

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES
INGENIERÍA QUÍMICA**

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

**“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE
QUÍMICA”**

TEMA:

DETERMINACIÓN DE LÍMITES DE CONFIANZA EN VALORACIÓN
MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA DE DOS FORMAS
FARMACÉUTICAS BAJO LA VENTA DE MEDICAMENTO
GENÉRICO O DE MARCA UTILIZANDO EL MÉTODO CILINDRO
PLACA

AUTOR:

QF. ANA ISABEL LOOR ALCÍVAR

Guayaquil - Ecuador

2022

RESUMEN

El presente trabajo de titulación tuvo como objetivo estimar los límites de confianza para la valoración de Gentamicina en solución inyectable y crema, en medicamentos de genéricos y de marcas, empleando el método microbiológico cilindro placa. Siguiendo los lineamientos del método de referencia descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos versión 43 NF 38, se propuso estudios de precisión empleando una herramienta estadística importante como fue el análisis de varianza de un solo factor (ANOVA). Toda la propuesta metodológica fue descrita en un procedimiento específico para valorar Gentamicina en solución inyectable y crema. Se caracterizaron todas las condiciones metrológicas de calibración para medir el potencial del antibiótico, obteniendo toda la variabilidad asociada al modelo de regresión lineal simple, con una significancia de $p < 0.01$. El rango empleado para la concentración del estándar de Gentamicina, para la cada curva de calibración fue de $0.256 \mu\text{g/mL}$ a $0.624 \mu\text{g/mL}$, con una concentración media de referencia de $0.4 \mu\text{g/mL}$. Los límites de confianza fueron determinados exitosamente, debido a que se tomó en consideración el aporte de la dispersión del factor y del error. Finalmente, se comprobó la similitud de los límites de confianza entre las dos formas farmacéuticas y el tipo de comercialización, empleando pruebas estadísticas como fueron Levene y $t_{Student}$, no obteniendo diferencias estadísticamente significativas, $p > 0.05$.

Palabras claves: Gentamicina, valoración microbiológica, cilindro placa, límites de confianza.

ABSTRACT

The objective of this degree work was to estimate the confidence limits for the Gentamicin assessment in injectable and cream dosage form, which is present in generic and brand drugs, using the microbiological cylinder plate assay. The following guidelines of reference method described in the United States Pharmacopeia version 43 NF 38, was proposed precision studies with an important statistical tool, such as the analysis of variance (ANOVA) for one factor. The proposal methodology was described in a specific procedure for Gentamicin assessment in injectable and cream dosage form. All metrological calibration conditions were characterized to measure the potential of the antibiotic, obtaining the total variability associated with linear regression model, with a significance $p < 0.01$. The range used for the concentration of Gentamicina standard was 0.256 $\mu\text{g/mL}$ to 0.624 $\mu\text{g/mL}$ for each calibration curve, with a mean reference concentration of 0.4 $\mu\text{g/mL}$. The confidence limits were successfully determined, because of the dispersion contribution of the factor and the error was considering. Finally, the similarity of confidence limits between the two pharmaceutical forms and the type of commercialization was verified, using statistical test such as Levene and $t_{Student}$, not obtaining statistically significant differences, $p > 0.05$.

Keywords: Gentamicin, microbiological assays, cylinder-place, confidence limits.

DEDICATORIA

Decido este trabajo de titulación con mucho cariño a mi familia, por su paciencia y apoyo incondicionalmente que me brindaron en cada momento, aunque fueron muchos obstáculos que tuve que pasar, siempre hubo una palabra de aliento para continuar y culminar unos del proyecto más grande que he deseado después de convertirme en profesional.

A mis hijos, mis más preciados tesoros, que siempre han sido mi motor para superarme y avanzar, su presencia es la imagen que me motiva día a día, a querer ser una mejor persona y enseñarles que, con disciplina y dedicación se obtienen grandes logros.

QF. Ana Isabel Loor Alcívar

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios, mi creador, salvador y fuerza, por haberme permitido culminar este proyecto tan anhelado.

A mi madre María Santísima, que me enseñó a ser dócil para aprender de los demás.

A mi madre, la Sra. Ana Alcívar, que siempre me dice “Sigue adelante, que si tú eres feliz yo también lo soy”.

A la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria-ARCSA, por haberme permitido desarrollar este proyecto, que servirá para mejorar la calidad de los servicios brindados, contribuyendo al desarrollo del país.

A mis compañeros de trabajo que día a día me brindaron su valioso tiempo y conocimiento, para lograr este objetivo tan importante de mi vida profesional.

A mi querido tutor, que compartió su tiempo y experiencia conmigo, así como también sus consejos en cada capítulo del proyecto.

Y a mis maestros y compañeros de maestría, por compartir su experiencia para adquirir nuevos conocimientos que aportaron mucho en el desarrollo del este proyecto.

Gracias a todos.

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación, me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

ANA ISABEL LOOR ALCÍVAR

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**JOEL EDUARDO
VIELMA PUENTE**

Joel Eduardo Vielma Puente, PhD
PRESIDENTE



Firmado electrónicamente por:
**ROBERTO ROLANDO
BAUZA FERMIN**

Roberto Rolando Bauza Fermín, PhD
TUTOR



Firmado electrónicamente por:
**NADIA MAGALY
FLORES
MANRIQUE**

Mgs. Nadia Magaly Flores Manrique
DOCENTE EVALUADOR

ABREVIATURAS O SIGLAS

Abreviatura	Significado: Inglés/Español
CFR:	Code of Federal Regulations/ Código de Regulaciones Federales
USP:	United States Pharmacopeial/ Farmacopea de los Estados Unidos
IC:	Confidence interval/ Intervalo de confianza
LC:	Confidence limits/ Límites de confianza
SD:	Standard deviation/ Desviación estándar
RSD:	Relative standard deviation/ Desviación estándar relativa
μ :	Population mean/ Media poblacional
σ :	Population standard deviation/ Desviación estándar poblacional
t :	Students test/ Prueba t de Student
\bar{x} :	Median sample/ Media muestral
$S_{1,2,4,5}$:	Concentration of the standard levels/ Niveles de concentración del estándar
S_3 :	The median concentration of the standard/ Concentración del estándar de referencia
z :	Corrected zone measurement/ Medición de zona corregida
c :	Concentration/ Concentración
b :	Slope of the line/ Pendiente de la recta
a :	Intercept/ Intercepto
ATCC	American Type Colletion / Colección tipo americana
R^2 :	Coefficient of determination/ Coeficiente de determinación
TM Media:	Culture median trade manufacturer of Titan Biotech Ltd / Marca de medio de cultivo fabricado por Titan Biotech Ltd
T 25%:	Transmittance of 25%/ Transmitancia de 25%
Log:	The base 10 log / Logaritmo base 10
ANOVA:	Analysis of variance/ Análisis de varianza
Levene test:	Test of inferencial stadistict to evaluate the similar variance/ Prueba de estadística inferencial para evaluar la igualdad de la varianza
Grubbs´test:	Test of inferencial stadistict to compare the deviation of the suspect value from the sample mean with the standard deviation of the sample/ Prueba de estadística inferencial para comparar la desviación de un valor sospechoso proveniente de una media muestral con una desviación estándar
IC (b):	Confidence interval of the slope of the line/ Intervalo de confianza de la pendiente
IC (a):	Confidence interval of the intercept/ Intervalo de confianza del intercepto

C_U :	Antilog of the sample – concentration/ Antilogaritmo de la muestra - concentración
SCF	Sum of squares of factor/ Suma cuadrática del factor
SCE	Sum of squares of error/ Suma cuadrática del error
SCT	Sum of squares total/ Suma cuadrática total
MCF	Meam squares of factor/ Media cuadrática del factor
MCE	Meam squares of error/ Media cuadrática del error
V_B	Between variance group/ Varianza entre grupo
V_R	Within variance group/ Varianza dentro del grupo
SD_B	Standard deviation between group/ Desviación estándar entre grupo
SD_R	Standard deviation within group/ Desviación estándar dentro grupo
SD_{WL}	Wide standard deviation laboratory/ Desviación estándar total del laboratorio

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Descripción del problema	2
1.3 Objetivos.....	2
1.4 Hipótesis.....	3
1.5 Alcance.....	3
CAPÍTULO 2	4
2 MARCO TEÓRICO	4
2.1 Gentamicina	4
2.2 Medicamentos de marca y genéricos.....	6
2.3 Intervalos de confianza	6
2.4 Valoraciones microbiológicas	7
CAPÍTULO 3	11
3 METODOLOGÍA	11
3.1 Diseño de la investigación	11
3.2 Muestra.....	11
3.3 Materiales y Equipos.....	11
3.4 Método.....	12
3.5 Determinación de la potencia de Gentamicina.....	17
3.6 Condiciones de precisión	18
3.7 Determinación de límites de confianza.....	19
CAPÍTULO 4	21
4 RESULTADOS.....	21
4.1 Elaboración de procedimiento específico.....	21
4.2 Determinación de las condiciones metrológicas de calibración.....	22
4.3 Valoración de Gentamicina en Solución Inyectable	26
4.4 Valoración de Gentamicina en crema	27
4.5 Determinación de límites de confianza.....	29
CAPÍTULO 5	32
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	32
5.1 Conclusiones.....	32

5.2	Recomendaciones	33
6	Referencias.....	34
7	Anexos	36

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura Química de Sulfato de Gentamicina [14]	4
Figura 2.2 Formas Farmacéuticas de Gentamicina en Ecuador	5
Figura 2.3 Medicamentos de marca y genéricos con Gentamicina en su formulación	6
Figura 2.5 Valoración en cilindro-placa [24].....	9
Figura 3.1 Espaciado uniforme de los cilindros en cada caja Petri [3].....	15
Figura 3.2 Distribución de las diluciones de estándar y muestra (a) S_1 (b) S_2 (c) S_4 (d) S_5 (e) U_3 , en todas las placas se distribuye S_3	16
Figura 3.3 Condiciones de precisión para la determinación de Límites de Confianza	18
Figura 4.1 Esquema del procedimiento específico para valoración microbiológica de Gentamicina por el método cilindro-placa.....	21
Figura 4.1 Curvas de calibración con intervalos de error para la determinación de Gentamicina en solución inyectable, genérica y marca.....	23
Figura 4.2 Curvas de calibración con intervalos de error para la determinación de Gentamicina en crema, genérica y marca	24
Figura 4.3 Comparación de medias para los LC de Gentamicina en solución inyectable.....	31
Figura 4.4 Comparación de medias para los LC de Gentamicina en crema	31

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Antibióticos que requieren ensayos microbiológicos [2].....	8
Tabla 2.2 Microorganismos de Prueba para Valoración en Cilindro Placa [2].....	10
Tabla 3.1 Equipos utilizados para valorar Gentamicina	12
Tabla 3.2 Concentración de estándares empleados en la calibración de la valoración microbiológica	13
Tabla 3.3 Preparación de capa base e inoculada para valoración de Gentamicina.....	14
Tabla 3.4 Tabla ANOVA	19
Tabla 4.2 Concentraciones halladas de Gentamicina en solución inyectable genérica (Concentración de empleada 0.4 µg/mL).....	27
Tabla 4.3 Concentraciones halladas de Gentamicina en solución inyectable marca (Concentración de empleada 0.4 µg/mL).....	27
Tabla 4.4 Comparación de concentración promedio (n=15) de las valoraciones de Gentamicina en solución inyectable	27
Tabla 4.5 Concentraciones halladas de Gentamicina en crema genérica (Concentración de empleada 0.4 µg/mL).....	28
Tabla 4.6 Concentraciones halladas de Gentamicina en crema marca (Concentración de empleada 0.4 µg/mL).....	28
Tabla 4.7 Resumen de propiedades de la variabilidad de las valoraciones de Gentamicina en crema	28
Tabla 4.8 Valores atípicos de Gentamicina en solución inyectable	29
Tabla 4.9 Valores atípicos de Gentamicina en crema	29
Tabla 4.10 Límites de confianza de Gentamicina- Solución Inyectable ^a	30
Tabla 4.11 Límites de confianza de Gentamicina – Crema ^a	30

CAPÍTULO 1

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Internacional

Las valoraciones microbiológicas son métodos empleados para cuantificar la potencia, o actividad antimicrobiana de los antibióticos. Las monografías de varios antibióticos fueron publicadas en el 21 CFR - Code of Federal Regulations, antes de 1998. Posteriormente, estas monografías fueron publicadas por la Farmacopea Americana (USP), para quedar como métodos oficiales de referencia [1].

Existen dos técnicas para determinar la potencia de antibióticos, cilindro-placa y turbidimétrica, para los cuales las valoraciones microbiológicas es el método analítico estándar [2]. Huerto y Vignolo emplearon la técnica cilindro-placa para la valoración de una crema de Gentamicina en un medicamento de marca. La técnica proporcionó resultados confiables, manteniendo las condiciones controladas del laboratorio durante la validación [3].

En la práctica, para conocer si una estimación es precisa, se necesita calcular un intervalo de confianza [4]. De acuerdo a González, un intervalo de confianza más estrecho es más preciso, al aumentar la muestra; por el contrario, cuando la variabilidad es mayor, la amplitud de intervalo aumenta indicando mayor dispersión [5].

Dado que, las valoraciones microbiológicas están sujetas a variables intervaloración e intravaloración, se requieren de tres o más valoraciones independientes, para estimar la potencia de manera adecuada [2]. En el estudio realizado por Fernández *et al.*, para calcular la exactitud del método microbiológico, las muestras fortificadas con Sulfato de Gentamicina se analizaron por quintuplicado cumpliéndose los criterios de aceptación [6].

1.1.2 Nacional

La Gentamicina en su forma farmacéutica líquido parenteral, pertenece al Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos [7]. Sin embargo; este agente antimicrobiano, también se comercializa en forma farmacéutica de cremas, solución y ungüento oftálmico. La solución inyectable y cremas, son las que tienen mayor disponibilidad en el país [8].

1.1.3 Local

En cuanto a la comparación de la actividad antimicrobiana entre ampollas de Gentamicina de marca y genérica, Acosta y Echeverría, realizaron un estudio muestreando ampollas de Gentamicina en la ciudad de Guayaquil, tomando lotes

iguales de medicamentos de marca y genérica. La potencia se la determinó por la técnica cilindro placa. Y se concluyó que la potencia calculada era equivalente a la declarada en la etiqueta de la muestra [9].

1.2 Descripción del problema

Los antibióticos son medicamentos empleados con mucha frecuencia para combatir infecciones bacterianas [10]. En el Ecuador se comercializan como medicamentos genéricos y de marca.

Los niveles de calidad, seguridad y eficacia deben mantenerse tanto en medicamentos genéricos como de marca [11]. Un punto importante en la calidad es la valoración de su principio activo, debido a que permite conocer si el valor encontrado cae dentro del rango de especificación.

Para la valoración de principios activos en antibióticos, los laboratorios emplean métodos químicos y microbiológicos. En efecto, los métodos químicos son más precisos y eficientes que los microbiológicos; sin embargo, con los últimos la reducción en la actividad antimicrobiana puede ser detectada. Las técnicas para las valoraciones microbiológicas son cilindro-placa y turbidimétrica [2].

Un antibiótico para el cual la valoración microbiológica en cilindro-placa es el método analítico estándar, es la Gentamicina. Las formas farmacéuticas disponibles, en farmacias y hospitales, son solución inyectable, crema, solución y ungüento oftálmico.

Para la estimación confiable de la potencia de Gentamicina se requiere de la cuantificación de Límites de Confianza, y para ello es necesario valorar tres o más veces cada muestra. La Farmacopea de los Estados Unidos en el capítulo de Valoraciones microbiológicas incluye el cálculo de Límites de Confianza [2].

Sin embargo, a pesar de disponer del método oficial para la valoración de Gentamicina, el laboratorio de microbiológica no cuantifica los límites de confianza, debido a que su procedimiento específico no incluye esta información. Adicional, solo se realiza una valoración independiente, siendo el criterio de aceptación de la potencia, la especificación descrita en su monografía oficial.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Estimar los límites de confianza para la valoración microbiológica de Gentamicina en formulaciones farmacéuticas de medicamentos de venta genérica y de marca, utilizando el método de cilindro placa.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Describir un procedimiento específico para la valoración microbiológica de Gentamicina por el método cilindro placa.
2. Determinar las condiciones metrológicas inherentes a la calibración para la cuantificación de Gentamicina en solución inyectable y crema en condiciones de reproducibilidad intermedia.
3. Cuantificar el intervalo de confianza asociado a la determinación de Gentamicina inyectable y en crema (genérica y de marca).

1.4 Hipótesis

Las valoraciones microbiológicas empleando el método cilindro placa, para medir el potencial de Gentamicina en medicamentos de marca y genéricos, ya sea en su forma inyectable o crema, obtienen intervalos de confianza sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

1.5 Alcance

La presente investigación fue experimental, en la cual se buscó estimar los límites de confianza y comparar estos rangos de concentración de Gentamicina para las dos formas farmacéuticas ya sea de marcas y genéricos.

Las valoraciones se llevaron a cabo en un laboratorio de microbiología que analiza medicamentos de marca y genéricos. La metodología a emplear fue la descrita en el Capítulo <81> ANTIBIÓTICOS - VALORACIONES MICROBIOLÓGICAS de la Farmacopea Americana USP 43 NF 38, con ligeras modificaciones adaptativas en el tratamiento de muestra, concentración media del estándar y cantidad del microorganismo de desafío añadido a la capa inoculada [2].

El periodo para realizar las valoraciones y análisis de datos abarcó tres meses, en el que se involucró operaciones previas para reducir la interferencia de factores que pueden influir en la obtención de los resultados, como fueron la preparación de: medios de cultivos, soluciones, esterilización de material y obtención del microorganismo de desafío.

Se emplearon muestras de medicamentos genéricos y de marcas, con Gentamicina como principio activo único, y combinado con Betametasona y Clotrimazol. Con los resultados obtenidos se estimaron los límites de confianza de la concentración hallada de Gentamicina, en solución inyectable y crema, durante la verificación del método.

CAPÍTULO 2

2 MARCO TEÓRICO

A continuación, se presenta la fundamentación teórica de todos aquellos aspectos y variables de interés en la presente investigación.

2.1 Gentamicina

La Gentamicina fue descubierta y aislada del *Micromonospora purpurea* en 1963, pertenece a clase de antibióticos aminoglucósido utilizado contra infecciones bacterianas a través de la inhibición de la síntesis de proteínas de las bacterias [12], [13]. La Gentamicina es un antibiótico de amplio espectro, por lo que actúa sobre gran cantidad de bacterias, principalmente en las gram negativas como son *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, y las gram positivas como el *Staphylococcus aureus* [14].

Una cualidad de la Gentamicina es que no se metaboliza, sino que se distribuye sin cambios dentro de los espacios extracelulares antes de la excreción por filtración glomerular [15]. Por tal razón, posee un efecto concentración-dependencia prolongada, así como también una acción sinérgica, en especial con antibióticos betalactámicos [16].

Aunque el mecanismo de acción de la Gentamicina está bien establecido, y se puede usar en una variedad de aplicaciones clínicas, su administración es limitada. La ototoxicidad, nefrotoxicidad y bloqueo neuromuscular, son efectos secundarios graves producidos por el uso de este antibiótico [15],[17].

2.1.1 Características físicas y químicas de Gentamicina

La Gentamicina, en su forma de sulfato, es soluble en agua, insoluble en alcohol y otros solventes orgánicos [14]. La solución de este antibiótico tiene un pH alrededor de 4.5, en la cual permanece estable. A su vez, tiene un efecto bactericida a pequeñas concentraciones, que es influenciado por el pH, siendo más efectiva en medios alcalinos que ácido [18].

En la Figura 2.1, se muestra la estructura química de Gentamicina, en su sal sulfato. La molécula está compuesta de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupo amino (aminociclitol) [19].

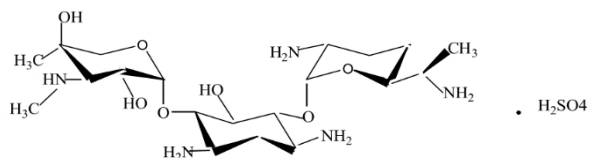


Figura 2.1 Estructura Química de Sulfato de Gentamicina [14]

2.1.2 Indicaciones terapéuticas

Como ya se mencionó, la Gentamicina posee actividad bactericida sobre bacterias aerobias gram negativas, por lo cual este antibiótico es una buena opción para tratar varias infecciones comunes [20].

Las vías de administración de Gentamicina son parenteral, tópica y oftálmica, la vía oral no se emplea, debido a su poca absorción gastrointestinal [20]. La Gentamicina se emplea en el tratamiento de infecciones respiratorias, biliares, del tracto urinario, laceraciones, huesos y articulaciones [12],[14].

A su vez, este antibiótico se sigue estudiando, por su acción sinérgica, para crear esquemas de tratamientos de algunas infecciones. Por ejemplo, Li *et al.*, proponen una alternativa de tratamiento de Gentamicina combinado con ertapenem, por la acción sinérgica que presentan, en el tratamiento de *Neisseria gonorrhoeae* [21].

2.1.3 Formas Farmacéuticas

La Gentamicina se encuentra disponible en medicamentos de marca y genéricos. Las formulaciones farmacéuticas comunes son solución inyectable, colirios oftálmicos y cremas de uso tópico sola o asociada a corticoides.

Para conocer las formulaciones farmacéuticas presentes en el Ecuador, se empleó el Consultor de Medicamentos disponible en la página oficial de la entidad reguladora [8]. Se realizó una búsqueda colocando Gentamicina como palabra clave, encontrándose 78 resultados, correspondientes a medicamentos que contiene Gentamicina en su formulación.

En la Figura 2.2, se muestra la cantidad de forma farmacéutica de Gentamicina en el Ecuador. La solución inyectable es la que está en mayor número (39), seguido de crema (27) y por último solución, y ungüento oftálmico (9 y 3, respectivamente).

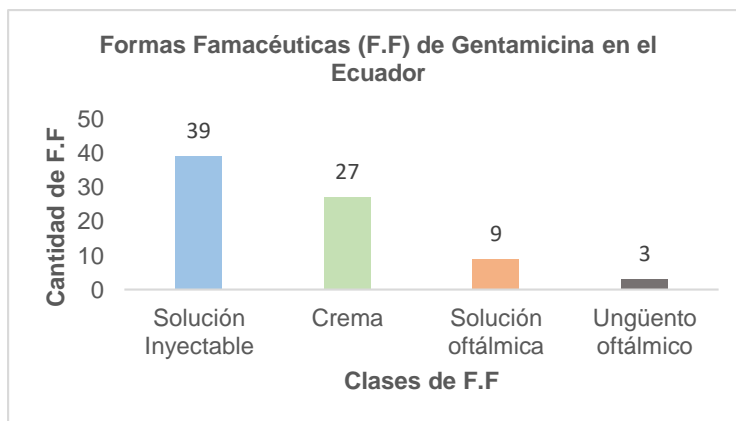


Figura 2.2 Formas Farmacéuticas de Gentamicina en Ecuador

2.2 Medicamentos de marca y genéricos

En el Ecuador, para comercializar un medicamento, es necesario que cuente con su registro sanitario, el mismo que es otorgado por la entidad reguladora. Primero, el medicamento tiene que ser clasificado, como marca o genérico, y luego se genera una solicitud de inscripción para la obtención de registro sanitario [22].

Con la información obtenida en mayo 2022, proveniente del Consultor de Medicamentos, se realizó un estudio exploratorio con la finalidad de calcular los medicamentos de marca y genéricos de Gentamicina. En la Figura 2.3, se evidencia mayor cantidad de medicamentos genéricos en soluciones inyectables (22); por el contrario, en crema son los de marca (24).

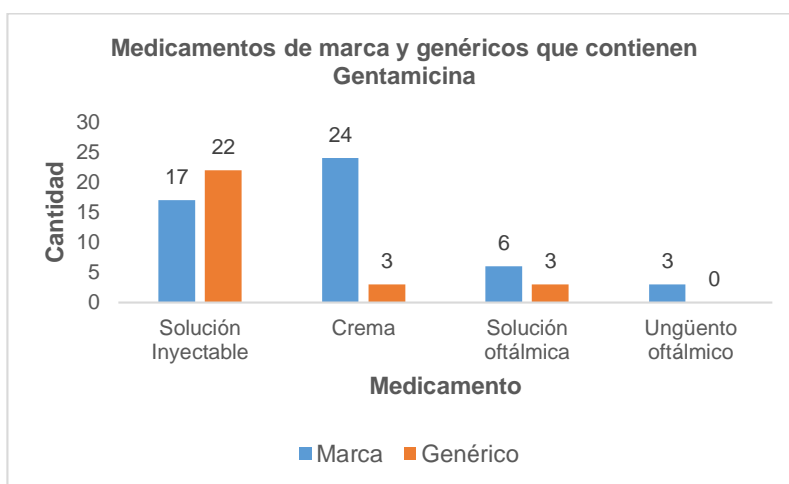


Figura 2.3 Medicamentos de marca y genéricos con Gentamicina en su formulación

2.3 Intervalos de confianza

Los análisis de laboratorio cuantitativos a menudo el valor real de una media poblacional, μ , no se puede determinar, debido a que se necesita un número representativo de mediciones. Por tal motivo, aplicando estadística se puede establecer un intervalo que rodee a la media \bar{x} obtenida experimentalmente, en la que se espera se encuentre dicho parámetro con cierto grado de probabilidad. A este intervalo se lo conoce como intervalo de confianza IC [23].

En efecto, el intervalo de confianza pretender encontrar dos números, L y U , esperando que μ esté entre ellos, con una probabilidad de $1 - \alpha$. En la fórmula 1, se expresa la μ esperada [4].

$$P(L \leq \mu \leq U) = 1 - \alpha \quad (1)$$

Los extremos del intervalo de confianza se los conoce como Límites de Confianza LC , los cuales están en función de la amplitud del intervalo. Si se desea obtener con seguridad el valor verdadero, la amplitud del intervalo será mayor; por lo tanto, el tamaño del intervalo dependerá de aquello.

La amplitud del intervalo de confianza es calculada a partir de la desviación estándar muestral, la cual depende de la estimación de la desviación estándar muestral s hacia la desviación estándar poblacional σ . Es decir, si s estima adecuadamente a σ , se espera un intervalo de confianza más estrecho [23].

2.3.1 Intervalo de confianza de una σ desconocida

Generalmente, el tiempo y la cantidad de muestra que se tienen disponible en determinada investigación son las principales limitantes para realizar una buena estimación de σ a partir de s . Por lo tanto, un conjunto de mediciones proporcionará la media, así como también una estimación de la precisión [23].

Para calcular s a partir de un pequeño grupo de datos, el valor obtenido puede ser incierto. Para la variabilidad de s se usa el estadístico t (t de Student), el cual es definido de la misma forma que el parámetro poblacional, z , con la diferencia de que s se reemplaza con σ . El estadístico t puede expresarse de esta manera:

$$t = \frac{x - \mu}{s} \quad (2)$$

Y para la media de n mediciones es:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{SD / \sqrt{n}} \quad (3)$$

El estadístico t depende del nivel de confianza deseado, así como también de los grados de libertad en el cálculo de SD .

Finalmente, para calcular el intervalo de confianza para la media \bar{x} con un número de n mediciones utilizando t , se puede expresar como sigue:

$$IC \text{ para } \mu = \bar{x} \pm t \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

2.4 Valoraciones microbiológicas

Para determinar la potencia de los antibióticos se emplean métodos químicos y microbiológicos. Las técnicas microbiológicas permiten demostrar la actividad microbiana de un antibiótico, siempre que las condiciones sean adecuadas, por el efecto inhibitorio que poseen sobre microorganismos de prueba. Las dos técnicas generales son valoración en cilindro placa y valoración turbidimétrica [2].

En la Tabla 2.1, se incluyen todos los antibióticos que requieren de valoraciones microbiológicas para determinar su potencia, y el tipo de técnica. Son 16 los

antibióticos que requieren la valoración en cilindro placa, 8 por turbidimetría, y 2 a los que puede emplear ambas técnicas; siendo un total de 26 antibióticos.

Tabla 2.1 Antibióticos que requieren ensayos microbiológicos [2].

Antibiótico	Tipo de Valoración
Amoxicilina	Cilindro placa
Amfotericina B	Cilindro placa
Bacitracina	Cilindro placa
Bleomicina	Cilindro placa
Capreomicina	Turbidimétrica
Cloranfenicol	Turbidimétrica
Clortetraciclina	Turbidimétrica
Cloxacilina	Cilindro placa
Colistimetato	Cilindro placa
Colistina	Cilindro placa
Dihidroestreptomina	Cilindro placa
Eritromicina	Turbidimétrica
Gentamicina	Cilindro placa
Gramicidina	Cilindro placa
Nafcilina	Turbidimétrica
Neomicina	Cilindro placa
Nobovicina	Turbidimétrica
Nistatina	Cilindro placa
Oxitetraciclina	Cilindro placa
Paromicina	Turbidimétrica
Penicilina G	Cilindro placa
Polimixina B	Cilindro placa
Tetraciclina	Cilindro placa
Tioestreptona	Turbidimétrica
Tilosina	Turbidimétrica
Vancomicina	Cilindro placa

2.4.1 Valoración en cilindro placa

La valoración en cilindro placa se fundamenta en la difusión del antibiótico, que ha sido colocado en un cilindro vertical sobre agar solidificado en una placa de Petri, el cual ha sido inoculado con un microorganismo de prueba [2]. En la Figura 2.5, se muestra un ejemplo de valoración en cilindro placa, en la que resulta un área circular de inhibición alrededor del cilindro.



Figura 2.5 Valoración en cilindro-placa [24].

Las diferentes respuestas con esta técnica, diámetros de los halos de inhibición, están relacionadas a la dosis del antibiótico empleadas en la valoración. La valoración en cilindro placa tiene mayor aplicación en la práctica, debido a su exactitud y sensibilidad [3].

Por otra parte, para obtener halos de inhibición bien definidos, se deben emplear condiciones adecuadas para realizar la valoración. La viabilidad del microorganismo de prueba, el medio de cultivo, condiciones de incubación, la velocidad de difusión del antibiótico y su concentración, son factores que influyen en la obtención de halos, y por lo tanto una valoración aceptable [2].

Adicional, para emplear la técnica cilindro-placa, hay que considerar que cada placa tiene dos concentraciones del antibiótico, la concentración de referencia S_3 y una de las cuatro concentraciones del estándar (S_1 , S_2 , S_4 , S_5) o la muestra (U_3). La potencia de la muestra se determina midiendo el halo de inhibición obtenido frente a una concentración conocida, generando la curva estándar [2].

2.4.2 Microorganismos de prueba

En el área microbiológica se emplean microorganismos de control para asegurar la validez de los resultados de análisis. Los microorganismos de control que generalmente se utilizan son bacterias, hongos y levaduras, y son también llamadas Cepas de Referencia. Por ejemplo, Bulacio *et al.*, realizaron un estudio microbiológico empleando treinta y nueve (39) cepas de la levadura del género *Candida* [25]. Por otro lado, Huang *et al.*, emplearon la bacteria *Escherichia coli* BW25113, para demostraron que una combinación entre iones metálicos con antibióticos, puede ser una alternativa terapéutica para combatir la resistencia de la bacteria [26].

Una cepa en microbiología es el conjunto de microorganismos que pertenecen a la misma especie e iguales características [27]. Las cepas son identificadas con un número asignado por la American Type Collection (ATCC) [2]. En la Tabla 2.2, se detallan las cepas de referencia (microorganismos de prueba), para cada antibiótico, en valoración en cilindro placa.

Tabla 2.2 Microorganismos de Prueba para Valoración en Cilindro Placa [2]

Antibiótico	Microorganismo de Prueba	Número ATCC
Amoxicilina	<i>Kocuria rhizophila</i>	9341
Amfotericina B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763
Bacitracina	<i>Micrococcus luteus</i>	10240
Bleomicina	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	607
Cloxacilina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Colistimetato	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617
Colistina	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617
Dihidroestreptomina	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
Eritromicina	<i>Kocuria rhizophila</i>	9341
Gentamicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Nafcilina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Neomicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Nobovicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Nistatina	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	2601
Paromicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Penicilina G	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Polimixina B	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617
Vancomicina	<i>Bacillus subtilis</i>	6633

CAPÍTULO 3

3 METODOLOGÍA

A continuación, se desarrolla y explica todos los procedimientos analíticos, y los tratamientos de datos que se emplearon en este estudio investigativo.

3.1 Diseño de la investigación

El diseño de esta investigación fue de tipo experimental, aplicada a la obtención de límites de confianza, para realizar una estimación confiable de la potencia de Gentamicina en solución inyectable y crema, dispensada en medicamentos genéricos y de marcas.

3.2 Muestra

En este trabajo se valoraron medicamentos que contenían Gentamicina, como principio activo, en solución inyectable y crema. Las muestras fueron medicamentos genéricos y de marca, adquiridas en distribuidoras farmacéuticas de la ciudad de Guayaquil. La cantidad empleada fue de diez, tanto ampollas como tubos, de Gentamicina para cada presentación comercial.

3.3 Materiales y Equipos

3.3.1 Medios de cultivos y reactivos

Los medios de cultivos empleados fueron caldos nutritivos y agares. Para la preparación del microorganismo de desafío se usaron caldo cerebro corazón de TM Media, y agar antibiótico 1 de BD Difco. Se empleó el agar antibiótico 11 de Merck, en la preparación de las cajas Petri para cada análisis.

Los reactivos que se emplearon para la preparación de solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1M, pH 8.0 fueron fosfato monobásico de potasio y fosfato dibásico de potasio, ambos de Sigma-Aldrich. El reactivo de cloruro de sodio de Merck, se empleó para la obtención de una solución al 0.9% m/v, y el cloroformo de Merck, para la extracción de Gentamicina en crema.

3.3.2 Estándar de referencia y microorganismo de desafío

Se empleó un estándar de referencia grado primario de Sulfato de Gentamicina, de la United States Pharmacopeial (USP). Se seleccionó *Staphylococcus epidermis* (ATCC 12228), de Microbiologics como microorganismo de desafío.

3.3.3 Equipos

En la Tabla 3.1 se detallan los equipos empleados en la valoración de Gentamicina, para el cálculo de las condiciones de precisión y finalmente los límites de confianza.

Tabla 3.1 Equipos utilizados para valorar Gentamicina

Nombre del Equipo	Marca	Especificación
Espectrofotómetro Genesys 20	Thermo Scientific	580 nm / T = 25%
Baño de María	Precision Scientific	50°C± 5°C
Mezclador de vórtice	Glas-Col Touch	N/A
Incubadora	Kayagaki	33 ± 2°C
Incubadora	Fanen	37 ± 1°C
Regla Vernier	Hardened	±0.1 mm
Balanza Analítica	SARTORIUS	Max 220 g d=0,1 mg
Balanza Analítica	Mettler toledo	Max 220 g d=0,1 mg
Potenciómetro	Mettler toledo	pH 4.0 – 10.0
Autoclave	Yamato	121 °C / 15 min

3.4 Método

Se empleó el método descrito en el Capítulo <81> ANTIBIÓTICOS –ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS de la Farmacopea de los Estados Unidos, versión 43 NF 38, con ligeras modificaciones adaptativas en el tratamiento de muestra, cantidad de suspensión estandarizada del microorganismo de desafío añadida al medio de cultivo, y concentración media de Gentamicina, tanto para el estándar como para las muestras [2].

Para la extracción de Gentamicina, presente en formulaciones de crema, se utilizó cloroformo como solvente en lugar del éter dietílico, debido a la poca disponibilidad del último en el laboratorio. Adicional, se realizó una sola extracción por réplica, para reducir el riesgo de exposición al solvente.

La cantidad de suspensión estandarizada del microorganismo de desafío, añadida al medio de cultivo fue de 0.06 mL/100 mL, para la obtención de halos de inhibición bien definidos. En cuanto a la concentración media de Gentamicina, se calculó a 0.4 µg/mL, debido a que no se obtuvo halos de inhibición con 0.1 µg/mL en las pruebas preliminares.

3.4.1 Preparación de medios de cultivos y solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1M, estéril, pH 8.0

Los medios de cultivos se prepararon de acuerdo a lo indicado en su etiqueta, verificando el tiempo y condiciones de esterilización. Las pruebas de control de calidad se efectuaron en cada preparación de medios de cultivos, como son la toma de pH y control de esterilidad.

La solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1M, pH 8.0, en adelante solo solución amortiguadora de fosfato de potasio, se preparó con fosfato dibásico de potasio, y fosfato monobásico de potasio. El pH de la solución amortiguadora, después de la esterilización fue de $8,0 \pm 0,1$.

3.4.2 Preparación de la solución stock y curva estándar

La solución stock (solución madre) se preparó a partir de 10 mg del estándar de Sulfato de Gentamicina en 10 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio, cuya concentración final fue de $1000 \mu\text{g/mL}$.

A partir de la solución stock, se prepararon cinco diluciones de prueba, con un aumento de concentración entre diluciones sucesivas de 1: 1,25. Para realizar el cálculo de las diluciones, se tomó la concentración media (S_3) de $0.1 \mu\text{g/mL}$, referida en el método de la Farmacopea vigente. En la Tabla 3.2 se detalla la concentración final de las diluciones de prueba calculadas con un factor de cuatro.

Tabla 3.2 Concentración de estándares empleados en la calibración de la valoración microbiológica

Estándar	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Factor	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
S ₁	0.064	4	0.256
S ₂	0.08	4	0.32
S ₃	0.1	4	0.4
S ₄	0.125	4	0.5
S ₅	0.156	4	0.624

3.4.3 Preparación de microorganismo de desafío

La cepa de referencia *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 fue activada siguiendo el procedimiento interno del laboratorio, para obtener la cepa de reserva. Se determinó la viabilidad del microorganismo al inicio del almacenamiento prolongado a -20°C , y luego de la congelación.

Para la obtención de cepas de trabajo, se empleó un criovial que contenía la cepa de reserva de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, la cual fue nutrida en caldo cerebro corazón, e incubada a 33°C por 24 horas. Posteriormente, se realizó pases en tubos con agar medio 1, incubándose a 33°C por 24 horas. Después de la incubación, los tubos se almacenaron a temperatura entre 2°C a 8°C .

La frescura del microorganismo de desafío se conservó realizando pases con 24 horas de incubación. Cada día de análisis, se recolectó el microorganismo de desafío en solución de cloruro de sodio estéril al 0.9% m/v. Finalmente, se estandarizó, empleando una longitud de onda de 580 nm, obteniendo una transmitancia de 25% (T).

3.4.4 Preparación de la muestra

Las muestras de Gentamicina en solución inyectable y crema, se diluyeron hasta obtener una potencia supuesta por unidad de peso o volumen (U_3), que es igual a la concentración media del estándar S_3 . El tratamiento de las muestras para Gentamicina en crema fue por extracción líquido-líquido, y el de solución inyectable por dilución.

a. Gentamicina en solución inyectable:

Se midió y diluyó la muestra con solución amortiguadora de fosfato de potasio, asignando una potencia supuesta por unidad de peso o volumen (U_3).

b. Gentamicina en crema

Se pesó 5 g ($\pm 0,0001$ g) de la muestra que contenía cerca de 5 mg de Gentamicina. Se agitó en una ampolla de decantación con 50 mL de cloroformo, y luego se añadieron 100 mL de amortiguadora de fosfato de potasio. Luego, se dejó reposar la mezcla hasta su separación. Finalmente, se diluyó el extracto acuoso de la muestra, asignando una potencia supuesta por unidad de peso o volumen (U_3).

3.4.5 Preparación de cajas Petri

Las cajas Petri que se utilizaron en la valoración de Gentamicina tuvieron una medida de 20 x 100 mm. El agar antibiótico 11 estuvo previamente fundido y enfriado a 50°C. En la Tabla 3.3., se detalla el volumen del medio de cultivo empleado en la preparación de la capa base e inoculada, junto con la cantidad del inóculo previamente estandarizado.

Tabla 3.3 Preparación de capa base e inoculada para valoración de Gentamicina

Capa	Medio de cultivo	Volumen (mL)	Volumen del microorganismo de desafío (mL/100mL)
Base	Agar 11	21	-
Inoculada	Agar 11	4	0,06

Una vez que la capa base e inoculada estuvieron endurecidas, se procedió a la distribución de los cilindros de acero inoxidable. En la Figura 3.1 se muestra el espaciado uniforme que presentaron los cilindros en cada placa Petri.

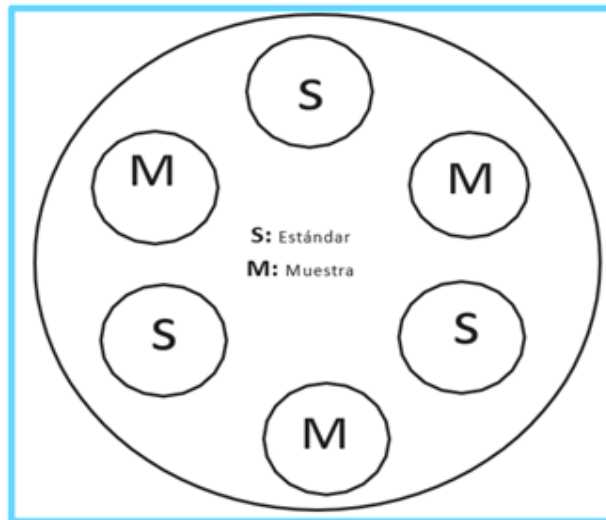


Figura 3.1 Espaciado uniforme de los cilindros en cada caja Petri [3].

Luego se agregó 100 μL de la dilución S_3 del estándar, en tres cilindros de cada placa Petri empleada en la valoración, y 100 μL de cada una de las cuatro diluciones de prueba del estándar en los cilindros restantes. En la Figura 3.2 se muestra la distribución de diluciones de prueba del estándar (S_1 , S_2 , S_4 , S_5) y la muestra (U_3). Para cada dilución de estándar y muestra se utilizaron tres placas Petri.

Una vez llenos los cilindros, se dejaron en reposo las cajas Petri tapadas por 15 minutos para mejor optimización de la difusión del antibiótico en la capa de agar. Posteriormente, se incubaron a 37°C de 16 a 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se retiraron los cilindros para medir los halos de inhibición. Finalmente, se procedió a calcular la potencia de Gentamicina y los límites de confianza.

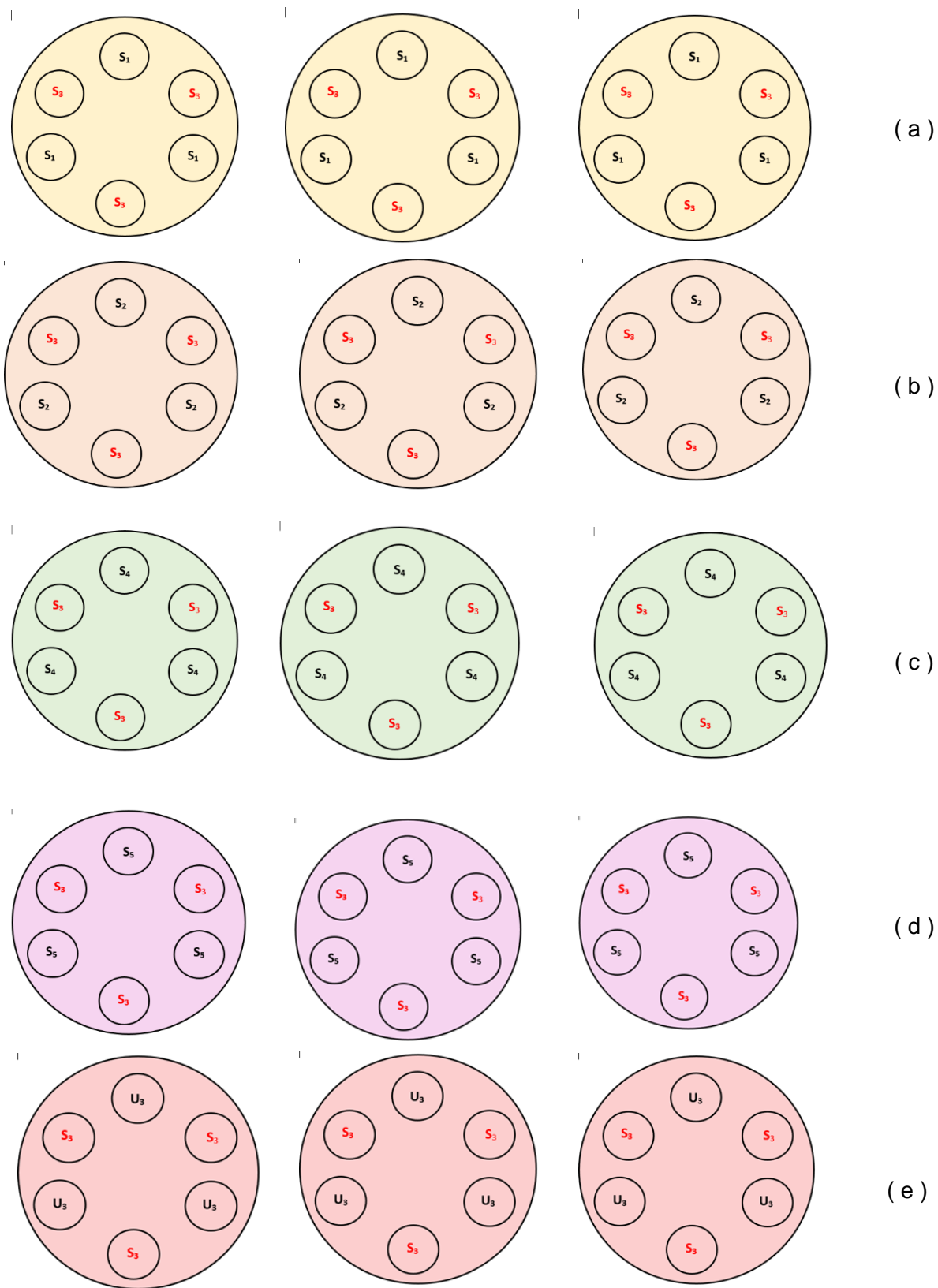


Figura 3.2 Distribución de las diluciones de estándar y muestra (a) S_1 (b) S_2 (c) S_4 (d) S_5 (e) U_3 , en todas las placas se distribuye S_3

3.5 Determinación de la potencia de Gentamicina

La determinación de la potencia de Gentamicina presente en solución inyectable y cremas, de medicamentos genéricos y de marca, se la obtuvo en primer lugar promediando los nueve valores de referencia (S_3), los nueve valores estándar (S_1, S_2, S_4, S_5) y los de la muestra (U_3), que fueron obtenidos midiendo la zona de inhibición de cada caja.

Seguidamente, se determinó la desviación estándar (SD) y la desviación estándar relativa (RSD) para cada conjunto de tres placas, de los nueve valores de referencia y de los nueve valores del estándar. Se obtuvo un límite no mayor al 10% en la desviación estándar relativa [2].

Luego, se realizó la corrección de variación entre placas, de las diferentes concentraciones de los estándares (\bar{x}_c) y de la muestra (\bar{U}), empleando la fórmula 5, donde el P se obtuvo promediando los valores del estándar de referencia (S_3), de cada una de las placas que contenían las concentraciones de los estándares (S_1, S_2, S_4, S_5).

$$\begin{aligned}\bar{x}_c &= \bar{x}_s - (\bar{x}_R - P) \\ \bar{U}_c &= \bar{U}_3 - (\bar{x}_R - P)\end{aligned}\tag{5}$$

Donde \bar{x}_c = medida corregida del estándar y \bar{U}_c = medida corregida de la muestra
 \bar{x}_s = media original del estándar y \bar{U}_3 = media original de la muestra
 \bar{x}_R = media de la referencia para el conjunto de placas
 P = promedio global S_3

Una vez realizada la corrección entre las placas, se determinó la linealidad de la curva estándar, graficando las mediciones corregidas de la zona, en función del logaritmo de los valores de concentración estándar. Se calculó la ecuación de la curva estándar, realizando una regresión lineal no ponderada estándar. Usando logaritmo natural, se graficó la curva estándar, obteniendo % R^2 no menor al 95%. En la fórmula 6, se expresa la ecuación de la curva estándar.

$$z = b(\log c) + a\tag{6}$$

z = medición de zona corregida
 c = concentración
 b = pendiente
 a = intercepto

Empleando la medición de zona promedio corregida de la muestra (z), en la ecuación de la curva estándar, se determinó el logaritmo de la concentración de la muestra, $\log c$ mediante la ecuación 7:

$$\log c = \frac{z - a}{b} \quad (7)$$

Por último, la concentración de la muestra C se obtuvo siguiendo la ecuación 8. El porcentaje de la concentración de referencia se la calculó siguiendo la fórmula 10.

$$C_U = \text{antilog } c \quad (8)$$

$$\% = \frac{C_U}{S_3} \times 100 \quad (9)$$

Una vez obtenida la concentración de Gentamicina en solución inyectable y crema, en medicamentos genéricos y de marca, se procedió a realizar una prueba de Grubbs, con la finalidad de evidenciar valores sospechosos o atípicos.

3.6 Condiciones de precisión

Se procedió a realizar un tratamiento tomando como primera categoría la forma farmacéutica, seguido de la subcategoría de acuerdo su comercialización, marca o genérica, como se muestra en la Figura 3.3.

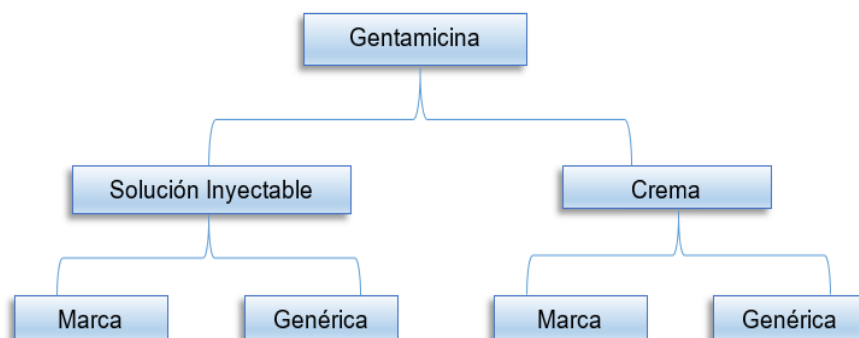


Figura 3.3 Condiciones de precisión para la determinación de Límites de Confianza

El estudio de captación de datos, corresponde a condiciones de repetibilidad y reproducibilidad intermedia. El esquema abordado, fue para 15 réplicas (n) en cada subcategoría evaluada. En este caso fueron: crema y solución inyectable.

Se empleó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) ($p=0,05$), con la finalidad de hallar los niveles de varianza para las condiciones o factores que pudieran alterar las dispersiones en los límites de confianzas evaluados. El estudio de varianza se llevó a cabo mediante una prueba de Levene [28].

3.7 Determinación de límites de confianza

Para la determinación de los límites de confianza se realizaron quince valoraciones independientes de Gentamicina en solución inyectable y crema, para cada medicamento de marca y genérico, con una probabilidad del 95%. Se empleó escala logarítmica, siguiendo la ecuación 10, para la obtención del intervalo de confianza [2].

$$LC = \text{antilog}M \pm t \frac{SD_{WL}}{\sqrt{n}} \quad (10)$$

Donde,

M = promedio

SD_{WL} = desviación estándar total del laboratorio

n = número de valoraciones

Para el cálculo de la desviación estándar total del laboratorio SD_{WL} , se realizó un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA), Tabla 3.4, y se determinó la varianza en el día y entre los días de trabajo [23].

Tabla 3.4 Tabla ANOVA

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Media de los cuadrados (MC)
Entre grupos (factor efecto)	SCF	$I - 1$	$MCF = \frac{SCF}{I - 1}$
Intragrupal (error)	SCE	$N - I$	$MCE = \frac{SCE}{N - I}$
Total	SCT	$N - 1$	

Con las medias de los cuadrados obtenidas entre grupos e intragrupal, se calculó la varianza de cada una, siguiendo las fórmulas 11 y 12. Donde, V_B corresponde a la varianza entre los días y V_R corresponde a la varianza en el día. Para la obtención de n_0 se consideró la cantidad de réplicas realizadas, correspondiendo a un esquema desbalanceado, para ello se siguió la fórmula 13 [29].

$$V_B = \frac{MCF - MCE}{n_0} \quad (11)$$

$$V_R = MCE \quad (12)$$

$$n_0 = \frac{N - (\sum_{i=1}^k \frac{1}{N} ni^2)}{k - 1} \quad (13)$$

Donde, k = corresponde a los días de trabajo

N = números de medidas totales

ni^2 = cuadrado de cada número de medidas

Finalmente, se aplicó raíz cuadrada a las varianzas para obtener la desviación estándar de cada una, SD_B y SD_R respectivamente, fórmulas 14 y 15. La desviación total de laboratorio se la obtuvo aplicando la fórmula 16, correspondiendo a la raíz cuadrada de las varianzas en el día y entre los días.

$$SD_B = \sqrt{V_B} \quad (14)$$

$$SD_R = \sqrt{V_R} \quad (15)$$

$$SD_{WL} = \sqrt{V_R + V_B} \quad (16)$$

CAPÍTULO 4

4 RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la determinación de límites de confianza, para medicamentos genéricos y de marca que contienen Gentamicina en su formulación. Las formas farmacéuticas estudiadas fueron solución inyectable y cremas, empleando el método microbiológico cilindro-placa.

4.1 Elaboración de procedimiento específico

Se elaboró el procedimiento específico para la valoración de Gentamicina, con un alcance en formulaciones farmacéuticas de solución inyectable y crema. Se tomó en consideración todas las condiciones con las que contaba el laboratorio.

Para la elaboración del documento, se siguió el esquema del procedimiento operativo correspondiente a la elaboración de documentos, inherente al Sistema de Gestión de Calidad del laboratorio. En la Figura 4.1 se muestra el esquema del procedimiento específico.

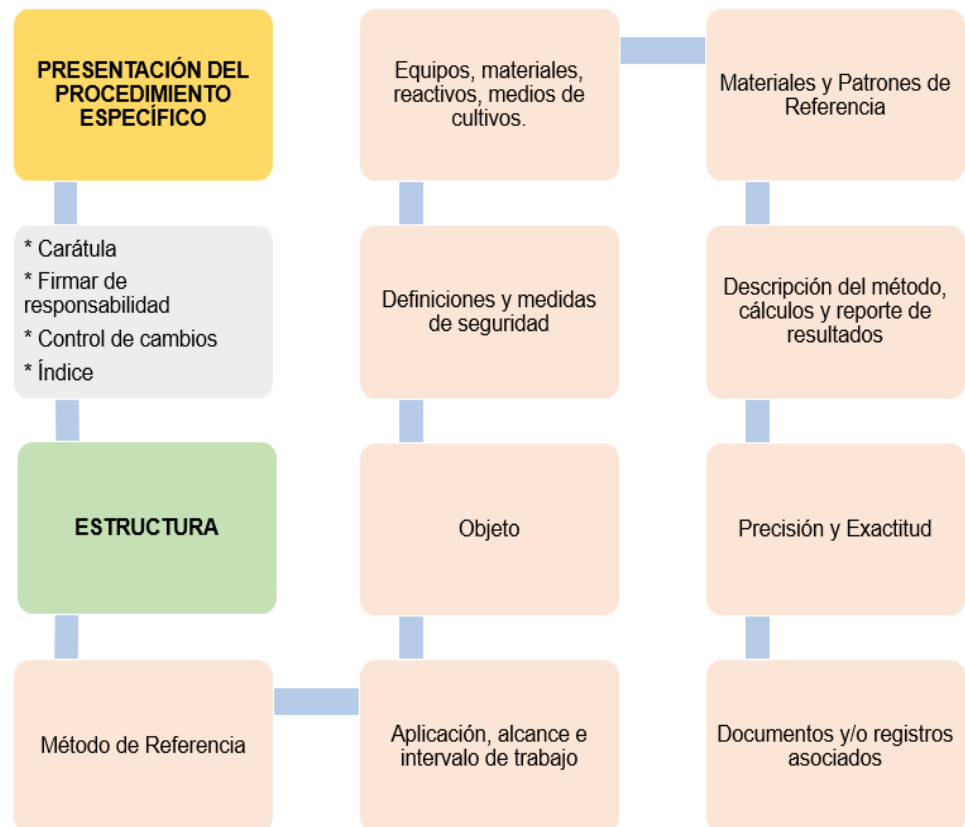


Figura 4.1 Esquema del procedimiento específico para valoración microbiológica de Gentamicina por el método cilindro-placa

El procedimiento específico incluyó toda la metodología para la valoración de Gentamicina, describiendo todas las modificaciones realizadas durante la implementación. Una de las modificaciones fue la cantidad de suspensión del microorganismo de desafío, 0.06 mL/100 mL de medio de cultivo, para obtener halos de inhibición bien definidos, a 37°C de temperatura de incubación de 16 – 24 horas. La Farmacopea de los Estados Unidos indica una cantidad inicial del inóculo de 0.03 mL/100mL; sin embargo, al emplear esta cantidad hubo poco crecimiento de microorganismo [2].

Otra modificación estuvo relacionada a la extracción de Gentamicina en crema, y para ello se empleó cloroformo como solvente de extracción, en lugar del éter dietílico, por la poca disponibilidad de este último [30]. Huerto y Vignolo para valorar Gentamicina en crema, combinada con Betametasona y Clotrimazol de un medicamento de marca, también emplearon cloroformo como solvente de extracción [3].

Con la elaboración del procedimiento específico se logró describir todo lo que implica la valoración microbiológica por el método cilindro placa, para uno de los dieciséis (16) antibióticos, que se encuentran en la Farmacopea de los Estados Unidos [2]. De este modo, por primera vez el laboratorio añadió a su lista de procedimientos específicos, una propuesta metodológica clara y concisa, permitiendo que el método sea aplicado de manera adecuada.

El procedimiento específico se socializó y quedó asequible para que el personal técnico pueda replicar su contenido, y comenzar la validación respectiva [31]. Finalmente, en el Anexo 1 se muestra el procedimiento específico, así como también la plantilla para el ingreso de datos y el cuaderno de trabajo elaborado para el reporte de resultados de cada valoración por día de trabajo.

4.2 Determinación de las condiciones metrológicas de calibración

Para evidenciar la dispersión del conjunto de datos correspondiente a los halos de inhibición medidos, con respecto a las concentraciones de los estándares, se muestran las curvas de calibración con intervalos de error por cada día de trabajo. Los diagramas de cajas fueron obtenidos, empleando el software estadístico RStudio:

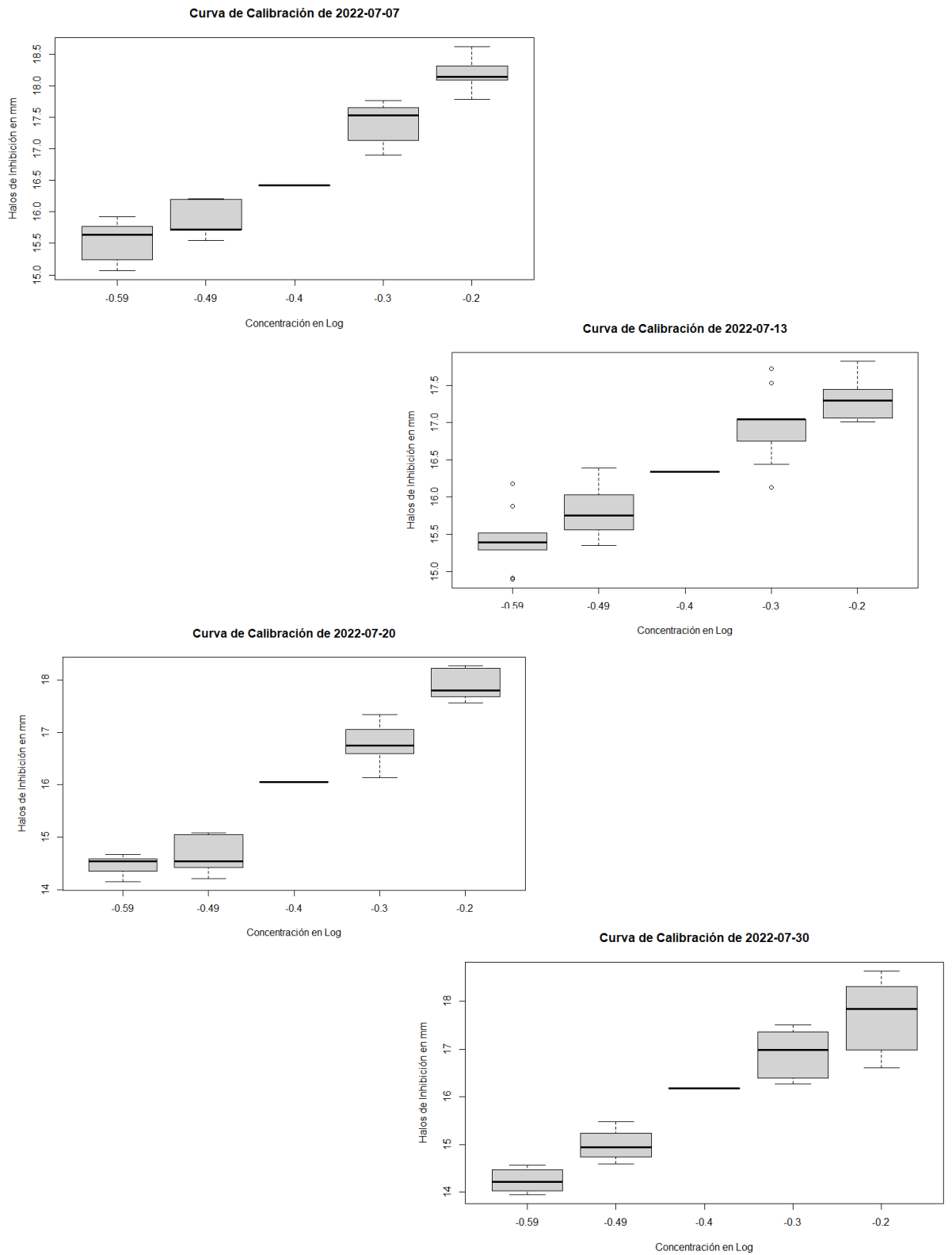


Figura 4.1 Curvas de calibración con intervalos de error para la determinación de Gentamicina en solución inyectable, genérica y marca

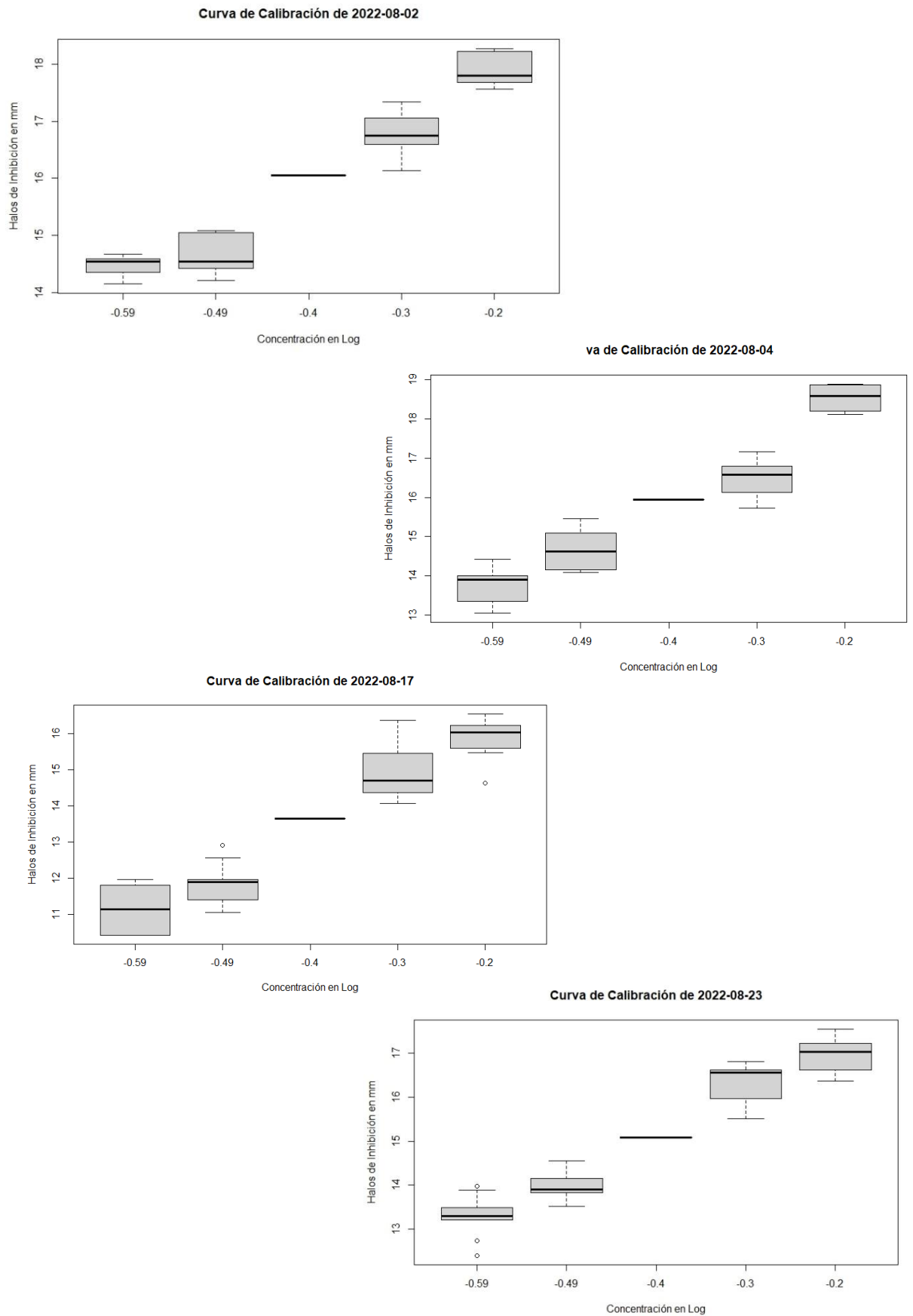


Figura 4.2 Curvas de calibración con intervalos de error para la determinación de Gentamicina en crema, genérica y marca

En las Figura 4.1 y 4.2, se muestran la dispersión de los halos de inhibición medidos que fueron corregidos, como se indicó en la fórmula 5 del capítulo 3, con respecto a la concentración de estándar. En primer lugar, se puede apreciar claramente, la correlación que existe entre la concentración del estándar y la medida de los halos de inhibición. Seguidamente, se evidencian valores fuera de límite superior e inferior, indicando que las condiciones de precisión no fueron contraladas en su totalidad.

Posteriormente, se atendieron las condiciones metrológicas, entendidas estas como las métricas necesarias para estudiar las condiciones de precisión. En este sentido, se evaluaron las varianzas asociadas a los parámetros de la calibración.

Para la obtención de los coeficientes del modelo de regresión lineal simple para el estándar de Gentamicina, se realizó un análisis de regresión en el Microsoft Excel. En la Tabla 4.1, se observan los estadígrafos más importantes que describen y cuantifican la variabilidad de los datos de las calibraciones, como son la desviación estándar de la pendiente SD_b , y la desviación estándar total de la regresión SD_r . El intervalo de confianza para la desviación estándar de la pendiente IC(b) e intercepto IC(a) también fue determinado, con la finalidad de evidenciar como es la dispersión de estos coeficientes.

La influencia de la concentración del estándar de Gentamicina fue muy significativa ($p < 0.01$), en la medida de los halos de inhibición [32]. Así también, los coeficientes de determinación ($\%R^2$) para cada curva, fueron muy cercanos al 95%, entre 81% a 92%, por lo que existe una de relación directamente proporcional entre la variable independiente y la variable dependiente [2]. Por lo cual, el rango de $0.256 \mu\text{g/mL}$ a $0.624 \mu\text{g/mL}$ proporciona una curva estándar de dosis respuesta adecuada, para estimar la potencia de Gentamicina.

Tabla 4.1 Coeficientes del modelo de regresión lineal simple para el estándar de Gentamicina

Fecha	Pendiente (b)	IC (b) [*]	SD_b	Intercepto (a)	IC (a) ^{**}	SD_r	R ²	p
2022-07-07	7,204	0,683	0,339	19,533	0,287	0,312	0,913	<0.01
2022-07-13	4,996	0,744	0,369	18,352	0,312	0,340	0,810	<0.01
2022-07-20	9,233	0,831	0,412	19,614	0,348	0,379	0,921	<0.01
2022-07-30	9,122	0,964	0,478	19,622	0,404	0,440	0,894	<0.01
2022-08-02	9,233	0,830	0,412	19,614	0,348	0,379	0,921	<0.01
2022-08-04	11,677	1,112	0,551	20,512	0,466	0,508	0,912	<0.01
2022-08-17	12,801	1,399	0,694	18,561	0,587	0,639	0,888	<0.01
2022-08-23	9,917	0,894	0,444	19,049	0,376	0,408	0,921	<0.01

IC (b)^{*} - Intervalo de confianza de la pendiente

IC (a)^{**} - Intervalo de confianza del intercepto

4.3 Valoración de Gentamicina en Solución Inyectable

En las Tablas 4.2 y 4.3 se muestran los resultados de la valoración de Gentamicina en solución inyectable, bajo la clasificación de venta genérica y de marca, obteniendo un porcentaje de la cantidad declarada de Gentamicina, para la mayoría de las réplicas dentro de la especificación de la Farmacopea vigente, 90,0% – 125,0% [33]. El porcentaje promedio fue de 102,02% para la clasificación genérica, y 103,83% para la de marca, como se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.2 Concentraciones halladas de Gentamicina en solución inyectable genérica (Concentración de empleada 0.4 $\mu\text{g/mL}$)

C_U ($\mu\text{g/mL}$)	0,39	0,35	0,44	0,38	0,40	0,41	0,38	0,44
	0,42	0,42	0,44	0,41	0,42	0,42	0,41	
Porcentaje de Gentamicina de la concentración declarada	98,18	87,23	109,42	94,46	98,13	102,90	95,44	110,83
	104,76	105,52	109,87	101,28	104,76	104,01	103,54	

Tabla 4.3 Concentraciones halladas de Gentamicina en solución inyectable marca (Concentración de empleada 0.4 $\mu\text{g/mL}$)

C_U ($\mu\text{g/mL}$)	0,41	0,41	0,42	0,41	0,42	0,42	0,38	0,42
	0,39	0,43	0,42	0,38	0,40	0,45	0,47	
Porcentaje de Gentamicina de la concentración declarada	101,85	103,44	104,45	103,21	105,17	105,75	93,95	105,81
	97,54	107,30	104,87	94,06	99,61	112,31	118,14	

Tabla 4.4 Comparación de concentración promedio (n=15) de las valoraciones de Gentamicina en solución inyectable

Propiedades	Gentamicina en Solución Inyectable	
	Genérica	Marca
Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$)	0,41	0,41
Porcentaje de Gentamicina de la concentración declarada	102,02	103,83
<i>SD</i>	0,028	0,022

El Anexo 2 contiene los resultados para las valoraciones de Gentamicina en solución inyectable genérica, y el Anexo 3 para la de marca. Las valoraciones se realizaron en diferentes días, con un total de 15 réplicas para cada subcategoría, de acuerdo a su comercialización. Se preparó una curva estándar para cada día de trabajo.

4.4 Valoración de Gentamicina en crema

En las Tablas 4.5 y 4.6 se muestran los resultados de la valoración de Gentamicina en crema, bajo la clasificación de venta genérica y de marca, obteniendo un porcentaje de la cantidad declarada de Gentamicina, para la mayoría de las réplicas dentro de la especificación de la Farmacopea vigente, 90,0% – 135,0% [30]. El porcentaje promedio fue de 101,85% para la clasificación genérica, y 102,30% para la de marca, como se muestra en la Tabla 4.7.

Tabla 4.5 Concentraciones halladas de Gentamicina en crema genérica (Concentración de empleada 0.4 $\mu\text{g/mL}$)

C_U ($\mu\text{g/mL}$)	0,41	0,43	0,41	0,43	0,43	0,44	0,45	0,46
	0,44	0,42	0,41	0,43	0,45	0,41	0,40	
Porcentaje de Gentamicina de la concentración declarada	102,53	107,44	103,39	98,77	103,76	102,09	106,42	106,28
	107,01	96,15	94,91	103,15	105,18	94,57	96,17	

Tabla 4.6 Concentraciones halladas de Gentamicina en crema marca (Concentración de empleada 0.4 $\mu\text{g/mL}$)

C_U ($\mu\text{g/mL}$)	0,44	0,41	0,41	0,41	0,41	0,39	0,42	0,43
	0,44	0,44	0,39	0,43	0,39	0,45	0,38	
Porcentaje de Gentamicina de la concentración declarada	109,72	100,07	100,86	101,17	101,19	97,09	104,37	104,63
	106,28	107,13	97,67	107,28	91,08	111,62	94,34	

Tabla 4.7 Resumen de propiedades de la variabilidad de las valoraciones de Gentamicina en crema

Propiedades	Gentamicina en Crema	
	Genérica	Marca
Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$)	0,43	0,42
Porcentaje de Gentamicina de la concentración declarada	101,85	102,30
<i>SD</i>	0,012	0,021

Con los resultados correspondiente a la concentración de Gentamicina, empleando el método microbiológico cilindro placa, en solución inyectable y crema, presente en medicamentos genéricos y de marca, obtienen una concentración similar de 0.4 $\mu\text{g/mL}$, a pesar de diferir en el proceso de extracción y formulación. La concentración del antibiótico hallada, coincide con el estudio realizado Huerto y Vignolo para valorar Gentamicina en crema, combinada con Betametasona y Clotrimazol de un medicamento de marca [3]. Por otro lado, Fernández *et al.*, empleó una concentración media del antibiótico de 1 U/mL [6].

La potencia del antibiótico fue demostrada sin influir su forma farmacéutica, formulación y tipo de comercialización. De esta manera, los niveles de calidad, seguridad y eficacia son mantenidos tanto en medicamentos genéricos como de marca [11].

En el Anexo 4 se muestran los resultados para las valoraciones de Gentamicina en crema genérica, y el Anexo 5 para la marca. Las valoraciones se realizaron en diferentes días, con un total de 15 réplicas para cada subcategoría, de acuerdo a su comercialización. Se preparó una curva estándar para cada día de trabajo.

4.5 Determinación de límites de confianza

Una vez calculada la concentración de Gentamicina en cada réplica de solución inyectable y crema, se procedió a realizar la prueba de Grubbs para verificar los valores atípicos. En la Tabla 4.8 y 4.9 se muestran los valores retirados para cada conjunto de datos.

Tabla 4.8 Valores atípicos de Gentamicina en solución inyectable

Gentamicina en solución inyectable									
C_U ($\mu\text{g/mL}$)	Genérica	0,39	0,35*	0,44	0,38	0,40	0,41	0,38	0,44
		0,42	0,42	0,44	0,41	0,42	0,42	0,41	
	Marca	0,41	0,41	0,42	0,41	0,42	0,42	0,38	0,42
		0,39	0,43	0,42	0,38	0,40	0,45	0,47*	

Los valores indicados con (*) son atípicos

Tabla 4.9 Valores atípicos de Gentamicina en crema

Gentamicina en crema									
C_U ($\mu\text{g/mL}$)	Genérica	0,41	0,43	0,41	0,43	0,43	0,44	0,45	0,46*
		0,44	0,42	0,41	0,43	0,45	0,41	0,40	
	Marca	0,44	0,41	0,41	0,41	0,41	0,39	0,42	0,43
		0,44	0,44	0,39	0,43	0,39	0,45*	0,38	

Los valores indicados con (*) son atípicos

Posteriormente, se determinó los límites de confianza, y para ello se realizó un análisis de varianza de un solo factor, para conocer la variabilidad en el día y entre los días de trabajo, ($p > 0,05$). Valoraciones independientes realizadas en varios días da una estimación más confiable de la potencia del antibiótico [2].

Seguidamente, se realizó el cálculo de la desviación estándar total del laboratorio, como se detalló en la metodología. La desviación estándar SD , influye en la amplitud del intervalo de confianza. Si SD estima adecuadamente la media muestral, se espera un intervalo de confianza más estrecho [23]. Por tal razón, la desviación estándar total del laboratorio fue determinada para caracterizar la dispersión de cada valoración.

Los límites de confianza fueron determinado, empleado la desviación estándar total del laboratorio (SD_{WL}). En la Tabla 4.10 se presentan el resultado del intervalo y límites de confianza para Gentamicina en solución inyectable, y Tabla 4.11 para Gentamicina en crema, obteniéndose límites de confianza similares para ambas formas farmacéuticas, al ser comparadas con la presentación comercial.

Tabla 4.10 Límites de confianza de Gentamicina- Solución Inyectable^a

Gentamicina- Solución Inyectable		
Datos	Genérica	Marca
Media (\bar{x})	0,413	0,411
SD_{WL}	0,021	0,020
IC	0,012	0,011
LC(mínimo)	0,400	0,400
LC (máximo)	0,425	0,423

^an, 14; grados de libertad, 13; $1 - \alpha, 0,95, t, 2,160$

Tabla 4.11 Límites de confianza de Gentamicina – Crema^a

Gentamicina- Crema		
Datos	Genérica	Marca
Media (\bar{x})	0,426	0,414
SD_{WL}	0,016	0,020
IC	0,009	0,011
LC(mínimo)	0,416	0,403
LC (máximo)	0,435	0,426

^an, 14; grados de libertad, 13; $1 - \alpha, 0,95, t, 2,160$

Con la prueba de homogeneidad de varianza de Levene, se aceptó la similitud de las varianzas de las dos presentaciones de Gentamicina genérica y marca, para cada forma farmacéutica ($p > 0.05$). Y, la similitud de los límites de confianza fue comprobada empleado una prueba $t_{Student}$ para dos muestras suponiendo varianzas iguales, no obteniendo diferencias significación ($p > 0.05$). En la Figura 4.3 y 4.4 se puede visualizar que las medias de los dos grupos de muestras son similares.

Comparación de límites de confianza para Gentamicina en solución inyectable

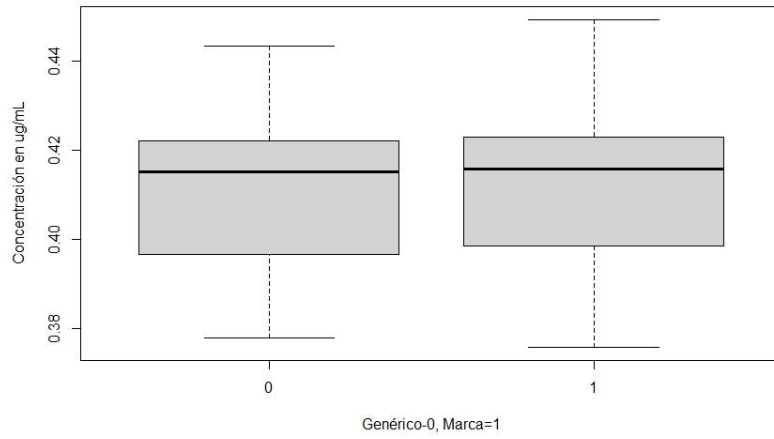


Figura 4.3 Comparación de medias para los LC de Gentamicina en solución inyectable

Comparación de límites de confianza para Gentamicina en crema

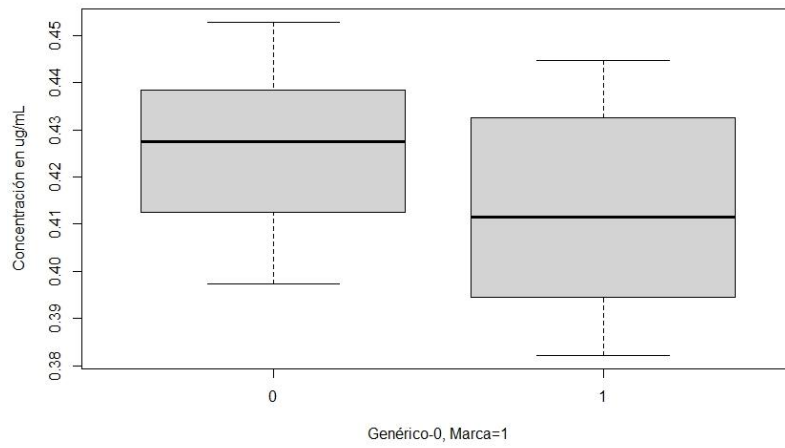


Figura 4.4 Comparación de medias para los LC de Gentamicina en crema

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Con la elaboración de un procedimiento específico para la valoración de Gentamicina en solución inyectable y crema, se propuso realizar estudios de dispersión para la determinación de límites de confianza. El procedimiento fue realizado siguiendo los lineamientos del laboratorio, en referente a la elaboración de documentos internos. Se detalló todas las modificaciones adaptativas realizadas al método de referencia. El documento fue difundido a todo el personal técnico del laboratorio.

Las condiciones metrológicas de calibración fueron caracterizadas en cada curva de calibración, al determinar toda la variabilidad a la que está asociado el modelo de regresión lineal simple. Se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,01$), indicando que la concentración del estándar tiene una gran influencia en el tamaño de los halos de inhibición. El rango empleado para la concentración del estándar de Gentamicina, para la cada curva de calibración fue de $0.256 \mu\text{g/mL}$ a $0.624 \mu\text{g/mL}$, con una concentración media de referencia de $0.4 \mu\text{g/mL}$.

Los límites de confianza fueron determinados exitosamente, desarrollando un estudio de precisión con una herramienta estadística importante, como fue el análisis de varianza (ANOVA). La desviación estándar total de laboratorio (SD_{WL}), proporcionó una variabilidad más representativa de cada valoración realizada en el día, y entre los días de trabajo. Finalmente, con las pruebas estadísticas como Grubbs, Levene, y $t_{Student}$, se lograron descartar como primer punto valores atípicos, y seguidamente se determinaron los límites de confianza, cuyos intervalos fueron estrechos y similares ($p > 0,05$), para Gentamicina en solución inyectable y crema, en cada modalidad de venta, estimando de manera confiable la potencia del antibiótico.

5.2 Recomendaciones

Con la información obtenida en el presente trabajo de titulación, se recomienda validar el método de Valoración de Gentamicina empleando la técnica cilindro-placa. El personal técnico que participe en la validación debe ser competente y estar debidamente capacitado.

Existen antibióticos para los cuales la valoración por microbiología es el método analítico estándar, por lo que la elaboración de procedimientos específicos ayudará en el adecuado desarrollo del método dando resultados confiables. Adicional, el realizar un estudio previo, para conocer los antibióticos que se comercializan en el país, es importante para obtener una muestra representativa y asequible de los mismos.

Debido a la variabilidad que existen en las valoraciones microbiológicas se recomienda realizar mínimo tres y un máximo de cinco valoraciones diarias, por muestra. Los límites de confianza determinados, ayudarán a decidir si el resultado de la valoración estima adecuadamente la potencia supuesta del antibiótico.

6 Referencias

- [1] USP, "<1223.1> VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS TO ANTIBIOTIC MICROBIAL ASSAYS," in *United States Pharmacopeia*, 43 NF 38., 2021, pp. 4–6.
- [2] USP, "<81> ANTIBIOTICS-MICROBIAL ASSAYS," in *United States Pharmacopeia*, 43 NF 38., 2022, pp. 1–21.
- [3] H. Huapaya, C. Aracelli, V. Asencio, and L. Ernesto, "Validación De Método Microbiológico Cilindro-Placa Para Cuantificación De Gentamicina Sulfato En Dermolab Nf Crema De Laboratorios Vitapharma S.a.C, Lima 2018"," pp. 1–94, 2019.
- [4] H. Gutiérrez, R. Salazar, P. Johnson, R; Kuby, K. Sáenz López, and G. Tamez González, *Estadística elemental: Lo esencial*. 2008.
- [5] J. A. González, "Use and interpretation of confidence intervals," *Med. Clin. Pract.*, vol. 4, pp. 1–2, 2021, doi: 10.1016/j.mcpsp.2021.100297.
- [6] O. Fernández C., Mirna; Muñoz M., Guadalupe; Palazón L., Zoe; Gutiérrez M., Mirza; Carrillo C. Dianelys; Bilbao R., "Estudio de la actividad antimicrobiana de la combinación quitina-gentamicina," *Rev. Mex. Ciencias Farm.*, vol. 37, pp. 21–29, 2006, Accessed: Jun. 11, 2022. [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937404>.
- [7] Comisión Nacional de Medicamentos e Insumos, *Cuadro Nacional De Medicameentos Basicos*, 10ma.revis. 2019.
- [8] "Consultor de medicamentos de la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria." <http://aplicaciones.controlsanitario.gob.ec> (accessed May 30, 2022).
- [9] A. Acosta and P. Echevería, "COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA ENTRE AMPOLLAS DE GENTAMICINA GENÉRICA Y EL MEDICAMENTO INNOVADOR," Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas, 2018.
- [10] M. Plus, "Antibióticos," *NIH Biblioteca Nacional de Medicina*, Nov. 04, 2021. <https://medlineplus.gov/spanish/antibiotics.html> (accessed Jun. 11, 2022).
- [11] Comisión de Legislación y Codificación, *Ley de medicamentos genericos de uso humano*. Ecuador: LEXISFINDER, 2011, pp. 9–14.
- [12] Q. Li, G. Jiang, D. Wang, H. Wang, L. Ding, and G. He, "Porous magnesium loaded with gentamicin sulphate and in vitro release behavior," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 69, pp. 154–159, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.06.074.
- [13] K. M. Krause, A. W. Serio, T. R. Kane, and L. E. Connolly, "Aminoglycosides: An overview," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 6, no. 6, Jun. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a027029.
- [14] A. Bayoumi, M. T. Sarg, T. Y. A. Fahmy, N. F. Mohamed, and W. K. El-Zawawy, "The behavior of natural biomass materials as drug carriers in releasing loaded Gentamicin sulphate," *Arab. J. Chem.*, vol. 13, no. 12, pp. 8920–8934, 2020, doi: 10.1016/j.arabjc.2020.10.018.
- [15] R. S. Hayward *et al.*, "Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: a systematic review," *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 84, no. 2. Blackwell Publishing Ltd, pp. 223–238, Feb. 01, 2018, doi: 10.1111/bcp.13439.
- [16] "Gentamicina: Usos, Interacciones, Mecanismo de Acción | DrugBank en línea." <https://go.drugbank.com/drugs/DB00798> (accessed Oct. 05, 2021).
- [17] S. Ferreira-Cendon *et al.*, "Prevention of Severe Vestibular Hypofunction after Systemic Gentamicin," *J. Clin. Med.*, vol. 11, no. 3, 2022, doi: 10.3390/jcm11030586.
- [18] "Gentamicina. - PMC." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1840594/?page=1> (accessed Jun. 09, 2022).
- [19] J. Molina, E. Cordero, J. Palomino, and J. Pachón, "Aminoglucósidos y

- polimixinas,” *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 27, no. 3, pp. 178–188, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.EIMC.2009.02.001.
- [20] “Gentamicina - StatPearls - NCBI Bookshelf.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557550/> (accessed Jun. 09, 2022).
- [21] X. Li, W. Le, X. Lou, B. Wang, C. A. Genco, and P. A. Rice, “In Vitro Efficacy of Gentamicin Alone and in Combination with,” no. May, pp. 1–8, 2021.
- [22] Ministerio de Salud Pública, “Reglamento de Registro Sanitario para Medicamentos en General,” *Acuerdo Minist. 586*, pp. 1–27, 2021, [Online]. Available: <https://www.controlsanitario.gob.ec>.
- [23] J. Holler and S. R. Crouch, *Fundamentos de Química Analítica*, 9 na. México, D.F.: Books/Cole, 2014.
- [24] “ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS EN CONTROL DE CALIDAD: ASPECTOS RELEVANTES - PDF Free Download.” <https://docplayer.es/88149962-Ensayos-microbiologicos-en-control-de-calidad-aspectos-relevantes.html> (accessed Jun. 06, 2022).
- [25] L. Bulacio, S. Ramadán, H. Dalmaso, A. Luque, and M. Sortino, “Optimization of variables in photodynamic antifungal assays against *Candida* species,” *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 53, no. 4, pp. 287–291, 2021, doi: 10.1016/j.ram.2020.12.006.
- [26] Y. Huang *et al.*, “Biochemical and Biophysical Research Communications Promoting effect of Fe³⁺ on gentamicin resistance in *Escherichia coli*,” vol. 625, pp. 6–11, 2022, doi: 10.1016/j.bbrc.2022.07.102.
- [27] W. Pérez, C. Plaza, and M. Romo, “Criterios Específicos. Acreditación de Laboratorios que realizan ensayos microbiológicos,” Quito, 2022. Accessed: Aug. 23, 2022. [Online]. Available: www.acreditacion.gob.ec.
- [28] D. Montgomery, *Design and analysis of Experiments*, 9na ed., vol. 3, no. April. Arizona: Lightning Source, Inc., 2015.
- [29] S. LR Ellison, V. J Barwick, and T. J Duguid Farrant, “Practical Statistics for the Analytical Scientist,” 2nd ed., The Royal Society of Chemistry, Ed. Cambridge, 2009.
- [30] USP, “Sulfato de Gentamicina, Crema,” in *United States Pharmacopeia*, 43 NF 38., 2022, p. 9175.
- [31] Servicio Ecuatoriano de Normalización, “Norma ISO/IEC 17025,” 2017. [Online]. Available: www.iso.org.
- [32] A. N. de V. S. ANVISA, *Farmacopeia Brasileira. 6a Edição - Volume 1*, vol. 1. 2019.
- [33] USP, “Sulfato de Gentamicina, Inyección,” in *United States Pharmacopeia*, 43 NF 38., 2022, p. 49759.

7 Anexos

Anexo 1. Procedimiento específico para la valoración microbiológica de Gentamicina por el Método cilindro placa

LOGO

PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA
VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA
POR EL MÉTODO CILINDRO-PLACA
CODIGO: EP XXX. MOPG XX
Versión 001

Dirección Técnica de Laboratorio de Referencia

<AGOSTO 2022>

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

TIPO DE COPIA: CONTROLADA NO CONTROLADA

PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA

RUBRO	CARGO	FIRMA	FECHA
APROBADO POR:	XXXXXX ANALISTA RESPONSABLE TÉCNICO		2022-08-31
REVISADO POR:	XXXXX ANALISTA		2022-08-31
ELABORADO POR:	XXXXXXX ANALISTA		2022-08-15

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

CONTROL DE CAMBIOS			
Versión	Descripción	Realizado por	Fecha de actualización (xxxx-xx-xx)

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

Contenido

1. OBJETO.....	5
2. APLICACIÓN, ALCANCE E INTERVALO DE TRABAJO.....	5
3. MÉTODO DE REFERENCIA.....	5
4. DEFINICIONES.....	5
5. MEDIDAS DE SEGURIDAD.....	6
6. EQUIPOS.....	6
7. MATERIALES.....	6
8. REACTIVOS.....	7
9. MEDIOS DE CULTIVOS.....	7
10. MATERIALES DE REFERENCIA.....	7
11. PATRONES DE REFERENCIA.....	7
12. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO.....	7
12.1 Operaciones previas.....	7
12.2 Preparación de la Solución amortiguadora B.3 (0.1 M, pH 8,0).....	7
12.3 Preparación de la solución madre.....	7
12.4 Preparación de las soluciones de la muestra.....	8
12.5 Preparación del microorganismo de prueba.....	8
12.6 Preparación de caja Petri.....	9
13. CÁLCULO.....	10
13.1 Determinación de la potencia.....	10
13.2 Determinación de los Límites de Confianza.....	11
14. REPORTE DE RESULTADOS.....	13
14.1 Criterios de aceptación y rechazo.....	13
15. PRECISIÓN Y EXACTITUD.....	13
16. REGISTROS.....	13

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

1. OBJETO

Determinar la potencia de Gentamicina en solución inyectable y crema, por el método microbiológico cilindro placa.

2. APLICACIÓN, ALCANCE E INTERVALO DE TRABAJO.

Este procedimiento aplica a todos los medicamentos genéricos y de marcas que contengan Gentamicina como principio activo.
Intervalo de trabajo 0.256 ug/mL – 0.625 ug/mL.

3. MÉTODO DE REFERENCIA

Farmacopea Americana USP 43 NF 38 <81> Antibióticos – Valoraciones Microbiológicas

4. DEFINICIONES

Antibiótico: Sustancia capaz de destruir un microorganismo o de inhibir su desarrollo y reproducción.

ATCC (American Type Culture Collection): Colección de cepas certificadas.

Difusión: Propagación del antibiótico a través del medio de cultivo sólido contenido en una caja de Petri.

Halo de inhibición: Área circular alrededor del cilindro en el cual se observa ausencia de crecimiento microbiano, por causa de la presencia del antibiótico.

Medio de cultivo: Compuesto nutritivo en estado líquido, sólido o semisólido que promueve el crecimiento microbiano.

Propiedad antimicrobiana: Capacidad de un antibiótico de inhibir el desarrollo de un microorganismo susceptible, lo cual se evidencia mediante un halo de inhibición o ausencia de turbidez en un medio líquido.

Solución madre: Dilución inicial de un antibiótico a partir de la cual se obtienen las diluciones para el ensayo de valoración antibiótica.

Turbidez: Grado de desarrollo microbiano que oscurece la transparencia normal de un medio líquido.

Fundir: Convertir una sustancia sólida en líquida por la acción del calor.

Patrón de referencia: Un patrón posee la más alta calidad metrológica disponible en un lugar o en una organización determinada, del cual se derivan las mediciones realizadas en dicho lugar.

Material de referencia (MR): Material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y están bien definidos para permitir

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

utilizarlos para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición, o la asignación de valores a los materiales.

Material de referencia certificado (MRC): Material de referencia acompañado de un procedimiento que establece su trazabilidad con una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad y para la cual cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con la indicación de un nivel de confianza.

5. MEDIDAS DE SEGURIDAD

El ensayo debe realizarse en un área limpia.

Todo material debe ser previamente esterilizado.

Controlar la temperatura durante la siembra del microorganismo y preparación del inóculo.

Verificar la temperatura de incubación requerida.

El material utilizado debe ser retirado del área para su inactivación, descontaminación, lavado y esterilizado.

6. EQUIPOS

Nombre del Equipo	Marca	Especificación	Código Interno
Espectrofotómetro	Genesys 20	580 nm / T = 25%	
Baño de María	Precision Scientific	45°C	
Vortex	Glas-Col Touch	N/A	
Incubadora	Kayagaki	32 -35 °C	
Incubadora	Fanen	37°C±1	
Regla Vernier	Hardened	±0.1 mm	
Balanza Analítica	SARTORIUS	Max 220 g d=0,1 mg	
Balanza Analítica	Mettler Toledo	Max 220 g d=0,0001 mg	
Plato de calentamiento	ThermoLyne	Max 500°C	
Micropipetas	COMECTA	10 – 100 µl	
Micropipetas	BOECO	1000 µl	
Micropipetas	CAPE COD	50 µl -100 µl -200 µl	
Bacti-Cinerator	MC Cormick	N/A	

7. MATERIALES

Matraces volumétricos de 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL

Ampolla de decantación

Vasos de precipitación de 150 mL, 200 mL

Cajas petri de 20 x 100 mm

Tubos de ensayo

Cilindro de acero inoxidable de 8 ±0.1 mm diámetro externo; 6 ± 0,1 mm de diámetro interno; de 10 ±0,1mm de altura.

Pinzas de acero inoxidable

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

Gradillas para tubos
 Lápiz graso
 Mascarilla, guantes, mandil, gorro
 Pipetas volumétricas
 Peras de extracción

8. REACTIVOS

- Fosfato dibásico de potasio
- Fosfato monobásico de potasio
- Cloroformo
- Cloruro de sodio

9. MEDIOS DE CULTIVOS

- Caldo cerebro corazón
- Agar medio antibiótico 11
- Agar medio antibiótico 1

10. MATERIALES DE REFERENCIA

Estándar USP Gentamicina sulfato
 Cepa de referencia Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

11. PATRONES DE REFERENCIA

Termómetro de referencia VW&R -20 a 110°C
 Termómetro de referencia Amarell -10 a 150°C
 Pesas 0,5000 g – 5,000 g – 10,0000g

12. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

12.1 Operaciones previas

- Verificar el material de vidrio
- Lavar y esterilizar todo el material de vidrio.
- Pinzas y cilindros de acero inoxidable esterilizados.
- Preparación de medios de cultivos y soluciones de trabajo.
- Activar la cepa de referencia de acuerdo al certificado otorgado por el proveedor.

12.2 Preparación de la Solución amortiguadora B.3 (0.1 M, pH 8,0).

La solución amortiguadora se la prepara a partir de 16,73 g/L de fosfato dibásico de potasio, y 0,523 g/L de fosfato monobásico de potasio. El pH después de la esterilización debe ser 8,0 ±0,1.

Ajustar el pH de la solución amortiguadora si fuera necesario, con ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N.

12.3 Preparación de la solución madre

La solución madre debe tener una concentración final de 1 mg de Gentamicina/mL. Pesar una cantidad suficiente del estándar de Sulfato de Gentamicina, y disolver en solución amortiguadora de fosfato de potasio. Almacenar de 2 a 8 °C y usar por no más de 30 días.

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

A partir de la solución stock, preparar cinco diluciones de prueba para la curva estándar dosis respuesta, con un aumento de concentración entre diluciones sucesivas de 1: 1,25. Para realizar el cálculo de las diluciones, se toma la concentración media (S_3) que para Gentamicina es $0.1 \mu\text{g/mL}$. En la Tabla 1 se detalla la concentración final de las diluciones de prueba calculadas con un factor de dilución de cuatro.

Tabla 1. Concentración de la curva estándar- dosis respuesta

Estándar	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Factor	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
S_1	0.064	4	0.256
S_2	0.08	4	0.32
S_3	0.1	4	0.4
S_4	0.125	4	0.5
S_5	0.156	4	0.624

12.4 Preparación de las soluciones de la muestra

Solución Inyectable

Asignar a la muestra una potencia supuesta por unidad de peso o volumen U_3 . Diluir con la solución amortiguadora hasta obtener una concentración nominal igual a la mediana de la concentración del estándar S_3 . Para Gentamicina el S_3 es $0.4 \mu\text{g/mL}$.

Crema

Se pesa ($\pm 0,0001 \text{ mg}$) la muestra que contenga cerca de 1 mg de Gentamicina. Agregar la cantidad pesada en una ampolla de decantación con 50 mL de cloroformo y agitar para disolver compuestos miscibles en el solvente. Seguidamente, añadir 100 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio, medidos en un matraz volumétrico.

Agitar suavemente por unos segundos, abrir la llave de la ampolla para eliminar la presión. Agitar con más intensidad y continuar hasta que ya no se genere la presión interna.

Dejar reposar para la separación de las dos fases.

Con el extracto acuso, tomar una alícuota de 10 mL y diluir con la solución amortiguadora hasta obtener una concentración nominal igual a la mediana de la concentración del estándar S_3 . Para Gentamicina el S_3 es $0.4 \mu\text{g/mL}$.

12.5 Preparación del microorganismo de prueba

- Tomar un criovial del microorganismo de prueba *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y verterlo en 9 mL de caldo cerebro corazón. Incubar de 32°C - 35°C de 18 a 24 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación, realizar el pase del microorganismo en 1 o más tubos inclinados que contenga agar antibiótico 1 e incubar por 24 horas de 32°C - 35°C .

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

- Transcurrido la incubación recolectar el crecimiento con 3 mL solución salina al 0.9% estéril.
- Esparcir la suspensión salina sobre la superficie de una o más placas de agar con medio antibiótico 1 cubriendo toda la superficie.
- Incubar la/s placa/s de 32°C-35°C por 24 horas.
- Transcurrido la incubación recolectar el crecimiento con 50 mL solución salina al 0.9% estéril. Esta es la suspensión de colección.
- Diluir una cantidad apropiada de la suspensión de colección con solución salina 0.9% estéril.
- Leer en el espectrofotómetro a 580 nm para obtener una transmitancia de 25%.

12.6 Preparación de caja Petri

Se utilizarán tres cajas Petri por nivel de concentración para la construcción de la curva de regresión dosis respuesta, y tres cajas por cada réplica de muestra.

Capa Base

El agar medio antibiótico 11 debe estar previamente fundido y enfriado a 45°C. Verter 21 mL en agar medio antibiótico 11 en la base de la caja de Petri, luego dejar solidificar con la tapa entreabierta para evitar la formación de gotas de agua.

Capa inoculada

Inocular 100 mL de agar antibiótico 11 con 0,06 mL del inóculo preparado. El agar antibiótico 11 debe estar a una temperatura de 45°C. (Agar para capa inoculada). La capa inoculada tendrá 4 mL de agar antibiótico 11 fundido y enfriado a 45°C. Inclinar la placa hacia atrás y hacia adelante para esparcir el inóculo uniformemente sobre la superficie de la capa base y dejar que se endurezca.

Cilindros

Dejar caer seis cilindros de acero inoxidable sobre la superficie inoculada utilizando una guía mecánica para asegurar el espaciado uniforme. Ver Figura 1.

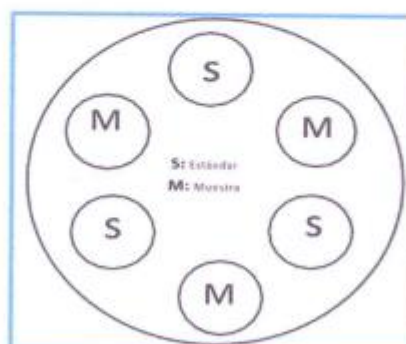


Figura 1. Guía mecánica para el espaciado uniforme de muestra y de estándar

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

- Para la curva de regresión dosis respuesta, verter 100 μl de la dilución correspondiente a la mediana de la dilución de prueba S_3 del estándar en tres cilindros de tres placas de Petri. Y en cada uno de los nueve cilindros remanentes, verter 100 μl una de las otras cuatro diluciones de prueba del estándar. Repetir el proceso cada dilución de prueba del estándar. Ver Anexo 1. Posición de las concentraciones del estándar y muestra.
- Para la muestra, verter 100 μl de la dilución correspondiente a la mediana de la dilución de prueba S_3 del estándar en tres cilindros de tres placas Petri, y los nueve cilindros remanentes con la dilución de prueba de la muestra U_3 . Ver Anexo 1. Posición de las concentraciones del estándar y muestra.
- Una vez llenos los cilindros dejar en reposo las cajas Petri tapadas por 15 minutos.
- Incubar todas las cajas a 37°C de 18 a 24 horas.
- Luego del periodo de incubación, medir los halos de inhibición y proceder a la recolección de datos.

13. CÁLCULO

Emplear la Hoja de Cálculo para el ingreso de datos y determinación de la potencia e intervalo de confianza de cada muestra, la misma que es parte del Reg. C 5.8.M1A CUADERNO DE RESULTADOS PARA VALORACIONES MICROBIOLÓGICAS DE ANTIBIÓTICOS POR EL MÉTODO CILINDRO. Ver Anexo 2.

13.1 Determinación de la potencia

1. Promediar los nueve valores de referencia S_3 y promediar los nueve valores para cada una de las concentraciones del estándar (S_1, S_2, S_4, S_5).
2. Para cada conjunto de tres placas, determinar la desviación estándar de los nueve valores de referencia y de la desviación estándar de los nueve valores estándar. Para cada desviación estándar, determinar la desviación estándar relativa. El límite sugerido es no más de 5%.
3. Realizar la corrección de variación entre placas, empleando la fórmula 1.

$$\bar{x}_c = \bar{x}_s - (\bar{x}_R - P) \quad (1)$$

Donde \bar{x}_c = medida corregida del estándar

\bar{x}_s = media original del estándar

\bar{x}_R = media de la referencia en el conjunto de tres placas Petri por estándar

P = promedio de las 36 lecturas de las medias de referencia en cada conjunto de tres placas Petri por estándar

4. De la misma forma que las concentraciones del estándar, realizar la corrección de la placas de la muestra tomado la media \bar{x}_{U3} por réplica, mediante la Fórmula 1.
5. Determinar la linealidad de la curva estándar, graficando las mediciones corregidas de la zona en función del logaritmo de los valores de concentración estándar. Emplear logaritmo natural o base 10.
6. Calcular la ecuación de la curva estándar, realizando una regresión lineal no ponderada estándar. La regresión es aceptable solo si la $\%R^2$ es no menos de 95%.

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

$$z = b(\log c) + a \quad (2)$$

z = medición de zona corregida

c = concentración

b = pendiente

a = intercepto

7. Usar la medición de zona promedio corregida en la ecuación de la línea de la curva estándar para determinar el logaritmo de la concentración de la muestra, $\log c$ mediante la fórmula 2, despejando la variable de interés:

$$\log c = (z - a) / b$$

8. Sacar el antilogaritmo para obtener concentración de la muestra C_U , mediante la Fórmula 3:

$$C_U = \text{antilogaritmo } c \quad (3)$$

9. Expresar en porcentaje de concentración, siguiendo la Fórmula 4:

$$\% = \frac{C_U}{S_3} \times 100 \quad (4)$$

13.2 Determinación de los Límites de Confianza

Para la determinación de los límites de confianza, realizar tres o más valoraciones independientes de Gentamicina en solución inyectable y crema, por muestra. Emplear escala logarítmica, de acuerdo a la Fórmula 5, para la obtención del intervalo de confianza:

$$LC = \text{antilog}(M \pm t \frac{SD}{\sqrt{n}}) \quad (5)$$

Donde,

M = promedio

SD = desviación estándar

n = número de valoraciones

$t(0,05, N - 1)$ = el punto del 5% de dos colas de una distribución t de Student con $N - 1$ grados de libertad

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

Para el cálculo de la desviación estándar total del laboratorio SD_{WL} , se debe realizar un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA). Tabla 2, y se determina la varianza en el día y entre los días de trabajo.

Tabla 2 Tabla ANOVA

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Media de los cuadrados (MC)
Entre grupos (factor efecto)	SCF	$I - 1$	$MCF = \frac{SCF}{I - 1}$
Intragrupal (error)	SCE	$N - I$	$MCE = \frac{SCE}{N - I}$
Total	SCT	$N - 1$	

Con las medias de los cuadrados obtenidas entre grupos e intragrupal, se calcula la varianza de cada una, siguiendo las fórmulas 6 y 7. Donde, V_B corresponde a la varianza entre los días y V_R corresponde a la varianza en el día. Para la obtención de n_0 se debe considerar la cantidad de réplicas realizadas, correspondiendo a un esquema desbalanceado, para ello se sigue la fórmula 8. El caso se realicen el mismo número de réplica en el días y entre los días, n_0 corresponderá a ese número .

$$V_B = \frac{MCF - MCE}{n_0} \quad (6)$$

$$V_R = MCE \quad (7)$$

$$n_0 = \frac{N - (\sum_{i=1}^k n_i^2)}{k - 1} \quad (8)$$

Donde, k = corresponde a los días de trabajo

N = números de medidas totales

n_i^2 = cuadrado de cada número de medidas

Finalmente, se saca la raíz cuadrada a las varianzas para obtener la desviación estándar de cada una, SD_B y SD_R respectivamente, fórmulas 9 y 10. La desviación total de laboratorio se la obtiene aplicando la fórmula 11, correspondiendo a la raíz cuadrada de las varianzas en el día y entre los días.

LOGO	CÓDIGO	EP XXX.MOPGXX
	VERSIÓN	001
PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA	FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
	Páginas 13	

$$SD_B = \sqrt{V_B} \quad (9)$$

$$SD_R = \sqrt{V_R} \quad (10)$$

$$SD_{WL} = \sqrt{V_R + V_B} \quad (11)$$

14. REPORTE DE RESULTADOS

14.1 Toma de datos

Las mediciones de los halos de inhibición se los registrarán en el Reg. C 5.8.M1A CUADERNO DE RESULTADOS PARA VALORACIONES MICROBIOLÓGICAS DE ANTIBIÓTICOS POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA.

14.2 Criterios de aceptación y rechazo

El producto cumple si la potencia declarada se encuentra no menos de 90,0% y no más de 125% para solución inyectable.

El producto cumple si la potencia declarada se encuentra no menos de 90,0% y no más de 135% para cremas.

15. PRECISIÓN Y EXACTITUD

La precisión se la realizará de acuerdo al PROG. XXXX PROGRAMA DE CONTROL INTERNO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS.

La exactitud se realizará cada día de valoración.

16. REGISTROS

DOCUMENTOS Y/O REGISTROS ASOCIADOS

PROG. xxxxx PROGRAMA DE CONTROL INTERNO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS.

Reg. xxxxx xxxxx Registro de verificación de equipos termorreguladores

INS xxxxx Instructivo para la preparación y control de calidad de medios de cultivos.

INS xxxxxx MOPG Instructivo de manejo de cepas (MATERIALES DE REFERENCIA).

Reg. xxxxx INFORME DE RESULTADOS.

Anexo 1. Cuaderno de resultados valoraciones microbiológicas de antibióticos por el método cilindro placa

LOGO		CÓDIGO	Reg xxxx
CUADERNO DE RESULTADOS VALORACIONES MICROBIOLÓGICAS DE ANTIBIÓTICOS POR EL MÉTODO CILINDRO PLACA		VERSIÓN	001
		FECHA DE VIGENCIA	2022-08-31
Páginas 2			

Código de la muestra: _____ **F. de recepción:** _____
Nombre del Producto: _____ **Tipo de Muestra:** _____
Forma farmacéutica: _____ **Reg. San.:** _____
Laboratorio fabricante: _____
Lote: _____ **F. Elab.** _____ **F. Exp.:** _____
Envase externo: _____
Envase interno: _____
F. de Análisis: _____ **F. de término de Análisis:** _____
Analista: _____

METODO DE REFERENCIA: USP 43 NF 37 <B1> Antibióticos. Valoraciones Microbiológicas
 Técnica: Cilindro-Placa

1. EQUIPOS UTILIZADOS
Parámetro de control a ser evaluado por analista: Los equipos deben contar con sus respectivos certificados o informes, según corresponda y cumplir con las tolerancias requeridas

Equipos	Código	SI	NO	Observación
Incubadora	IN-031			
Vortex	VR-062			
Bacteriador	BI-002			
Baño María	BM-006			
Micropipetas	MPA-034/ MPA-033			
Balanza Analítica	BA-090			
Baño ultrasónico	BU-009			
Medidor de halo/Regla Vernier	VE-093			
Espectrofotómetro	EF-022			
Centrifuga	CE-018			
Plato de calentamiento	PC-047			

2. MATERIALES UTILIZADOS
Parámetro de control a ser evaluado por analista: Todo material debe estar estéril.

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Tubos de ensayo estériles</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Asa de digrafsky</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Mechero de alcohol</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Fracos de Roux</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Cajas petri</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Matraces volumétricos estériles</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Pipetas volumétricas</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Cilindros de acero inoxidable</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> </table>	Tubos de ensayo estériles	<input type="checkbox"/>	Asa de digrafsky	<input type="checkbox"/>	Mechero de alcohol	<input type="checkbox"/>	Fracos de Roux	<input type="checkbox"/>	Cajas petri	<input type="checkbox"/>	Matraces volumétricos estériles	<input type="checkbox"/>	Pipetas volumétricas	<input type="checkbox"/>	Cilindros de acero inoxidable	<input type="checkbox"/>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Puntas 10 - 100 - 1000 µl</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Peras de extracción/Auxiliar de pipeta</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Gradillas</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Marcadores ó lápiz graso</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>EPP's</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Recipiente para descarte</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Pinza estéril</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>Beaker o matraz elermeyer</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> </table>	Puntas 10 - 100 - 1000 µl	<input type="checkbox"/>	Peras de extracción/Auxiliar de pipeta	<input type="checkbox"/>	Gradillas	<input type="checkbox"/>	Marcadores ó lápiz graso	<input type="checkbox"/>	EPP's	<input type="checkbox"/>	Recipiente para descarte	<input type="checkbox"/>	Pinza estéril	<input type="checkbox"/>	Beaker o matraz elermeyer	<input type="checkbox"/>
Tubos de ensayo estériles	<input type="checkbox"/>																																
Asa de digrafsky	<input type="checkbox"/>																																
Mechero de alcohol	<input type="checkbox"/>																																
Fracos de Roux	<input type="checkbox"/>																																
Cajas petri	<input type="checkbox"/>																																
Matraces volumétricos estériles	<input type="checkbox"/>																																
Pipetas volumétricas	<input type="checkbox"/>																																
Cilindros de acero inoxidable	<input type="checkbox"/>																																
Puntas 10 - 100 - 1000 µl	<input type="checkbox"/>																																
Peras de extracción/Auxiliar de pipeta	<input type="checkbox"/>																																
Gradillas	<input type="checkbox"/>																																
Marcadores ó lápiz graso	<input type="checkbox"/>																																
EPP's	<input type="checkbox"/>																																
Recipiente para descarte	<input type="checkbox"/>																																
Pinza estéril	<input type="checkbox"/>																																
Beaker o matraz elermeyer	<input type="checkbox"/>																																

3. MEDIOS, REACTIVOS, CEPAS Y DILUYENTES
Parámetro de control a ser evaluado por analista: Todos los medios de cultivo y cepas deben contar con sus respectivos certificados de análisis.

Medio de Cultivo: _____	Capa base: _____	Capa Inoculada: _____	pH del Medio: _____
Microorganismo de desafío: _____	ATCC: _____	Medio de cultivo: _____	pH del Medio: _____
Estándar: _____	Potencia: _____		
Código: _____	Lote: _____	F. exp: _____	

Diluyente inicial: _____	Diluyente Final: _____
---------------------------------	-------------------------------

T° de incubación: _____ **Tiempo de incubación:** _____ **T° de baño maría:** 45°C

4. Concentración y cálculos de estándares

Estándar	Concentración µg/mL
S ₁	0,256
S ₂	0,320
S ₃	0,4
S ₄	0,50
S ₅	0,63

Concentración de Solución madre _____

5. Dilución de la muestra

INSTITUCIÓN: _____
 FECHA DE EMISIÓN: _____
 FECHA DE VIGENCIA: _____
 TÍTULO: _____
 AUTOR: _____
 REVISOR: _____
 APROBADO: _____
 FECHA DE APROBACIÓN: _____
 TÍTULO DE APROBACIÓN: _____
 INSTITUCIÓN: _____

6. Resultados de Estándar- Halos de Inhibición

Placa	S1 (0,256ug/ml)	S2 (0,4ug/ml)	S3 (0,32ug/ml)	S4 (0,4ug/ml)	S5 (0,625 ug/ml)	S6 (0,4ug/ml)	S7 (0,625 ug/ml)	S8 (0,4ug/ml)
1								
2								
3								
1								
2								
3								
1								
2								
3								

7. Resultados de Muestra (Réplicas)-Halos de inhibición

Placa	M1 (U3)	S1 (0,4ug/ml)	M2 (U3)	S2 (0,4ug/ml)	M3 (U3)	S3 (0,4ug/ml)	M4 (U3)	S4 (0,4ug/ml)	M5 (U3)	S5 (0,4ug/ml)
1										
2										
3										
1										
2										
3										
1										
2										
3										

8. Potencia del antibiótico

9. Límites de confianza

10. Conclusión

CUMPLE

NO CUMPLE

Analista _____

Analista Técnico Responsable _____

Validado por: _____

Fecha: _____

LOGO

Código	Reg. XXXX
Versión	001
Fecha de Vigencia	2022-08-31
Páginas 1	

Hoja de Cálculo para Valoraciones Microbiológicas de Antibióticos por el Método Cilindro Placa

Código de muestra: _____ Forma Farmacéutica: _____ Modalidad de venta: _____

Fecha de valoración: _____ Fecha de resultados: _____

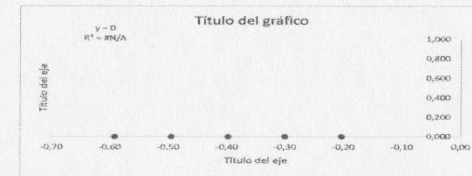
1. Halos de Inhibición

Placa	S1 (0,256ug/ml)	S3 (0,4ug/ml)	S2 (0,32ug/ml)	S3 (0,4ug/ml)	S4 (0,5 ug/ml)	S3 (0,4ug/ml)	S5 (0,625 ug/ml)	S3 (0,4ug/ml)	M1 (U3)	S3 (0,4ug/ml)	M2 (U3)	S3 (0,4ug/ml)	M3 (U3)	S3 (0,4ug/ml)
1														
2														
3														
1														
2														
3														
1														
2														
3														
Suma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
Gran promedio	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
Corrección (GP-Promedio de St X)	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
Promedio de St X corregido	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
DS	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
NRDS	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!

2. Curva de Regresión

Estándar	Concentración ug/ml	Log 10 C	Mediciones de la zona corregida		
S1	0,256	-0,59	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
S2	0,320	-0,49	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
S3	0,4	-0,40	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
S4	0,50	-0,30	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
S5	0,63	-0,20	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
U3	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
Intercepto (a)	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
Pendiente (b)	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
LU3	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
CU3 (antilogaritmo)	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
Cantidad de muestra en mg o g					
Volumen ml	100				
Volumen ml	25	Volumen de dilución que se llevo a la muestra, y la alicuota tomada.			
Volumen ml	25				
Alicuota ml	1,56				
Concentración teorica	0	0	0	0	0
% Potencia real	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!

Criterio: %GRDS ≤ 10%
 %R² ≥ 95%



3. Determinación de Límites de Confianza

Promedio	# DIV/0!
DS	# DIV/0!
n	3
Grados de Libertad	2
t-alfa	0,05
t tabla	0,070799233
Intervalo de confianza	# DIV/0!

4. Reporte de resultado

	Log 10 C	antilogaritmo C	Potencia en %
Declara la potencia:	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
Límite Superior	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!
Límite Inferior	# DIV/0!	# DIV/0!	# DIV/0!

Anexo 1. Hoja de Cálculo para Valoraciones Microbiológicas de Antibióticos por el Método Cilindro Placa
Anexo 2. Resultados de Valoración Gentamicina en Solución Inyectable - Genérica

VALORACIÓN DE GENTAMICINA - TÉCNICA CILINDRO-PLACA

Forma Farmacéutica:	Solución Inyectable	Material de Referencia	Sulfato de Gentamicina USP
Modalidad de venta:	Genérica	Concentración	671 ug/mg
FECHA DE VALORACIÓN:	6/7/2022	Lote:	R084Q0
FECHA DE RESULTADOS	7/7/2022		

Placa	S ₁ (0,256ug/ml)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₂ (0,32ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₄ (0,5 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₅ (0,625 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	15,67	16,43	15,82	16,03	17,79	16,32	18,89	16,1
2	15,37	16,43	15,82	16,5	17,9	16,46	18,89	16,44
3	15,95	16,43	15,82	16,88	17,27	16,35	18,55	16,76
1	15,27	16,14	16,3	16,74	17,75	16,9	18,06	16,58
2	15,8	16,61	16,3	16,74	17,67	16,9	18,41	16,43
3	15,8	16,68	15,7	16,29	17,15	16,59	18,41	16,43
1	15,1	16,43	16,31	16,64	17,03	16,72	18,36	15,47
2	15,1	16,82	15,65	16,74	17,8	16,72	18,59	15,61
3	15,69	16,12	15,9	16,19	17,63	16,05	18,07	15,61
Suma	139,75	148,09	143,62	148,75	157,99	149,01	166,23	145,43
Promedio	15,53	16,45	15,96	16,53	17,55	16,56	18,47	16,16
Gran promedio S₃	16,42							
Corrección	0,03		0,10		0,13		0,27	
Promedio de St X corregido	15,50		15,85		17,42		18,20	
DS	0,322	0,230	0,269	0,294	0,319	0,286	0,300	0,480
%RDS	2,1	1,4	1,7	1,8	1,8	1,7	1,6	3,0

Intercepto (a) 19,533
 Pendiente (b) 7,204
 R² 0,973

Estándar	Concentración ug/mL	Mediciones de la zona corregida
S ₁	0,256	15,50
S ₂	0,320	15,85
S ₃	0,4	16,42
S ₄	0,50	17,42
S ₅	0,63	18,20

Placa	M1 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M2 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M3 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M4 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M5 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	16,58	16,98	15,25	16,39	15,69	15,43	15,5	16,03	16,59	16,58
2	16,51	15,8	15,52	16,27	16,14	15,61	16,68	16,4	16,52	16,85
3	16,24	15,65	15,42	15,28	15,02	15,27	16,13	15,65	17,52	16,52
1	16,5	16,09	16,04	16,23	15,18	14,73	15,94	16,12	16,63	16,26
2	15,55	16,1	16,42	15,91	15,67	14,73	15,93	16,51	16,01	16,26
3	16,29	16,01	16,22	16,17	15,4	14,73	16,63	16,19	17,46	16,56
1	16,36	16,02	15,7	15,97	15,31	15,44	15,55	15,4	16,76	16,54
2	16,05	16,52	15,7	15,96	15,62	14,74	16,05	15,4	16,81	16,53
3	16,05	15,3	16,22	15,98	16,22	14,86	15,32	15,46	16,47	16,74
Suma	146,13	144,47	142,49	144,16	140,25	135,54	143,73	16,3	150,77	16,44
Promedio	16,24	16,05	15,83	16,02	15,58	15,06	15,97	15,91	16,75	16,54
Corrección	-0,4		-0,4		-1,4		-0,5		0,1	
Promedio corregido	16,61		16,24		16,95		16,49		16,64	
DS	0,320	0,484	0,408	0,323	0,407	0,370	0,474	0,437	0,477	0,192
%RDS	2,0	3,0	2,6	2,0	2,6	2,5	3,0	2,7	2,8	1,2
Log10_u	-0,41		-0,46		-0,36		-0,42		-0,40	
C_u	0,39		0,35		0,44		0,38		0,39	
% Potencia	98,18		87,23		109,42		94,46		99,13	

VALORACIÓN DE GENTAMICINA - TÉCNICA CILINDRO-PLACA

Forma Farmacéutica:	Solución Inyectable	Material de Referencia	Sulfato de Gentamicina USP
Modalidad de venta:	Genérica	Concentración	671 ug/mg
FECHA DE VALORACIÓN:	12/7/2022	Lote:	R084Q0
FECHA DE RESULTADOS	13/7/2022		

Placa	S ₁ (0,256ug/ml)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₂ (0,32ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₄ (0,5 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₅ (0,625 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	15,52	16,46	15,5	15,93	17,55	16,75	17,91	16,65
2	15,52	16,85	15,5	16,1	17,04	15,93	17,1	16,44
3	16,31	16,3	15,69	15,73	16,77	15,74	17,15	16,55
1	16,01	16,33	15,29	16,42	17,74	16,52	17,12	16,58
2	15,03	16,71	16,02	16,41	17,06	16,41	17,38	15,85
3	15,04	15,93	15,97	16,33	17,06	16,41	17,17	16,21
1	15,65	16,55	15,58	16,33	17,06	16,41	17,53	15,81
2	15,42	16,45	15,95	16,55	16,46	16,52	17,53	15,7
3	15,65	16,7	16,33	16,74	16,15	16,58	17,53	16,53
Suma	140,15	148,28	141,83	146,54	152,89	147,27	156,42	146,32
Promedio	15,57	16,48	15,76	16,28	16,99	16,36	17,38	16,26
Gran promedio S₃	16,34							
Corrección	0,13		-0,06		0,02		0,09	
Promedio de St X corregido	15,44		15,82		16,97		17,29	
DS	0,411	0,274	0,329	0,313	0,491	0,322	0,272	0,376
%RDS	2,6	1,7	2,1	1,9	2,9	2,0	1,6	2,3

Intercepto (a) 18,353
 Pendiente (b) 4,996
 R² 0,989

Estándar	Concentración ug/mL	Mediciones de la zona corregida
S ₁	0,256	15,44
S ₂	0,320	15,82
S ₃	0,4	16,34
S ₄	0,50	16,97
S ₅	0,63	17,29

Placa	M1 (U _s)	S ₃ (0,4ug/mL)	M2 (U _s)	S ₃ (0,4ug/mL)	M3 (U _s)	S ₃ (0,4ug/mL)	M4 (U _s)	S ₃ (0,4ug/mL)	M5(U _s)	S ₃ (0,4ug/mL)	M6 (U _s)	S ₃ (0,4ug/mL)	M7 (U _s)	S ₃ (0,4ug/mL)	M8 (U _s)	S ₃ (0,4ug/mL)	M9 (U _s)	S ₃ (0,4ug/mL)	M10 (U _s)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	16,32	16,67	15,91	15,87	15,82	16,81	16,72	16,16	17,03	16,48	16,03	16,43	16,59	16,94	16,5	15,96	16,47	16,94	16,2	15,95
2	15,75	16,67	15,91	15,87	16,09	16,05	16,66	16,88	17,02	16,18	16,02	15,09	16,24	16,38	16,01	16,53	15,91	16,45	16,02	16,15
3	16,67	16,77	15,87	15,98	16,89	15,63	16,79	16,41	17,03	16,22	16,2	15,1	16,5	16,02	16,5	16,53	16,11	15,61	16,98	16,23
1	16,54	15,86	16,22	16,44	16,55	16,41	16,71	16,84	16,3	16,54	16,84	15,43	16,95	16,4	17,1	16,69	16,29	16,85	16,56	16,23
2	16,46	15,8	16,22	16,06	16,44	15,17	16,81	16,98	16,53	16,79	16,01	16,77	16,42	16,61	16,37	16,69	16,89	16,2	16,73	16,52
3	16,3	15,8	16,22	16,39	16,56	16,58	16,81	16,23	16,53	16,58	16,33	15,37	15,32	15,76	16,34	16,32	16,89	16,89	15,44	16,03
1	16,02	16,08	16,07	16,4	16,59	16,28	16,18	16,33	17,03	16,77	15,88	16,95	16,36	16,2	16,69	16,1	16,54	16	16,31	16,44
2	16,27	15,99	16,43	16,4	16,29	16,29	16,18	16,33	16,56	16,45	16,25	16,95	16,35	16,2	16,68	16,29	16,56	16,53	16,24	16,69
3	15,36	15,31	16,23	16,4	16,47	16,29	16,32	15,93	15,52	16,31	16,25	15,7	16,31	16,1	16,61	16,6	16,69	15,93	16,56	15,94
Suma	145,69	144,95	145,08	145,81	147,7	145,51	149,18	148,09	149,55	148,32	145,81	143,79	147,04	146,61	148,8	147,71	148,35	147,4	147,04	146,18
Promedio	16,19	16,11	16,12	16,20	16,41	16,17	16,58	16,45	16,62	16,48	16,20	15,98	16,34	16,29	16,53	16,41	16,48	16,38	16,34	16,24
Corrección	-0,2		-0,1		-0,2		0,1		0,1		-0,4		-0,1		0,1		0,0		-0,1	
Promedio corregido	16,43		16,26		16,59		16,47		16,48		16,57		16,39		16,47		16,45		16,44	
DS	0,414	0,497	0,191	0,250	0,311	0,498	0,269	0,362	0,500	0,218	0,281	0,793	0,436	0,345	0,299	0,260	0,333	0,474	0,447	0,262
%RDS	2,6	3,1	1,2	1,5	1,9	3,1	1,6	2,2	3,0	1,3	1,7	5,0	2,7	2,1	1,8	1,6	2,0	2,9	2,7	1,6
Log10_v	-0,39		-0,42		-0,35		-0,38		-0,37		-0,36		-0,39		-0,38		-0,38		-0,38	
C_v	0,41		0,38		0,44		0,42		0,42		0,44		0,40		0,42		0,41		0,41	
% Potencia	102,90		95,44		110,83		104,76		105,52		109,87		101,28		104,76		104,01		103,54	

Anexo 3. Resultados de Valoración Gentamicina en Solución Inyectable - Marca

VALORACIÓN DE GENTAMICINA - TÉCNICA CILINDRO-PLACA

Forma Farmacéutica: Solución Inyectable **Material de Referencia** Sulfato de Gentamicina USP
Modalidad de venta: Marca **Concentración** 671 ug/mg
FECHA DE VALORACIÓN: 19/7/2022 **Lote:** R084Q0
FECHA DE RESULTADOS 20/7/2022

Placa	S ₁ (0,256ug/ml)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₂ (0,32ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₄ (0,5 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₅ (0,625 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	14,03	16,21	14,43	16,3	16,66	16,65	17,07	16,79
2	14,05	15,21	14,51	16,32	16,19	16,17	17,46	15,44
3	14,41	15,97	14,77	16,35	16,76	15,67	17,17	15,47
1	14,55	15,46	14,22	16,7	16,94	15,71	17,75	17,85
2	14,23	16,13	14,22	15,74	16,23	15,06	17,28	16,78
3	14,3	15,61	14,55	15,38	16,35	15,06	17,16	17,29
1	14,46	15,62	15,06	15,55	15,8	15,3	17,72	16,19
2	14,46	16,72	15,09	16,27	16,47	15,43	17,71	16,19
3	14,45	16,35	15,06	15,91	15,74	15,8	17,05	17,07
Suma	128,94	143,28	131,91	144,52	147,14	140,85	156,37	149,07
Promedio	14,33	15,92	14,66	16,06	16,35	15,65	17,37	16,56
Gran promedio S₃	16,05							
Corrección	-0,13		0,01		-0,40		-0,52	
Promedio de St X corregido	14,45		14,65		16,75		17,89	
DS	0,188	0,482	0,352	0,435	0,409	0,520	0,290	0,812
%RDS	1,3	3,0	2,4	2,7	2,5	3,3	1,7	4,9

Intercepto (a) 19,616
Pendiente (b) 9,233
R² 0,962

Estándar	Concentración ug/mL	Mediciones de la zona corregida
S ₁	0,256	14,45
S ₂	0,320	14,65
S ₃	0,4	16,05
S ₄	0,50	16,75
S ₅	0,63	17,89

Placa	M1 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M2 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M3 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M4 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M5 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	15,47	15,59	15,91	15,74	16,56	16,68	16,7	16,23	15,82	15,59
2	15,51	15,64	15,9	15,36	16,05	16,11	15,84	15,91	16,09	15,59
3	16,05	16,76	15,98	15,36	16,32	16,76	15,87	15,87	15,33	16,59
1	15,57	15,25	15,64	15,79	16,41	16,29	16,23	15,63	15,46	15,48
2	15,25	15,57	16,13	15,65	16,41	16,29	16,2	15,63	15,76	16,12
3	15,25	16,13	16,2	15,7	15,01	15,2	15,14	16,3	15,76	15,53
1	16,75	15,75	15,96	16,48	15,6	15,38	15,84	15,65	15,46	15,52
2	16,75	16,49	15,96	16,6	16,72	16,25	15,61	15,65	16,69	15,66
3	16,75	16,49	15,65	16,41	16,72	16,25	16,2	16,6	15,95	15,4
Suma	143,35	143,67	143,33	143,09	145,8	145,21	143,63	143,47	142,32	141,48
Promedio	15,93	15,96	15,93	15,90	16,20	16,13	15,96	15,94	15,81	15,72
Corrección	-0,1		-0,1		0,1		-0,1		-0,3	
Promedio corregido	16,01		16,07		16,11		16,07		16,14	
DS	0,659	0,521	0,187	0,476	0,567	0,525	0,443	0,356	0,411	0,386
%RDS	4,1	3,3	1,2	3,0	3,5	3,3	2,8	2,2	2,6	2,5
Log10_u	-0,39		-0,38		-0,38		-0,38		-0,38	
C_u	0,41		0,41		0,42		0,41		0,42	
% Potencia	101,85		103,44		104,45		103,21		105,17	

Placa	M1 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M2 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M3 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M4 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M5(U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M6 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M7 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M8 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M9 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M10 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	16,75	16,62	16,31	16,14	16,41	16,23	16,7	16,24	15,87	16,39	16,57	15,72	16,16	17,19	17,04	16,77	17,14	15,27	17,09	16,16
2	16,01	16,78	15,38	16,62	16,28	15,38	15,84	16,74	15,54	16,34	15,31	15,63	15,19	17,15	17,32	17,64	15,49	16,2	17,19	15,09
3	16,24	15,89	15,95	16,64	15,9	15,88	15,87	16,76	16,71	16,3	16,76	16,1	15,68	16,72	16,94	16,84	17,32	14,98	17,33	15,09
1	16,77	16,62	16	16,65	16,5	16,38	16,23	16,38	16,96	15,31	16,8	16,41	16,11	15,96	15,75	16,06	15,57	14,52	17,1	16,16
2	15,94	15,92	15,95	16,56	16,5	16,6	16,2	15,83	15,87	15,43	16,3	16,1	16,09	15,96	14,71	15,84	15,71	15,06	16,16	15,26
3	16,63	15,62	16,13	15,97	16,53	16,59	15,14	16,03	16,03	16,37	15,84	16,14	15,75	15,41	15,56	15,96	14,81	14,15	15,85	16,1
1	15,17	16,64	16,16	16,08	15,83	16,16	15,84	16,12	16,22	15,81	16,14	16,7	15,71	15,99	16,39	15,97	14,89	15,61	16,18	15,37
2	16,62	16,62	15,71	15,55	15,83	15,99	15,61	15,92	15,95	15,81	16,01	15,94	15,77	16,19	16,22	16,44	15,58	15,22	15,69	15,91
3	16,96	15,83	15,31	16,37	16,42	16,42	16,2	15,95	16,08	16,4	15,42	16,16	16,62	16,15	15,45	15,45	14,9	15,09	15,21	15,62
Suma	147,09	146,54	142,9	146,58	146,2	145,63	143,63	145,97	145,23	144,16	145,15	144,9	143,08	146,72	145,38	146,97	141,41	136,1	147,8	140,76
Promedio	16,34	16,28	15,88	16,29	16,24	16,18	15,96	16,22	16,14	16,02	16,13	16,10	15,90	16,30	16,15	16,33	15,71	15,12	16,42	15,64
Corrección	0,1		0,1		0,0		0,0		-0,2		-0,1		0,1		0,2		-0,8		-0,5	
Promedio corregido	16,23		15,76		16,23		15,01		16,29		16,20		15,77		15,99		16,47		16,67	
DS	0,564	0,454	0,345	0,380	0,303	0,389	0,443	0,344	0,442	0,437	0,541	0,326	0,402	0,596	0,860	0,665	0,926	0,588	0,773	0,454
%RDS	3,5	2,8	2,2	2,3	1,9	2,4	2,8	2,1	2,7	2,7	3,4	2,0	2,5	3,7	5,3	4,1	5,9	3,9	4,7	2,9
Lu	-0,37		-0,43		-0,37		-0,41		-0,37		-0,38		-0,42		-0,40		-0,35		-0,33	
Cu	0,42		0,38		0,42		0,39		0,43		0,42		0,38		0,40		0,45		0,47	
% Potencia	105,75		93,95		105,81		97,57		107,30		104,87		94,06		99,61		112,31		118,14	

Anexo 4. Resultados de Valoración Gentamicina en Crema – Genérica

VALORACIÓN DE GENTAMICINA - TÉCNICA CILINDRO-PLACA

Forma Farmacéutica:	Crema	Material de Referencia	Sulfato de Gentamicina USP
Modalidad de venta:	Genérica	Concentración	671 ug/mg
FECHA DE VALORACIÓN:	2/8/2022	Lote:	R084Q0
FECHA DE RESULTADOS	3/8/2022		

Placa	S ₁ (0,256ug/ml)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₂ (0,32ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₄ (0,5 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₅ (0,625 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	14,85	16,59	15,24	16,11	17,47	16,65	18,95	16,5
2	14,56	16,29	15,19	15,79	16,77	16,21	19,13	16,68
3	14,86	16,18	15,17	16,59	16,71	16,41	19,13	16,41
1	14,43	16,69	15,12	16,52	17,35	16,71	17,88	16,99
2	14,17	16,75	14,61	16,17	17,34	16,71	18,38	16,5
3	14,51	16,68	15,44	16,39	16,98	16,27	19,1	16,4
1	14,78	15,92	14,74	16,14	17,32	16,68	17,91	16,27
2	13,25	16,75	15,58	15,69	17,52	16,66	18,57	16,3
3	13,69	16,04	14,76	16,21	17,27	15,61	19,8	16,28
Suma	129,1	147,89	135,85	145,61	154,73	147,91	168,85	148,33
Promedio	14,34	16,43	15,09	16,18	17,19	16,43	18,76	16,48
Gran promedio S₃	16,38							
Corrección	0,55		-0,20		0,05		-0,10	
Promedio de St X corregido	14,29		15,30		17,14		18,86	
DS	0,553	0,327	0,329	0,302	0,298	0,365	0,631	0,231
%RDS	3,9	2,0	2,2	1,9	1,7	2,2	3,4	1,4

Intercepto (a) 20,878
 Pendiente (b) 11,321
 R² 0,985

Estándar	Concentración ug/mL	Mediciones de la zona corregida
S ₁	0,256	14,29
S ₂	0,320	15,30
S ₃	0,4	16,38
S ₄	0,50	17,14
S ₅	0,63	18,86

Placa	M1 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M2 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M3 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	15,5	15,72	15,81	15,3	16,4	17,33
2	16,45	16,3	16,73	15,38	16,3	16,43
3	16,7	15,75	15,59	15,72	16,17	15,83
1	16,3	16,18	15,53	15,98	16,23	15,94
2	16,67	16,47	16,5	15,24	16,55	15,84
3	16,3	16,25	16,33	15,6	16,74	15,69
1	16,57	16,67	15,95	16,3	16,13	16,86
2	16,28	16,3	15,6	16,29	16,29	15,86
3	16,3	16,38	16,42	15,53	16,8	16,41
Suma	147,07	146,02	144,46	141,34	147,61	146,19
Promedio	16,34	16,22	16,05	15,70	16,40	16,24
Corrección	-0,2		-0,7		-0,1	
Promedio corregido	16,50		16,73		16,54	
DS	0,357	0,312	0,452	0,403	0,244	0,559
%RDS	2,2	1,9	2,8	2,6	1,5	3,4
Log10_u	-0,38		-0,38		-0,37	
C_u	0,41		0,41		0,32	
Peso de la muestra (g)	5,0026		5,0026		5,0026	
% Potencia	102,53		103,44		107,44	

VALORACIÓN DE GENTAMICINA - TÉCNICA CILINDRO-PLACA

Forma Farmacéutica:	Crema	Material de Referencia	Sulfato de Gentamicina USP
Modalidad de venta:	Genérica	Concentración	671 ug/mg
FECHA DE VALORACIÓN:	3/8/2022	Lote:	R084Q0
FECHA DE RESULTADOS	4/8/2022		

Placa	S ₁ (0,256ug/ml)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₂ (0,32ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₄ (0,5 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₅ (0,625 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	14,02	16,59	14,97	15,91	16,6	15,5	18,48	15,86
2	14,05	15,84	14,3	16,37	15,57	16,33	18,09	16,56
3	14,14	16,18	14,64	16,72	16,65	15,12	18,64	15,19
1	14,44	16,69	15,17	15,09	16,43	15,65	18,77	16,62
2	13,5	16,75	14,5	15,81	16,68	16,32	18,75	15,92
3	13,5	16,68	13,98	16,57	17,01	16,02	18,76	16,75
1	14,15	15,21	14,04	15,34	15,65	16,51	18,47	16,01
2	13,21	15,8	14,02	15,37	16,23	15,34	18,01	16,31
3	14,57	15,21	15,34	15,36	15,98	15,42	18,08	15,36
Suma	125,58	144,95	130,96	142,54	146,8	142,21	166,05	144,58
Promedio	13,95	16,11	14,55	15,84	16,31	15,80	18,45	16,06
Gran promedio S₃	15,95							
Corrección	0,15		-0,11		-0,15		-0,11	
Promedio de St X corregido	13,80		14,67		16,46		18,56	
DS	0,457	0,622	0,515	0,598	0,492	0,504	0,313	0,549
%RDS	3,3	3,9	3,5	3,8	3,0	3,2	1,7	3,4

Intercepto (a) 20,512
 Pendiente (b) 11,677
 R² 0,962

Estándar	Concentración ug/mL	Mediciones de la zona corregida
S ₁	0,256	13,80
S ₂	0,320	14,67
S ₃	0,4	15,95
S ₄	0,50	16,46
S ₅	0,63	18,56

Placa	M1 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M2 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M3 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M4 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M5 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M6 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	16,95	17,53	15,49	15,8	17,63	16,66	16,44	15,89	17,1	16,78	15,88	16,01
2	17,09	17,17	16,12	15,8	17,57	16,66	16,49	15,91	17,92	17,11	16,44	16,05
3	16,92	17,65	18,28	15,8	17,41	16,65	15,88	15,7	17,73	17,39	16,16	15,18
1	17,65	16,2	16,2	16,3	16,66	16,33	16,12	15,12	17,39	16,99	15,84	15,99
2	17,46	16,76	15,48	16,8	17,37	16,34	16,12	16,62	17,5	16,38	16,59	15,38
3	17,13	16,47	16,68	16,45	16,89	17,05	16,13	16,03	17,5	16,6	16,62	15,68
1	16,44	15,61	17,41	16,84	15,55	17,26	16,36	16,04	16,72	16,33	16,36	17,46
2	15,46	16,15	16,89	15,99	17,18	16,68	18,82	17,04	16,89	15,83	17,16	16,53
3	15,86	15,42	16,84	16,63	17,46	16,68	16	15,52	15,85	15,24	17,04	16,3
Suma	150,96	148,96	149,39	146,41	153,72	150,31	148,36	143,87	154,6	148,65	148,09	144,58
Promedio	16,77	16,55	16,60	16,27	17,08	16,70	16,48	15,99	17,18	16,52	16,45	16,06
Corrección	0,6		0,3		0,7		0,0		0,6		0,1	
Promedio corregido	16,17		16,28		16,33		16,45		16,61		16,34	
DS	0,724	0,794	0,902	0,434	0,656	0,298	0,899	0,568	0,629	0,668	0,460	0,673
%RDS	4,3	4,8	5,4	2,7	3,8	1,8	5,5	3,6	3,7	4,0	2,8	4,2
Log10_u	-0,37		-0,36		-0,36		-0,35		-0,33		-0,36	
C_u	0,43		0,43		0,44		0,45		0,46		0,44	
Peso de la muestra (g)	5,3803		5,2328		5,3688		5,2739		5,4522		5,1329	
% Potencia	98,77		103,76		102,09		106,42		106,28		107,02	

Placa	M7 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M8 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M9 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M10 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M11 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M12 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	18,08	17,78	16,72	16,06	16,4	16,87	15,34	15,91	16,7	16,29	15,4	15,14
2	18,46	17,78	15,8	17,14	16,41	15,58	15,4	15,34	17,13	15,29	15,39	15,22
3	17,44	17,46	18,36	17,19	16,21	15,58	16,84	16,1	16,91	16,81	15,4	15,22
1	16,53	15,67	17,19	16,14	15,59	15,39	17,62	16,08	17,06	15,99	15,46	15,2
2	16,52	15,87	16,71	16,87	15,59	15,8	17,56	16,22	16,08	15,48	15,46	15,39
3	16,3	15,87	16,14	16,75	16,25	15,28	16,85	15,47	16,08	17,77	15,24	15,51
1	17,26	16,63	15,95	16,15	15,4	15,08	15,78	15,84	16,85	16,32	15,21	15,46
2	16,23	18,22	15,95	16,61	15,68	15,51	16,1	15,96	14,54	16,22	15,44	16,07
3	16,4	16,56	15,82	15,65	16,2	15,93	15,69	15,39	16,32	16,88	15,12	16
Suma	153,22	151,84	148,64	148,56	143,73	141,02	147,18	142,31	147,67	147,05	138,12	139,21
Promedio	17,02	16,87	16,52	16,51	15,97	15,67	16,35	15,81	16,41	16,34	15,35	15,47
Corrección	0,9		0,6		-0,3		-0,1		0,4		-0,5	
Promedio corregido	16,11		15,96		16,25		16,49		16,02		15,83	
DS	0,825	0,963	0,845	0,532	0,398	0,518	0,888	0,330	0,806	0,753	0,124	0,346
%RDS	4,8	5,7	5,1	3,2	2,5	3,3	5,4	2,1	4,9	4,6	0,8	2,2
Log10_u	-0,38		-0,39		-0,36		-0,34		-0,38		-0,40	
C_u	0,42		0,41		0,43		0,45		0,41		0,40	
Peso de la muestra (g)	5,4522		5,3688		5,2328		5,3803		5,4522		5,1645	
% Potencia	96,16		94,91		103,15		105,18		94,57		96,17	

Anexo 5. Resultados de Valoración Gentamicina en Crema – Marca

VALORACIÓN DE GENTAMICINA - TÉCNICA CILINDRO-PLACA

Forma Farmacéutica:	Crema	Material de Referencia:	Sulfato de Gentamicina USP
Modalidad de venta:	Marca	Concentración:	671 ug/mg
FECHA DE VALORACIÓN:	17/8/2022	Lote:	R084Q0
FECHA DE RESULTADOS	18/8/2022		

Placa	S ₁ (0,256ug/ml)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₂ (0,32ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₄ (0,5 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₅ (0,625 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	12,09	14,81	11,82	13,31	15,73	13,97	16,32	13,68
2	12,09	14,07	12,42	14,02	16,17	13,65	16,01	14,35
3	11,93	14,07	12,77	14,02	15,27	13,95	16,02	15,27
1	11,43	13,67	11,8	12,76	14,51	12,89	15,81	13,87
2	11,25	14,88	11,13	12,77	14,85	12,58	15,95	13,2
3	11,26	13,08	10,91	13,02	14,17	13,61	15,38	13,8
1	10,55	13,37	11,76	14,01	14,19	14,08	15,26	13,5
2	10,55	12,69	11,3	14,12	13,88	13,15	15,46	13,58
3	10,55	13,22	11,27	13,48	13,95	13,15	14,41	13,58
Suma	101,7	123,86	105,18	121,51	132,72	121,03	140,62	124,83
Promedio	11,30	13,76	11,69	13,50	14,75	13,45	15,62	13,87
Gran promedio S₃	13,65							
Corrección	0,12		-0,14		-0,20		-0,22	
Promedio de St X corregido	11,18		11,83		14,94		15,85	
DS	0,647	0,759	0,611	0,563	0,819	0,528	0,573	0,611
%RDS	5,7	5,5	5,2	4,2	5,6	3,9	3,7	4,4

Intercepto (a) 18,560
 Pendiente (b) 12,802
 R² 0,978

Estándar	Concentración ug/mL	Mediciones de la zona corregida
S ₁	0,256	11,18
S ₂	0,320	11,83
S ₃	0,4	13,65
S ₄	0,50	14,94
S ₅	0,63	15,85

Placa	M1 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M2 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M3 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M4 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M5 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M6 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M7 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	16,22	15,45	14,1	14,26	14,21	14,27	15,19	14,71	15,1	14,19	13,52	14,12	13,9	14
2	15,98	15,36	14,35	14,36	14,21	14,07	14,64	14,87	14,43	15,18	13,67	13,99	13,78	13,92
3	15,16	15,14	14,64	13,96	14,22	14,13	14,6	14,62	14,76	15,56	15,62	15,42	13,89	14,16
1	15,09	14,45	13,83	13,67	14,86	14,53	14,51	14,2	15,12	14,3	15,19	15,91	14,42	13,28
2	14,67	14,97	13,11	13,61	14,84	14,38	13	14,38	15,06	14,61	15,63	15,97	13,77	13,36
3	14,83	13,91	13,4	13,68	14,2	14,39	14,14	14,25	14,66	14,84	14,41	13,9	13,84	13,38
1	14,39	13,94	13,75	13,64	14,65	14,98	14,97	15,37	16,26	16,28	13,51	14,82	14,01	13,97
2	14,28	14,11	13,7	13,63	15,16	15,25	15,32	15,12	16	16,39	14,29	14,64	14,02	14,03
3	14,41	14,01	13,61	13,64	15,17	15,96	15,36	14,93	15,47	16,39	14,83	14,7	13,46	13,89
Suma	135,03	131,34	124,49	124,45	131,52	131,96	131,73	132,45	136,86	137,74	14,83	133,47	125,09	123,99
Promedio	15,00	14,59	13,83	13,83	14,61	14,66	14,64	14,72	15,21	15,30	14,55	14,83	13,90	13,78
Corrección	0,9		0,2		1,0		1,1		1,7		1,2		0,1	
Promedio corregido	14,06		13,65		13,60		13,57		13,55		13,37		13,77	
DS	0,695	0,637	0,471	0,294	0,414	0,621	0,737	0,398	0,607	0,890	0,851	0,786	0,256	0,337
%RDS	4,6	4,4	3,4	2,1	2,8	4,2	5,0	2,7	4,0	5,8	5,8	5,3	1,8	2,4
Log10_u	-0,35		-0,38		-0,39		-0,39		-0,39		-0,41		-0,37	
C_u	0,44		0,41		0,41		0,41		0,41		0,39		0,42	
Peso de la muestra (g)	5,0660		5,1638		5,0743		5,0308		5,0136		5,0568		5,057	
% Potencia	109,72		100,07		100,86		101,67		101,19		97,09		104,37	

VALORACIÓN DE GENTAMICINA - TÉCNICA CILINDRO-PLACA

Forma Farmacéutica: Crema

Material de Referencia Sulfato de Gentamicina USP

Modalidad de venta: Marca

Concentración 671 ug/mg

FECHA DE VALORACIÓN: 23/8/2022

Lote: R084Q0

FECHA DE RESULTADOS 24/8/2022

Placa	S ₁ (0,256ug/ml)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₂ (0,32ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₄ (0,5 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)	S ₅ (0,625 ug/mL)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	13,26	14,66	14,69	15,47	16,36	14,97	17,65	15,8
2	13,46	15,6	14,49	16,05	16,81	14,99	17,48	14,99
3	13,26	15,35	13,66	16,07	16,56	14,94	17,33	15,16
1	13,17	14,88	13,78	15,31	15,96	15,5	16,72	14,89
2	13,39	15,97	14,3	15,3	16,61	15,41	16,8	15,32
3	13,95	14,18	14,04	15,3	16,61	14,27	16,47	14,23
1	13,86	14,15	14,07	14,95	16,62	15,26	16,65	14,42
2	12,37	15,45	14,02	14,35	15,6	15,26	17,3	14,62
3	12,71	15,16	13,97	14,16	15,5	15,04	17,13	15,32
Suma	119,43	135,4	127,02	136,96	146,63	135,64	153,53	134,75
Promedio	13,27	15,04	14,11	15,22	16,29	15,07	17,06	14,97
Gran promedio S₃	15,08							
Corrección	-0,03		0,14		-0,01		0,10	
Promedio de St X corregido	13,30		13,97		16,30		16,95	
DS	0,499	0,628	0,328	0,657	0,484	0,362	0,412	0,494
%RDS	3,8	4,2	2,3	4,3	3,0	2,4	2,4	3,3

Intercepto (a) 19,048
 Pendiente (b) 9,918
 R² 0,987

Estándar	Concentración ug/mL	Mediciones de la zona corregida
S ₁	0,256	13,30
S ₂	0,320	13,97
S ₃	0,4	15,08
S ₄	0,50	16,30
S ₅	0,63	16,95

Placa	M1 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/ mL)	M2 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M3 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M4 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/m L)	M5 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)	M6 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/ mL)	M7 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/ mL)	M8 (U ₃)	S ₃ (0,4ug/mL)
1	15,47	14,32	15,06	13,92	14,28	13,38	15,53	13,85	16,21	15,5	15,2	15,33	15,2	14,89	15,5	15,89
2	15,47	14,66	14,52	14,3	14,11	13,24	15,87	15,95	16,26	15,52	15,63	15,2	14,68	14,22	15,3	15,29
3	14,68	14,68	14,98	14,31	13,51	13,88	14,18	14	15,42	15,45	15,9	16	14,83	14,4	15,3	15,23
1	14,08	14,27	13,77	13,72	13,67	13,81	14,02	14,74	14,66	14,38	14,72	14,86	15,34	15,84	15,24	16,14
2	14,68	14,15	13,81	13,68	13,69	13,43	14,44	14,19	14,75	14,3	14,8	14,66	15,56	15,44	16,2	15,11
3	14,75	14,88	13,86	13,73	13,78	13,56	14,34	14,6	14,77	13,97	15,03	14,79	15,68	15,59	15,07	15,63
1	14,76	14,89	13,73	13,36	14,54	14,06	14,22	14,79	14,76	14,45	14,51	14,75	16,01	14,00	15,63	15,69
2	14,28	14,11	13,95	13,46	15,56	14,15	14,22	14,31	14,6	14,65	14,2	14,6	16,08	14,25	16,28	16,13
3	14,41	14,01	13,79	13,46	14,04	13,38	13,3	14,3	14,8	14,75	14,71	14,71	14,98	14,76	15	15,95
Suma	132,58	129,97	127,47	123,94	127,18	122,89	130,12	130,73	136,23	132,97	14,83	134,9	138,36	133,39	139,52	141,06
Promedio	14,73	14,44	14,16	13,77	14,13	13,65	14,46	14,53	15,14	14,77	14,95	14,99	15,37	14,82	15,50	15,67
Corrección	-0,6		-1,3		-1,4		-0,6		-0,3		-0,1		-0,3		0,6	
Promedio corregido	15,37		15,47		15,55		15,01		15,44		15,04		15,63		14,91	
DS	0,478	0,340	0,541	0,348	0,628	0,329	0,781	0,622	0,666	0,580	0,539	0,452	0,499	0,667	0,461	0,389
%RDS	3,2	2,4	3,8	2,5	4,4	2,4	5,4	4,3	4,4	3,9	3,6	3,0	3,2	4,5	3,0	2,5
Log10_U	-0,37		-0,36		-0,35		-0,41		-0,36		-0,40		-0,34		-0,42	
C_U	0,42		0,44		0,44		0,39		0,43		0,39		0,45		0,38	
Peso de la muestra (g)	5,0824 0		5,1234		5,1834		5,0106		5,0404		5,413		5,063		5,0643	
% Potencia	104,63		106,28		107,13		97,67		107,28		91,08		111,62		91,34	