condiciones técnicas bien definidas y constantes para estimar un valor verdadero. *La exactitud representa la cualidad de concordancia entre el valor medido y el valor verdadero o convencionalmente verdadero.* La exactitud se determina cuando:

- ⦿ Se dispone de patrones cuyo valor se conoce
- ⦿ La precisión es tal que la amplitud de errores no afecta con la exactitud.

Puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento con respecto a un analito con pureza conocida (como un estándar de referencia). En la valoración de un fármaco en un producto formulado, puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto, se puede aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas del analito. Se calcula como el porcentaje de la recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida del analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la medida de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

2.5.3.3. Precisión

La precisión o fidelidad de un método representa la cualidad de concordancia en una zona definida de valores por determinar entre medidas repetidas, efectuadas en una misma muestra de condiciones constantes y determinadas. Represente la calidad de la concordancia entre distintas mediciones de una misma muestra en condiciones determinadas. Se utilizan términos especiales para designar cada tipo de evaluación:

- ⦿ distribución de las mediciones del tiempo
- ⦿ del técnico
- ⦿ condiciones de operación

De acuerdo en las condiciones de operación la precisión será la medida de la repetibilidad o la Reproducibilidad. Se relaciona con la dispersión de una media alrededor de un valor medio o central, que pueda ser expresado en términos de varianza, desviación estándar o coeficiente de variación. Se considera a niveles: repetibilidad, reproducibilidad y solidez y robustez.



2.5.3.3.1 Repetibilidad: Medida de la precisión del método cuando se realizan mediciones sucesivas por el mismo analista el mismo día, mismo reactivos, mismo instrumentos y condiciones de medición (precisión dentro del ensayo).

2.5.3.3.2 Reproducibilidad: grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo analito realizadas en diferentes condiciones de medición. Una declaración válida de reproducibilidad requiere que se especifiquen los cambios en las condiciones del análisis o calibración. Estos cambios puede incluir el principio activo en que se basa la medición, el método, analista/observador e instrumento, material y patrones de referencia, ubicación, condiciones de uso y tiempo. Puede ser expresado en términos de los parámetros de dispersión de los resultados (desviación estándar, varianza, coeficiente de variación). Es importante y uno de los principales objetivos de los programas internos de aseguramiento de la calidad. Garantiza que el laboratorio es capaz de producir resultados constantes a lo largo del tiempo.

2.5.3.4. Especificidad

Es la capacidad del método para diferenciar precisa y específicamente el compuesto de interés, en presencia de los demás componentes, que se espera que estén presentes en la muestra. Se puede estudiar agregando a la muestra algunas sustancias que se sospecha que reaccionan de la misma manera que el componente estudiado y comparar estadísticamente los resultados analíticos con y sin agregado.

La especificidad puede influir mucho en la exactitud. Un método es específico si, en un sistema con varios componentes, solo se da la señal para el método que se mide. Se estudian mediante:

- ⦿ Establecimiento de la función de calibración del componente que se mide.
- ⦿ El estudio de los componentes que producen la misma reacción
- ⦿ El estudio separado de la sustancia por analizar a la que se añaden sustancias.

El método específico aumenta cuando se mide para un único componente, es selectivo cuando aumenta para todos los componentes seleccionados. La evaluación se hace en las soluciones primarias o en mezclas de diversas muestras. Su capacidad es detectar una gama de microorganismos que pueden estar presentes en el artículo de prueba. Se detecta por medio de la promoción que dependen del crecimiento para demostrar la presencia o ausencia del microorganismo. Capacidad de detectar un



panel de microorganismos aptos para demostrar que el método sirve al objetivo propuesto. Esto se demuestra empleando el organismo adecuado.

2.5.3.5. Linealidad

Tiene que ver con la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta, es decir, si la técnica o método produce resultados directa o indirectamente proporcionales a la concentración a cantidad del analito dentro de un intervalo determinado. Se considera un estudio de regresión. El cual consiste en estudiar la relación y su representación mediante un modelo matemático cuando uno de los valores no es aleatorio. Permite verificar que la relación entre las cantidades introducidas en el sistema de medición y la respuesta instrumental es una recta que debe pasar por el origen. El método que permite calcular la recta es el de "mínimos cuadrados", el cálculo de esto se puede complementarse mediante el cálculo del coeficiente de correlación (es el reflejo de la proporcionalidad de la relación entre dos caracteres concentración y respuesta). La determinación del coeficiente de correlación r no permite por si sola verificar si la representación de concentración-respuesta corresponde una recta. A partir de los resultados se obtiene la media y el coeficiente de variación expresado en porcentaje. Un valor bajo de este coeficiente permite afirmar con certeza que la representación concentración–respuesta es una recta. Es la capacidad para generar resultados que sean proporcionales a la concentración de microorganismos presentes en la muestra dentro de un intervalo dado. La r^2 no deberá ser menor al 95%. Se podrá determinar mediante graficas visualmente si tiene un efecto lineal, se debe hacer mediante métodos estadísticos adecuados. Se deberá presentar el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de las ordenadas, la pendiente de la línea de regresión, y la suma de los cuadrados residuales. Valoración de un fármaco o de un producto terminado = 90-110% de la concentración de prueba.

2.5.3.6. Intervalo

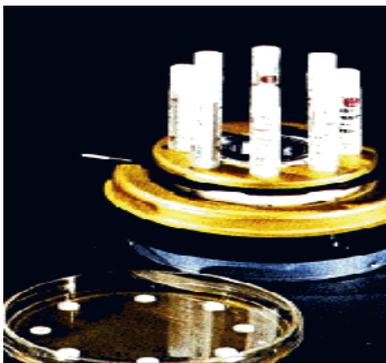
Es el intervalo que existen entre los niveles superiores e inferiores de microorganismos que has demostrado poder determinarse con precisión, exactitud y linealidad. Se refiere a concentraciones inferior y superior del analito.

2.6. Valoración Microbiológica de los Antibióticos.

La actividad o potencia de un antibiótico puede demostrarse por la inhibición del crecimiento de microorganismos sensibles y específicos, frente a diferentes concentraciones óptimas de un agente antimicrobiano. En los antibióticos puede haber ligeros cambios químicos que se traducen en pérdida de actividad antimicrobiana, que no puede demostrarse por métodos químicos, por esta razón, en caso de duda respecto a la actividad de un antibiótico, los métodos de valoración microbiológica prevalecen sobre los métodos químicos. Para valorar microbiológicamente un antibiótico, se emplean dos métodos:

2.6.1. Método de difusión en agar.

Se basa en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical, a través de una superficie con agar inoculado con el microorganismo de prueba. La difusión origina zonas de inhibición del microorganismo cuyo tamaño (diámetro) difundido en el agar está en relación con la concentración del antibiótico que hace referencia a la concentración crítica del fármaco (cantidad justa capaz de inhibir el crecimiento microbiano bajo las condiciones de prueba después de un tiempo de incubación).



Figuras 8.- Colocador de Penicilindros

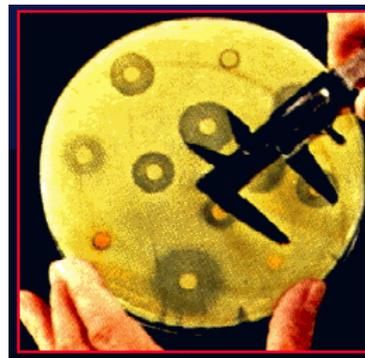


Figura 9.- Medición de Halos de inhibición del antibiótico



3.- JUSTIFICACIÓN

Dentro de la industria Farmacéutica la validación de un proceso es importante, se refiere a los métodos analíticos que se usan para mejorar y acondicionar principalmente un método dentro de un lugar específico. El laboratorio de microbiología tiene un gran papel dentro de la industria farmacéutica, es el encargado de hacer las pruebas necesarias para determinar si un determinado lote está libre de microorganismos patógenos. Hacer una validación de algún método implica la obtención de datos estadísticos como documentación, la Industria Farmacéutica está regida por la FEUM, USP y normas oficiales. En la validación de la valoración del antibiótico Neomicina por el método de difusión en agar es de una gran importancia, ya que para el método antes mencionado se puede desarrollar un protocolo normalizado de operación (PNO's) con las características y las condiciones adecuadas de trabajo del laboratorio de microbiología. Esto con el fin de encontrar el método que cumpla con las expectativas que deseamos encontrar en los distintos antibióticos. Existen ciertos microorganismos que producen y tienen una actividad inhibitoria contra otros microorganismos, que les confiere propiedades que los sitúan entre los productos de origen biológico, en donde estos se dividen en varias categorías. Para llevar a cabo esta Validación se realizará por el Método de difusión en agar. Y de lo que se va a desarrollar en forma práctica en sincronía con los datos teóricos, buscaremos validar un método que cumpla con las características que nosotros consideremos que se adaptan mejor para el pleno desarrollo y obtención de los objetivos que queremos lograr.

4.- OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

- Validar el procedimiento de la valoración microbiológica del antibiótico Neomicina por medio del método de difusión en agar, para el laboratorio de microbiología asegurando la fiabilidad de los resultados.



4.2. Objetivos particulares.

- Validar el método de valoración del antibiótico, aplicando los criterios necesarios.
- Desarrollar la valoración del antibiótico con el método difusión de agar.
- De acuerdo a la literatura adecuar las cepas, medios de cultivo y equipos a utilizar para llevar a cabo la validación en el laboratorio de microbiología.
- Después de la obtención de datos de las pruebas experimentales tratar los datos estadísticos para lleva acabo la validación en el laboratorio de microbiología.

5.- MATERIAL Y EQUIPO.

- 15 cajas petri de vidrio estériles
- 1 pipeta de 25ml
- 1 matraces 500ml
- Cilindros de acero inoxidable con las siguientes dimensiones:
 - Diámetro externo 8mm
 - Diámetro interno 6mm
 - Longitud de 10mm
- colocador de cilindros
- 2 pipetas de 1ml
- 1 pinzas de acero inoxidable
- suficientes puntas para micropipeta de 200 μ l
- 1 frasco lechero para depositar la solución concentrada de microorganismos
- 1 pipeta de 5ml
- 1 tubo de vidrio para realizar los factores de dilución para estandarizar al microorganismo
- suficientes puntas para la pipeta de 5ml
- 1 probeta de 100ml
- Baño de agua
- Espectrofotómetro que lea en un intervalo de 580nm.
- Medidores de zonas de inhibición



Figura 10 Tubos de ensayo de vidrio

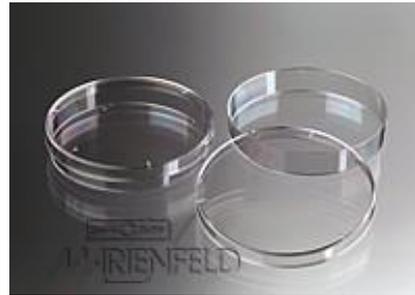


Figura 11.- Cajas de petri de virio

6.-METODOLOGIA

Se dividió la técnica en 5 días por potencia para la valoración del antibiótico Neomicina.

6.1. Día 1

6.1.1. Solución salina al 1%

Pesar exactamente 1.0 g de cloruro de sodio, transferir esta cantidad a un matraz aforado de 100.0 mL, agregar aproximadamente 50.0 mL de agua purificada, mezclar perfectamente hasta la completa disolución, aforar con agua purificada. Esterilizar por calor húmedo.

6.1.2. Preparar solución reguladora de Fosfato de Potasio 0.1 M, pH 8.0±0.1

Pesar 16.73g de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) y 0.523g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), transferirlos a un matraz aforado de 1,0 L, adicionar 500 ml de agua purificada hasta que se disuelva completamente. Si es necesario ajustar el pH con ácido Fosfórico 18 N ó Hidróxido de Potasio 10 N, según se requiera, aforar con agua purificada. Esterilizar por calor húmedo.

6.1.3. Preparar Agar para Antibiótico Núm. 1. (A1 A)

Pesar 30.5g de agar deshidratado por cada 1,0 L de agua purificada, transferir 15 ml de este agar por tubo en total se trabajará con 14 tubos de boca ancha con tapa de baquelita previamente etiquetados. Si es necesario ajustar el pH con ácido Clorhídrico 1.0 N ó Hidróxido de Sodio 10 N según se requiera, aforar con agua purificada. Esterilizar por calor húmedo. Una vez ya estériles los tubos con agar se tienen que inclinar para así dejar solidificar el agar para ser usados posteriormente.



6.2 Día 2

6.2.1. Siembra de microorganismos.

Sembrar los microorganismos prueba en un tubo con agar para antibióticos núm. 1 (A1A) inclinado, sembrar por estría, previamente preparado.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

6.2.2. Incubación de tubos.

Incubar los tubos inoculados a una temperatura de 32-35°C por 24 horas.

6.2.3. Preparar el material para llevar a cabo la potencia y esterilizarlos.

Esterilizar el material mencionado en el punto 5 según sea por calor húmedo o seco.

6.2.4. Pesar estándar de referencia

En un pesafiltro transferir la cantidad necesaria de estándar de referencia, colocar el pesafiltro destapado con una estufa vacía, secar a una atmosfera con 10% de humedad relativa a 60°C y una presión de 5mmHg durante 3 horas. Al terminar abrir la estufa, tapar inmediatamente el pesafiltro y colocarlo en un desecador con gel de sílice. Pesar con exactitud 10.0 mg de estándar de sulfato de Neomicina (Base anhidra) de potencia química conocida, y aforarlo con un matraz volumétrico de 10.0 ml, agregar 5.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos. Agitar perfectamente (si es necesario meterlas a ultrasonido) hasta que el estándar este completamente disuelto y aforar con solución amortiguadora de fosfatos. La solución tiene una concentración aproximada de 1.0 mg/ml. Solución concentrada.

6.3. Día 3

6.3.1. Resuspender crecimiento y volver a inocular

A partir de los tubos ya inoculados y pasado el tiempo de incubación (24 horas), resuspender el crecimiento adicionando 3.0 ml de solución salina estéril al 1%, obteniendo así una suspensión controlada. Inocular con esa suspensión resultante 5 tubos que contengan aproximadamente 15 ml de agar para antibióticos núm. 1

- Etiquetar los tubos a inocular.
- Incubar los tubos a una temperatura de 32-35°C por 24 horas.

6.3.2. Preparar la curva tipo (duración en el refrigerador 14 días). Ver anexo 1

6.3.2.1. *Staphylococcus aureus*

Tomando en cuenta que la farmacopea indica que la concentración media de µg/ml debe ser 10.0 µg/ml. Tomar una alícuota de la solución concentrada de 5.0 ml y aforarla a 50.0 ml con solución reguladora de fosfatos. La solución tiene una



concentración aproximada de 100.0 µg/ml (0.1mg/ml) solución stock. Homogeneizar mecánicamente. De la solución stock transferir a 5 matraces volumétricos de 50.0 ml las siguientes cantidades: 3.0 ml, 4.0 ml, 5.0 ml, 6.0 ml y 7.0 ml respectivamente. Puntos de la curva tipo que corresponden a las letras a, b, c, d y e. Aforar con solución reguladora de fosfatos. Las soluciones tienen una concentración aproximada de 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 y 14.0 µg/ml respectivamente.

6.3.2.2. *Staphylococcus epidermidis*

Tomando en cuenta que la farmacopea indica que la concentración media de µg/ml debe ser 1.0 µg/ml. Tomar una alícuota de la solución concentrada de 1.0 ml y aforarla a 100.0 ml con solución reguladora de fosfatos. La solución tiene una concentración aproximada de 10.0 µg/ml (0.01mg/ml) solución stock. Homogeneizar mecánicamente. De la solución stock transferir a 5 matraces volumétricos de 50.0 ml las siguientes cantidades: 3.0 ml, 4.0 ml, 5.0 ml, 6.0 ml y 7.0 ml respectivamente. Puntos de la curva tipo que corresponden a las letras a, b, c, d y e. Aforar con solución reguladora de fosfatos. Las soluciones tienen una concentración aproximada de 0.6, 0.8, 0.10, 0.12 y 0.14 µg/ml respectivamente.

6.3.3. PRODUCTO TERMINADO (SUSPENSIÓN DE SULFATO DE NEOMICINA).

6.3.3.1. *Staphylococcus aureus*.

Tomar una alícuota de 3.0 mL de la suspensión de sulfato de Neomicina (equivalente a 29.32 mg de Neomicina base aproximadamente) y transferirla a un matraz volumétrico de 50.0 mL, agregar aproximadamente 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos, homogeneizar mecánicamente. Aforar con el mismo diluyente. La solución tiene una concentración aproximada de 0.5864 mg/mL. De la solución anterior tomar una alícuota de 3.0 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 50.0 mL homogeneizar mecánicamente, aforar con solución amortiguadora de fosfatos. La solución tiene una concentración aproximada de 0.0351 mg/mL. De la solución anterior tomar una alícuota de 8.0 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 25.0 mL homogeneizar mecánicamente, aforar con solución amortiguadora de fosfatos La solución tiene una concentración aproximada de 0.0112 mg/mL. Solución problema ajustada a la concentración del punto medio de la curva tipo.

6.3.3.2. Para *Staphylococcus epidermidis*.

Tomar una alícuota de 3.0 mL de la suspensión de sulfato de Neomicina (equivalente a 29.32mg de Neomicina base aproximadamente) y transferirla a un matraz volumétrico de 50.0 mL, agregar aproximadamente 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos, homogeneizar mecánicamente. Aforar con el mismo diluyente. La solución tiene una concentración aproximada de 0.4398 mg/mL. De la solución anterior tomar



una alícuota de 3.0 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 50.0 mL homogeneizar mecánicamente, aforar con solución amortiguadora de fosfatos. La solución tiene una concentración aproximada de 0.0351 mg/mL. De la solución anterior tomar una alícuota de 7.0 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 25.0 mL homogeneizar mecánicamente, aforar con solución amortiguadora de fosfatos La solución tiene una concentración aproximada de 0.0985 mg/mL. Solución problema ajustada a la concentración del punto medio de la curva tipo

6.4. Día 4

6.4.1. Resuspender crecimiento

Trascurrido el tiempo de incubación (24 horas a una temperatura de 32-35°C) de los microorganismos en tubos inclinados inoculados el día 3, resuspender el crecimiento de cada tubo con 3 ml de solución salina estéril al 1%, La suspensión obtenida de todos los tubos se recolecta en un frasco lechero para cada microorganismo para ajustar la solución original. Para ajustar la suspensión, diluir una alícuota usando el factor de dilución para cada microorganismo: *S. aureus* fd=1:20 (1ml de la suspensión original y 19 ml de solución salina al 1%) y para *S. epidermidis* fd=1:24 (1ml de la suspensión original y 23 ml de solución salina al 1%), pasar poco a poco esta solución a una celda y leer en el espectrofotómetro el porcentaje de transmitancia a 580nm, la dilución de la suspensión original debe tener una lectura del 25% \pm 2. Este solo sirve de referencia para ajustar la transmitancia de la suspensión original (esta es la que se inocula en la capa siembra).

NOTA: No llevar la suspensión original a una transmitancia del 25%, lo que se lleva a esa transmitancia son las diluciones 1:20 y 1:24.

↑%T-adicionar microorganismo

↓%T-adicionar solución salina al 1%

6.4.2. Aplicación del método de difusión en agar

Capa base: Preparar el volumen necesario de medio de cultivo Antibiótico No. 11. Se requieren 21.0 ml de medio de cultivo estéril, fundido y mantenido en baño maría entre 48 y 50 °C aproximadamente para cada caja, tomando en cuenta que se requieren tres placas por muestra problema y 12 para la curva tipo. Dejar solidificar sobre una superficie plana y a nivel, dejar las tapas de las cajas entre abiertas para evitar la acumulación de agua de condensación. Capa siembra: Preparar el volumen necesario de medio de cultivo Antibiótico No. 11, considerando que cada caja debe contener 4.0 ml de capa siembra. De la solución de prueba obtenido en la preparación del microorganismo adicionar si es *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P 1.0 ml de inóculo



ó de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 1.0 ml por cada 100 ml de medio de cultivo (capa siembra). Homogenizar él inoculo con el medio de cultivo, mediante movimientos rotatorios. Con una pipeta estéril medir 4.0 ml del medio de cultivo inoculado y depositarla en cada placa con capa base solidificada. Extender la capa uniforme y rápidamente y dejar solidificar en un plano horizontal

6.4.3. Procedimiento de la técnica.

Colocar 6 cilindros a intervalos de 60 grados sobre las cajas ya antes mencionadas tanto para la curva tipo como para la muestra sobre la superficie del agar por medio del aplicador de cilindros.

Llenar los cilindros con una micropipeta con 200.0 μ l de las diluciones correspondientes y de la muestra (s).

Para la Muestra: de los seis cilindros que contiene cada una de las tres cajas, llenar alternadamente tres de ellos con la solución muestra y los tres restantes con la solución del estándar que contiene la concentración media de la curva tipo que es el punto de referencia o punto central de la curva (Punto C).

Para la Curva tipo: para cada punto de la curva a, b, d y e se requieren 3 placas por muestra, cada una de ellas con 6 cilindros. De los cilindros de cada caja, llenar alternadamente 3 cilindros con la disolución correspondiente (a, b, d y e) y los 3 restantes con el punto de referencia o punto central de la curva (Punto C). De esta manera se obtendrán 36 zonas de inhibición para la concentración de referencia (Punto C) y 9 para los demás puntos de la curva (a, b, d y e). Incubar las caja con la tapa bien sujeta a la base a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 16 a 18 hrs. Pasado el tiempo de incubación medir el diámetro del halo de inhibición con un medidor de halos. Registrar los datos obtenidos para realizar los cálculos posteriores.

6.5. Día 5

6.5.1. Leer la potencia

Una vez pasado el tiempo de incubación sacar la potencia y leer los halos de inhibición con ayuda del lector de halos de inhibición, se deben obtener zonas de inhibición de tamaño (14mm-16mm de diámetro).

6.5.2. Cálculos.

Promediar las 36 zonas de inhibición de cada una de las concentraciones de la solución de referencia ó del punto central de la grafica (punto c). Este punto corresponde al punto de corrección de la curva, con el cual se corrigen los promedios de cada una de las concentraciones de los demás puntos de la curva tipo (Puntos a, b, d y e). Promediar las 9 lecturas de cada punto restante de la curva tipo (Puntos a, b, d



y e). Efectuar la corrección de la siguiente manera: si el promedio de las 36 lecturas de la solución de referencia (punto c) es mayor al valor promedio de las lecturas del punto c en cualquiera de las concentraciones de la curva, la diferencia se suma, si por el contrario el promedio del estándar es menor, la diferencia se le resta, para así corregir el valor de este punto.

Ejemplo 1:

$$\text{Promedio St} = 17.2 \text{ mm}$$

$$\text{Promedio punto c} = 17.0 \text{ mm}$$

$$\text{Promedio punto a} = 16.3 \text{ mm}$$

Por lo tanto:

$$17.2 - 17.0 = 0.2 \text{ (diferencia)}$$

$$\text{Valor corregido punto a} = 16.3 + 0.2 = 16.5$$

Ejemplo 2:

$$\text{Promedio St} = 17.2 \text{ mm}$$

$$\text{Promedio punto c} = 17.5 \text{ mm}$$

$$\text{Promedio punto a} = 16.3$$

Por lo tanto:

$$17.2 - 17.5 = -0.3 \text{ (diferencia)}$$

$$\text{Valor corregido punto a} = 16.3 - 0.3 = 16.0$$

Trazar la línea dosis-respuesta en una gráfica semilogarítmica de doble ciclo usando la concentración en $\mu\text{g/ml}$ en las ordenadas (escala logarítmica) y el diámetro de las zonas de inhibición en las abscisas (escala milimétrica). La línea dosis-respuesta se traza a través de los valores corregidos o bien obtener los puntos H (Punto más alto) y L (Punto más bajo) mediante las siguientes ecuaciones:

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

Ecuación 1.- Cálculo del valor más pequeño en la curva

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Ecuación 2.- Cálculo del valor más grande en la curva

Donde:

L= Diámetro de la zona de inhibición en milímetros para la concentración más baja de la SRef.

H=Diámetro calculado de la zona de inhibición en milímetros para la concentración más alta de la SRef.

a, b, c, d, e= Promedios de los valores corregidos para las concentraciones de la Sref.



Registrar los puntos L y H en la gráfica del formato para obtener el punto central de la curva y de esta manera estimar la potencia de las muestras.

6.5.3. Estimación de la potencia de la muestra

Promediar los diámetros de las zonas de inhibición de la Sref (punto c) y de la muestra en las tres placas empleadas. Si el promedio del diámetro de las zonas de inhibición de la muestra es mayor que el de la Sref, sumar la diferencia entre ellos al diámetro de la concentración media de referencia de la curva estándar. Si el promedio del diámetro de las zonas de inhibición de la muestra es mayor que el de la Sref, sumar la diferencia entre ellos al diámetro de la concentración media de referencia de la línea dosis respuesta de la curva estándar, por el contrario si el promedio del diámetro de las zonas de inhibición de la muestra es más baja que la de la Sref. Interpolar en la línea dosis respuesta el valor corregido para obtener la concentración correspondiente. De esta manera se obtendrá la potencia de la muestra.

Reportar en el formato correspondiente.

6.5.4. Validación de la técnica de Valoración de Antibiótico

Esta se va a llevar a cabo midiendo los parámetros mencionados en el punto 2.5.6. y tratando estadísticamente los resultados obtenidos de las potencias microbiológicas que se llevaron a cabo.



7. RESULTADOS

La validación de la valoración del antibiótico Neomicina se llevó a cabo en 2 etapas

7.1. Etapa 1: Selección del microorganismo de prueba

El objetivo de esta etapa fue seleccionar a un microorganismo de prueba exclusivamente con el cual se va a realizar la validación, esto se hizo de acuerdo a las características que presentaron los microorganismos a lo largo de las potencias ya realizadas y a su comportamiento mismo, como el crecimiento, la facilidad de observación de los halos de inhibición al igual que los diámetros de los halos de inhibición.

Se trabajaron con dos microorganismos de prueba recomendados según la FEUM con especificaciones explícitas durante la prueba, los m.o. de prueba son: [2], ver anexo 3

- *S.aureus ATCC 6538P*
- *S.epidermidis ATCC 12228*

Se realizaron 3 potencias con los 2 microorganismos bajo las mismas condiciones de temperatura, tiempo de incubación del microorganismo, transmitancia del microorganismo, etc., por potencia

7.1.1. Primera potencia.

7.1.1.1. *S. epidermidis*

Se escogió un número de lote específico para poder llevar a cabo la selección del microorganismo. El lote analizado fue el número 10938. La potencia se dividió por 5 días de la semana, ver punto 6.

Para la lectura de la potencia

- Total de horas de incubación: 17h
- Temperatura inicial de incubación: 34.5°C
- Temperatura final de incubación: 34°C

Se obtuvieron una serie de valores en la lectura con el medido de halos, los cuales se muestran en la tabla 4.



Tabla 4.- Datos de la primera potencia con *S.epidemidis* (mm)

a	c	b	c	d	c	e	c	10938	c
12,4	14,6	14,6	14	13,6	14	14,2	14	13,8	15
13	13	13,8	14,2	15	13,8	14	13,6	14,2	14,8
14,8	13,8	13,6	14,4	14,2	13,8	14,6	13,8	14,6	14,8
14	15	13,8	13,6	14,2	14	15	13,6	14	14,4
12,8	13,8	14	14	13,4	13,6	14,2	13,8	14,2	13,8
12,8	13,2	13,4	14,2	14,2	14,2	14,6	14	14,6	14
13,2	14,6	13,6	13,8	13,8	14,2	14,2	14,2	14,4	14
13,8	14	13,8	14,2	14,2	14,4	14,8	13,8	14,4	13,8
12,8	13,8	13,6	14	14	14,2	14,2	13,8	14	14
13,29	13,98	13,80	14,04	14,07	14,02	14,42	13,84	14,24	14,29

Una vez que se tienen los datos hay que hacer corrección de los valores ya obtenidos, calculando así mismo la diferencia de C.

Tabla 5.- Datos de la potencia con *S. epidemidis*

Diferencias de "c"		Valores corregidos		volumen	Conc	Conc µg/ml
C	-0,01	a	13,28	3	0,006	6
C	-0,07	b	13,73	4	0,008	8
C	-0,05	d	14,02	5	0,010	10
C	0,13	e	14,55	6	0,012	12
C	-0,32	10938	13,93	7	0,014	14

Según la ecuación 1y 2 se debe calcular L y H de la curva tipo

Tabla 6.- Punto bajo y alto de la curva tipo para *S. epidemidis* (mm)

L	H
13,35	14,47

Una vez teniendo esos puntos se calcula por medio de la ecuación de la recta, la pendiente y la ordenada al origen como se indica en el ejemplo del Anexo 4, una vez teniendo esos valores sustituimos en la ecuación de la recta y se calcula la valoración.

Tabla 7.- Valores de la pendiente y

Tabla 8.-Valores de la valoración



ordenada al origen

m	7,09
b	-88,57

de antibiótico Neomicina

%	102,79
cantidad	753,42

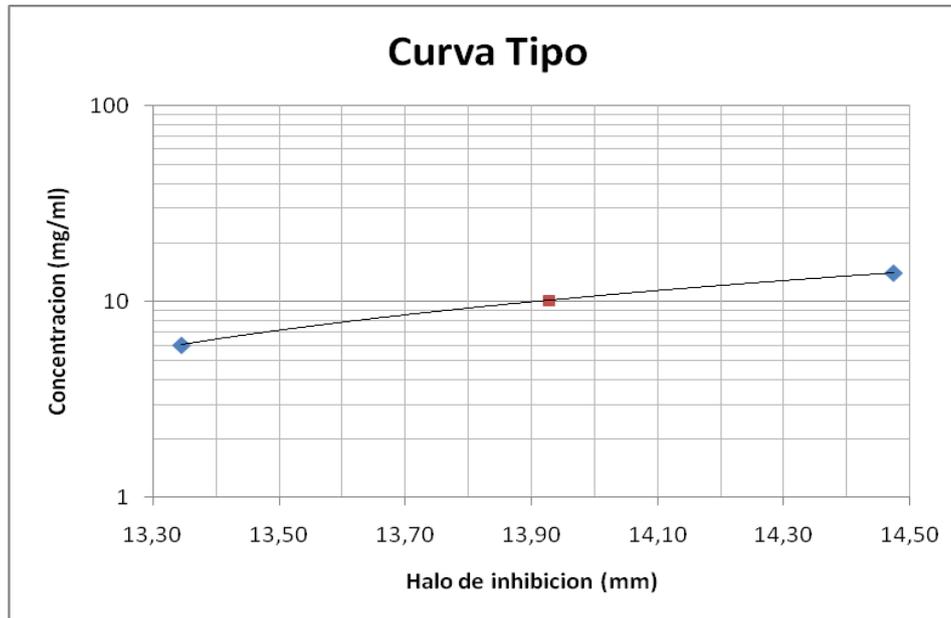


Figura 12.- Curva tipo de *S. epidermidis* de la primera potencia.

7.1.1.2. *S. aureus*

Para la lectura de la potencia

- Total de horas de incubación: 17h
- Temperatura inicial de incubación: 34.5°C
- Temperatura final de incubación: 34°C

Se obtuvieron una serie de valores en la lectura midiendo los de halos, los resultados de esa medición se muestran en la tabla 9.anexo 2

Una vez que se tienen los datos hay que hacer corrección de los valores ya obtenidos, calculando así mismo la diferencia de C .tabla 10 anexo 2

Según la ecuación 1y 2 se debe calcular L y H de la curva tipo

Tabla 11.- Punto bajo y alto de la curva tipo para *S. aureus*(mm)



L	H
14,03	14,84

Una vez teniendo esos puntos se calcula por medio de la ecuación de la recta, se debe calcular la pendiente y la ordenada al origen como se indica en el ejemplo del Anexo 4, una vez teniendo esos valores sustituimos en la ecuación de la recta y se calcula la valoración.

Tabla 12.- Valores de la pendiente y ordenada al origen

m	9,78
b	-131,22

Tabla 13.-Valores de la valoración de antibiótico Neomicina

%	97,31
cantidad	713,32

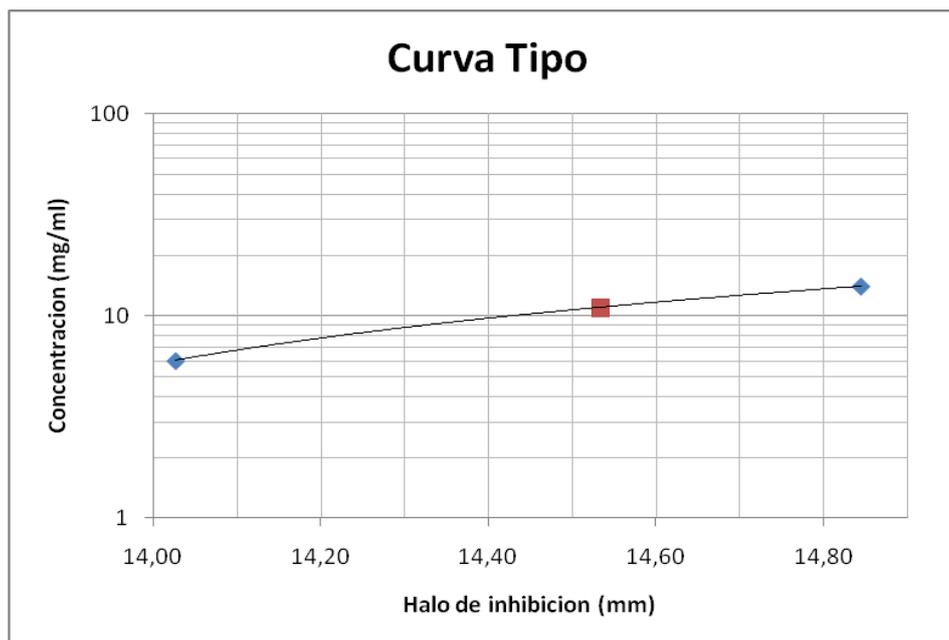


Figura 13.- Curva tipo de *S. aureus* de la primera potencia.

7.1.2. Segunda potencia.

7.1.2.1. *S. epidermidis*



Para la lectura de la potencia

- Total de horas de incubación: 17h
- Temperatura inicial de incubación: 34.3°C
- Temperatura final de incubación: 34.3°C

Se obtuvieron una serie de valores en la lectura con el medido de halos, los cuales se muestran en la tabla 14. *anexo 2*

Una vez que se tienen los datos hay que hacer corrección de los valores ya obtenidos, calculando así mismo la diferencia de C. ver tabla 15 *anexo 2*

Según la ecuación 1y 2 se debe calcular L y H de la curva tipo

Tabla 16- Punto bajo y alto de la curva tipo para *S. epidemidis* (mm)

L	H
14,10	14,63

Una vez teniendo esos puntos se calcula por medio de la ecuación de la recta, se debe calcular la pendiente y la ordenada al origen como se indica en el ejemplo del Anexo 4, una vez teniendo esos valores sustituimos en la ecuación de la recta y se calcula la valoración.

Tabla 17.- Valores de la pendiente y valoración ordenada al origen

m	15,00
b	-205,47

Tabla 18.-Valores de la de antibiótico Neomicina

%	101,85
cantidad	746,53

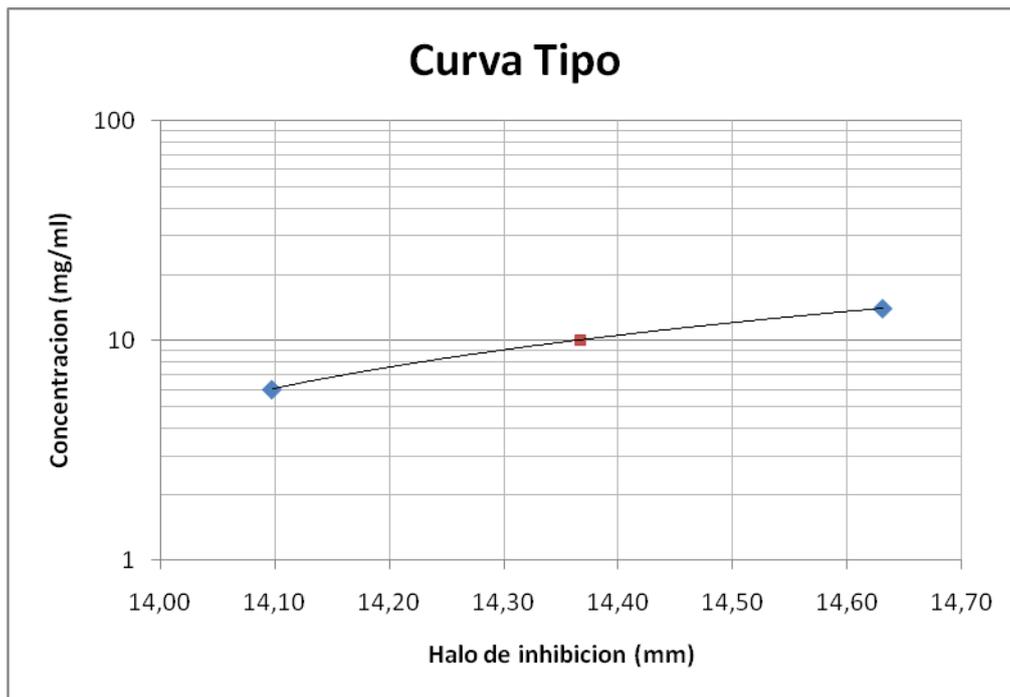


Figura 14.- Curva tipo de *S. epidermidis* de la segunda potencia.

7.1.2.2. *S. aureus*

Para la lectura de la potencia

- Total de horas de incubación: 17h
- Temperatura inicial de incubación: 34.5°C
- Temperatura final de incubación: 34°C

Se obtuvieron una serie de valores en la lectura con el medido de halos, los cuales se muestran en la tabla 19. Anexo 2

Una vez que se tienen los datos hay que hacer corrección de los valores ya obtenidos, calculando así mismo la diferencia de C. tabla 20 anexo 2

Según la ecuación 1y 2 se debe calcular L y H de la curva tipo

Tabla 21.- Punto bajo y alto de la curva tipo para *S. aureus*

L	H
14,78	15,99



Tabla 22.- Valores de la pendiente y ordenada al origen

m	6,62
b	-91,79

Tabla 23.-Valores de la valoración de antibiótico Neomicina

%	93,52
cantidad	685,51

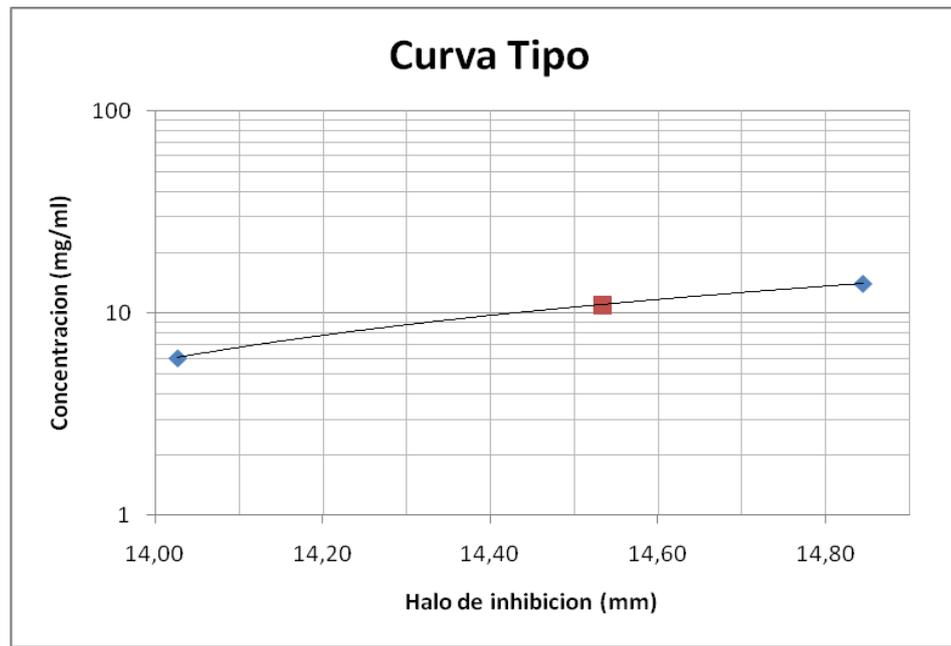


Figura 15.- Curva tipo de *S. aureus* de la segunda potencia.

7.1.3. Tercera potencia.

7.1.3.1. Para *S. epidermidis*

Para la lectura de la potencia

- Total de horas de incubación: 17h
- Temperatura inicial de incubación: 34.6°C
- Temperatura final de incubación: 34.3°C

Se obtuvieron una serie de valores en la lectura con el medido de halos, los cuales se muestran en la tabla 24 *anexo 2*.

Una vez que se tienen los datos hay que hacer corrección de los valores ya obtenidos, calculando así mismo la diferencia de C. tabla 25 *anexo 2*

Según la ecuación 1 y 2 se debe calcular L y H de la curva tipo



Tabla 26.- Punto bajo y alto de la curva tipo para *S. epidemidis*

L	H
14,32	14,59

Tabla 25.- Valores de la pendiente y valoración ordenada al origen

m	30,00
b	-423,70

Tabla 26.-Valores de la de antibiótico Neomicina

%	102,86
cantidad	753,97

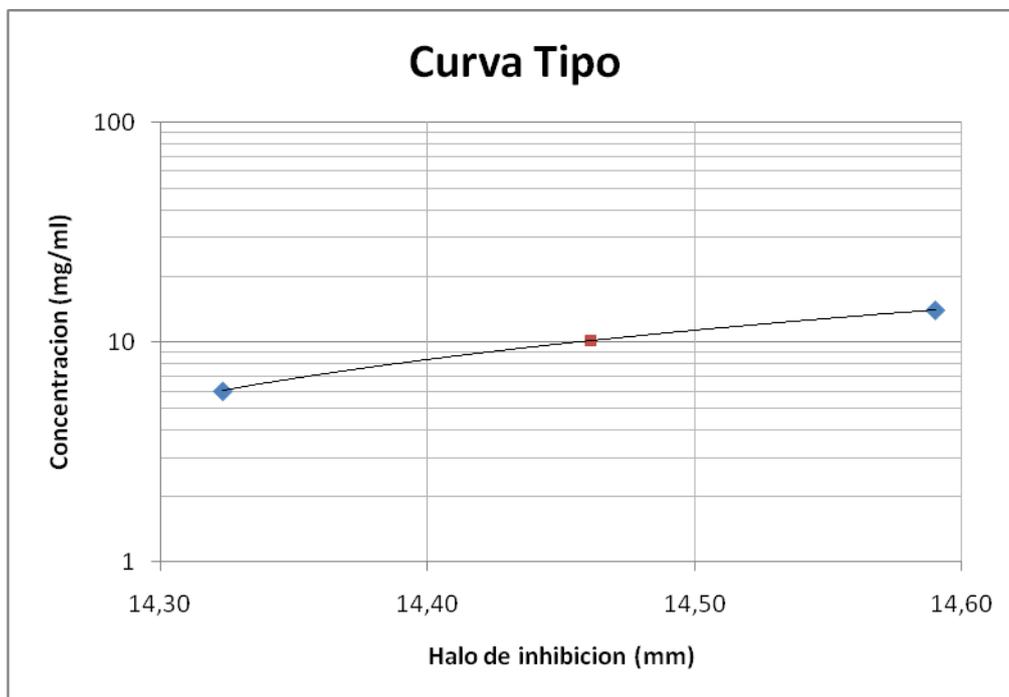


Figura 16.- Curva tipo de *S. epidemidis* de la tercera potencia.

7.1.3.2. Para *S. aureus*

Para la lectura de la potencia

- Total de horas de incubación: 17h
- Temperatura inicial de incubación: 34.5°C
- Temperatura final de incubación: 34°C

Se obtuvieron una serie de valores en la lectura con el medido de halos, los cuales se muestran en la tabla 29 *anexo 2*

Una vez que se tienen los datos hay que hacer corrección de los valores ya obtenidos, calculando así mismo la diferencia de C. tabla 30 *anexo 2*



Según la ecuación 1y 2 se debe calcular L y H de la curva tipo

Tabla 31.- Punto bajo y alto de la curva tipo para *S. aureus*

L	H
14,86	15,11

Tabla 32.- Valores de la pendiente y ordenada al origen

m	32,14
b	-471,79

Tabla 33.-Valores de la valoración de antibiótico Neomicina

%	101,51
cantidad	744,05

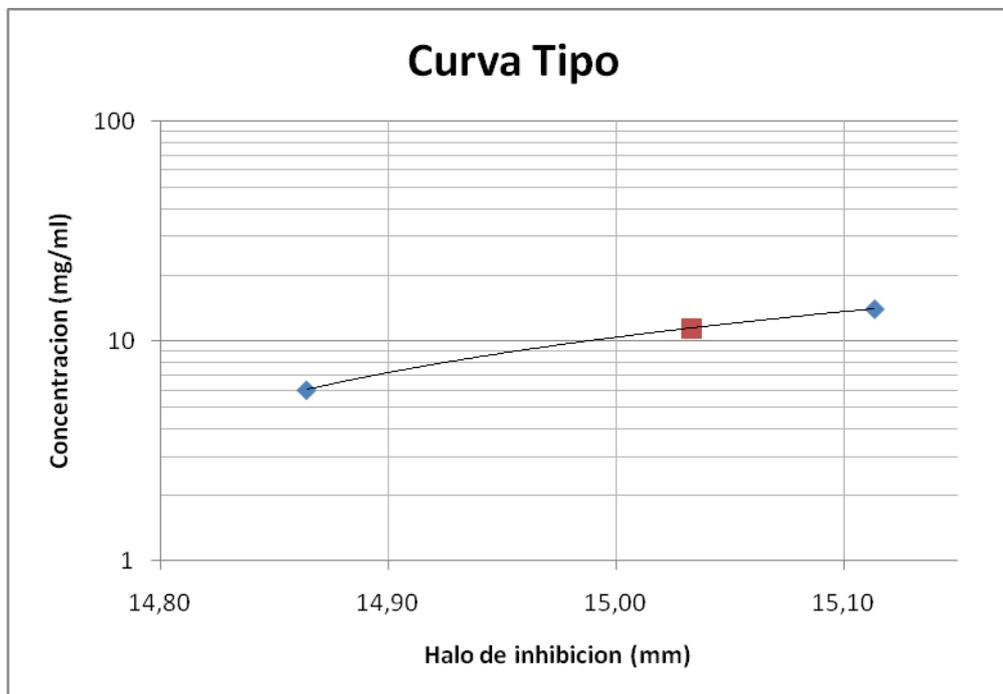


Figura 17.- Curva tipo de *S. aureus* de la tercera potencia.

7.2. Etapa 2: Validación de la valoración del antibiótico Neomicina.

La segunda etapa se realizó, comparando un placebo cargado elaborado por el analista y así compararlo con el lote 10919 que el departamento de producción nos proporcionó:

7.2.1. Determinación de la Exactitud:



Se determina cuando se dispone de patrones cuyo el valor se conoce. Se aprecia por la diferencia entre la medida observada (X_i) y un valor teórico (X): ($X_i - X$)

Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por sextuplicado adicionarle la cantidad de analito correspondiente al 100% de éste en la muestra. Determinar la cantidad recuperada del analito. Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro. Ver *anexo 6*

El analito de pureza conocida o estándar de referencia fue el placebo cargado elaborado dentro del laboratorio de microbiología con las materias específicas proporcionadas por el departamento de almacén y la muestra va a ser el Nineka suspensión elaborado por el departamento de producción con lote 10919.

Para esto se realizaron 3 potencias del placebo cargado y 3 potencias del lote 10919.

Tabla 36 Datos de las valoraciones del Placebo cargado y muestra del lote 10919

	valoración	
	%	cantidad
placebo cargado	97.27	713.04
placebo cargado	105.73	775.04
placebo cargado	101.51	744.05
10919	93.05	682.04
10919	101.51	744.05
10919	97.28	713.05

Al calcular la exactitud de todas las muestras con la fórmula de:

$$Exactitud = (X_i - X)$$

Ejemplo

Tabla 37 Ejemplo para determinar la exactitud



Placebo analítico adicionado	Cantidad adicionada	Cantidad recuperada	% de recobro (y)
1	50.00	50.04	100.08
2	50.10	50.39	100.58
3	50.00	50.11	100.22
4	49.90	49.89	99.98
5	50.00	50.23	100.46
6	50.00	49.93	99.86

Dando así un valor de **exactitud de 2.37%**

7.2.1. Determinación de la Precisión:

Se midió por medio de 2 parámetros que fueron: REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.

Para poder determinar la reproducibilidad se tienen que reunir varias condiciones como son:

- Mismo técnico
- Misma muestra
- Mismo laboratorio
- Mismos aparatos
- Mismos reactivos
- Misma serie de análisis.

Lo cual se cumplió obteniendo así un % de valoración promedio de la muestra del

Tabla 38. Valoración promedio de la muestra

	valoración	
	%	cantidad
10919	105.27	713.04

Con respecto a la Reproducibilidad se puede realizar por 2 medios:

- Reproducibilidad en el laboratorio
- Reproducibilidad entre laboratorios.

La que se llevo a cabo fue en el laboratorio, realizada en una o varias series, se realizo con los mismos reactivos y patrones, el mismo día, por diferentes analistas.

Tabla 39 Valores de reproducibilidad

	valoración	
	%	cantidad
Analista A	103.27	758.04
Analista B	105.73	775.04

7.2.3. Determinación de la Especificidad:

Se diferencio el analito de interés que fue la Neomicina en el producto Nineka suspensión, aunque la formulación contiene pectina y caolín la técnica únicamente sirve y forma halos de inhibición en relación con la concentración del antibiótico Neomicina como se muestra en la figura 34.



Figura 18. Especificidad de Neomicina

Esto se logra filtrando la muestra llevando a cabo las 3 diluciones que marca la FEUM para poder llegar a una concentración de 1mg/ml de realizar la curva tipo, la filtración se realizo entre la dilución 1 para pasar a la 2da dilución tomando de la primera dilución 3ml para seguir con las diluciones posteriores y así 2 reteniendo así la concentración deseada. Esta filtración nos vas ayudo a retener el caolín y la pectina de la muestra a valorar permitiendo obtener únicamente el paso de Neomicina que es soluble y un bajo porcentaje de caolín y pectina.

Criterio de aceptacion

La respuesta del método únicamente debe ser debida al análito.



7.2.4. Determinación de la Linealidad:

Un analista debe preparar por lo menos 5 niveles de concentración de la solución de referencia ya sea por dilución o por pesadas independientes. La concentración central debe ser igual al 100% en la muestra procesada para su medición. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración contra respuesta analítica. *Ver anexo 5*

Criterios de Aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

Se va a determinar por medio de la concentración del analito y la respuesta, dictaminando si la técnica produce resultados directa o indirectamente proporcionales a la concentración. (FEUM 9 ed.)[4]

De los resultados obtenidos de las potencias realizadas se debe calcular un contraste lineal L_p

$$L_p = -2a - b + d + 2e$$

Tabla 40 Valores de la linealidad

b	2.247
M	-0.0890
R	0.981

Por medio de los resultados obtenidos se calculo por el método de mínimos cuadrados (FEUM 9na ed.):

El valor de la pendiente con la formula:

$$b = \frac{L_p}{90 \log\left(\frac{d_3}{d_2}\right)}$$

Calcular el logaritmo de la muestra de la potencia relativa de la muestra

$$M = \frac{\text{muestra}}{9 * b}$$

Po lo tanto se calcula el coeficiente de correlación r



$$r = 10^M$$

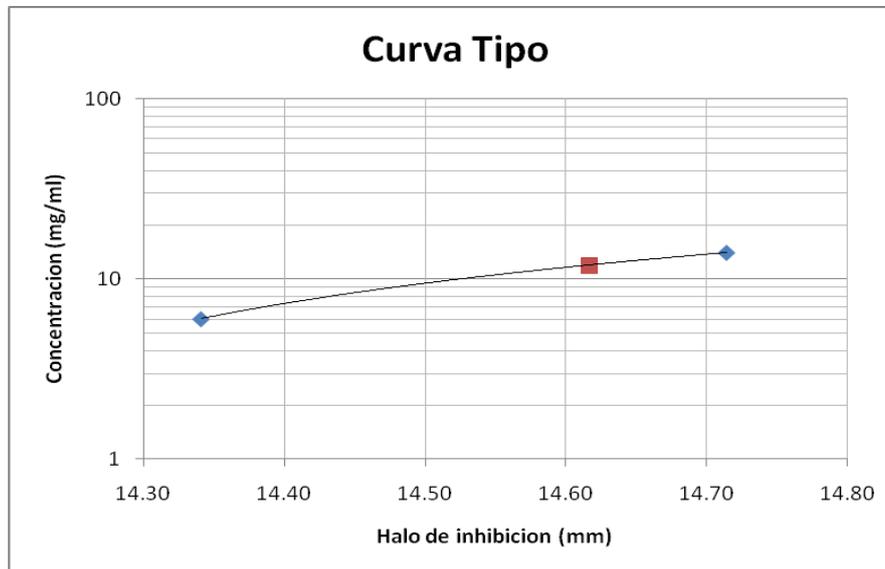


Figura 19.- Ejemplo de grafica con linealidad

8.- CAMBIOS REALIZADOS UNA VEZ REALIZADA LA VALIDACION

Lo que se esperaba en esta etapa es cambiar algunos de los puntos que la FEUM nos indica que se deben realizar en su MGA-100 como llevar a cabo:

Los datos que se muestran en los puntos 7.2.1 hasta 7.2.4 se llevaron a cabo bajo los puntos que se querían cambiar en la metodología en la FEUM que son:

- La siembra del microorganismo llevarlo de tubos a cajas petri estériles con agar, ya que tiene mayor área superficial, por lo tanto sería equivalente a la cantidad de tubos que la FEUM nos indica que es necesario.

Esto fue posible ya que se demostró experimentalmente que el crecimiento del microorganismo es exactamente igual que en el tubo de agar, se decidió dejar la caja petri debido a que tiene una mayor área superficial y esto nos permite disminuir la cantidad de agar empleado para la cultivación del microorganismo como se muestra en la tabla 41:

Tabla 41.- Resultados para el tratamiento del microorganismo



Caja petri	Tubo de ensaye con rosca de vaquelita
<ul style="list-style-type: none">• Mayor area superficial de crecimiento• Es necesario 21ml de agar por caja petri• Se necesitan 2 cajas para la valoración de la muestra	<ul style="list-style-type: none">• Menor area de superficie de crecimiento• Es necesario 15 ml de agar por tubo de ensaye• Se necesitan 6 tubos para la valoración de la muestra

- Se busco que la trasmitancia del microorganismo no se lleve a la dilución según el factor que marca la FEUM por el microorganismo de prueba , por lo cual se busco un margen de trasmitancia de la solución concentrada para poder omitir el paso de realización del factor de dilución (fd) correspondiente.

Se trabajo con la trasmitancia del microorganismo ya que la FEUM nos indica que deben realizarse un factor de dilución para el microorganismo: *S. aureus* fd=1:20 (1ml de la suspensión original y 19 ml de solución salina al 1%) y leer en el espectrofotómetro el por ciento de trasmitancia a 580nm, la dilución de la suspensión original debe tener una lectura del 25% \pm 2., esto se logro modificar realizando en las 3 potencias las diluciones como se muestra en la tabla 36, en las cuales también se midió la absorbancia de la solución concentrada como se muestra en la tabla 36.

Tabla 42.- valores de la trasmitancia de *S. aureus*

Factor de dilución 1/20	Solución concentrada
24.6	1.2
25.4	1.2
26.8	1.2

Teniendo así como resultado que para llevar acabo el método se puede medir la trasmitancia de la solución concentrada con una lectura de 1.2, evitando de esta forma la realización del factos de dilución 1/20 para este microorganismo.

- La eliminación del agua de condensación en las cajas petri durante la incubación de las mismas, posterior a la lectura de los halos de inhibición.



“VALIDACION DE LA ADECUACIÓN DEL MÉTODO FARMACOPEICO PARA LA VALORACIÓN DEL ANTIBIÓTICO NEOMICINA , POR DIFUSIÓN EN AGAR , PARA ASEGURAR LA FIABILIDAD DE LOS RESULTADOS”



La eliminación del agua de resolvió colocando las cajas petri en la incubadora lo más separadas posibles y sin empalmar lo menos posible una sobre otra debido a que esto provoca agua de condensación a lo largo de su incubación, en dado caso que se llegase a formar una mínima cantidad de agua antes de la lectura de las placas se soluciono quitando la tapa de las cajas antes de sacarlas de la incubadora evitando asi que el agua desprenda gotas sobre la placa en el transcurso la incubadora el lugar de lectura, alterando así los resultados debido a que puede llegar a interferir por el barrido que el microorganismo puede sufrir.

Es muy importante antes de validar saber que parte del método se va a cambiar o adecuar para obtener una mayor fiabilidad de los resultados, teniendo así la validación de la adecuación del método farmacopéica cumpliendo con los parámetros de desempeño, para el laboratorio de microbiología.

Tabla 43 Resultados de los parámetros de desempeño

Parámetro de desempeño	Prueba	Criterio de aceptación	Resultado
Exactitud	Porcentaje de recobro	El porcentaje de recobro no debe ser mayor al 3%	2.37%
Precisión	Coefficiente de variación	$CV \leq 3\%$	2.46%
Especificidad	Especificidad	La respuesta del método únicamente debe de ser del analito	cumple
Linealidad	Coefficiente de correlación r^2	$r \geq 0.98$	0.981
Intervalo	Intervalo de confianza	90-110%	105.3%



8.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para poder llevar a cabo la validación de la valoración del antibiótico Neomicina para el laboratorio de microbiología en la empresa Novag Infancia S.A. de C.V., se desarrollo en 2 etapas muy importantes para poder obtener la fiabilidad de los resultados de cada etapa. En primer lugar se tuvo que llevar a la reproducibilidad el método indicado en la FEUM para ver si las especificaciones que nos indica dicho texto oficial coinciden con las que cuenta el laboratorio y una vez teniendo esto en cuenta proceder con la segunda etapa que es la mas importante para esta validación debido a que los parámetros que se desean cambiar serán evaluados en esta etapa para ver si el método es reproducible o no.

Lo primero que se tiene que hacer cuando vas a validar una adecuación de un método farmacopéico es comprobar que se cuenta con todo lo necesario ya sean equipos, material, medios de cultivo, microorganismos, etc, que se vaya a utilizar para llevar a cabo la prueba, una vez que comprobamos que se cuenta con todo lo necesario debemos llevar a la reproducibilidad dicho método en estamos hablando del método para la valoración de un antibiótico, una vez que se llevó a la reproducibilidad se detectaron los puntos en los cuales se hizo la adecuación debido a que el laboratorio no cumplía con todas las condiciones y materiales para que se realizara el experimento según la FEUM, por lo tanto se prosiguió quedarse con un solo microorganismo debido a la comodidad y la facilidad para dejar establecido solo uno de los 2 que marca la FEUM.

Para la etapa 1 lo que se pretendía era eliminar a uno de los microorganismos que la FEUM nos sugiere para llevar a cabo la técnica farmacopéica de la valoración del antibiótico Neomicina, y dejar asentado en el procedimiento validado dentro del laboratorio de microbiología la técnica con el microorganismo de mayor facilidad de manejo y que cumpla las especificaciones requeridas para la evaluación de dicha técnica.

La valoración del antibiótico se dividió en 5 días o 1 semana completa, en la primera etapa se tuvo que realizar la valoración exactamente como indica la FEUM con los 2 microorganismos, bajo las condiciones que marcaba, para esto se analizo un lote que el área de Producción facilitó para poder hacer la selección de uno de los microorganismos, el lote que se proporcionó fue el lote Nineka 10938. Con el cual se realizaron 3 potencias con cada microorganismo, cada una de ella se metió con parámetros idénticos para los 2 diferentes microorganismos como son la temperatura



que estuvo dentro del rango de 33-35 °C, incubando un tiempo de 17 horas por potencia, se prosiguió a medir los halos de igual forma y tratar los datos para poder calcular el resultado de la valoración como se muestra en los resultados.

Es importante tomar en cuenta que durante la valoración hay que cuidar parámetros que pueden llegar a afectar a la prueba como son la temperatura del medio de cultivo de la capa siembra, la temperatura a la cual se incuba la prueba, el tiempo de incubación que sea exacto, el agua de condensación, que estos fueron los parámetros que se cambiaron durante la validación.

De las 3 potencias que se realizaron se puede analizar que el microorganismo más adecuado para la validación es *Staphylococcus aureus* con ATCC 6538P debido a que hay una gran facilidad en su manejo y que cumple con las especificaciones de la FEUM la cual nos dice que el diámetro de los halos de inhibición del antibiótico debe estar en un promedio de los 14-16mm lo cual *Staphylococcus epidermidis* con ATCC 12228 tiene valores por debajo de ese parámetro.

Además de que visiblemente los halos de inhibición para *S. aureus* son muy notables y sin problemas de lectura callendo dentro de los parámetros de valoración para el antibiótico Neomicina de 90-110%. Lo especificado en su monografía interna de la empresa.

Las 3 potencias realizadas fueron del mismo frasco tomando las alícuotas necesarias para poder llevar a cabo el análisis. Tomando en cuenta que la efectividad de la suspensión disminuyó de la primera potencia a la tercera debido a que una vez que el frasco se abre la duración de fases homogéneas es de un poco más de una semana, debido a que se empieza a oscurecer la suspensión y se empieza a formar una piedra en el fondo del frasco contenedor, perdiendo así posiblemente parte del sulfato de Neomicina a valorar, por lo cual hay una diferencia entre una potencia y otra de aproximadamente 5 unidades del mismo microorganismo.

Esta primera etapa arrojó como resultado que el microorganismo con el cual se va a validar la técnica farmacopéica con el microorganismo *S. aureus* por su excelente manejo y desarrollo a lo largo del análisis, además de que su crecimiento es mucho más rápido y proliferado que *S. epidermidis*.

Para la segunda etapa ya que se tenía el microorganismo con el cual se valido la adecuación nos enfocamos a los puntos que queríamos eliminar o bien modificar ya que causaba problemas y repercutía en ocasiones en la lectura de los halos de inhibición, para esto la FEUM nos indica como poder validar la adecuación que se le hizo al laboratorio de microbiología en el cual nos basamos en la categoría 1 donde es posible evaluar únicamente al analito de interés bajo los parámetros de desempeños



que ya se describieron más arriba en el trabajo, por lo tanto lo único que se prosiguió a realizar fueron los cálculos de los parámetros y deliberar si la técnica con los cambios propuestos era realmente confiable para poder aplicarlo ya al laboratorio de microbiología, y checando los resultados obtenidos se puede deducir que la adecuación del método es optima debido a que el porcentaje de valoración que se obtiene ya con los cambios realizados, están dentro de los limites de valoración para la Neomicina, como se puede observar nunca sobrepasa el 110 % de la potencia del antibiótico, esto esta ya especificado en la monografía interna de la empresa.

Es muy importante que para poder adecuar un método o técnica farmacopeica se tenga en cuenta que es lo que se va a realizar ya que puntos en la técnica se puede adecuar o modificar esperando que el método cumpla con el propósito, en este caso el adecuar el método no causo problema ya que al valorar de nuevo el antibiótico Neomicina se observo que los resultados obtenidos tienen la misma tendencia que la técnica mencionada en la FEUM.

9.- CONCLUSIONES

- Es necesario validar los métodos o técnicas farmacopéicas dentro del laboratorio especificando los parámetros con los que cuenta dicho laboratorio debido a que los métodos que contiene la farmacopea están en condiciones específicas como son temperatura de incubación, tiempo de incubación, etc. Para esto el laboratorio debe encargarse de llevar acabo la reproducibilidad de los métodos que se encuentran en la farmacopea, para así poder llevarlos a la practica en el laboratorio, una vez que ya se llevo acabo la reproducibilidad nos arrojó los resultados que se tenia que adecuar de tal forma que el método producirá resultados confiables, para así poder realizar un PNO y se estableciera en este las adecuaciones relajadas durante la etapa de validación.
- Para los laboratorios de análisis microbiológico es importante desarrollar técnicas que produzcan confiabilidad de los resultados, lo cual se logra a través de la validación de dichos métodos, ya que de esta forma se consigue emitir resultados exactos puesto que el laboratorio de microbiología tiene la responsabilidad de analizar emitir datos importantes para la empresa a niveles económicos y de calidad.



- Los resultados obtenidos nos demuestra que el microorganismo *Staphylococcus aureus* es el mas optimo para llevar acabo la validación de la técnica según la FEUM MGA-100 para el laboratorio de microbiología, ya que en comparación con el *Staphylococcus epiermidis* el inconveniente mas es el tiempo de crecimiento, esto puede llegar a ser un gran problema debido a que en la industria es necesario emitir resultados lo antes posible, pero siempre bajo los límites establecidos tanto por la FEUM como por los lineamientos internos de la propia empresa.
- Es importante dentro de la industria farmacéutica asegurar la calidad de los productos por medio de pruebas que puedan llegar a cuantificar la eficiencia de algunos fármacos, como lo es la técnica de la valoración de un antibiótico para asegurar que este cumpla con su potencia, para eso se valora y se emite un resultado ya sea aprobatorio o de rechazo, si llegase a ser negativo el resultado o bien rechazado el lote se detiene, esto quiere decir que no esta en este caso el Nineka cumpliendo con su potencia y los resultados están por fuera de los limites especificados, en caso de que cumpla con los limites de especificación y su potencia este entre el 90-11% se aprueba y es dictaminado por el laboratorio de microbiología ,para que una vez aprobado se dictamine por las demás áreas en colaboración como inspección y control de calidad.

10.- SUGERENCIA PARA ESTANCIA FUTURAS

10.1. Para la empresa

- Dirigir la estancia a una actividad especifica con posibilidades de conocer la mayoría de las actividades de la empresa para un conocimiento general del campo de trabajo.
- Tener revisiones programadas con avances
- Seguir apoyando a los alumnos de ser ingenieros titulados y motivar las aptitudes y habilidades de cada uno.
- Una capacitación para el manejo de relaciones humanas ya que es necesaria una correcta relación con el personal de planta como supervisores, operadores, etc., para un trabajo eficiente.



10.2. Para los alumnos

- Dar y aportar siempre lo mejor de cada uno y aprovechar oportunidades de aprendizaje
- Desarrollar una sana comunicación de compañerismo así como el buen trato de relaciones humanas.
- Llevar una bitácora de actividades diarias para un mejor reporte final y una mejor organización con respecto a la empresa.
- Es importante realizar estancias industriales, ya que vos sirven para un desarrollo profesional en el área productiva y da pauta para aplicar los conocimientos adquiridos dando como resultado una experiencia laboral
- Es recomendable que al realizar una estancia industrial dentro del area de calidad o de producción en cualquier industria farmacéutica los estudiantes tengan conocimientos básicos sobre las normas que actualmente rigen a estas industrias.
- Es importante aprender a relacionarse con todo el personal que labora dentro de la empresa ya que de esta forma las actividades que realicen serán mas fáciles de llevar.
- Desempeñar el trabajo de manera eficaz y segura

12.- BIBLIOGRAFIA

12.1. Libros o textos Oficiales

[1] Bock Thomas D., Smith David W., 1987. *Microbiología*, Cuarta Edición. México, Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A.

[2] Comisión Interinstitucional de prácticas adecuadas de manufactura México, 1992. *Guía para el Control Microbiológico de Medicamentos*. CIPAM. Paginas consultadas: 32-39

[3] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.2004. 8va. Edición. Paginas consultadas: 343-352. MGA. 0100.



[4] Farmacopea de los Estados Unidos de América, Formulario Nacional. Comprendida de Normas Oficiales. 1992. Vol.1. Edición en Español. Editorial U.S. Pharmacopeia. Paginas consultadas: 111-117.

[5] Fernández Mirna C. *Estudio de la actividad antimicrobiana de la combinación quitina- gentamicina*, Instituto de Farmacia y Alimentos

[6] Padilla José Esteban , *Validación secundaria del método de recuento en placa de superficie con Staphylococcus aureus en muestras de laboratorio*, facultad de ciencias, Bogota.

[7] Pelcazar Michael J., Reid Roger D, 1995. *Microbiología*. Cuarta Edición. México, D.F. E Editorial Mc Graw Hill. Paginas consultadas: 403-432

[8] Pradeau Dominique, 1998. *Análisis Químicos de los Farmacéuticos de Medicamentos*. Primera Edición. México, D.F. Editorial Uteha Noriega Editores. Páginas consultadas: 112-141

[9] Prescott Lansing M., Jonh P. Harley, Klein Donald A., 2001. *Microbiología*. Segunda Edición. México, D.F. Editorial Mc Graw Hill. Paginas consultadas: 700-718

[10] Stanier Roger Y., Ingraham John L, Wheelis Mark L, Painter Page R, 1990. *Microbiología*. Segunda Edición México, D.F. Editorial Reverte S.A.. Paginas consultadas: 715-725

12.2. Normas

[11] NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.

[12] NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos.

[13] NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.



12.3. Electrónicas

[14] <http://www.wiziq.com/educational-tutorials/presentation/9828-Antibioticos>

[15] [www.http://ingenieria.udea.edu.co/grupos/microbiol/control3.ppt](http://www.ingenieria.udea.edu.co/grupos/microbiol/control3.ppt)

[16] www.emagister.com/master/antibioticos-tps-1417530.htm

[17] www.biol.unlp.edu.ar/farmacia/control/control_teorico.htm

[18] www.farmacia.unal.edu.co/V20P55-58.pdf

[19] GUIDELINE ON GENERAL PRINCIPLES OF PROCESS VALIDATION, FDA, MAY 1987 <http://www.fda.gov/cder/guidance/pv.htm>

[20] Orientación de Validación de Proceso, GHTF, Junio 29, 1999 <http://www.ghtf.org>

[21] Sec. 490.100 Process Validation Requirements for Drug Products and Active Pharmaceutical Ingredients Subject to Pre-Market Approval (CPG 7132c.08), FDA, Revised 3/12/04 http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/cpg/cpgdrg/cpg490-100.html

12.4. Artículos

[22] *Productos Farmacéuticos*. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos.

[23] *Validación de métodos microbiológicos y biológicos*, Referencia USP 29, Farmacopea Mexicana.

[24] *Validación de métodos microbiológicos*, Protocolo de validación. Norma ISO 17025

[25] *Guía de practica de microbiología industrial*. Facultad de farmacia Universidad de Madrid.



GLOSARIO

Adecuabilidad del sistema: Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

Analito: Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

ATCC: American Type Cell Collection

Bactericida: es aquel que produce la muerte a una bacteria. Un efecto bactericida está producido por sustancias bactericidas. Estas sustancias son secretadas por los organismos como medios defensivos contra las bacterias. antimicrobianos de efecto lísico o lítico (Lisis) en las bacterias, provocan una reducción en la población bacteriana en el huésped o en el uso de sensibilidad microbiana.

Bacterioestático: es aquel que aunque no produce la muerte a una bacteria, impide su reproducción; la bacteria envejece y muere sin dejar descendencia. Un efecto bacteriostático está producido por sustancias bacteriostáticas. Estas sustancias son secretadas por los organismos como medios defensivos contra las bacterias.

Calibración: Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.

Documentación: Conjunto de información que sustenta una actividad realizada

Especificaciones: Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.

FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos de América

m.o.: Microorganismos

Muestra: Porción del material a evaluar.

Muestra analítica: Porción del material a evaluar de acuerdo al método analítico.

Muestra adicionada: Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito.

Parámetros de desempeño: Parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación.



Placebo analítico: Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del análisis.

Placebo adicionado: Muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida del análisis.

PNO's: Procedimiento Normalizado de Operación

S.aureus: *Staphylococcus aureus*

S.epidermidis: *Staphylococcus epidermidis*



Anexo 1

Memoria de cálculo de la curva Tipo para la valoración del antibiótico Neomicina Según la FEUM 8va edición.

Cálculos para la **solución concentrada**.

$$C = \frac{m}{v} \quad C = \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} = 1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

- ❑ Pesar 10mg de sulfato de Neomicina a partir de un estándar de referencia USP
- ❑ Transferir la cantidad pesada a un matraz de 10 ml y aforar con solución reguladora de fosfatos (**solución concentrada**). La solución tiene una concentración de 1mg/ml.
- ❑ Se van a realizar 2 curvas tipos para los diferentes microorganismos a partir de la **solución concentrada**.

-*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

-*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Para **S. aureus** ATCC 6538P

- ❑ De la solución concentrada Tomar un a alícuota de 5ml y aforar a 50 ml

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad C_2 = \frac{C_1 V_1}{V_2}$$

Sustituyendo para la **solución stock**

$$C_2 = \frac{1 \text{ mg}}{\text{ml}} \frac{5 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 0.1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

Para que se pueda llegar a una concentración de 10μ/ml (FEUM) con el microorganismo *S. aureus*, se necesita determinar que volumen se va a utilizar como concentración media (**Punto C**), y así poder proponer 2 puntos superiores y 2 inferiores, y una vez conociendo este volumen proponer los 5 puntos de la curva.



$$C_1=100 \mu\text{g/ml}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$C_2=10\mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = \frac{10\mu\text{g}}{\text{ml}} \frac{50\text{ml}}{100\mu\text{g}} = 5\text{ml}$$

$$V_2=50 \text{ ml}$$

- ☒ De la solución stock transferir a 5 matraces volumétricos de 50 ml los siguientes volúmenes: 3.0 ml, 4.0 ml, 5.0 ml, 6.0 ml y 7.0 ml. Los cuales correspondan a los 5 puntos de la curva tipo que corresponden a las letras a, b, c, d y e. Aforar con solución reguladora de fosfatos

- Punto A (3ml)

$$C_1=0.1\text{mg/ml}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$

$$V_1=3\text{ml}$$

$$C_2 = \frac{0.1\text{mg}}{\text{ml}} \frac{3\text{ml}}{50\text{ml}} = 0.006 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

$$V_2=50\text{ml}$$

- Punto B (4ml)

$$C_1=0.1\text{mg/ml}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$

$$V_1=4\text{ml}$$

$$C_2 = \frac{0.1\text{mg}}{\text{ml}} \frac{4\text{ml}}{50\text{ml}} = 0.008 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 8 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

$$V_2=50\text{ml}$$

- Punto C (5ml)

$$C_1=0.1\text{mg/ml}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$

$$V_1=5\text{ml}$$

$$C_2 = \frac{0.1\text{mg}}{\text{ml}} \frac{5\text{ml}}{50\text{ml}} = 0.01 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

$$V_2=50\text{ml}$$

- Punto D (6ml)

$$C_1=0.1\text{mg/ml}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$



$$V_1=6ml$$

$$C_2 = \frac{0.1mg}{ml} \frac{6ml}{50ml} = 0.012 \frac{mg}{ml} = 12 \frac{\mu g}{ml}$$

$$V_2=50ml$$

- Punto E (7ml)

$$C_1=0.1mg/ml$$

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$

$$V_1=7ml$$

$$C_2 = \frac{0.1mg}{ml} \frac{7ml}{50ml} = 0.014 \frac{mg}{ml} = 14 \frac{\mu g}{ml}$$

$$V_2=50ml$$

Para *S. epidermidis* ATCC 12228

- ❏ De la solución concentrada Tomar un a alícuota de 1ml y aforar a 100 ml

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad C_2 = \frac{C_1C_2}{V_1}$$

Sustituyendo para la **solución stock**

$$C_2 = \frac{1 mg}{ml} \frac{1ml}{100 ml} = 0.01 \frac{mg}{ml} = 10 \frac{\mu g}{ml}$$

Para que se pueda llegar a una concentración de 1μ/ml (FEUM) con el microorganismo *S. epidermidis*, se necesita determinar que volumen se va a utilizar como concentración media (**Punto C**), y así poder proponer 2 puntos superiores y 2 inferiores, y una vez conociendo este volumen proponer los 5 puntos de la curva.

$$C_1=10 \mu g/ml$$

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$C_2=1\mu g/ml$$

$$V_1 = \frac{1\mu g}{ml} \frac{50ml}{10\mu g} = 5ml$$

$$V_2=50 ml$$

- ❏ De la solución stock transferir a 5 matraces volumétricos de 50 ml los siguientes volúmenes: 3.0 ml, 4.0 ml, 5.0 ml, 6.0 ml y 7.0 ml. Los cuales correspondan a los 5 puntos de la curva tipo que corresponden a las letras a, b, c, d y e. Aforar con solución reguladora de fosfatos



- Punto A (3ml)

$$C_1=0.01\text{mg/ml}$$

$$V_1=3\text{ml}$$

$$V_2=50\text{ml}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$
$$C_2 = \frac{0.01\text{mg} \cdot 3\text{ml}}{\text{ml} \cdot 50\text{ml}} = 0.0006 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 0.6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

- Punto B (4ml)

$$C_1=0.1\text{mg/ml}$$

$$V_1=4\text{ml}$$

$$V_2=50\text{ml}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$
$$C_2 = \frac{0.01\text{mg} \cdot 4\text{ml}}{\text{ml} \cdot 50\text{ml}} = 0.0008 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 0.8 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

- Punto C (5ml)

$$C_1=0.1\text{mg/ml}$$

$$V_1=5\text{ml}$$

$$V_2=50\text{ml}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$
$$C_2 = \frac{0.01\text{mg} \cdot 5\text{ml}}{\text{ml} \cdot 50\text{ml}} = 0.001 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 0.1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

- Punto D (6ml)

$$C_1=0.1\text{mg/ml}$$

$$V_1=6\text{ml}$$

$$V_2=50\text{ml}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$
$$C_2 = \frac{0.01\text{mg} \cdot 6\text{ml}}{\text{ml} \cdot 50\text{ml}} = 0.0012 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 0.12 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

- Punto E (7ml)

$$C_1=0.1\text{mg/ml}$$

$$V_1=7\text{ml}$$

$$V_2=50\text{ml}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$
$$C_2 = \frac{0.01\text{mg} \cdot 7\text{ml}}{\text{ml} \cdot 50\text{ml}} = 0.0014 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 0.14 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$



Anexo 2

Primera potencia *S. aureus*

Tabla 9.- Datos de la primera potencia con *S.aureus* (mm)

a	c	b	c	d	c	e	c	10938	c
13,8	14,6	14,2	14,2	14	13,8	14,8	14,2	14,4	14,2
14,2	15	14,4	13,8	14	14,4	15	14,2	14	13,8
14	14	13,8	14,4	14,6	13,8	14,8	15	14,2	15,6
14,2	14	15	16	15,6	14,8	14,8	14	14,4	14,2
13,8	15	15,6	14,6	14,8	15	14,4	14,6	14,4	14,6
14,2	15,2	14	14,8	14,6	14,2	15	14,6	14,8	14,6
13,4	14,4	14	14	14	14,4	14,2	14,2	14,8	14,4
14	14,4	14,4	14,4	14,8	14,4	14,2	14,2	14	14
14	14,2	14,6	15,8	14,2	14,2	15,6	15,6	14,8	14,2
13,96	14,53	14,44	14,67	14,51	14,33	14,76	14,51	14,42	14,40

Tabla 10.- Datos de la potencia con *S. aureus*

Diferencias de "c"	Valores corregidos	volumen	Conc	Conc µg/ml		
C	-0,02	a	13,93	3	0,006	6
C	-0,16	b	14,29	4	0,008	8
C	0,18	d	14,69	5	0,010	10
C	0,00	e	14,76	6	0,012	12
C	0,11	10938	14,53	7	0,014	14

Segunda potencia *S. epidermidis*

Tabla 14.- Datos de la segunda potencia con *S.epidermidis*(mm)

a	c	b	c	d	c	e	c	10938	c
14,00	14,60	14,00	14,00	15,00	14,60	15,60	14,80	14,20	15,80
14,20	13,80	13,80	14,40	14,60	14,40	15,30	14,60	16,20	14,80
13,80	14,00	14,20	14,60	14,40	13,80	15,20	14,80	15,00	14,60
13,80	14,40	14,00	14,40	15,00	14,00	15,00	14,80	14,40	14,60
14,40	14,20	14,20	14,60	14,40	13,80	14,20	15,00	16,00	13,80
14,00	14,60	14,00	15,00	14,00	14,20	14,60	14,60	14,20	16,40



“VALIDACION DE LA ADECUACIÓN DEL MÉTODO FARMACOPEICO PARA LA VALORACIÓN DEL ANTIBIÓTICO NEOMICINA , POR DIFUSIÓN EN AGAR , PARA ASEGURAR LA FIABILIDAD DE LOS RESULTADOS”



13,60	14,40	14,00	13,80	14,20	14,00	14,20	15,20	14,60	13,60
14,20	14,00	13,60	14,00	15,60	14,40	14,80	14,80	14,80	14,20
14,00	14,20	14,00	14,20	14,80	14,60	14,20	14,40	14,40	16,20
14,00	14,24	13,98	14,33	14,67	14,20	14,79	14,78	14,87	14,89

Tabla 15.- Datos de la potencia con *S. epidemidis*

Diferencias de "c"	Valores corregidos		volumen	Conc	Conc µg/ml	
C	0,14	a	14,14	3	0,006	6
C	0,06	b	14,03	4	0,008	8
C	0,19	d	14,86	5	0,010	10
C	-0,39	e	14,40	6	0,012	12
C	-0,50	10938	14,37	7	0,014	14

Segunda potencia *S. aureus*

Tabla 19.- Datos de la primera potencia con *S.aureus* (mm)

a	c	b	c	d	c	e	c	10938	c
14,20	14,60	15,60	16,00	15,60	15,00	15,80	15,00	16,40	16,20
14,00	13,80	15,80	15,80	15,80	14,80	16,40	15,80	16,20	16,40
14,00	14,00	14,60	15,40	16,00	16,00	16,40	15,60	16,00	16,20
14,80	15,00	15,00	15,80	15,80	15,80	16,40	15,40	15,40	15,80
14,00	14,40	16,00	16,20	15,60	16,00	16,00	15,40	16,00	16,40
14,80	15,20	16,40	15,00	16,00	15,80	16,40	16,20	15,20	14,80
14,80	15,20	14,20	15,00	16,00	15,80	16,60	15,00	16,20	15,60
14,00	15,60	14,40	15,20	15,80	15,60	16,40	15,00	15,40	15,60
14,40	15,40	14,80	15,60	15,40	15,20	15,80	16,00	16,00	14,80
14,33	14,80	15,20	15,56	15,78	15,56	16,24	15,49	15,87	15,76

Tabla 20.- Datos de la potencia con *S. aureus*



“VALIDACION DE LA ADECUACIÓN DEL MÉTODO FARMACOPEICO PARA LA VALORACIÓN DEL ANTIBIÓTICO NEOMICINA , POR DIFUSIÓN EN AGAR , PARA ASEGURAR LA FIABILIDAD DE LOS RESULTADOS”



Diferencias de "c"		Valores corregidos		volumen	Conc	Conc µg/ml
C	0,55	a	14,88	3	0,006	6
C	-0,21	b	14,99	4	0,008	8
C	-0,21	d	15,57	5	0,010	10
C	-0,14	e	16,11	6	0,012	12
C	-0,41	10938	15,46	7	0,014	14

Tercera potencia *S. epidermidis*

Tabla 24.- Datos de la segunda potencia con *S.epidermidis* (mm)

a	c	b	c	d	c	e	c	10938	c
14,00	14,60	14,40	14,40	14,60	14,60	14,20	15,20	15,00	14,40
14,20	14,60	13,60	14,60	14,40	14,80	15,60	14,80	14,80	14,80
13,80	14,20	14,40	14,80	14,40	15,00	14,40	14,60	14,20	15,20
13,20	14,40	14,20	13,80	15,00	14,80	15,00	15,00	14,40	14,40
14,40	13,80	15,00	14,60	15,40	14,40	15,20	14,60	14,20	14,00
14,00	13,60	14,40	14,60	14,60	14,80	14,40	15,20	15,40	14,20
14,40	14,00	14,40	14,00	14,40	15,20	14,60	14,00	14,80	15,20
14,00	13,80	13,80	15,60	15,60	14,60	15,00	14,20	14,00	14,60
14,20	14,20	14,60	14,40	14,00	14,60	14,20	13,80	14,40	14,80
14,02	14,13	14,31	14,53	14,71	14,76	14,73	14,60	14,58	14,62

Tabla 25.- Datos de la potencia con *S. epidermidis*

Diferencias de "c"		Valores corregidos		volumen	Conc	Conc µg/ml
C	0,37	a	14,39	3	0,006	6
C	-0,03	b	14,28	4	0,008	8
C	-0,25	d	14,46	5	0,010	10
C	-0,09	e	14,64	6	0,012	12
C	-0,12	10938	14,46	7	0,014	14

Tercera potencia *S. aureus*

Tabla 29.- Datos de la primera potencia con *S.aureus* (mm)



“VALIDACION DE LA ADECUACIÓN DEL MÉTODO FARMACOPEICO PARA LA VALORACIÓN DEL ANTIBIÓTICO NEOMICINA , POR DIFUSIÓN EN AGAR , PARA ASEGURAR LA FIABILIDAD DE LOS RESULTADOS”



a	c	b	c	d	c	e	c	10938	c
14,40	15,00	13,80	14,40	15,40	15,40	15,20	14,80	15,40	15,80
14,80	14,80	14,60	14,00	16,40	15,00	15,60	15,20	16,80	15,80
14,20	14,00	15,20	14,80	14,00	15,20	16,00	15,40	16,40	16,20
13,80	14,20	14,00	14,20	15,60	14,80	15,00	16,20	15,80	15,60
14,40	14,60	14,40	14,80	15,40	14,80	15,80	15,40	16,00	16,20
14,40	14,60	15,40	14,40	15,00	15,60	16,40	14,60	15,20	15,40
14,60	14,20	14,00	14,80	16,40	15,40	15,40	16,20	15,80	15,00
14,00	14,00	16,00	15,00	14,80	16,40	15,40	15,40	15,00	15,80
14,20	15,00	15,00	14,20	16,00	15,00	15,20	15,40	16,00	15,60
14,31	14,49	14,71	14,51	15,44	15,29	15,56	15,40	15,82	15,71

Tabla 30.- Datos de la potencia con *S. aureus*

Diferencias de "c"		Valores corregidos		volumen	Conc	Conc µg/ml
C	0,43	a	14,74	3	0,006	6
C	0,41	b	15,12	4	0,008	8
C	-0,37	d	15,08	5	0,010	10
C	-0,48	e	15,08	6	0,012	12
C	-0,79	10938	15,03	7	0,014	14



Anexo 3

Especificaciones de los microorganismos según la FEUM

Tabla 44.- Microorganismo de prueba preparación del inóculo

Microorganismo de prueba ATCC NUM.	Antibiótico (Método de prueba)	Medio de cultivo Num.	Condiciones de incubación		Factor de dilución	Duración de refrigeración	Volumen (ml) de inóculo sugerido para 100ml de CS
			Temp °C	Tiempo			
<i>Staphylococcus aureus</i> (A) ATCC 6538P	Neomicina (Cilindro en placa)	1	32-35	24 h	1:20	1 semana	1.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (D) ATCC 12228	Neomicina (Cilindro en placa)	1	32-35	24 h	1:24	1 semana	1.0

Tabla 45.- Método de difusión en agar preparación de placas

Antibiótico	Medio de Cultivo (num)		Medio de Cultivo (ml)		Microorganismo de prueba clave	Volumen (mL) de inóculo sugerido para cada 100 mL de capa siembra	Temperatura de incubación (°C)
	Capa Base	Capa Siembra	Capa Base	Capa Siembra			
Neomicina	11	11	21	4	A	1.0	32-35
Neomicina	11	11	21	4	D	1.0	32-35

Tabla 46.- Método de difusión en agar curva dosis respuesta

Antibiótico	Sref		Diluciones de prueba de la curva dosis respuesta		
	Concentración final de la solución base por mL	Duración en refrigeración (días)	Concentración media (U o µg) por mL (c)	microorganismo	Factor de dilución
Neomicina	1 mg	14	1.00mg	D	1,25
Neomicina	1 mg	14	10.00mg	A	1,25



Anexo 4

❏ Calcular la valoración del antibiótico

Siguiendo la ecuación de la recta

$$y = mx + b$$

X	Y
puntos	conc
13,35	6
14,47	14
13,93	10,13

Calcular m

$$m = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1} = \frac{14 - 6}{14,47 - 13,35} = 7,09$$

Calcular b por medio de regresión lineal en calculadora

$$b = -88,57$$

Sustituyendo la ecuación de la recta

$$y = mx + b = 7,09 * 13,93 + (-88,57) = 10,55 \mu\text{g}$$

m	7,09
b	-88,57

Calculando la valoración

$$\begin{array}{l} 10,55 \mu\text{g} \text{-----} x \\ 1000 \mu\text{g} \text{-----} 1\text{mg} \end{array} \quad x = 0,01055 \text{ mg}$$

$$\frac{0,0105 \text{ mg}}{\text{ml}} * \frac{25\text{ml}}{7\text{ml}} * \frac{50\text{ml}}{3\text{ml}} * \frac{50\text{ml}}{3\text{ml}} * \frac{75\text{ml}}{75\text{ml}} = 784,97 \text{ mg}$$

$$\% \text{valoracion} = \frac{753,42\text{mg}}{733\text{mg}} * 100 = 102,79\%$$

Calculando valoración

Valoración	
%	102,79
cantidad	753,42



Anexo 5

FORMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA LA LINEALIDAD

A) FORMULAS

Pendiente

$$b_1 = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n=numero de mediciones (concentración-respuesta analítica)

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación.

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$



Anexo 6

Para la Exactitud

A) FORMULAS

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$t_{0,975,n-1}$ = Referirse al anexo 7, para determinar el valor de la t Student.

n= número de recobros



Anexo 7

Monografía del producto Terminado

NINEKA Suspensión (Neomicina, caolín y pectina)

FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN:

Cada 100 ml de Suspensión contienen:

Sulfato de Neomicina equivalente a	0.733 g
de Neomicina base	
Caolín	10.000 g
Pectina	0.700 g

Vehículo, c.b.p. 100 ml.

INDICACIONES TERAPÉUTICAS: Antiséptico intestinal y antidiarréico.

Propiedades: NINEKA ofrece la acción adsorbente y demulcente del caolín y la pectina sumados a la acción antibacteriana de la Neomicina. La neomicina es un antibiótico que no es inactivado por las secreciones gastrointestinales ni por los productos de la digestión o crecimiento bacteriano. Está indicado en gastroenteritis producidas por *Escherichia coli*, causa principal de este cuadro en lactantes y niños. La neomicina es un antibiótico de contacto útil en los procesos diarreicos infecciosos, actuando contra bacterias grampositivas y gramnegativas, incluso sobre *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, y otros microorganismos sensibles a la Neomicina.

FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINÁMIA: La acción del caolín es especialmente sobre el tracto digestivo y la piel como protector directo, forma una capa protectora que tapiza la mucosa y el cráter de una úlcera, cuando ésta existe, pero no se absorbe. Es un polvo químicamente inerte, pero no neutraliza al ácido clorhídrico. Su acción protectora, al disminuir la irritación de la mucosa, puede disminuir la secreción ácida. A nivel de intestino, posee poca acción en personas normales, pero en casos de diarrea, ofrece protección mecánica impidiendo la acción irritante del contenido intestinal y las toxinas bacterianas. De esta manera disminuye la actividad motora propulsora del intestino, constituyendo así la acción protectora y antidiarréica.



Neomicina: La Neomicina administrada por vía oral es capaz de eliminar en un plazo de 12 horas las bacterias presentes en el intestino pudiendo durar su efecto hasta 72 horas.

No es inactivado por las secreciones intestinales o por los productos de la digestión o por el crecimiento bacteriano. Se absorbe pobremente en el tracto gastrointestinal, por lo que su acción antimicrobiana la realiza en el intestino. Debido a su pobre absorción, rara vez puede ocasionar reacciones de toxicidad. Administrada a razón de 0.1 g/kg por día durante 6 semanas no ocasiona daño renal. Sin embargo, administrando 10 g diarios a una persona de 70 kg durante 15 días, pueden encontrarse niveles elevados en sangre de Neomicina con daño renal.

Caolín y pectina: Son polvos finos protectores inertes que tienen gran poder de adhesión y de revestimiento sobre la piel y las mucosas, y por lo cual actúan mecánicamente sin interferir con ningún proceso digestivo o metabólico. Son capaces de remover las bacterias y elementos irritantes que son causa común de diarrea. Protegen la mucosa gastrointestinal contra ciertas sustancias irritantes. No se absorben a nivel de piel y mucosas, y su acción es únicamente mecánica: absorben toxinas e irritantes. El caolín, en virtud de sus propiedades físicas, se adhiere a la mucosa intestinal formando una capa protectora que cubre las paredes del intestino.

Se emplean para recubrir la mucosa del tubo digestivo y protegerla contra los irritantes en las diarreas bacterianas y de otra etiología, en las úlceras gástrica y duodenal, y como adsorbentes y antídotos contra algunos venenos. Se sabe que la pectina remueve productos tóxicos de las bacterias en desarrollo. También puede destruir bacterias a través de la formación de ácido galactourínico que produce un medio desfavorable para el crecimiento de microorganismos causantes de diarrea. De esta manera puede combinarse con sustancias tóxicas y volverlas inertes.

Mecanismo de acción: NINEKA actúa únicamente a nivel de la luz intestinal removiendo o destruyendo los elementos irritantes y las toxinas, protegiendo la mucosa intestinal mientras reduce el proceso inflamatorio.

Combate la infección por dos mecanismos: por el efecto antimicrobiano de la Neomicina, antibiótico de contacto de piel y mucosas, y por acción mecánica del caolín y la pectina. No interfiere con el contenido gástrico o intestinal y ayuda a aumentar la consistencia de las heces.

CONTRAINDICACIONES: Está contraindicado en casos de obstrucción intestinal y en aquellas personas con historia de hipersensibilidad a cualquiera de los componentes de la fórmula. Tampoco debe emplearse en caso de que exista fiebre elevada.



RESTRICCIONES DE USO DURANTE EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA: No se conocen reacciones de este medicamento durante el embarazo; sin embargo, deben tomarse en cuenta las precauciones generales sobre el producto: no debe emplearse por más de tres días debido a la posibilidad de efectos sistémicos. Si aparecen signos de daño renal, se deberá suspender el medicamento. El uso prolongado de este producto puede desencadenar el desarrollo de organismos susceptibles a la Neomicina, particularmente monilia.

Debe recordarse que se han presentado algunos casos de ototoxicidad, sobre todo cuando se administra por varios días la Neomicina; de esta manera durante el embarazo debe considerarse que pudiera presentarse la posibilidad de disminución de la agudeza auditiva, tanto en la madre como en el hijo. No debe administrarse en niños menores de 3 años.

REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS: Aunque se sabe que la Neomicina ocasiona náuseas y vómito, no se tienen reportes de estos síntomas asociados con la administración.

INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS Y DE OTRO GÉNERO: Se sabe que el caolín y la pectina pueden inhibir la absorción de tetraciclina, y disminuir la biodisponibilidad de la digoxina, así como la absorción de otros medicamentos como antibióticos, etc. El caolín interfiere con las fenotiacinas formando complejos y limitando su absorción. Esto se evita aumentando el periodo entre la toma de ambos.

ALTERACIONES EN LOS RESULTADOS DE PRUEBAS DE LABORATORIO: No se han reportado a la fecha.

DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN:

Niños de 6 a 12 años: 10 ml tres a cuatro veces al día.

Niños de 12 años y adultos: 20 ml tres o cuatro veces al día.

MANIFESTACIONES Y MANEJO DE LA SOBREDOSIFICACIÓN O INGESTA

ACCIDENTAL: Si se ingieren grandes cantidades, por arriba de 200 mg/kg puede provocarse obstrucción intestinal y si se administra en forma crónica, pueden presentarse signos de ototoxicidad, nefrotoxicidad y pueden aparecer granulomas en intestino.

PRESENTACIONES:

Frasco con 100 ml y vaso dosificador.

RECOMENDACIONES SOBRE ALMACENAMIENTO: Consérvese a temperatura ambiente a no más de 30°C.

LEYENDAS DE PROTECCIÓN:

No se deje al alcance de los niños. No se administre a niños menores de seis años.

