

**VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA DE VALORACIÓN
MICROBIOLÓGICA EMPLEADA EN EL LABORATORIO AQM S.A.S PARA
CUANTIFICAR ESTREPTOMICINA EN MATERIA PRIMA**

MARTHA LILIANA BONILLA BORRERO

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA**

2023

**VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA DE VALORACIÓN
MICROBIOLÓGICA EMPLEADA EN EL LABORATORIO AQM S.A.S PARA
CUANTIFICAR ESTREPTOMICINA EN MATERIA PRIMA**

MARTHA LILIANA BONILLA BORRERO

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al Título de
MICROBIÓLOGO**

TUTOR

**LILIANA ROJAS CONTRERAS PhD.
Docente, Universidad de Pamplona**

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

PAMPLONA

2023

Tabla de Contenido

1. Introducción.....	14
2. Justificación.....	17
3. Objetivos.....	20
3.1 Objetivo General	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4. Marco Teórico.....	21
4.1 Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.	21
4.2 Validación microbiológica	23
4.3 Técnica valoración microbiológica:	25
4.4 Principio activo:.....	26
4.5 Microorganismo de referencia	27
5. Marco Legal	28
6. Marco de Referencia	29
7. Metodología.....	31
7.1 Descripción de las muestras	31
7.2 Información relacionada al principio activo:	32
7.3 Valoración microbiológica de Estreptomicina	32
7.3.1 Estándares	33
7.3.2 Equipos	33
7.3.3 Reactivos.....	35
7.4 Especificidad	35
7.4.1 Preparación del estándar:	35
7.4.2 Preparación de la muestra	36

7.5 Selectividad	37
7.5.1 Procedimiento tratamiento ácido:.....	37
7.5.2 Procedimiento tratamiento básico:	38
7.5.3 Procedimiento tratamiento térmico:.....	39
7.5.4 Procedimiento tratamiento fotolítico:.....	39
7.6 Linealidad del método.....	40
7.7 Linealidad del sistema.....	43
7.8 Exactitud	44
7.8.1 Preparación al 70%:.....	44
7.8.2 Preparación al 100%	45
7.8.3. Preparación al 130%	45
7.9 Precisión del sistema	46
7.10. Precisión del método	47
7.11. Precisión intermedia	47
7.12. Límite de detección.....	47
7.13. Límite de cuantificación.....	48
8. Cronograma de Actividades	51
9. Resultados y Discusión	52
9.1 Linealidad del sistema.....	52
9.2 Linealidad del método.....	55
9.3. Selectividad	57
9.3.1 Tratamiento ácido.....	58
9.3.2. Tratamiento básico	60
9.3.4 Tratamiento térmico.....	62
9.3.5 Tratamiento luz ultra violeta.....	64

9.4 Exactitud	66
9.4.1 Exactitud 70%.....	66
9.4.2 Exactitud al 100%	68
9.4.3. Exactitud al 130%	70
9.5. Precisión del método	73
9.6. Precisión intermedia	76
9.6.1 Precisión intermedia día 1	76
9.6.2 Precisión intermedia día 2	78
9.7 Limite de cuantificación.....	80
9.8 Límite de detección.....	83
10. Conclusiones	86
11. Recomendaciones	88
12. Referencias Bibliográficas.....	90
13. Anexos	92

Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Principio activo Estreptomicina Sulfato</i>	32
<i>Tabla 2. Información relacionada de la técnica de valoración microbiológica de Estreptomicina.</i>	32
<i>Tabla 3. Especificaciones estándar Estreptomicina sulfato</i>	33
<i>Tabla 4. Equipos utilizados en la valoración microbiológica</i>	34
<i>Tabla 5. Información de los reactivos usados en la prueba de valoración microbiológica</i>	35
<i>Tabla 6. Estándar Estreptomicina utilizado en la linealidad del método</i>	40
<i>Tabla 7. Estándar Estreptomicina</i>	43
<i>Tabla 8. Información del límite de detección y el estándar utilizado para este parámetro</i>	47
<i>Tabla 9: Parámetros evaluados y su criterio de aceptación</i>	50
<i>Tabla 10. Datos halos de inhibición (mm) de los puntos EST.A, EST.B, EST.C, EST.E, EST.F, EST.G los cuales hacen referencia al estándar (Estreptomicina Sulfato) + el punto correspondiente a la curva de Estreptomicina.</i>	52
<i>Tabla 11. Datos curva de calibración para la linealidad del sistema.</i>	53
<i>Tabla 12. Datos de halo de inhibición, linealidad del método</i>	55
<i>Tabla 13. Datos curva de calibración</i>	56
<i>Tabla 14. Datos de estándar y muestra tratamiento ácido</i>	58
<i>Tabla 15. Datos obtenidos en el tratamiento básico para el estándar (M1) y muestra (M2).</i> ...	59
<i>Tabla 16. Datos obtenidos del tratamiento básico para el estándar y la muestra</i>	60
<i>Tabla 17. Datos estadísticos correspondientes al estándar (M1) y a la muestra (M2)</i>	61
<i>Tabla 18. Datos obtenidos del tratamiento térmico para el estándar y la muestra</i>	62

<i>Tabla 19. Datos estadísticos del tratamiento térmico para el estándar y la muestra</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 20. Datos tratamiento ultra violeta</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 21. Porcentajes de degradación en el tratamiento de radiación UV</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 22. Datos obtenidos exactitud al 70%</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 23. Log 10, Concentración recuperada, Concentración teórica y porcentaje de recuperación obtenidos para las muestras M1, M2 y M3</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 24. Datos estadísticos obtenidos de Concentración teórica y porcentaje de recuperación de las muestras (M1, M2 y M3).</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 25. Datos obtenidos exactitud al 100%</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 26. Datos obtenidos de exactitud al 70% de las tres muestras analizadas. La tabla arroja resultados de concentración teórica, concentración recuperada y porcentaje de degradación.</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 27. Datos estadísticos obtenidos a partir de la concentración teórica y porcentaje de recuperación de las 3 muestras (M1, M2 y M3).</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 28. Datos obtenidos de exactitud al 100%</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 29. Datos obtenidos a partir de concentración teórica y porcentaje de recuperación de las muestras (M1, M2 y M3).</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 30. Datos estadísticos obtenidos de concentración teórica, porcentaje de recuperación de las muestras (M1, M2 y M3 y desviación estándar relativa.</i>	<i>72</i>
<i>Tabla 31. Datos de las muestras (M1, M2, M3, M4, M5 y M6) en precisión del método</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 32. Log C, concentración, concentración en $\mu\text{g}/\text{mg}$ y porcentaje de las muestras M1, M2 y M3</i>	<i>74</i>
<i>Tabla 33. Promedio y porcentaje obtenidos de $\mu\text{g}/\text{mg}$.....</i>	<i>75</i>

<i>Tabla 34. Precisión intermedia día 1.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 35. Datos estadísticos Log 10, concentración, concentración $\mu\text{g}/\text{mg}$ y porcentaje de cada muestra.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 36. Promedio y porcentaje de las muestras M1, M2 y M3</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 37. Precisión intermedia día 2.....</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 38. Datos estadísticos Log 10C, concentración $\mu\text{g}/\text{mg}$ y porcentaje de cada una de las tres muestras.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 39. Promedio y porcentaje obtenido de las muestras M1, M2 y M3</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 40. Datos obtenidos límite de cuantificación de las tres muestras y el estándar.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 41. Datos estadísticos límite de cuantificación.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabla 42. Datos obtenidos a partir de concentración teórica y porcentaje de recuperación de las muestras (M1, M2 y M3).....</i>	<i>82</i>
<i>Tabla 43. Datos obtenidos límite de detección.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabla 44. Datos estadísticos límite de detección.....</i>	<i>84</i>

Tabla de Gráficos

Gráfico 1: Preparación del estándar Estreptomicina Sulfato.....	36
Gráfico 2: Preparación de la muestra Estreptomicina	37
Gráfico 3: Procedimiento preparación de tratamiento ácido.....	38
Gráfico 4: Procedimiento tratamiento básico.....	38
Gráfico 5: Preparación procedimiento tratamiento térmico	39
Gráfico 6: Procedimiento para la preparación del tratamiento fotolítico.....	39
Gráfico 7: Representación preparación linealidad del método	40
Gráfico 8: Curva de Estreptomicina Sulfato.	41
Gráfico 9. Linealidad del método. En cada grupo de cajas (4 cajas) se sembró una muestra de acuerdo a la concentración final de las soluciones de la curva de calibración.....	42
Gráfico 10. Linealidad del sistema. Se observan tres grupos de cajas las cuales fueron sembradas con el punto D (concentración equivalente al 100%) de la curva de calibración y Muestra (UM1, UM2 y UM3).	42
Gráfico 11: Preparación linealidad del sistema	44
Gráfico 12: Preparación exactitud al 70%.....	44
Gráfico 13: Preparación al 100%.....	45
Gráfico 14: Preparación procedimiento al 130%.....	46
Gráfico 15: Procedimiento límite de detección.....	48
Gráfico 16: Procedimiento límite de cuantificación	49
Gráfico 17. Curva de calibración, linealidad del sistema.....	54
Gráfico 18: Curva de calibración, linealidad del método	57

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios por ser mi guía y fortaleza durante el proceso de realización de este trabajo. Su presencia y sabiduría han sido fundamentales para superar los desafíos y obstáculos que he enfrentado a lo largo de esta investigación. Agradezco su inspiración divina, que ha iluminado mi camino y ha permitido que este trabajo sea posible. Gracias Dios, por ser mi apoyo inquebrantable en este viaje académico y por permitirme crecer y aprender a través de esta experiencia.

A mis amados padres, muchas gracias por su inmenso apoyo y amor incondicional durante todo el proceso de realización de este trabajo de grado. Su constante aliento, comprensión y sacrificio han sido la base de mi éxito académico. Han sido mi fuente de inspiración y mis guías a lo largo de esta travesía.

A mis hermanas mi más profundo agradecimiento por su constante apoyo y aliento, su presencia ha sido un verdadero regalo en mi vida y su influencia ha dejado una huella profunda en mi camino académico. Agradezco su disposición incondicional para escucharme, brindarme consejos valiosos y compartir su sabiduría conmigo.

A mis compañeras de trabajo del laboratorio AQM S.A.S agradezco su disposición para compartir conocimientos, brindar ideas y ofrecer ayuda cuando más lo necesitaba. Su dedicación y profesionalismo han sido una fuente constante de inspiración y motivación para alcanzar mis objetivos.

Agradezco a mi tutora Liliana Rojas Contreras por su invaluable orientación, apoyo y dedicación a lo largo de este trabajo. Su conocimiento, experiencia y paciencia han sido fundamentales en mi desarrollo académico y profesional.

Resumen

Los antibióticos desempeñan un papel fundamental en el tratamiento de infecciones bacterianas. Sin embargo, es crucial utilizarlos de manera adecuada y responsable para asegurar su eficacia y hacer frente al creciente problema de resistencia bacteriana. El presente trabajo tuvo como objetivo principal validar la metodología analítica para la cuantificación microbiológica de Estreptomicina en materia prima empleando el método analítico Difusión en agar establecido por la Farmacopea Británica en su apéndice XIV. Se seleccionó la Estreptomicina como objeto de análisis y se empleó el método de Difusión en agar para su cuantificación microbiológica, siendo este método establecido y reconocido por la Farmacopea Británica en su apéndice XIV como una técnica confiable y precisa. Durante la validación de la metodología analítica, se evaluaron diversos parámetros como linealidad del método, linealidad del sistema, precisión y exactitud entre otros. Los resultados obtenidos se encuentran en el rango establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos. Esto indica que el método analítico utilizado es capaz de proporcionar resultados precisos y confiables en la detección de este principio activo.

Palabras clave: Antibiótico, Estreptomicina, Difusión en agar. *Bacillus spizizenii*.

Abstract

Antibiotics play a key role in the treatment of bacterial infections. However, it is crucial to use them properly and responsibly to ensure their efficacy and to face the growing problem of bacterial resistance. The main objective of the present work was to validate the analytical methodology for the microbiological quantification of Streptomycin in raw material using the analytical method Agar Diffusion established by the British Pharmacopoeia in its appendix XIV. Streptomycin was selected as the object of analysis and the agar diffusion method was used for its microbiological quantification, being this method established and recognized by the British Pharmacopoeia in its appendix XIV as a reliable and precise technique. During the validation of the analytical methodology, several parameters such as method linearity, system linearity, precision and accuracy, among others, were evaluated. The results obtained are within the range established by the United States Pharmacopoeia. This indicates that the analytical method used is capable of providing accurate and reliable results in the detection of this active principle.

Key words: Antibiotic, Streptomycin, Agar diffusion. *Bacillus spizizenii*.

1. Introducción

La industria farmacéutica conformada por organizaciones tanto públicas como privadas, tiene como principal objetivo investigar, desarrollar, producir y comercializar medicamentos para la salud humana y animal. Por esta razón, juega un papel fundamental en los sistemas de atención médica alrededor del mundo. La industria farmacéutica es una fuerza impulsora que busca mejorar la calidad de vida de muchas personas, ya que sus productos ayudan a prevenir enfermedades, aliviar síntomas y curar enfermedades. Por lo tanto, es esencial que la industria farmacéutica continúe invirtiendo en investigación y desarrollo para garantizar la disponibilidad de medicamentos seguros y eficaces.

La industria farmacéutica se enfoca en la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento y la prevención de muchas enfermedades. Estos medicamentos contienen principios activos con una amplia variedad de actividades farmacológicas y propiedades toxicológicas. Actualmente con los avances tecnológicos y científicos, la industria ha evolucionado rápidamente, permitiendo el descubrimiento y desarrollo de productos farmacéuticos con una mayor actividad terapéutica y una disminución de efectos secundarios. Estos avances permiten a los pacientes recibir más tratamientos efectivos y seguros (Tait Keith s.f.).

Los procesos de elaboración de productos farmacéuticos tienen la responsabilidad de garantizar la salud y calidad de vida de los consumidores a través de la elaboración de productos seguros y efectivos. Para lograr esto, es necesario asegurar la calidad de los productos en todas las etapas de su elaboración, desde la recepción de la materia prima hasta la obtención del producto terminado. Para ello, se deben implementar las Buenas Prácticas de Manufactura, las

cuales están contempladas en la Resolución 1160 de 2016 del Ministerio de Salud y Protección Social. Esta resolución establece los manuales y guías de inspección para la obtención del Certificado de Cumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura. La implementación de estas prácticas es fundamental para garantizar la calidad y seguridad de los productos farmacéuticos (Ministerio de Salud y Protección Social, 2016).

Es importante destacar que, en Colombia, los laboratorios encargados de la elaboración y análisis de productos farmacéuticos deben cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) establecidas en la Resolución 3619 de 2013 del Ministerio de Protección Social. Esta resolución establece el Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos. Para el Laboratorio de Análisis Químico y Microbiológico AQM SAS, es vital cumplir con lo establecido en esta resolución para garantizar que los datos obtenidos en los análisis sean representativos, reproducibles y que aseguren la validez y confiabilidad de los resultados. Esto permite ofrecer productos que garantizan la seguridad y el bienestar del consumidor (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013).

La validación de una materia prima es de suma importancia, ya que asegura la calidad del producto final. En el caso específico de la materia prima Estreptomina, al realizar su validación, se verifica que cumpla con los estándares de calidad requeridos. Esto contribuye a la producción de medicamentos seguros y eficaces. Además, la validación de una materia prima ayuda a prevenir la presencia de impurezas y contaminantes. Estos elementos pueden tener consecuencias graves para la salud de los consumidores si están presentes en el producto final. La validación garantiza que la materia prima esté libre de contaminantes y asegura la pureza del medicamento (PAHO, 2002).

La validación de la materia prima también está relacionada con la eficacia terapéutica del antibiótico. Al garantizar la calidad de la materia prima, se asegura que el principio activo presente en el antibiótico este en la concentración adecuada y pueda ejercer su acción antimicrobiana de manera eficiente. esto es esencial para asegurar el éxito del tratamiento y prevenir el desarrollo de la resistencia antimicrobiana (PAHO, 2002).

Este trabajo tuvo como objetivo validar la metodología analítica de valoración microbiológica para cuantificar Estreptomina en materia prima.

2. Justificación

Los antibióticos son medicamentos utilizados para tratar una amplia variedad de enfermedades bacterianas y son considerados uno de los descubrimientos terapéuticos más significativos e importantes en la historia de la medicina.

Uno de los hallazgos más importantes, fue el descubrimiento de la penicilina realizado por Ernest Duchesne en 1897 aunque no fue muy conocido por la comunidad científica. Alexander Fleming redescubrió la penicilina en el año 1928 y la convirtió en un agente terapéutico útil.

Gracias a los descubrimientos de Freudreich, Domagk, Fleming, Waksman y otros científicos, se han perfeccionado una amplia gama de antibióticos eficaces para tratar infecciones bacterianas.

Debido al uso inadecuado de los antibióticos se produce la resistencia bacteriana, la cual ocurre cuando las bacterias tienen la capacidad de mutar y desarrollar una defensa como respuesta al uso de los antibióticos, lo que las hace menos susceptibles o incluso inmunes a los efectos de los antibióticos. La resistencia a los antibióticos puede provocar problemas graves de salud, como la necesidad de antibióticos más fuertes con efectos secundarios más graves, menos opciones de tratamiento, mayores costos de tratamiento, estancias hospitalarias más prolongadas e incluso la muerte. La prevención del uso inadecuado de los antibióticos es esencial para garantizar que estos sigan siendo eficaces en el tratamiento de infecciones bacterianas en el futuro.

El control analítico de los productos farmacéuticos y materias primas es esencial para garantizar la calidad, seguridad y eficacia del producto durante todo su ciclo de vida, desde la

producción hasta el uso final. El control analítico incluye pruebas y ensayos para verificar la identidad, pureza, potencia y estabilidad del producto.

Esto ayuda a asegurar que el producto cumpla con los estándares regulatorios y normativos, y que sea seguro y efectivo para su uso en humanos y animales. Además, el control analítico también es importante para detectar cualquier problema de calidad o desviación que pueda afectar la calidad del producto final. En resumen, el control analítico es una parte fundamental de la fabricación y control de calidad de los productos farmacéuticos y materias primas.

La validación de la materia prima, en particular Estreptomicina, es de suma importancia para garantizar la calidad y eficacia de los productos finales que la contienen. La Estreptomicina es un antibiótico ampliamente utilizado en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas y ha demostrado su capacidad para combatir bacterias resistentes. Además de su uso en el tratamiento de infecciones, esta materia prima ha sido fundamental en la investigación científica y ha contribuido significativamente al conocimiento de los mecanismos de acción de los antibióticos y ha sido utilizada como base para el desarrollo de nuevos fármacos.

La validación de la materia prima Estreptomicina permite garantizar que los productos finales que la contiene sean seguros, efectivos y cumplan con los estándares de calidad requeridos. Esto es esencial para asegurar resultados terapéuticos positivos y prevenir riesgos para la salud de los pacientes.

Según la Farmacopea Británica Veterinaria del 2021 para realizar un ensayo microbiológico de antibióticos se pueden emplear dos métodos: método de difusión en agar y método turbidimétrico, en este trabajo se aplicará el método de difusión en agar el cual se utiliza

para la cuantificación de la capacidad inhibitoria de los antibióticos frente al crecimiento bacteriano ((BP, 2023).

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Validar la metodología analítica de valoración microbiológica para cuantificar Estreptomicina en materia prima.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la efectividad del método analítico de validación microbiológica de difusión en agar.
- Evaluar los parámetros de exactitud, precisión, especificidad del sistema, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad del sistema, linealidad del método y selectividad para la validación microbiológica de Estreptomicina en materia prima.

4. Marco Teórico

Los antibióticos son medicamentos utilizados para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias a humanos y animales, inhibiendo el crecimiento y la replicación de las bacterias. Se descubrieron en las décadas de 1940 y 1950, desde ese momento los antibióticos han salvado miles de millones de vida (Werth, 2022).

4.1 Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.

4.1.1 Antibióticos que afectan la síntesis de la pared bacteriana.

La pared bacteriana es una estructura que brinda protección a la célula de los cambios osmóticos a nivel externo, además de otorgar rigidez y forma. La composición de la pared bacteriana puede variar entre una bacteria Gram positiva o una Gram negativa. La pared de las bacterias Gram positivas está compuesta por una capa de 50 a 100 moléculas de peptidoglicano, mientras que en las bacterias Gram negativas está compuesta por solo una o dos moléculas de peptidoglicano (Suárez y Gudiol, 2009 pp. 117).

Los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana necesitan que la bacteria esté en crecimiento activo y que el medio en el que se encuentre la bacteria sea hipotónico o isotónico, para así favorecer el estallido celular cuando la pared celular se elimina o pierde su estructura (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

4.1.2 Antibióticos que afectan la membrana citoplasmática.

La membrana citoplasmática interviene en los procesos de difusión y transporte activo controlando la composición del medio intracelular. Las sustancias que alteran la membrana

causan cambios en la permeabilidad y provocan la salida de iones de potasio y de elementos esenciales para la vida de la bacteria o la entrada de otros elementos con altas concentraciones que alteran el metabolismo normal de la bacteria.

Los antibióticos que actúan en la membrana citoplasmática desempeñan un papel fundamental como bactericidas, los cuales incluyen polimixinas, lipopéptidos, antibióticos activos frente a hongos como poliélicos (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

4.1.3 Antibióticos que inhiben la síntesis proteica.

Un ejemplo de los antibióticos que inhiben la síntesis proteica son las tetraciclinas y glicilciclinas las cuales al unirse al ribosoma 30 s de la bacteria impiden el acceso del aminoacil tRNA al sitio aceptor en el complejo mRNA ribosoma causando la inhibición de la síntesis proteica (Randa *et al.*, 2015).

4.1.4 Antibióticos que afectan la síntesis de ácidos nucleicos bacterianos.

Este proceso se puede desarrollar mediante dos mecanismos. El primer mecanismo ocurre por medio de la inhibición producida por la enzima ADN girasa, la cual posee dos subunidades. La subunidad B tiene la capacidad de enrollar las cadenas de ADN paso fundamental para acomodar el núcleo dentro de la bacteria a través de la reducción de su tamaño, la subunidad A, sella el corte en el ADN. Un ejemplo de esto son las quinolonas las cuales inhiben la actividad de la ADN girasa (Paredes y Roca, 2004 pp. 118).

El segundo mecanismo se da debido a la formación de compuestos tóxicos para las bacterias. Los productos de reducción del grupo “nitro” se conjugan con el ADN, causando la desestabilización y causando la muerte celular (Paredes y Roca, 2004 pp. 118).

4.1.5 Antibióticos que bloquean las vías metabólicas.

Antibióticos como las sulfamidas y la trimetoprima impiden el crecimiento bacteriano, los cuales tienen acción bacteriostática. Las sulfamidas inhiben completamente la incorporación del ácido paraminobenzoico debido a su similitud química, impidiendo a partir de este la síntesis de ácido fólico, factor esencial para el crecimiento microbiano (Paredes y Roca, 2004 pp. 118).

La trimetoprima inhibe el dihidrofolato enzima reductora de ácido dihidrofólico, obstruyendo la formación de ácido tetrahidrofólico metabolito esencial para la síntesis de purinas por la bacteria (Paredes y Roca, 2004 pp. 118).

4.2 Validación microbiológica

“Conjunto de procesos desarrollados para la confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto de los procedimientos analíticos” (Camaró-Sala *et al.*, 2015).

Proceso que establece, mediante diversos análisis que las características de un procedimiento cumplen los requisitos para posteriores aplicaciones analíticas (USP 81, 2023).

4.2.1 Características del desempeño analítico

4.2.1.1 Exactitud: Proximidad entre los resultados de un análisis obtenido mediante el procedimiento respecto a los valores teóricos (USP 1225, 2023).

La exactitud de un procedimiento analítico debe ser establecida en todo su intervalo de medición, esto significa que los resultados deben ser precisos en todas las concentraciones analíticas para las cuales se ha diseñado el procedimiento. Para determinar la exactitud de un método analítico, se utiliza un analito cuya pureza es conocida, como por ejemplo un estándar de referencia, que posee una composición química estable y conocida para comprobar los resultados del procedimiento analítico con los valores teóricos esperados (USP 1225, 2023).

4.2.1.2 Precisión: Mide el grado de relación entre los resultados analíticos obtenidos a través de una serie de mediciones repetidas de un mismo analito. Es posible cuantificar la precisión mediante el cálculo de la desviación estándar o la desviación estándar relativa de un conjunto específico de mediciones (UNODC, 2010).

Para evaluar la precisión de un procedimiento analítico, se recomienda utilizar un mínimo de nueve concentraciones las cuales abarquen todo el rango de medición del análisis. Además de esto, se puede utilizar un mínimo de seis concentraciones al 100% de la concentración de prueba para evaluar la precisión (USP 1225, 2023).

4.2.1.3 Especificidad: Capacidad que tiene un procedimiento analítico para la detección y evaluación de un analito en presencia de muchos componentes que pueden estar en la muestra, tales como impurezas, productos de degradación entre otros. Es decir, la selectividad se refiere a la capacidad del procedimiento para distinguir claramente el analito de cualquier otra sustancia o compuesto que pueda interferir con la detección y cuantificación precisa del analito (USP 1225, 2023).

4.2.1.4 Límite de detección: Concentración mínima del analito que puede ser detectada e identificada con precisión en una muestra. La determinación del límite de detección de un procedimiento analítico, se realiza mediante un análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito, estableciendo el nivel mínimo que pueda ser detectado de manera confiable (USP 1225, 2023).

4.2.1.5 Límite de cuantificación: Característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, tales como: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en fármacos terminados.

Se expresa como concentración de analito en la muestra. Se puede determinar mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas, estableciendo el nivel mínimo que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables.

4.2.1.6 Linealidad: Se refiere a la capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en las muestras dentro de un rango específico. Es decir, la relación entre la concentración del analito y la medida de valoración debe ser lineal. La linealidad se evalúa mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas en el rango de interés y la construcción de una curva de calibración, y se determina mediante el coeficiente de correlación de la curva (USP 1225, 2023).

4.3 Técnica valoración microbiológica:

Se utiliza para medir y analizar la potencia de los antibióticos a través de la capacidad de inhibición de crecimiento de los microorganismos que son sensibles a diferentes concentraciones de los antimicrobianos (USP 81, 2022).

Este método es importante para determinar la eficacia de los antibióticos y establecer la concentración óptima para su uso en diferentes aplicaciones médicas.

El apéndice XIV de la Farmacopea Británica describe dos métodos para realizar una validación microbiológica en el ensayo de antibióticos, el método A Difusión en Agar o Perforación en Agar y el Método B, Método Turbidimétrico, siendo el método A el utilizado en este trabajo (BP, 2023).

4.3.1 Difusión en agar:

Se basa en la difusión del antibiótico a través de una capa de agar gelificado en una caja Petri. El antibiótico se aplica ya sea mediante un cilindro vertical, disco o perforación en agar y

su difusión en el agar produce la inhibición del crecimiento de los microorganismos agregados en un área circular o “zona de inhibición”. Este método es utilizado comúnmente para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos (Asencios y Cárdenas, 2008).

4.4 Principio activo:

4.4.1. Estreptomicina:

Antibiótico soluble en agua obtenido a través de la purificación del microorganismo *Streptomyces griseus*. La estreptomicina actúa uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano provocando la inhibición de la síntesis de proteínas y la muerte de bacterias que presentan susceptibilidad (ThermoFisher Scientific, sf).

La estreptomicina es considerada el primer antibiótico aminoglucósido descubierto y fue aislada de la bacteria *Streptomyces griseus* en 1943 por Albert Schatz y Selman Waksman. Fue uno de los primeros medicamentos eficaces para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar y se utiliza para combatir infecciones bacterianas. La estreptomicina tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y algunas bacterias Gram positivas (Waters & Tadi, 2022).

La estreptomicina interfiere en la síntesis de péptidos y proteínas ribosómicas, uniéndose a un extremo del rRNA 16S ubicado en el componente 30S más pequeño del ribosoma bacteriano, inhibiendo su funcionalidad e interfiriendo en la síntesis de proteínas mediante la obstrucción en la formación de enlaces peptídicos (Waters & Tadi, 2022).

La Farmacopea de los Estados Unidos en su capítulo 81 (2023) especifica que “se debe realizar la potencia para Estreptomicina en todos los productos farmacéuticos que contienen este compuesto, utilizando *Bacillus spizizenii* como microorganismo de prueba”.

4.5 Microorganismo de referencia

4.5.1. *Bacillus spizizenii*

Bacteria en forma de bastón que pertenece al grupo de las Gram positivas y es capaz de formar esporas. Esta bacteria puede crecer en medios mínimos que contiene sales esenciales, así como fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Además, utiliza una variedad de mecanismos para controlar la expresión de genes involucrados en vías metabólicas, tanto degradativas como no degradativas (Fan *et al.*, 2011).

Bacillus spizizenii es un microorganismo ampliamente usado como modelo para la investigación de la regulación de genes y proteínas, y es muy importante a nivel industrial como fuente de diversas moléculas funcionales, como los péptidos antimicrobianos. Hace una década, se secuenció el primer genoma de *Bacillus spizizenii* y recientemente se ha actualizado (Fan *et al.*, 2011).

5. Marco Legal

British Pharmacopeia (Veterinary) Apéndice XIV. Ensayo Microbiológico de Antibióticos. 2023.

Ministerio de Salud y Protección Social Resolución 3619 de 2013. "Por la cual se expide el Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos".

Ministerio de Salud y Protección Social Resolución 1160 de 2016. "Por la cual se establece el Manual de Buenas Prácticas de Manufactura para Medicamentos".

United States Pharmacopeia USP-NF capítulo 81. Antibióticos Valoraciones Microbiológicas. 2023.

United States Pharmacopeia USP-NF capítulo 1225. Validación de Procedimientos Farmacopeicos. 2023.

6. Marco de Referencia

6.1 Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method

Este artículo proporciona un resumen sobre los principios necesarios para evaluar la susceptibilidad bacteriana de los antibióticos utilizando el método de difusión en agar, los cuales incluyen la preparación adecuada del medio de cultivo, la técnica de inoculación, la preparación de la técnica difusión en agar y la interpretación de los resultados a nivel teórico. Todos estos principios son necesarios y esenciales para garantizar resultados confiables y reproducibles en la determinación de la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos. (Bonev et al., 2008).

6.2 Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.

Este artículo se centra en proporcionar una visión general de los métodos fundamentales utilizados para el estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos, así como técnicas de valoración microbiológica como dilución en agar, difusión en disco, micro dilución en caldo, gradiente de difusión. Estos métodos básicos son ampliamente utilizados en valoraciones microbiológicas para estudiar la sensibilidad de los microorganismos frente a diversos antibióticos utilizados como materias primas (Picazo, s/f).

6.3 "Mathematical Modeling for Benzylpenicillin Potassium and Streptomycin Sulphate Potency Determination of Ascomycin

Este artículo se centra en el desarrollo de modelos matemáticos para la determinación de la potencia sulfato de bencilpenicilina y potasio y estreptomicina en ascomicina. El uso de un modelo matemático proporciona un método más eficiente y preciso en comparación a los enfoques tradicionales. Al incorporar ecuaciones matemáticas y análisis estadístico, el artículo tiene como objetivo establecer los modelos matemáticos que puedan predecir la potencia de estos antibióticos (Ciuca et al., 2016).

7. Metodología

La técnica utilizada para este análisis es Difusión en Agar también conocida como Perforación en Agar. Esta técnica se basa en la difusión controlada de un antibiótico, en este caso Estreptomicina, a través de una capa de agar previamente gelificada en una caja de Petri.

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos en este trabajo, se estableció la siguiente metodología, en la cual se evaluaron los parámetros establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos en su capítulo 1225, los cuales son: Linealidad del sistema, linealidad del método, selectividad, exactitud, precisión intermedia, precisión del sistema, límite de cuantificación y límite de detección. Todos estos parámetros son necesarios para poder determinar la efectividad del método analítico.

7.1 Descripción de las muestras

Se transfirió una parte de la materia prima Estreptomicina sobre una hoja de papel blanco, se observó aspecto, color, olor y presencia de partículas extrañas del polvo.

Se reconstituyó el producto como indica la etiqueta, se agitó vigorosamente, se transfirió una porción a un tubo de ensayo y se observó aspecto, color, olor y presencia de partículas extrañas de la solución.

7.2 Información relacionada al principio activo:

En la Tabla 1 se presenta la información relacionada al principio activo Estreptomicina sulfato

Tabla 1. Principio activo Estreptomicina Sulfato

Nombre común:	Estreptomicina sulfato		
Pureza:	650-850 µg/mg Base Húmeda	Numero CAS	3810-74-0
Formula Molecular	$(C_{21}H_{39}N_7O_{12})_2 \cdot 3H_2SO_4$	Peso Molecular	1457.4
Descripción	Polvo fino de color blanco, libre de partículas extrañas.		
Solubilidad:	Fácilmente soluble en agua, muy poco soluble en alcohol, casi insoluble en cloroformo.		

Fuente: Protocolo de validación de metodologías analíticas. Análisis químico y microbiológico S.A.S.

7.3 Valoración microbiológica de Estreptomicina

La tabla 2 muestra la información relacionada de la técnica, microorganismo, medios de cultivo y buffer empleados para la valoración microbiológica de Estreptomicina

Tabla 2. Información relacionada de la técnica de valoración microbiológica de Estreptomicina.

Método	Microbiológico
Técnica	Perforación en Agar-Difusión en Agar
Microorganismo	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633
Inóculo	De un cultivo reciente se tomó una asada y se llevó a caldo ST hasta obtener una suspensión con una transmitancia de 580 nm, lo que corresponde al 25% de esta suspensión. De esta suspensión se tomaron 0,5 ml por cada 100 ml de medio 11.
Tiempo de incubación	16-18 horas 37°C ± 2°C

Medio base y volumen	Medio 11 volumen 15 ml
Medio inoculado y volumen	Medio 11 volumen 6 ml
Volumen de siembra	100µl por pozo
Equipo	Equipo medidor de Halos de inhibición Scan 4000 Espectrofotómetro UV Puntas de desplazamiento directo no estériles de 5 ml. Pipeteadora repetidora de 50 a 500 µL.
Preparación del Buffer	Buffer pH 8: Se pesaron 16,73 gramos de fosfato de potasio dibásico y 0,523 gramos de fosfato de potasio monobásico; se disolvieron en 100 ml de agua destilada. El pH se ajustó a $8 \pm 0,005$ con ácido clorhídrico 1N e hidróxido de sodio 1N.
Preparación del Diluyente	Buffer pH 8.

Fuente: Protocolo de validación de metodologías analíticas. Análisis químico y microbiológico S.A.S.

7.3.1 Estándares

Para el ensayo se utilizó el estándar de Estreptomicina sulfato, cuyas especificaciones se presentan en la Tabla 3.

Estándar	Estreptomicina sulfato
Tipo	Secundario – Sigma
Lote	LRAC5959
Potencia	754 Base Húmeda
Código/Frasco	E-2
Numero de Análisis	NA
Fecha de Reanálisis	NA
Fecha de Vencimiento	31-07-2024

Tabla 3. Especificaciones estándar Estreptomicina sulfato

Fuente: Protocolo de validación de metodologías analíticas. Análisis químico y microbiológico S.A.S.

7.3.2 Equipos

A continuación, se muestra la tabla 4 donde se especifican los equipos utilizados así como sus características y códigos internos.

Tabla 4. Equipos utilizados en la valoración microbiológica

Equipo	Parámetros	Datos
E-A 235 SCAN 4000	Fabricante	Intersacence
	Modelo	SCAN 4000
	Fecha de Calibración o Calificación	NA
	Fecha de Mantenimiento	27-01-2023
EA-59 Incubadora	Fabricante	Binder
	Modelo	BD 115
	Fecha de Calibración o Calificación	29-09-2022
	Fecha de Mantenimiento	21-02-2022
EA-308 Micropipeta	Fabricante	Brand
	Modelo	Handy Step
	Fecha de calibración o calificación	15-03-2022
	Fecha de mantenimiento	NA
EA-149 Balanza Analítica	Fabricante	Precisa
	Modelo	LS220A
	Fecha de calibración o calificación	24-05-2022
	Fecha de mantenimiento	09-03-2023
EA-26 Cabina de Bioseguridad	Fabricante	C4
	Modelo	FIC-120
	Fecha de calibración o calificación	30-02-2023
	Fecha de mantenimiento	NA
EA-53 Horno	Fabricante	Fisher Scientific
	Modelo	280A
	Fecha de calibración o calificación	11-12-05-2022 y 01-03-2022
	Fecha de mantenimiento	04-2022
EA-324 Micropipeta	Fabricante	Brand
	Modelo	Trafer Pettes
	Fecha de calibración o calificación	27-09-2022
	Fecha de mantenimiento	NA
EA-217 Espectrofotómetro	Fabricante	Scientific Product
	Modelo	V 5800-PC
	Fecha de calibración o calificación	13-05-2022
	Fecha de mantenimiento	17-11-2022
EA-29 Cabina de Bioseguridad	Fabricante	Purificación
	Modelo	PAF-2448
	Fecha de calibración o calificación	14-12-2022
	Fecha de mantenimiento	03-2023
EA-189 Nevera	Fabricante	Harer
	Modelo	H y CA-28A
	Fecha de calibración o calificación	16-10-09-2022
	Fecha de mantenimiento	03-06-2022
EA-85 Potenciómetro	Fabricante	Mettler Toledo
	Modelo	504-K (SEvenmulti)
	Fecha de calibración o calificación	16-06-2022
	Fecha de mantenimiento	21-12-2022
EA-14 Balanza de Platillo Externo	Fabricante	Precisa
	Modelo	B1610C
	Fecha de calibración o calificación	19-09-2022

	Fecha de mantenimiento	13-09-2022
--	------------------------	------------

Fuente: Protocolo de Validación de Metodologías Analíticas. Análisis Químico y Microbiológico S.A.S

7.3.3 Reactivos

La tabla 5 muestra los reactivos que se utilizaron en la prueba, donde se especifica el tipo de reactivo, lote, pureza y fecha de vencimiento.

Tabla 5. Información de los reactivos usados en la prueba de valoración microbiológica

Nombre	Tipo	Lote	Pureza	Fecha de vencimiento
Medio 11	Microbiológico	124683	NA	05-2026
Fosfato de potasio dibásico	GR	0002015172	90%	12-2027
Fosfato de potasio monobásico	GR	22328702	99.83%	12-2028
Agua de osmosis	Osmosis	-	-	-
Ácido clorhídrico	GR	22279404	37.99%	11-2026
Hidróxido de sodio	GR	0001961352	98%	01-2027

Fuente: Protocolo de Validación de Metodologías Analíticas. Análisis Químico y Microbiológico S.A.S.

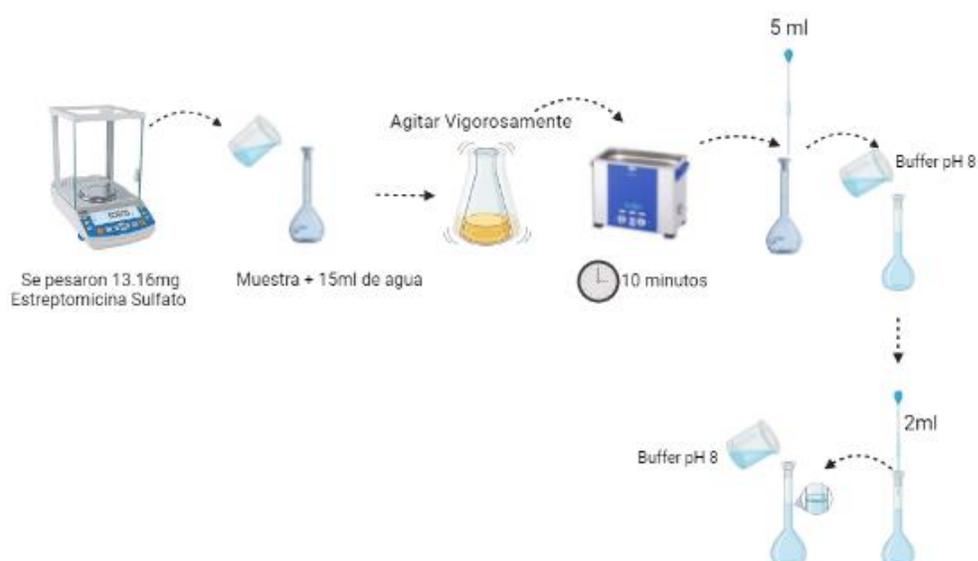
7.4 Especificidad

7.4.1 Preparación del estándar:

Se pesó con exactitud el equivalente a 10 mg de estándar de Estreptomicina base (aproximadamente 13,16 mg de Estreptomicina sulfato) en un balón aforado de 20 ml, se agregó aproximadamente 15 ml de agua, se agitó de forma manual y vigorosamente por 30 segundos, posteriormente, se dejó en ultrasonido por 10 minutos, se enfrió y se completó el volumen con agua. Luego se tomó una alícuota de 5 ml de esta solución y se agregó a un balón de 50 ml, llevando a volumen con buffer pH 8. Se transfirió una alícuota de 2 ml a un balón volumétrico de

25 ml, llevando a volumen con buffer pH 8 y se homogenizó. La figura adjunta muestra detalladamente el procedimiento descrito para la preparación del estándar de Estreptomicina Sulfato.

Gráfico 1: Preparación del estándar Estreptomicina Sulfato



Fuente: Autor

7.4.2 Preparación de la muestra

Se pesó con exactitud 13.0 mg de Estreptomicina en un balón aforado de 100 ml, y se aforó, después de esto se agitó vigorosamente por 30 segundos y se dejó en ultrasonido por 10 minutos, se enfrió y se aforó hasta completar el volumen con agua y se procedió a mezclar. Se

transfirió una alícuota de 5 ml de esta solución a un balón de 50 ml, llevando a volumen con buffer pH 8 y luego se homogenizó. Este proceso se preparó por triplicado. Estas muestras se denominaron UM₁, UM₂ y UM₃.

Concentración final de Estreptomicina base de la muestra fue de: 10 µg/ml

Gráfico 2: Preparación de la muestra Estreptomicina



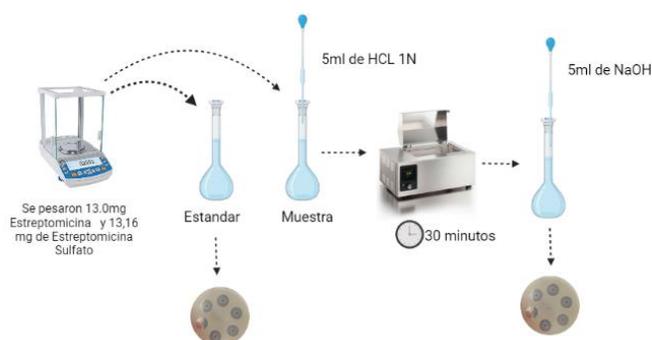
Fuente: Autor

7.5 Selectividad

7.5.1 Procedimiento tratamiento ácido:

Se pesó el estándar y la muestra, adicionando 5ml de HCL al 1N, se calentó a baño maría (agua en ebullición) por 30 minutos, posteriormente se dejó enfriar y se neutralizó con 5 ml de NaOH. En el siguiente gráfico, se presenta una representación visual de la preparación de este tratamiento.

Gráfico 3: Procedimiento preparación de tratamiento ácido

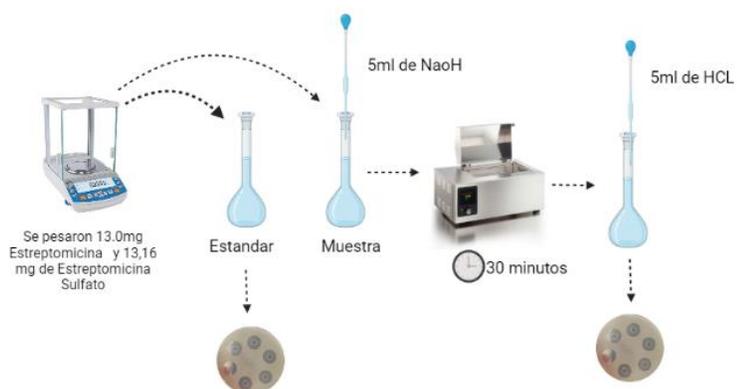


Fuente: Autor

7.5.2 Procedimiento tratamiento básico:

Se pesó el estándar y la muestra, adicionando 5ml de NaOH, se calentó a baño maría (agua en ebullición) por 30 minutos, y se dejó enfriar, posteriormente se neutralizó con 5ml de HCL, en el siguiente grafico se puede observar de manera más clara este procedimiento.

Gráfico 4: Procedimiento tratamiento básico

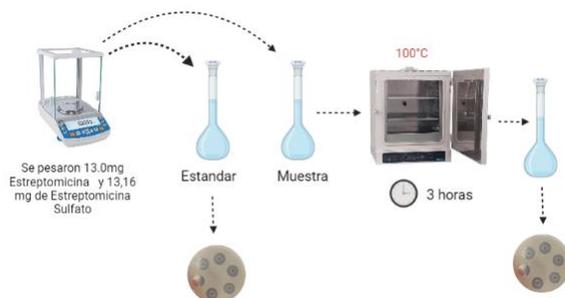


Fuente: Autor

7.5.3 Procedimiento tratamiento térmico:

Se peso el estándar y la muestra, y se expusieron a 100°C por tres horas, se dejaron enfriar. A, continuación se puede observar el grafico 5 el cual describe de manera más detallada este procedimiento.

Gráfico 5: Preparación procedimiento tratamiento térmico

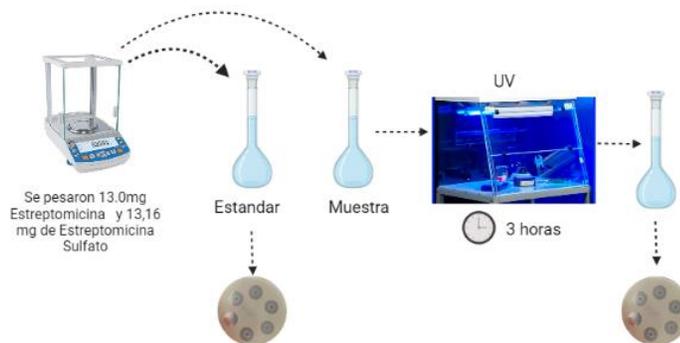


Fuente: Autor

7.5.4 Procedimiento tratamiento fotolítico:

Se procedió a pesar tanto el estándar como la muestra y se expusieron a luz ultravioleta durante un periodo de 4 horas. En la figura 6 se presenta un gráfico el cual ilustra el proceso de preparación mencionado anteriormente.

Gráfico 6: Procedimiento para la preparación del tratamiento fotolítico



Fuente: Autor

7.6 Linealidad del método

Para el parámetro linealidad del método se utilizó el estándar Estreptomicina cuyas características se pueden observar en la tabla 6:

Tabla 6. Estándar Estreptomicina utilizado en la linealidad del método

Estándar	Estreptomicina
Lote del Estándar	LRAC5959
Potencia	0.754mg/mg

Fuente: Protocolo de validación de metodologías analíticas. Análisis químico y microbiológico S.A.S.

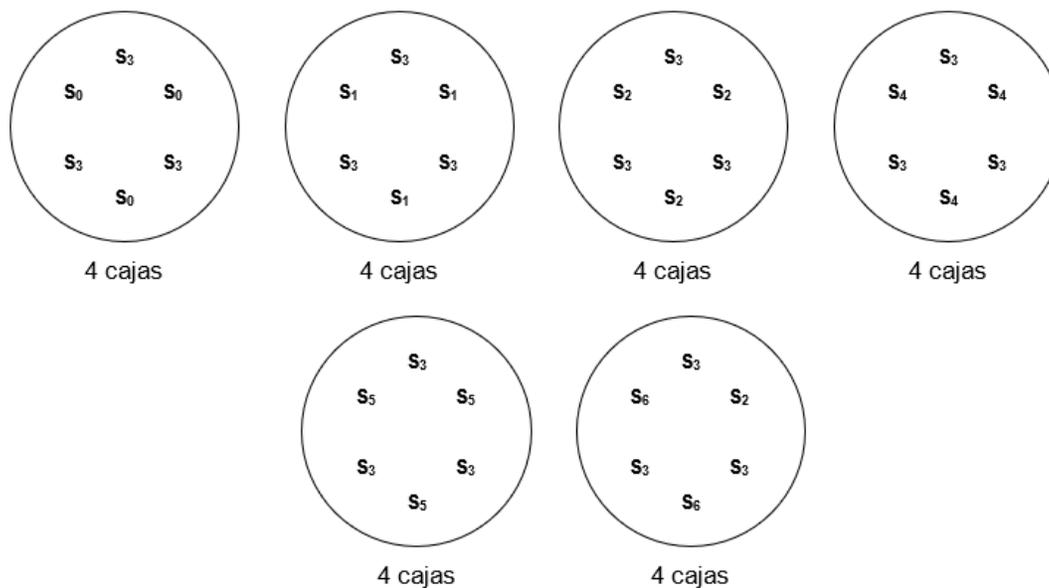
Se pesó con exactitud el equivalente a 10 mg de estándar de Estreptomicina base (aproximadamente 13,16 mg de Estreptomicina sulfato) en un balón aforado de 20 ml y se agregó aproximadamente 15 ml de agua, luego de esto se agitó por 30 segundos y se dejó en ultrasonido por 10 minutos, después se dejó enfriar y se completó el volumen con agua.

Se tomó una alícuota de 5 ml de esta solución y se agregó a un balón de 50 ml y se llevó a volumen con buffer pH 8. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 ml y se pasaron a balones volumétricos de 25 ml llevando a volumen con buffer pH 8, como se puede observar en el siguiente gráfico.

Gráfico 7: Representación preparación linealidad del método



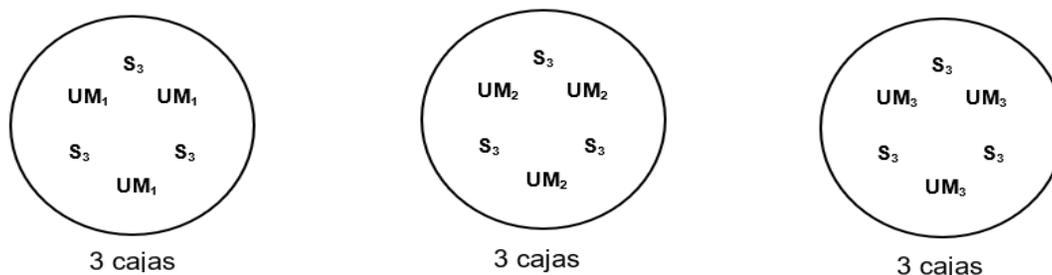
Gráfico 9. Linealidad del método. En cada grupo de cajas (4 cajas) se sembró una muestra de acuerdo a la concentración final de las soluciones de la curva de calibración.



Fuente: Protocolo de validación de metodologías analíticas. Análisis químico y microbiológico S.A.S.

Se tomaron las 9 cajas restantes (3 grupos de 3 cajas c/u), y se llenaron las perforaciones con las soluciones S₃ y Muestra (UM), tal como se indica en el gráfico 10.

Gráfico 10. Linealidad del sistema. Se observan tres grupos de cajas las cuales fueron sembradas con el punto D (concentración equivalente al 100%) de la curva de calibración y Muestra (UM1, UM2 y UM3).



Fuente: Protocolo de validación de metodologías analíticas. Análisis químico y microbiológico S.A.S.

Las cajas se incubaron de 16 a 18 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Y los diámetros de los halos de inhibición se leyeron de acuerdo a las metodologías internas establecidas para la interpretación de los resultados. Las lecturas se realizaron en el equipo Scan 4000, donde se lee cada caja de acuerdo al parámetro establecido.

7.7 Linealidad del sistema

Para el parámetro linealidad del sistema se utilizó el estándar de Estreptomicina cuyas características se observan en la siguiente tabla.

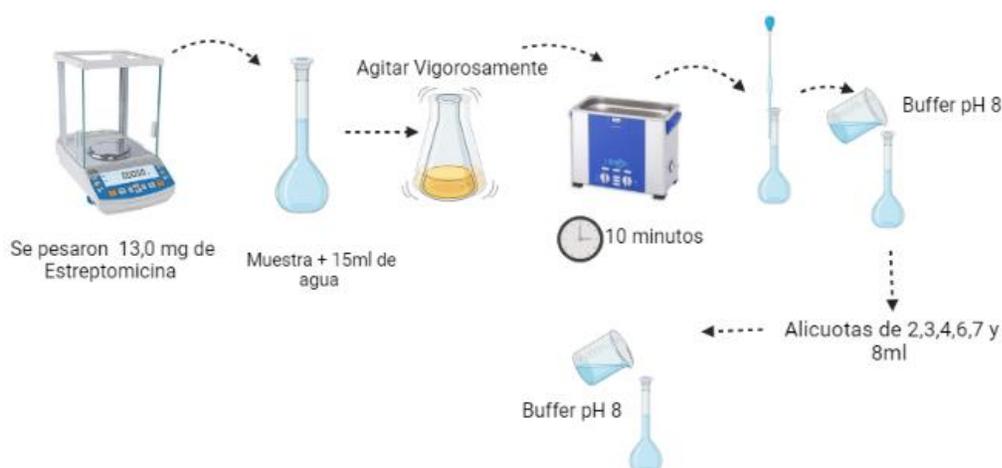
Tabla 7. Estándar Estreptomicina

Estándar	Estreptomicina
Lote del Estándar	LD-210915-3
Potencia	769 mg/mg

Fuente: Protocolo de validación de metodologías analíticas. Análisis químico y microbiológico S.A.S.

Se pesaron con exactitud 13.0 mg de Estreptomicina en un balón aforado de 100 ml, se aforó y agitó de manera manual por 30 segundos, se dejó en ultrasonido por 10 minutos y pasado este tiempo se dejó enfriar y se completó el volumen con agua. Se transfirió una alícuota de 5 ml de esta solución a un balón de 50 ml, y se llevó a volumen con buffer pH 8 y se mezcló. Posteriormente se transfirieron alícuotas de 2, 3, 4, 6, 7 y 8 ml a balones volumétricos de 25 ml, llevando a volumen con buffer pH 8 y homogenizando. En el siguiente grafico se puede observar esta preparación de manera más detallada.

Gráfico 11: Preparación linealidad del sistema



Fuente: Autor

7.8 Exactitud

7.8.1 Preparación al 70%:

Se pesaron 9,1 mg de Estreptomicina en un balón aforado de 100 ml, se aforó y agitó manual y vigorosamente por 30 segundos y se dejó en ultrasonido por 10 minutos, luego de esto se enfrió y se completó el volumen con agua. Posteriormente se tomó una alícuota de 5 ml de esta solución y se agregó a un balón de 50 ml, se llevó a volumen con buffer pH 8 y se homogenizó. A continuación se detalla gráficamente el proceso de preparación mencionado anteriormente.

Gráfico 12: Preparación exactitud al 70%



Fuente: Autor

7.8.2 Preparación al 100%

Se pesaron 13,0 mg de Estreptomicina en un balón aforado de 100 ml, se aforó y agitó manual y vigorosamente por 30 segundos y se dejó en ultrasonido por 10 minutos. Posteriormente se dejó enfriar y se completó el volumen con agua.

Se transfirió una alícuota de 5 ml de esta solución a un balón de 50 ml, llevar a volumen con buffer pH 8 y homogenizar. En el gráfico 13 se representa detalladamente esta preparación.

Gráfico 13: Preparación al 100%



Fuente: Autor

7.8.3. Preparación al 130%

Se pesaron 16.9 mg de Estreptomicina en un balón aforado de 100 ml, se aforó y agitó manual y vigorosamente por 30 segundos y se dejó en ultrasonido por 10 minutos. Posteriormente se dejó enfriar y se completó el volumen con agua. Después de esto se transfirió una alícuota de 5 ml de esta solución a un balón de 50 ml, llevar a volumen con

buffer pH 8 y homogenizar. A continuación, se puede observar de manera más detallada el proceso mencionado anteriormente.

Gráfico 14: Preparación procedimiento al 130%



Fuente: Auto

7.9 Precisión del sistema

Este parámetro mide la repetibilidad de los equipos empleados para este análisis, es decir es la variación causada por el dispositivo de medición y este se ve reflejado cuando se usa muchas veces bajo las mismas condiciones. Este parámetro se realizó de la siguiente manera: se pesó con exactitud el equivalente a 10 mg de estándar de Estreptomicina base (aproximadamente 13,16 mg de Estreptomicina sulfato) en un balón aforado de 20 ml y se agregaron aproximadamente 15 ml de agua, luego de esto se agitó manual y vigorosamente por 30 segundos y se dejó en ultrasonido por 10 minutos, posteriormente se enfrió y se completó el volumen con agua.

Se transfirió una alícuota de 5 ml de esta solución a un balón de 50 ml, y se llevó a volumen con buffer pH 8. Después de esto, se transfirieron alícuotas de 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 ml a balones volumétricos de 25 ml, se aforaron con buffer pH 8 y se homogenizaron. Se realizaron seis lecturas empleando el equipo Scan 4000.

7.10. Precisión del método

En este parámetro se evalúa la cercanía de los datos de la metodología empleada, en el cual se realizó la cuantificación de seis muestras del estándar, bajo las condiciones analíticas establecidas, en un mismo día y en un mismo equipo. Se preparó el estándar y las muestras como se indica en la especificidad (numeral 7.4).

7.11. Precisión intermedia

Se preparó el estándar y al menos tres soluciones de muestra cómo se indica en la especificidad (numeral 7.4).

7.12. Límite de detección

En la tabla 8 se muestra el límite de detección especificado y el estándar que se utilizó para este parámetro.

Tabla 8. Información del límite de detección y el estándar utilizado para este parámetro.

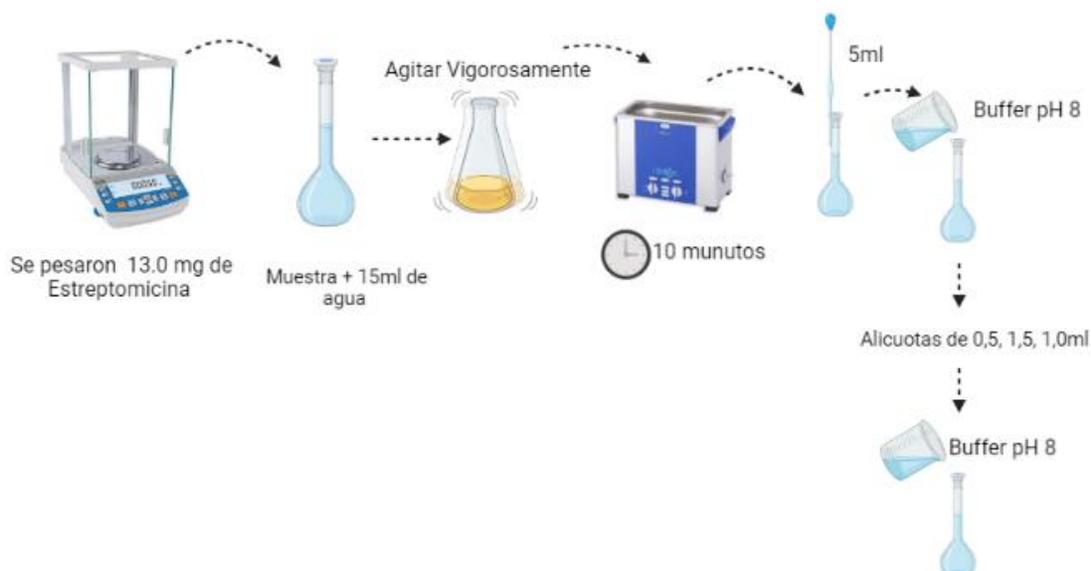
Límite de Detección especificado	0.5 µg/ml
Estándar	Estreptomicina
Lote	LD-210915-3
Potencia	769 mg/mg

Fuente: Protocolo de validación de metodologías analíticas. Análisis químico y microbiológico S.A.S.

Se pesaron con exactitud 13.0 mg de Estreptomicina en un balón aforado de 20 ml, se aforó y agitó manual y vigorosamente por 30 segundos, luego se dejó en ultrasonido por 10 minutos, se enfrió y se completó el volumen con agua. Posteriormente se transfirió una alícuota de 5 ml de esta solución a un balón de 50 ml se aforó buffer pH 8 y se mezcló.

Se transfirió una alícuota de 0.5 ml (concentración 0,25), 1,5 (concentración 0,75) y 1,0 ml (concentración 0,5) a un balón volumétrico de 100 ml y cada una se llevó a volumen con buffer pH 8. El siguiente grafico muestra de manera más detallada el procedimiento para este parámetro.

Gráfico 15: Procedimiento límite de detección



Fuente: Autor

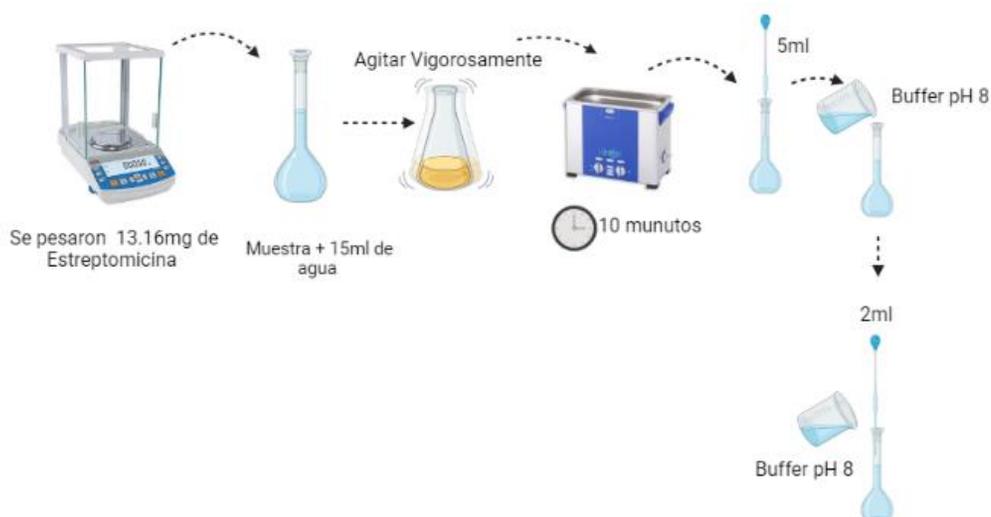
7.13. Límite de cuantificación

Se pesó con exactitud el equivalente a 10 mg de estándar de Estreptomicina base (aproximadamente 13,16 mg de Estreptomicina sulfato) en un balón aforado de 20 ml, y se agregó aproximadamente 15 ml de agua, agitando manual y vigorosamente por 30 segundos, luego se dejó en ultrasonido por 10 minutos, y se completó el volumen con agua.

Se transfirió una alícuota de 5 ml de esta solución a un balón de 50 ml y se aforó con buffer pH 8. Posteriormente se transfirió una alícuota de 2 ml a un balón volumétrico de 25 ml,

se llevó a volumen con buffer pH 8. El gráfico que se presenta a continuación, explica de manera detallada el procedimiento descrito anteriormente.

Gráfico 16: Procedimiento límite de cuantificación



Fuente: Autor

7.14 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realiza utilizando hojas de cálculo validadas y el programa Validation del Laboratorio de Análisis Químico y Microbiológico S.A.S. esta herramienta nos permite evaluar la variabilidad de los datos y obtener medidas que respalden la interpretación de los resultados obtenidos.

En esta metodología se evaluaron los parámetros: Linealidad del método, linealidad del sistema los cuales se calcularon mediante la ecuación:

$$y = \text{inhibición de halo} + \log [\text{estreptomicina}] + R^2$$

Los demás parámetros como linealidad del sistema, selectividad, exactitud, precisión, límite de cuantificación y límite de cuantificación se calculan de acuerdo a los datos obtenidos en la ecuación mencionada anteriormente, como el intervalo, la pendiente y el R^2

Adicionalmente los parámetros evaluados deben cumplir con los criterios establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos los cuales se pueden observar en la siguiente tabla:

Tabla 9: *Parámetros evaluados y su criterio de aceptación*

Parámetro	Criterio de Aceptación
Linealidad del Sistema	$R^2 > 0,95$
Linealidad del Método	$R^2 > 0,95$
Especificidad	Concentración [10 μ g/ml]
Exactitud	Desviación estándar relativa 5%
Precisión	Desviación estándar relativa 5%
Límite de Detección	90.0% a 110%

Fuente: Autor

9. Resultados y Discusión

De acuerdo con las técnicas establecidas por la Farmacopea de los Estados Unidos y la Farmacopea Británica se obtuvieron los siguientes resultados para la validación de la metodología analítica de valoración microbiológica para la cuantificación de Estreptomicina en materia prima:

9.1 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se refiere a la capacidad del sistema para producir respuestas proporcionales a las concentraciones utilizadas. La linealidad del sistema arrojó resultados de los datos de halo de inhibición de los puntos A (40%), B (60%), C (80%), E (120%), F (140%), G (160%) y el estándar para cada uno de ellos, los cuales se ven reflejados en la siguiente tabla.

Las columnas correspondientes a EST.D significan la Preparación del punto D de la curva de Estreptomicina, equivalente al 100%.

Tabla 10. Datos halos de inhibición (mm) de los puntos EST.A, EST.B, EST.C, EST.E, EST.F, EST.G los cuales hacen referencia al estándar (Estreptomicina Sulfato) + el punto correspondiente a la curva de Estreptomicina.

DATOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)											
EST. D	EST. A	EST. D	EST. B	EST. D	EST. C	EST. D	EST. E	EST. D	EST. F	EST. D	EST. G
19,6	16,2	19,0	18,4	18,0	18,1	19,5	19,1	19,6	20,4	20,3	21,2
19,3	16,3	19,2	18,1	19,0	18,7	19,1	19,0	19,6	20,5	20,7	21,0
20,0	15,9	19,3	17,6	19,0	17,9	18,8	20,5	20,5	20,1	19,0	20,3

19,1	16,5	20,1	17,8	20,5	18,8	18,9	19,3	19,8	20,9	20,1	21,3	
19,3	15,4	19,8	18,1	20,6	19,0	19,0	19,3	19,6	20,5	20,2	20,5	
19,7	15,9	20,2	18,2	20,5	19,0	19,4	19,7	20,7	20,9	19,6	20,4	
17,3	15,9	20,1	17,3	20,3	17,6	18,8	20,1	20,1	20,8	20,8	21,3	
17,1	16,5	19,9	17,9	19,7	18,3	19,0	19,6	20,2	19,9	20,1	21,4	
17,6	15,7	20,4	18,2	20,9	19,3	18,4	19,1	20,3	20,5	20,6	21,3	
18,5	16,7	19,1	18,2	18,7	17,8	19,0	19,5	20,7	20,1	19,7	20,5	
18,9	16,2	19,1	17,1	18,8	18,2	19,0	19,8	20,2	20,7	20,4	21,2	
19,8	17,1	20,3	18,1	18,5	18,4	18,8	19,5	20,3	20,8	20,4	21,3	
Promedio	18,85	16,19	19,71	17,92	19,54	18,43	18,98	19,54	20,13	20,51	20,16	20,98
DS	1,01	0,47	0,53	0,40	0,99	0,54	0,29	0,44	0,41	0,33	0,51	0,42
DSR %	5,34	2,89	2,69	2,22	5,05	2,91	1,51	2,25	2,01	1,63	2,55	2,00
Promedio final		16,90		17,77		18,44		20,13		19,94		20,38

Fuente: Hoja de cálculo HCA-033 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los halos de inhibición obtenidos del valor promedio final para cada EST.D + el punto de la curva (A, B, C, E, F,y G), así como la concentración $\mu\text{g}/\text{mg}$ y Log 10 de cada uno de los puntos.

Tabla 11. Datos curva de calibración para la linealidad del sistema.

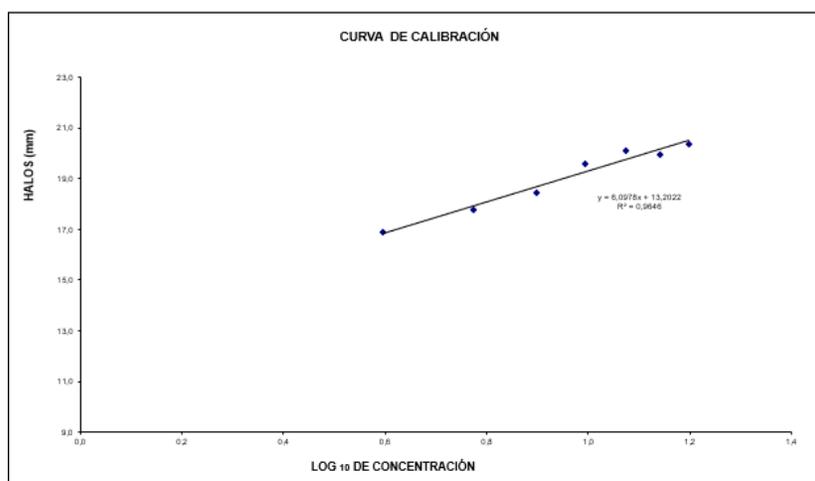
DATOS CURVA CALIBRACIÓN			
HALO	Concentración	Log 10	
(mm)	$\mu\text{g}/\text{mg}$		
16,90	3,951	0,597	
17,77	5,926	0,773	
18,44	7,902	0,898	
C	19,56	9,877	0,995
	20,13	11,853	1,074
	19,94	13,828	1,141
	20,38	15,804	1,199

Fuente: Hoja de cálculo HCA-033 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: Los cálculos de la tabla se realizaron de acuerdo a lo establecido por la USP <81>. La letra C señalada en la tabla hace referencia a la concentración del punto D de la curva de estreptomicina equivalente al 100% de la preparación.

El siguiente gráfico ilustra los datos obtenidos de la curva de calibración con su R^2 .

Gráfico 17. Curva de calibración, linealidad del sistema.



Fuente: Hoja de cálculo HCA-033 Análisis químico y microbiológico S.A.S

La curva de calibración realizada entre el diámetro de los halos de inhibición en la dependiente (Y) y el logaritmo de la concentración en la variable independiente (X) es lineal en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 0,5 a 1,2 $\mu\text{g/ml}$.

Al aplicar la regresión lineal de los datos obtenidos se obtuvo la ecuación de la recta la cual se expresó de la siguiente manera $y = 6,0978x + 13,2022$ arrojando el valor del coeficiente de correlación de $R^2 = 0,9646$ (Gráfico 4).

La regresión lineal es un método estadístico utilizado para modelar la relación entre una variable dependiente y una variable independiente, el objetivo que tiene esta regresión lineal es encontrar la línea recta que se ajuste a los datos observados, de manera que se puede predecir o simular el comportamiento de la variable dependiente en función de una variable independiente.

El coeficiente de correlación obtenido en el índice estadístico mide la relación lineal entre las dos variables cuantitativas las cuales con el Log 10 de concentración y diámetro. Este mide la correlación entre la variable dependiente (diámetro del halo) y una variable independiente (Log

10 de concentración). El coeficiente de correlación obtenido es muy cercano a 1, existiendo una correlación positiva. El índice indica que existe una dependencia total entre las dos variables denominada relación directa: cuando el halo tiene mayor diámetro la concentración del principio activo es mayor, es decir cuando una de las variables aumenta la otra también lo hace en idéntica proporción, es por esto que se puede decir que hay una relación directamente proporcional.

9.2 Linealidad del método

La linealidad del método es la capacidad del método analítico para proporcionar respuestas lineales dentro de un rango determinado de concentraciones.

En la tabla 12 se pueden observar los datos obtenidos de los halos de inhibición de los puntos A, B, C, D, E, F y G de la curva de Estreptomicina y el estándar (EST.D).

Tabla 12. Datos de halo de inhibición, linealidad del método

DATOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)														
	EST.D	ST A	EST.D	ST B	EST.D	ST C	EST.D	ST D	EST.D	ST E	EST.D	ST F	EST.D	ST G
	19,6	16,7	20,4	19,3	20,3	18,7	20,8	20,8	20,8	21,3	20,5	21,1	20,7	21,6
	20,1	16,1	20,3	19,6	20,7	18,8	20,9	18,8	20,1	21,0	20,1	21,3	21,2	22,1
	20,2	16,7	20,9	18,2	20,3	18,1	19,8	20,0	19,8	18,7	20,3	20,2	20,7	22,5
	19,1	16,0	20,2	18,2	19,8	19,1	19,9	20,5	20,4	19,7	20,4	20,0	20,4	20,7
	18,7	16,6	20,9	19,1	20,2	19,1	20,6	20,7	20,0	18,9	19,9	19,4	20,0	19,5
	19,1	16,0	20,5	18,4	19,9	19,8	19,9	19,5	18,5	19,2	19,9	19,5	20,0	20,2
	19,9	16,7	20,6	18,7	20,3	19,8	20,2	20,5	19,8	18,3	19,6	20,3	20,0	20,8
	20,1	16,7	20,2	18,1	20,7	19,1	20,2	19,2	19,6	19,9	21,6	21,0	19,6	20,5
	20,4	16,3	20,1	18,9	19,2	17,1	20,0	19,5	19,6	20,6	20,4	20,7	19,3	20,6
	20,3	19,9	20,4	19,1	19,8	19,8	18,3	17,7	19,9	19,5	19,6	20,2	20,5	20,8
	19,9	20,3	19,5	19,1	18,9	19,8	18,5	18,0	19,9	20,2	20,8	21,3	20,3	19,6
	19,5	19,3	19,9	19,7	18,5	20,2	19,1	18,8	19,5	19,9	20,3	20,3	19,9	20,7
Promedio	19,74	17,28	20,33	18,87	19,88	19,12	19,85	19,50	19,83	19,77	20,28	20,44	20,22	20,80
DS	0,54	1,58	0,40	0,55	0,70	0,87	0,83	1,04	0,55	0,92	0,55	0,65	0,52	0,90
DSR %	2,75	9,15	1,95	2,91	3,50	4,58	4,20	5,34	2,79	4,63	2,72	3,17	2,59	4,31
Promedio		17,55		18,56		19,25		19,67		19,96		20,18		20,60

final														
-------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Fuente: Hoja de cálculo HCA-032 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

En la siguiente tabla se reflejan los resultados obtenidos de los halos de inhibición obtenidos del valor promedio final para cada EST.D + el punto de la curva (A, B, C, E, F,y G), así como la concentración $\mu\text{g}/\text{mg}$ y Log 10 de cada uno de los puntos.

Tabla 13. Datos curva de calibración

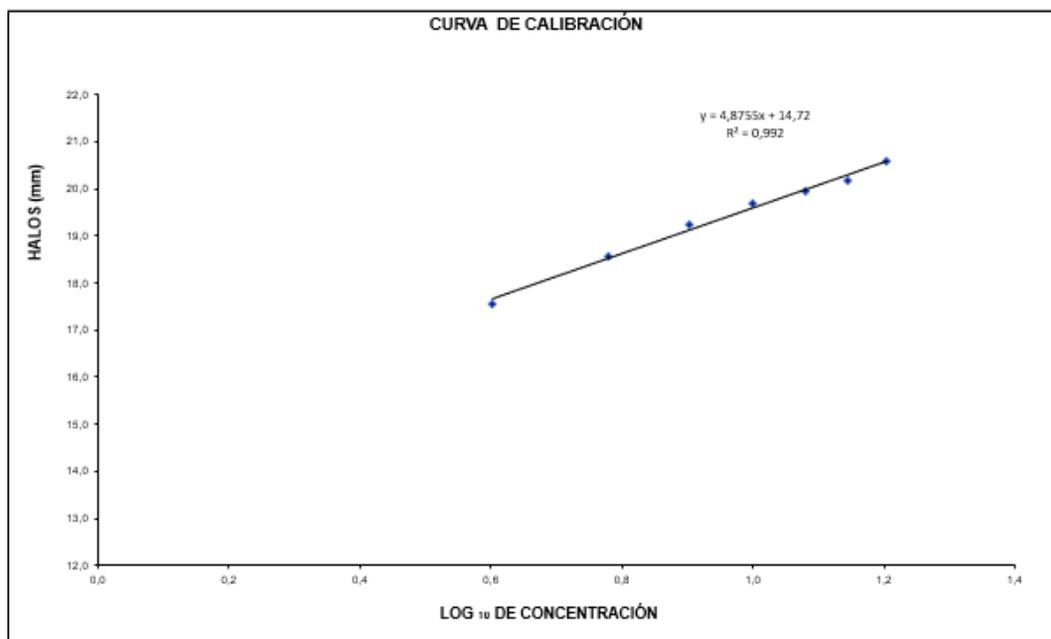
DATOS CURVA CALIBRACIÓN		
HALO (mm)	Concentración	Log 10
17,55	3,999	0,602
18,56	5,998	0,778
19,25	7,998	0,903
C 19,67	9,997	1,000
19,96	11,996	1,079
20,18	13,996	1,146
20,60	15,995	1,204

Fuente: Hoja de cálculo HCA-032 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: Los cálculos de la tabla se realizaron de acuerdo a lo establecido por la USP <81>. La letra C señalada en la tabla hace referencia a la concentración del punto D de la curva de estreptomicina equivalente al 100% de la preparación.

En el siguiente gráfico se ilustra la curva de calibración para Estreptomicina sulfato.

Gráfico 18: Curva de calibración, linealidad del método



Fuente: Hoja de cálculo HCA-032 Análisis químico y microbiológico S.A.S

La curva realizada entre el diámetro del halo (mm) en la variable dependiente (Y) y el logaritmo de la concentración en la variable independiente (X) arrojó un resultado lineal en el intervalo de las concentraciones 0,5 a 1,2 $\mu\text{g/ml}$. Al aplicar la ecuación de regresión lineal a los datos obtenidos, la ecuación de la recta se expresó de la siguiente manera: $y = 4,8755x + 14,72$, arrojando como resultado de coeficiente de correlación un valor de $R^2 = 0,992$ (Gráfico 5). En esta curva se observa una correlación positiva lo cual indica que existe una dependencia entre las dos variables denominada relación directa.

9.3. Selectividad

Este parámetro se refiere a la capacidad de evaluar el analito en presencia de otros componentes. En las tablas 14, 16, 18 y 20 se pueden observar los porcentajes obtenidos para

cada muestra y su correspondiente estándar en relación a los tratamientos a los que fueron sometidos como condiciones ácidas, básicas, térmicas y de radiación UV, respectivamente.

9.3.1 Tratamiento ácido

En la tabla 14 se encuentran los datos relacionados con el Estándar, específicamente el punto D de la curva de estreptomicina. En la cuarta columna de la tabla se presentan los datos correspondientes a la muestra de tratamiento ácido.

Tabla 14. Datos de estándar y muestra tratamiento ácido

	Estándar (Punto D)	Estándar + tratamiento ácido	Estándar (Punto D)	Muestra
	20,1	17,0	19,8	19,2
	20,5	17,1	19,5	18,0
	20,9	20,1	19,9	19,2
	21,5	20,4	20,0	19,3
	19,3	17,8	20,7	20,3
	20,3	18,5	19,9	18,6
	18,7	19,1	20,3	19,0
	19,4	19,9	20,1	18,4
	20,3	20,3	19,0	18,1
Promedio	20,16	18,91	19,1	18,9
DS	0,88	1,37	0,48	0,72
%DSR	4,38%	7,22%	2,40%	3,79%
%DSR de rechazo	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Promedio corregido		18,97		19,20

Fuente: Hoja de cálculo HCA-029 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

La tabla 14 muestra los datos correspondientes al estándar (M1) y a la muestra (M2). Las columnas etiquetadas como C (Estándar) y C (Muestra) representan las concentraciones obtenidas. La columna " $\mu\text{g/ml}$ " se refiere al valor teórico establecido como punto de referencia para este tratamiento. Este valor se calcula multiplicando la concentración del estándar (C estándar) por el factor de dilución que es 1000 y esto se divide por el peso de la muestra.

La columna "porcentaje" se calcula a partir de los valores de las columnas C (Estándar) o C (Muestra) y la columna de concentración ($\mu\text{g/ml}$). El porcentaje de degradación es el valor de la cantidad de sustancia o muestra que ha sido degradada o consumida por microorganismos en comparación con la cantidad inicial presente en la muestra. Esto implica que se ha evaluado la degradación del tratamiento básico en relación con la concentración teórica establecida.

Tabla 15. Datos obtenidos en el tratamiento básico para el estándar (M1) y muestra (M2).

Log 10c (M1)	0,862
C (Estándar)	7,2859
$\mu\text{g/ml}$	9,9528
Porcentaje	73,2
Porcentaje de degradación	26,8
Log 10c (M2)	0,894
C (Muestra)	7,8287
$\mu\text{g/mg}$	602,2051
Porcentaje	73,2
Porcentaje de degradación	21,7

Fuente: Hoja de cálculo HCA-029 Análisis químico y microbiológico S.A.S

9.3.2. Tratamiento básico

En la tabla 16 se presentan los datos relacionados con el Estándar, en particular, se hace referencia al punto D de la curva de estreptomicina. Además, en la cuarta columna de la tabla se encuentran registrados los datos correspondientes a la muestra del tratamiento básico.

Tabla 16. Datos obtenidos del tratamiento básico para el estándar y la muestra

	Estándar (Punto D)	Estándar + tratamiento básico	Estándar (Punto D)	Muestra
	18,7	18,1	17,1	15,7
	18,4	18,3	16,6	16,8
	16,8	17,7	16,6	16,8
	18,4	18,4	19,0	18,4
	19,1	17,2	17,6	16,8
	18,2	17,0	16,5	16,9
	17,6	18,1	18,1	17,9
	18,5	18,4	19,3	19,7
	16,6	17,5	18,4	16,4
Promedio	18,03	17,86	17,69	17,27
DS	0,86	0,53	1,07	1,20
%DSR	4,75%	2,95%	6,04%	6,97%
%DSR de rechazo	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Promedio corregido		18,26		18,02

Fuente: Hoja de cálculo HCA-029 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

La tabla 17 presenta los datos correspondientes al estándar (M1) y a la muestra (M2). Las columnas etiquetadas como C (Estándar) y C (Muestra) indican las concentraciones obtenidas en el estudio. La columna " $\mu\text{g/ml}$ " hace referencia al valor teórico establecido como punto de referencia para este tratamiento en particular. Este valor se calcula multiplicando la

concentración del estándar (C estándar) por el factor de dilución que es 1000 y esto se divide por el peso de la muestra.

La columna "porcentaje" se calcula utilizando los valores de las columnas C (Estándar) o C (Muestra) en relación con la columna de concentración ($\mu\text{g/ml}$). Este cálculo permite determinar el porcentaje de la concentración teórica establecida que se ha alcanzado en el estándar o la muestra. El porcentaje de degradación representa el valor obtenido en el ensayo para el tratamiento básico. Este valor indica la cantidad de degradación experimentada por la muestra en relación con la concentración teórica establecida

Tabla 17. Datos estadísticos correspondientes al estándar (M1) y a la muestra (M2)

Log 10c (M1)	0,963
Concentración (Estándar)	9,1754
$\mu\text{g/ml}$	9,9528
Porcentaje	92.2
Porcentaje de degradación	7,8
Log 10c (M2)	0,924
Concentración (muestra)	8,3900
$\mu\text{g/mg}$	645,3834
Porcentaje	83,9
Porcentaje de degradación	16,1

Fuente: Hoja de cálculo HCA-029 Análisis químico y microbiológico S.A.S

En los medios ácidos y básicos se observó una baja degradación ya que el porcentaje de degradación del principio activo fue de: 26,8 (M1), 21,7 (M2) para el tratamiento ácido y en el tratamiento básico 7,8 (M1) y 16,1 (M2). De esta manera se puede determinar que el principio

activo no presenta una alta susceptibilidad a la degradación en medio ácido y básico lo cual no es un interferente fuerte para tener en cuenta a la hora de su fabricación, almacenamiento y en la realización de pruebas para análisis de potencia.

9.3.4 Tratamiento térmico

Los datos obtenidos en este tratamiento se ven reflejados en la tabla 18, los cuales indican parámetros como el promedio, la desviación estándar, la desviación estándar relativa, el porcentaje de rechazo de la desviación estándar relativa y el promedio corregido.

Tabla 18. Datos obtenidos del tratamiento térmico para el estándar y la muestra

	Estándar (Punto D)	Estándar + tratamiento térmico	Estándar (Punto D)	Muestra
	20,5	20,2	20,7	19,3
	20,0	19,7	19,2	18,7
	19,5	19,9	19,1	19,5
	20,7	20,1	21,2	19,6
	20,0	19,4	19,4	18,3
	19,6	19,6	19,3	18,7
	20,5	20,4	17,6	18,3
	20,3	19,7	18,4	19,0
	20,2	19,2	17,7	18,2
Promedio	20,14	19,80	19,18	18,84
DS	0,41	0,39	1,21	0,53
%DSR	2,03%	1,96%	6,32%	2,83%
%DSR de rechazo	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Promedio corregido		19,87		19,88

Fuente: Hoja de cálculo HCA-029 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

A continuación, se presenta la tabla 19 en la cual se reflejan los datos estadísticos obtenidos en un tratamiento térmico tanto para el estándar como para la muestra. En esta tabla, se incluyen las concentraciones del estándar y la muestra, así como la concentración teórica establecida como referencia. Además, se muestra el porcentaje de degradación obtenido en este tratamiento

Tabla 19. Datos estadísticos del tratamiento térmico para el estándar y la muestra

Log 10c (M1)	0,983
Concentración (Estándar)	9,6127
µg/ml	9,9528
Porcentaje	96,6
Porcentaje de degradación	3,4
Log 10c (M2)	0,984
Concentración (Muestra)	9,6457
µg/mg	741,9737
Porcentaje	96,5
Porcentaje de degradación	3,5

Fuente: Hoja de cálculo HCA-029 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Al someter las muestras al tratamiento térmico a 100°C por 3 horas, se observó que el porcentaje de degradación fue de 3,4 para la muestra M1 y 3.5 para la muestra M2. En el caso del principio activo Estreptomicina, se puede afirmar que no muestra una alta susceptibilidad a temperaturas de 100°C, ya que los porcentajes obtenidos no superan el 10%. Sin embargo, es importante destacar que, si experimenta una pérdida de estabilidad, ya que registra un porcentaje de degradación de 3,4 y 3,5%. Estas condiciones pueden tener un efecto perjudicial durante la fabricación y el almacenamiento de dicho principio activo.

Por lo tanto, se recomienda almacenar el principio activo Estreptomicina a temperatura ambiente, evitando exposiciones prolongadas a temperaturas elevadas. Esto garantizará su estabilidad y preservará su calidad durante los procesos de fabricación y almacenamiento.

9.3.5 Tratamiento luz ultra violeta

En la tabla 20 se presentan los resultados obtenidos en el tratamiento de luz ultravioleta. Además, hay tres columnas etiquetadas como "Estándar" que corresponden al Estándar (punto D de la curva de estreptomicina). Los datos de la cuarta columna de la tabla corresponden a la muestra sometida al tratamiento UV.

Tabla 20. Datos tratamiento ultra violeta

	Estándar (Punto D)	Estándar + tratamiento UV	Estándar (Punto D)	Muestra
	19,5	18,1	22,0	21,5
	18,9	18,2	20,7	19,5
	18,9	18,8	19,0	20,8
	20,8	20,1	20,5	20,4
	19,2	19,3	20,3	19,9
	19,6	18,4	20,1	19,3
	17,2	18,8	20,4	19,5
	19,0	18,2	19,2	19,4
	18,4	18,2	19,3	19,1
Promedio	19,06	18,68	20,17	19,93
DS	0,97	0,66	0,93	0,80
%DSR	5,08%	3,58%	4,60%	4,04%
%DSR de rechazo	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Promedio corregido		19,83		19,98

Fuente: Hoja de cálculo HCA-029 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

A continuación, se presenta la tabla 21 la cual contiene los datos estadísticos obtenidos en un tratamiento de radiación UV tanto para el estándar como para la muestra. En esta tabla, se incluyen las concentraciones del estándar y la muestra, así como la concentración teórica establecida como referencia. Además, se muestra el porcentaje de degradación obtenido en este tratamiento

Tabla 21. Porcentajes de degradación en el tratamiento de radiación UV

Log 10c (M1)	0,978
Concentración (estándar)	9,5145
µg/ml	9,9528
Porcentaje	95,6
Porcentaje de degradación	4,4
Log 10c (M2)	0,998
Concentración (muestra)	9,9473
µg/mg	759,3365
Porcentaje	98,7
Porcentaje de degradación	1,3

Fuente: Hoja de cálculo HCA-029 Análisis químico y microbiológico S.A.S

En el tratamiento fotolítico, se obtuvieron porcentajes de degradación de 4,4% para la muestra M1 y 1,3% para la muestra M2. Estos resultados indican que el principio activo se ve afectado de manera relativamente baja al ser sometido a radiación UV durante un periodo de 4 horas.

La baja degradación observada en ambos casos sugiere que el principio activo muestra una cierta resistencia a la radiación UV, lo que es una característica deseable en términos de

estabilidad. Sin embargo, es importante tener en cuenta que incluso una degradación mínima puede tener implicaciones en la eficacia y la vida útil del principio activo.

9.4 Exactitud

9.4.1 Exactitud 70%

La tabla 22 muestra los resultados obtenidos en la exactitud al 70%, los cuales están relacionados con el estándar, en particular el punto D de la curva de estreptomicina. En la tabla se presentan tres columnas denominadas Muestra 1, Muestra 2 y Muestra 3, indicando que el análisis se llevó a cabo por triplicado para cada muestra, con el objetivo de evaluar la confiabilidad de los datos.

Tabla 22. Datos obtenidos exactitud al 70%

	Estándar	Muestra 1	Estándar	Muestra 2	Estándar	Muestra 3
	16,7	17,0	18,5	18,5	19,6	18,3
	17,6	16,1	18,4	16,7	19,9	18,6
	17,0	16,5	19,3	18,0	19,1	18,0
	18,9	16,1	19,6	17,1	20,2	18,2
	17,4	16,1	18,5	19,2	19,6	18,5
	17,9	16,9	19,4	17,3	20,0	19,5
	19,0	17,4	18,4	17,9	19,6	17,6
	18,4	16,0	19,3	17,4	19,5	18,0
	18,9	16,8	20,1	16,9	20,1	18,3
Promedio	17,98	16,54	19,06	17,67	19,73	18,33
DS	0,87	0,50	0,62	0,81	0,35	0,53
%DSR	4,82%	3,04%	3,27%	4,59%	1,76%	2,89%
%DSR de rechazo	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Promedio corregido		18,78		18,82		18,81

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

En la tabla 23 se presentan los datos estadísticos relacionados con el porcentaje de exactitud al 70%. Esta tabla proporciona información sobre la concentración teórica y la concentración recuperada en el análisis, así como el porcentaje de recuperación obtenido para cada muestra. Los datos de concentración teórica representan los valores esperados o deseados para cada muestra en el análisis. La concentración recuperada se refiere a la cantidad real o medida de la sustancia obtenida en el análisis. El porcentaje de recuperación se calcula comparando la concentración recuperada con la concentración teórica establecida.

Tabla 23. Log 10, Concentración recuperada, Concentración teórica y porcentaje de recuperación obtenidos para las muestras M1, M2 y M3

Log 10 C (M1)	0,837
Concentración recuperada µg/ml	6,8742
Concentración teórica µg/ml	6,9979
Porcentaje de recuperación	98,23
Log 10 C (M2)	0,843
Concentración recuperada µg/ml	6,9689
Concentración teórica µg/ml	6,9971
Porcentaje de recuperación	99,60
Log 10 C (M3)	0,842
Concentración recuperada µg/ml	6,9451
Concentración teórica µg/ml	6,9971
Porcentaje de recuperación	99,26

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

En la tabla 24 se presentan los datos del promedio obtenidos de la concentración teórica $\mu\text{g/ml}$ de las tres muestras. Además, se muestra la desviación estándar relativa calculada a partir del valor obtenido del porcentaje de recuperación de cada muestra. Estos datos fueron obtenidos de acuerdo a los valores obtenidos en la tabla anterior (tabla 23).

Tabla 24. Datos estadísticos obtenidos de Concentración teórica y porcentaje de recuperación de las muestras (M1, M2 y M3).

Promedio	6,9974 $\mu\text{g/mg}$
Porcentaje	99,03 %
DRS	0,72 %

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DRS: Desviación estándar relativa

9.4.2 Exactitud al 100%

A continuación, se muestra la tabla con los resultados obtenidos en la exactitud al 100% relacionados con el estándar (punto D de la curva de estreptomicina). En esta tabla se presentan tres columnas correspondientes a las muestras 1,2, y 3.

Tabla 25. Datos obtenidos exactitud al 100%

Estándar	Muestra 1	Estándar	Muestra 2	Estándar	Muestra 3
17,4	17,8	17,6	18,1	17,9	18,1
16,4	16,8	17,8	18,4	18,7	18,9
17,9	17,4	18,2	18,5	19,0	18,6
18,4	17,6	18,8	18,1	16,8	17,6
18,0	16,5	18,9	17,3	17,8	18,0
18,5	18,1	19,0	17,4	19,0	16,7
17,8	17,8	18,2	18,7	18,0	17,0
17,0	17,6	17,8	17,0	17,8	16,6

	18,2	17,6	17,9	17,7	16,8	17,8
Promedio	17,73	17,47	18,24	17,91	17,98	17,70
DS	0,69	0,51	0,53	0,59	0,83	0,81
%DSR	3,88%	2,91%	2,90%	3,30%	4,59%	4,56%
%DSR de rechazo	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Promedio corregido		19,95		19,88		19,93

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

La siguiente tabla proporciona los resultados de concentración teórica, concentración recuperada para cada una de las tres muestras analizadas. Además de esto se evidencia el porcentaje de recuperación calculado mediante la concentración recuperada y la concentración teórica establecida.

Tabla 26. Datos obtenidos de exactitud al 70% de las tres muestras analizadas. La tabla arroja resultados de concentración teórica, concentración recuperada y porcentaje de degradación.

Log 10 C (M1)	0,993
Concentración recuperada µg/ml	9,8457
Concentración teórica µg/ml	10,0739
Porcentaje de recuperación	97,73
Log 10 C (M2)	0,984
Concentración recuperada µg/ml	9,6457
Concentración teórica µg/ml	10,0739
Porcentaje de recuperación	95,75
Log 10 C (M3)	0,992
Concentración recuperada µg/ml	9,8121
Concentración teórica µg/ml	9,9970

Porcentaje de recuperación	98,15
-----------------------------------	--------------

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

A continuación, se pueden observar los datos estadísticos obtenidos a partir de la tabla anterior (26). Donde se puede observar el promedio, el porcentaje y la desviación estándar (DSR).

Tabla 27. Datos estadísticos obtenidos a partir de la concentración teórica y porcentaje de recuperación de las 3 muestras (M1, M2 y M3).

Promedio	10,0483 µg/mg
Porcentaje	97,21 %
DRS	1,32 %

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DRS: Desviación estándar relativa

9.4.3. Exactitud al 130%

A continuación, se pueden observar los datos estadísticos obtenidos en la exactitud al 130% para las muestras (M1, M2 y M3). Además de esto las columnas denominadas “estándar” hacen referencia al punto D de la curva de estreptomycin

Tabla 28. Datos obtenidos de exactitud al 100%

Estándar	Muestra 1	Estándar	Muestra 2	Estándar	Muestra 3
17,6	17,2	17,4	17,9	17,4	19,3
15,6	17,4	17,8	18,8	19,3	19,6
18,1	17,8	17,3	18,2	18,3	18,6
16,2	17,3	17,6	18,5	17,9	18,9

	17,1	17,8	18,1	18,2	18,9	19,0
	17,6	17,2	18,7	18,0	18,9	18,4
	16,7	16,8	18,2	18,1	16,6	17,7
	16,1	17,1	17,2	18,2	17,8	18,7
	16,4	17,1	18,3	18,4	18,3	18,2
Promedio	16,82	17,30	17,84	18,26	18,16	18,71
DS	0,83	0,33	0,51	0,27	0,84	0,58
%DSR	4,94%	1,90%	2,87%	1,50%	4,63%	3,08%
%DSR de rechazo	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Promedio corregido		20,69		20,62		20,77

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

En la siguiente tabla se ven reflejados los resultados obtenidos de la concentración teórica, concentración recuperada para cada una de las tres muestras analizadas. Además de esto se puede observar el porcentaje de recuperación calculado mediante la concentración recuperada y la concentración teórica establecida.

Tabla 29. Datos obtenidos a partir de concentración teórica y porcentaje de recuperación de las muestras (M1, M2 y M3).

Log 10 C (M1)	1,093
Concentración recuperada µg/ml	12,3825
Concentración teórica µg/ml	12,9990
Porcentaje de recuperación	95,26
Log 10 C (M2)	1,084
Concentración recuperada µg/ml	12,1309
Concentración teórica µg/ml	12,9961

Porcentaje de recuperación	93,34
Log 10 C (M3)	1,103
Concentración recuperada µg/ml	12,6826
Concentración teórica µg/ml	12,9961
Porcentaje de recuperación	97,59

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

A continuación, se presentan los datos estadísticos obtenidos a partir de la tabla anterior (28). Estos datos incluyen el promedio, el porcentaje y la desviación estándar (DSR).

Tabla 30. Datos estadísticos obtenidos de concentración teórica, porcentaje de recuperación de las muestras (M1, M2 y M3 y desviación estándar relativa.

Promedio	12,9971 µg/mg
Porcentaje	95,40%
DRS	2,23%

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DRS: Desviación estándar relativa

La desviación estándar relativa es una medida estadística que se utiliza para medir la dispersión de un conjunto de datos en relación con su media. En este estudio, se utilizó la desviación estándar relativa para determinar la homogeneidad de los datos.

Los resultados obtenidos mostraron que existen diferencias significativas entre los tres tratamientos evaluados en términos de dispersión. La menor desviación estándar relativa se observó en el tratamiento de exactitud al 70%, con un valor de 0,72%. Esto indica que, los datos de este tratamiento están más cerca de la media y, por lo tanto, son más homogéneos.

Por otro lado, el tratamiento de exactitud al 130% mostró la mayor desviación estándar relativa, con un valor de 2,23% indicando una mayor dispersión de datos con respecto a la media, lo que sugiere una mayor variabilidad en los datos obtenidos.

La exactitud es una medida de la capacidad que tiene un método para obtener mediciones que se acerquen al valor verdadero. En este trabajo, se analizaron tres concentraciones diferentes del analito con el objetivo de observar su porcentaje de recuperación en cada una de ellas. Para evaluar la exactitud, la Farmacopea de los Estados Unidos en su capítulo 81 establece un rango deseado de porcentaje de recuperación esperado entre el 95% y el 105%. Este rango se considera aceptable ya que se espera que las mediciones se acerquen al valor verdadero dentro de este margen.

Al analizar los resultados obtenidos para los tres tratamientos se encontró que, todos ellos se encuentran dentro del rango establecido. Ninguno de ellos supera el 105% ni está por debajo del 95% en ninguna de las concentraciones evaluadas. Esto indica que la exactitud del método cumple con los parámetros establecidos ya que las mediciones generadas se acercan al valor verdadero dentro del rango establecido. Esto demuestra que, el método utilizado es capaz de generar mediciones precisas y confiables del analito en las diferentes concentraciones evaluadas.

9.5. Precisión del método

En la tabla 31 se presentan los datos de las muestras (M1, M2, M3, M4, M5 y M6). Las columnas etiquetadas como “estándar” hacen referencia al punto D de la curva de estreptomycin, que se utiliza como referencia en el análisis. Además de las columnas, la tabla incluye filas que contienen información del promedio, desviación estándar, porcentaje de desviación relativa, porcentaje de rechazo de desviación relativa y promedio corregido.

Tabla 31. Datos de las muestras (M1, M2, M3, M4, M5 y M6) en precisión del método

Estándar	Muestra 1	Estándar	Muestra 2	Estándar	Muestra 3	Estándar	Muestra 4	Estándar	Muestra 5	Estándar	Muestra 6	
20,3	20,4	20,8	20,1	19,1	18,5	19,6	19,6	19,3	19,3	18,8	17,4	
19,5	18,1	20,3	19,1	17,5	17,3	19,3	18,7	19,5	18,5	18,4	17,9	
19,8	20,2	19,0	19,4	18,3	18,7	17,8	18,7	18,2	18,7	17,8	18,3	
19,2	19,5	18,6	19,6	17,3	17,8	18,7	19,4	18,1	18,2	18,7	19,5	
19,8	19,5	18,2	17,9	16,9	16,8	19,1	18,9	18,2	17,9	17,7	17,7	
19,2	19,6	18,2	18,6	18,2	17,8	18,8	19,0	18,1	18,3	17,0	17,2	
19,8	19,8	18,9	18,5	16,1	16,1	19,7	19,0	17,9	18,8	16,8	17,0	
19,5	19,2	18,4	18,0	17,8	17,0	19,3	18,6	19,6	18,6	19,0	18,5	
19,6	19,5	17,1	18,2	17,3	17,7	19,2	18,9	17,9	17,7	17,9	18,3	
Promedio	19,63	19,53	18,83	18,82	17,61	17,52	19,06	18,98	18,53	18,44	18,01	17,98
DS	0,34	0,66	1,12	0,77	0,87	0,82	0,57	0,33	0,71	0,49	0,78	0,77
%DSR	1,75	3,36	5,97	4,08	4,95	4,69	3,00	1,74	3,84	2,63	4,33	4,30
%DSR de rechazo	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Prom. corregido		20,11		20,20		20,12		20,13		20,12		20,18

Fuente: Hoja de cálculo HCA-034 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

A continuación, se puede observar en la tabla 32 los datos estadísticos de las muestras (M1, M2, M3, M4, M5 y M6). Esta tabla incluye información de la concentración de las 6 muestras, así como la concentración teórica y el porcentaje.

Tabla 32. Log C, concentración, concentración en $\mu\text{g}/\text{mg}$ y porcentaje de las muestras

M1, M2 y M3

Log 10 C (M1)	1,016
Concentración (M1)	10,364
$\mu\text{g}/\text{mg}$	797,249
Porcentaje	103,7
Log 10 C (M2)	1,027
Concentración (M2)	10,652

µg/mg	819,373
Porcentaje	106,6
Log 10 C (M3)	1,017
Concentración (M3)	10,400
µg/mg	799,981
Porcentaje	104,0
Log 10 C (M4)	1,019
Concentración (M4)	10,435
µg/mg	802,723
Porcentaje	104,4
Log 10 C (M5)	1,0170
Concentración (M5)	10,400
µg/mg	799,981
Porcentaje	104,0
Log 10 C (M6)	1,024
Concentración (M6)	10,579
µg/mg	813,785
Porcentaje	105,8

Fuente: Hoja de cálculo HCA-034 Análisis químico y microbiológico S.A.S

En la tabla siguiente se contemplan los datos promedio y porcentaje que son obtenidos de µg/mg de las seis muestras. El promedio se calcula utilizando las concentraciones µg/mg de la tabla anterior (32). El promedio se obtiene a partir del porcentaje representado en la tabla anterior que indica el grado de cumplimiento o desviación de las concentraciones de las muestras.

Tabla 33. Promedio y porcentaje obtenidos de µg/mg

Promedio	805,515 µg/mg
Porcentaje	104,7 %

Fuente: Hoja de cálculo HCA-034 Análisis químico y microbiológico S.A.S

9.6. Precisión intermedia

9.6.1 Precisión intermedia día 1

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para el parámetro en cuestión, el cual se ha realizado por triplicado. La tabla consta de tres columnas denominadas Muestra 1, Muestra 2 y Muestra 3. También se incluyen tres columnas denominadas estándar, que hacen referencia al estándar de referencia utilizado en el análisis. Además de estas columnas la tabla contiene información estadística derivada de los resultados obtenidos de las tres muestras y el estándar. Estos datos son: el promedio, desviación estándar, porcentaje de desviación relativa y porcentaje de desviación relativa de rechazo.

Tabla 34. *Precisión intermedia día 1.*

	Estándar	Muestra 1	Estándar	Muestra 2	Estándar	Muestra 3
	20,3	20,4	20,8	20,1	19,1	18,5
	19,5	18,1	20,3	19,1	17,5	17,3
	19,8	20,2	19,0	19,4	18,3	18,7
	19,2	19,5	18,6	19,6	17,3	17,8
	19,8	19,5	18,2	17,9	16,9	16,8
	19,2	19,6	18,2	18,6	18,2	17,8
	19,8	19,8	18,9	18,5	16,1	16,1
	19,5	19,2	18,4	18,0	17,8	17,0
	19,6	19,5	17,1	18,2	17,3	17,7
Promedio	19,63	19,53	18,83	18,82	17,61	17,52
DS	0,34	0,66	1,12	0,77	0,87	0,82
%DSR	1,75%	3,36%	5,97%	4,08%	4,95%	4,69%
%DSR de rechazo	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Promedio corregido		20,11		20,20		20,12

Fuente: Hoja de cálculo HCA-036 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

En la siguiente tabla se ven reflejados los resultados obtenidos de la concentración, concentración $\mu\text{g}/\text{mg}$ y el porcentaje para cada una de las tres muestras analizadas.

Tabla 35. Datos estadísticos Log 10, concentración, concentración $\mu\text{g}/\text{mg}$ y porcentaje de cada muestra

Log 10 C (M1)	1,016
Concentración (M1)	10,36
$\mu\text{g}/\text{mg}$	797,249
Porcentaje	103,7
Log 10 C (M2)	1,027
Concentración (M2)	10,65
$\mu\text{g}/\text{mg}$	819,373
Porcentaje	106,6
Log 10 C (M3)	1,017
Concentración (M3)	10,40
$\mu\text{g}/\text{mg}$	799,981
Porcentaje	104,0

Fuente: Hoja de cálculo HCA-036 Análisis químico y microbiológico S.A.S

La siguiente tabla proporciona información adicional del promedio y el porcentaje obtenidos a partir de las concentraciones en $\mu\text{g}/\text{mg}$ y el promedio de la tabla anterior.

Tabla 36. Promedio y porcentaje de las muestras M1, M2 y M3

Promedio	805,534 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Porcentaje	104,8%

Fuente: Hoja de cálculo HCA-036 Análisis químico y microbiológico S.A.S

9.6.2 Precisión intermedia día 2

En la siguiente tabla se presentan los resultados de un parámetro que fue evaluado por triplicado. La tabla consta de tres columnas denominadas Muestra 1, Muestra 2 y Muestra 3, que representan las tres muestras. Adema, se incluyen tres columnas denominadas “estándar” que hacen referencia al punto D de la curva de estreptomicina utilizado como estándar de referencia en el análisis.

Tabla 37. Precisión intermedia día 2

	Estándar	Muestra 1	Estándar	Muestra 2	Estándar	Muestra 3
	15,7	16,7	17,3	17,3	15,0	15,6
	17,3	16,7	17,7	18,2	16,1	17,3
	15,9	15,3	17,4	17,7	16,7	15,9
	17,7	16,9	16,9	17,9	16,8	17,4
	16,1	16,8	17,3	17,2	18,1	17,8
	16,7	17,1	17,7	17,4	17,8	17,6
	16,3	17,6	16,7	16,3	16,1	16,6
	17,7	18,1	16,1	16,7	16,0	15,6
	17,3	17,6	16,2	16,1	16,1	16,8
Promedio	16,74	16,98	17,03	17,20	16,52	16,73
DS	0,78	0,79	0,60	0,71	0,96	0,86
%DSR	4,66%	4,68%	3,51%	4,14%	5,80%	5,15%
%DSR de rechazo	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Promedio corregido		18,67		18,61		18,65

Fuente: Hoja de cálculo HCA-036 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

En la siguiente tabla se ven reflejados los resultados obtenidos de la concentración, concentración $\mu\text{g}/\text{mg}$ y el porcentaje para cada una de las tres muestras analizadas.

Tabla 38. Datos estadísticos Log 10C, concentración $\mu\text{g}/\text{mg}$ y porcentaje de cada una de las tres muestras.

Log 10 C (M1)	1,028
Concentración (M1)	10,67
$\mu\text{g}/\text{mg}$	820,441
Porcentaje	106,7
Log 10 C (M2)	1,017
Concentración (M2)	10,41
$\mu\text{g}/\text{mg}$	800,659
Porcentaje	104.1
Log 10 C (M3)	1,024
Concentración (M3)	10,58
$\mu\text{g}/\text{mg}$	813,793
Porcentaje	105,8

Fuente: Hoja de cálculo HCA-036 Análisis químico y microbiológico S.A.S

A continuación, se puede observar los datos de promedio y porcentaje que son obtenidos de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de las tres muestras y del promedio reflejados en la tabla anterior

Tabla 39. Promedio y porcentaje obtenido de las muestras M1, M2 y M3

Promedio	811,631 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Porcentaje	105,5%

Fuente: Hoja de cálculo HCA-036 Análisis químico y microbiológico S.A.S

La precisión obtenida en este estudio hace referencia al grado de dispersión entre los datos de las mediciones de los halos de inhibición. Para evaluar esta precisión se utilizó el concepto de repetibilidad, que es la capacidad de obtener resultados consistentes bajo las mismas condiciones de operación en diferentes días por el mismo analista, utilizando la misma muestra homogénea.

La desviación estándar obtenida en cada una de las muestras indica el grado de dispersión de los datos con respecto al valor promedio. Valores grandes de desviación estándar indican que los puntos de datos están alejados de la media, mientras que valores pequeños de desviación estándar indican que los datos están agrupados más cerca de la media.

En este trabajo, los promedios de las mediciones realizadas por el mismo analista en los dos días evaluados no mostraron diferencias significativas. Esto demuestra una buena repetibilidad del método, lo cual implica que se obtienen resultados consistentes bajo las mismas condiciones. Además, se evaluó la desviación estándar relativa entre los seis datos obtenidos. Esta medida se utiliza para comparar la dispersión de los datos con respecto al promedio. En este caso, los valores de la desviación estándar relativa cumplieron con el criterio de aceptación establecido, ya que no superan el 10%. Esto indica que la dispersión de los datos en relación con la media es aceptable y que la precisión de el método se encuentra dentro de los parámetros aceptados.

9.7 Limite de cuantificación

En el límite de cuantificación se analizaron 3 muestras y el estándar de referencia el punto D de la curva de estreptomicina cuyos resultados se muestran en la tabla 40.

Tabla 40. Datos obtenidos límite de cuantificación de las tres muestras y el estándar

ESTANDAR	MUESTRA 1	ESTANDAR	MUESTRA 2	ESTANDAR	MUESTRA 3
16,5	13,3	17,1	15,0	17,9	14,4
17,1	13,7	16,8	15,5	18,0	15,4
15,8	12,7	17,1	15,2	17,9	15,0
15,7	13,3	17,9	15,8	17,4	15,6
16,7	14,4	18,8	14,4	19,0	15,5
15,6	14,2	17,0	15,3	18,1	13,9

	16,5	14,4	17,6	15,3	18,0	16,8
	16,9	14,2	18,9	15,3	18,4	17,1
	16,7	14,4	17,0	13,9	18,4	16,7
Promedio	16,39	13,84	17,58	15,08	18,12	15,60
DS	0,55	0,62	0,80	0,58	0,44	1,10
%DSR	3,36%	4,50%	4,53%	3,86%	2,45%	7,04%
%DSR de rechazo	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Promedio corregido		15,89		15,94		15,92

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

En la siguiente tabla se pueden observar los datos estadísticos obtenidos de acuerdo a las muestras M1, M2 y M3 del límite de cuantificación. La tabla muestra los datos de promedio y porcentaje obtenidos a partir de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de las tres muestras analizadas, así como del promedio general. Estos datos resumen la información relevante y brindan una visión más general de los resultados del análisis.

Tabla 41. Datos estadísticos límite de cuantificación

Log 10 C (M1)	0,586
Concentración recuperada $\mu\text{g}/\text{ml}$	3,8578
Concentración teórica $\mu\text{g}/\text{ml}$	4,0296
Porcentaje de recuperación	95,74
Log 10 C (M2)	0,593
Concentración recuperada $\mu\text{g}/\text{ml}$	3,9211
Concentración teórica $\mu\text{g}/\text{ml}$	3,9988
Porcentaje de recuperación	98,06
Log 10 C (M3)	0,590
Concentración recuperada $\mu\text{g}/\text{ml}$	3,8893

Concentración teórica µg/ml	4,0296
Porcentaje de recuperación	96,52

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

En la siguiente tabla se pueden apreciar los datos estadísticos obtenidos de la *C. teórica* y *porcentaje de recuperación de las muestras (M1, M2 y M3)*.

En la siguiente tabla se presentan los datos del promedio, el porcentaje y el porcentaje de desviación estándar relativa, obtenidos a partir de las concentraciones teóricas y del porcentaje de recuperación de cada una de las tres muestras analizadas en la tabla anterior.

Tabla 42. Datos obtenidos a partir de concentración teórica y porcentaje de recuperación de las muestras (M1, M2 y M3).

Promedio	4,0193µg/mg
Porcentaje	96,77 %
DRS	1,22 %

Fuente: Hoja de cálculo HCA-030 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

La concentración mínima de Estreptomocina que se pudo determinar con exactitud y precisión aceptables en las condiciones experimentales indicadas es de 0,2 µg/ml. Los datos obtenidos del análisis estadístico se presentan en la tabla 42

En la tabla 42 se observa la desviación estándar relativa para cada una de las muestras analizadas. Se estableció un criterio de aceptación en el cual las desviaciones estándar relativas deben estar por debajo del 10%. En este caso, se cumple con dicho criterio ya que los valores de desviación estándar relativa están por debajo de ese umbral.

Además, se estableció un intervalo de recuperación aceptable entre el 90 y el 110%. Esto significa que los valores obtenidos deben estar por encima del 90% y no deben exceder el 110%

del valor esperado. En este caso, los valores obtenidos cumplen con este criterio ya que no están por debajo del 90% ni superan el 110%.

9.8 Límite de detección

En el análisis del límite de detección se utilizaron 3 muestras para evaluar las concentraciones mínimas detectables. La muestra 1 tenía una concentración de 0,25 µg/ml, la muestra 2 tenía una concentración de 0,75 µg/ml y la muestra 3 tenía una concentración de 0,5 µg/ml. Además, se incluyeron datos del estándar representado en 3 columnas, el cual corresponde al punto D de la curva de estreptomina.

Tabla 43. Datos obtenidos límite de detección

	ESTÁNDAR	MUESTRA 1	ESTÁNDAR	MUESTRA 2	ESTÁNDAR	MUESTRA 3
	18,2	9,8	16,3	8,2	17,6	0,0
	17,9	9,6	16,2	8,0	17,7	0,0
	17,6	9,9	16,2	8,7	17,6	0,0
	17,1	10,2	18,4	8,5	16,8	0,0
	17,9	9,4	18,2	8,4	17,7	0,0
	17,5	9,5	18,2	8,9	17,5	0,0
	17,5	10,0	17,7	9,1	18,0	0,0
	17,6	10,3	18,5	9,0	18,2	0,0
	17,2	10,3	18,2	9,2	17,5	0,0
Promedio	17,61	9,89	17,54	8,67	17,62	0,00
DS	0,35	0,34	1,01	0,42	0,39	0,00
%DSR	1,98%	3,45%	5,74%	4,83%	2,19%	0,00%
%DSR de rechazo	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Promedio corregido		10,72		9,56		0,82

Fuente: Hoja de cálculo HCA-031 Análisis químico y microbiológico S.A.S

Nota: DS: Desviación estándar, DSR %: porcentaje de desviación estándar relativa.

En la siguiente tabla se ilustran los datos obtenidos de las tres muestras del límite de detección. La tabla muestra los datos de promedio y porcentaje obtenidos a partir de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de las tres muestras analizadas, así como del promedio general.

Tabla 44. Datos estadísticos límite de detección

Log 10 C (M1)	-0,253
Concentración recuperada $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,580
Concentración teórica $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,735
Porcentaje de recuperación	78,84
Log 10 C (M2)	-0,421
Concentración recuperada $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,380
Concentración teórica $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,490
Porcentaje de recuperación	77,46
Log 10 C (M3)	-1,811
Concentración recuperada $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,015
Concentración teórica $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,245
Porcentaje de recuperación	6,31

Fuente: Hoja de cálculo HCA-031 Análisis químico y microbiológico S.A.S

A través del análisis cualitativo, se realizó la determinación del límite de detección en la muestra M3 a una concentración de $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ de Estreptomicina. En esta concentración, no se observó la formación de un halo, lo cual indica que la presencia de Estreptomicina no pudo ser detectada en estas condiciones experimentales.

El límite de detección se define como la cantidad mínima de Estreptomicina en una muestra que puede ser detectada, aunque no necesariamente cuantificada, en las condiciones

experimentales específicas. En este caso, se estableció que el límite de detección fue de 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

La concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ representa el nivel más bajo de concentración de Estreptomicina que pudo ser identificado como estadísticamente diferente del blanco del analito. Esto implica que el método utilizado es capaz de detectar cantidades mínimas de Estreptomicina en una muestra, siempre y cuando estén por encima de la concentración 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

10. Conclusiones

- En conclusión, el presente trabajo ha logrado alcanzar con éxito su objetivo general. El objetivo planteado inicialmente consistía en validar la metodología analítica de valoración microbiológica para cuantificar Estreptomicina en materia prima. A lo largo de este estudio, esta metodología demuestro ser precisa y confiable en el análisis de estreptomicina. Se ha observado una concordancia entre los resultados de las pruebas realizadas en el laboratorio, lo que indica que el método es consistente y confiable, brindando mediciones precisas y reproducibles de la concentración de Estreptomicina.
- Este trabajo también cumple satisfactoriamente con los objetivos específicos planteados, ya que los resultados obtenidos demuestran que el método analítico utilizado para la cuantificación de Estreptomicina presenta una adecuada linealidad, precisión y exactitud. Esto demuestra que el método es capaz de proporcionar los resultados precisos y confiables en la detección y cuantificación de este principio activo. En conjunto, los parámetros mencionados anteriormente son satisfactorios ya que respaldan la idoneidad y confiabilidad del método analítico para su uso en aplicaciones de detección y cuantificación de Estreptomicina en materia prima.
- Se comprobó que tanto la linealidad del sistema como la del método exhiben un elevado valor del coeficiente de correlación alcanzado, el cual se acerca a 1. La linealidad del sistema y la del método son un aspecto crucial en los análisis cuantitativos, ya que aseguran la proporcionalidad entre la señal medida y la concentración del analito. La alta linealidad obtenida en este trabajo proporciona

confianza en la precisión y exactitud de los resultados analíticos obtenidos en este rango de concentraciones.

- Los tratamientos evaluados para la selectividad son fundamentales en el método analítico de cuantificación de Estreptomicina. Es necesario tener en cuenta soluciones ácidas, básicas, tratamientos térmicos y radiación UV, ya que estos pueden actuar como interferentes durante la cuantificación de este principio activo. La selección adecuada de los tratamientos garantiza la precisión y exactitud de los resultados analíticos, evitando posibles errores o sesgos en la medición de la concentración de Estreptomicina.

- Se ha determinado que la exactitud el método analítico utilizado cumple con los parámetros y criterios de aceptación establecidos. Esto se traduce en que los resultados de las pruebas obtenidos a través del procedimiento especificado, bajo las condiciones descritas, exhiben una cercanía al valor verdadero.

11. Recomendaciones

La validación de un método microbiológico es un paso crucial para asegurar su confiabilidad y precisión. A continuación, se presentan algunas recomendaciones para llevar a cabo la validación de un método microbiológico.

1. Se recomienda determinar las concentraciones adecuadas para el parámetro límite de detección, para esto se debe realizar un análisis de la sensibilidad de la metodología analítica, esto implica realizar pruebas con diferentes concentraciones conocidas de la muestra y el estándar y evaluar la capacidad del método para detectar y cuantificar estas concentraciones.
2. Al evaluar la exactitud se debe considerar la preparación del estándar de referencia y de la muestra, con el fin de asegurar que los diámetros de los halos de inhibición estén proporcionales a la concentración establecida, ya sea al 70%, al 100% o al 130%.

12. Referencias Bibliográficas

Asencios, D. & Cárdenas, D. (2008). Evaluación de un método de ensayo microbiológico para determinar la potencia antimicrobiana de tirosina. 17. <https://core.ac.uk/download/pdf/323345051.pdf>

Asociación Española de Pediatría. (s.f). Estreptomicina. Recuperado el 1 de abril de 2023, de <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/estreptomicina>

Brian J. Werth. (2022, junio). *Introducción a los antibióticos—Infecciones*. Manual MSD versión para público general. <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/infecciones/antibi%C3%B3ticos/introducci%C3%B3n-a-los-antibi%C3%B3ticos>

Bonev, B., Hooper, J., & Parisot, J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1295–1301. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn090>

BP. British Pharmacopeia (Veterinary). (2023). Apéndice XIV. Ensayo microbiológico de antibióticos.

Calvo, J. & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>

Camaró-Sala, M.L., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P., Catalá-Cuenca, V., Ocete-Mochón, M. D., & Gimeno-Cardona, C. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(7), e31–e36. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>

Ciuca, V., Burghelea, V., Safta, V. V., Nita, D., & Paraschiv, L. (2016). MATHEMATICAL MODELING FOR BENZYL PENICILIN POTASSIUM AND STREPTOMYCIN SULPHATE POTENCY DETERMINATION OF ASCOMICIN. 10

Fan, L., Bo, S., Chen, H., Ye, W., Kleinschmidt, K., Baumann, H. I., Imhoff, J. F., Kleine, M., & Cai, D. (2011). Genome Sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* gtP20b, Isolated from the Indian Ocean. *Journal of Bacteriology*, 193(5), 1276–1277. <https://doi.org/10.1128/JB.01351-10>

Lee, R. A., Centor, R. M., Humphrey, L. L., Jokela, J. A., Andrews, R., & Qaseem, A. (2021). Appropriate Use of Short-Course Antibiotics in Common Infections: Best Practice Advice From the American College of Physicians. *Annals of Internal Medicine*, 174(6), 822–827. <https://doi.org/10.7326/M20-7355>

Mejía Rangel, L.S.M. (s/f). Validación de la técnica para la cuantificación de tilosina en un producto sólido.
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8677/tesis150.pdf?sequence=1>

Ministerio de Salud y Protección Social. (2013). Resolución número 3619 de 2013. Por la cual se expide el Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos, se establece la Guía de Evaluación y se dictan otras disposiciones.
https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%203619%20de%202013.pdf

Ministerio de Salud y Protección Social. (2016). Resolución número 1160 de 2016. Por la cual se establecen los Manuales de Buenas Prácticas de Manufactura y las Guías de inspección de Laboratorios o Establecimientos de Producción, para la obtención del Certificado de Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura.
https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%201160%20de%202016.pdf

Organización Panamericana de la Salud. (2002). Validación de métodos analíticos. Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico.
https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACIoN_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf

Paredes, F., y Roca, J. (2004). Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. (Vol., 23). 116-124. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-accion-antibioticos-perspectiva-medicacion-antimicrobiana-13059414>

Picazo, J. J. (s/f). Procedimientos en Microbiología Clínica.
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

Suárez, C., y Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos [Beta-lactam antibiotics]. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 27(2), 116–129.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>

Tait Keith. (s.f.) Industria farmacéutica. Capítulo 79.
<https://www.insst.es/documents/94886/161971/Cap%C3%ADtulo+79.+Industria+farmac%C3%A9utica>

UNODC. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. 17

USP. United States Pharmacopeia. (2023). Capítulo <81> Antibióticos-Valoraciones Microbiológicas https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-