

UNIVERSIDAD GALILEO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA BIOLÓGICA

“Validación de métodos de potencia antibiótica en disco-placa para Neomicina Sulfato y Gentamicina Sulfato en productos semisólidos”

TESIS



PRESENTADA A LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

POR

ANA KAREN POP LARA
CARLOS FERNANDO CARDONA MORALES

PREVIO A CONFERIRLES EL TÍTULO DE

QUÍMICOS BIÓLOGOS

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADOS

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2,023

**MIEMBROS DE HONOR
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DE LA UNIVERSIDAD GALILEO**

DECANA	Dra. Vilma Judith Chávez de Pop
COORDINADOR ACADÉMICO	MSc. María Teresa Meneses Sánchez
COORDINADOR ÁREA DE TESIS	MSc. Glenda Marina Escalante Paz de Ramírez MSc. Claudia Sofía Gatica Canoj

JURADO QUE PRACTICÓ EL EXAMEN PRIVADO DE TESIS

PRESIDENTE:	MSc. Glenda Marina Escalante Paz de Ramírez
SECRETARIO:	MSc. María Teresa Meneses Sánchez
EXAMINADOR:	MSc. Claudia Sofía Gatica Canoj

Guatemala, 24 de agosto 2,023

Estimadas

MSc. Glenda Marina Escalante Paz de Ramírez

MSc. Claudia Sofía Gatica Canoj

Coordinador Área de Tesis

Licenciatura en Química Biológica

Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad Galileo

Estimadas:

De conformidad a la designación que fui objeto, bajo el dictamen FACISA-001-2014, procedí a asesorar a los estudiantes Ana Karen Pop Lara y Carlos Fernando Cardona Morales, en la elaboración de su tesis titulada: **“Validación de métodos de potencia antibiótica en disco-placa para Neomicina Sulfato y Gentamicina Sulfato en productos semisólidos”**

La tesis cumple con las normas y requisitos académicos necesarios y constituye un aporte significativo para la institución objeto de estudio.

Con base a lo anterior, recomiendo que se acepte el trabajo en mención para sustentar el Examen Privado de Tesis, previo a optar el título de Química Biológica en el grado académico de licenciatura.

Atentamente,


Ldo. Msc. Gerbert Solís
Colegiado No. 2392

DEDICATORIA

A DIOS por darnos la sabiduría y salud para llevar a cabo esta investigación de forma correcta y permitir que todo lo realizado sea un aporte para la ciencia.

A NUESTROS PADRES por ese cariño incondicional, por tener fe en nosotros, por el apoyo incondicional y creer en nosotros para llevar a cabo este trabajo, además por su ayuda emocional, intelectual y económica a lo largo de toda nuestra carrera profesional.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitir que lo planificado se haya llevado a cabo en su totalidad y en el tiempo estipulado, por darnos la salud y fuerza para no desmayar en el camino y superar cada obstáculo que se presentó.

A nuestros padres, hermanos, hermanas y demás familiares, por el apoyo incondicional, emocional y económico que nos permitió llevar a cabo esta investigación, buscando no defraudar su confianza. Gracias por todo el apoyo recibido. ¡Los queremos!

Al Químico Biólogo Msc. Gerbert Solís, por ser un gran asesor de tesis, sin su paciencia, compromiso, conocimiento y entrega no habría sido posible llevar a cabo esta investigación, por creer en que seríamos capaces de finalizar la investigación y su gran amistad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Galileo. Por permitirnos llevar a cabo este estudio experimental.

Al Laboratorio de microbiología de la Farmacéutica Pharmalat, por abrirnos sus puertas y permitir realizar la parte experimental de la investigación en sus instalaciones.

A nuestros catedráticos, colegas y amigos, que de una u otra forma colaboraron, en el perfeccionamiento de nuestros estudios profesionales.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS	6
INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO I	8
MARCO METODOLÓGICO	8
1.1 Justificación de la investigación	8
1.2 Planteamiento del problema	8
1.3 Hipótesis	9
1.4 Objetivos de la Investigación	9
1.5 Métodos, técnicas e instrumentos	9
1.6 Recursos	10
CAPÍTULO II	12
MARCO TEÓRICO	12
1. Marco histórico	12
2. Antecedentes	13
3. Cálculos	23
4. Valoración cilindro-placa	24
5. Regresión lineal	25
7. Descripción de microorganismos	27
CAPÍTULO III	29
MÉTODO PROPUESTO DE POTENCIA ANTIBIÓTICA EN DISCO-PLACA PARA NEOMICINA SULFATO Y GENTAMICINA SULFATO	29
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIÓN	47
ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resultados de especificidad	39
Tabla 2. Resultados de linealidad	39
Tabla 3. Resultados de precisión	41
Tabla 4 Resultados de exactitud	43
Tabla 5. Resultados de la validación	44
Tabla 6. Organismos de prueba para antibióticos para analizar en los métodos de disco placa y turbidimétrico.	51
Tabla 7 Ingredientes para la preparación de la solución amortiguadora B3	53
Tabla 8. Concentraciones requeridas para las diluciones estándar de la potencia antibiótica para Neomicina Sulfato	53
Tabla 9. Concentraciones requeridas para las diluciones estándar de la potencia antibiótica para Gentamicina Sulfato	54
Tabla 10. Ingredientes para la preparación del medio 11	54
Tabla 11. Datos de valoración Disco-placa experimentales para Neomicina Sulfato	55
Tabla 12. Datos de valoración Disco-placa experimentales para Gentamicina Sulfato	56

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 1 Certificado cepa ATCC	57
Figura 2 Pasos para hidratar una cepa liofilizada	60
Figura 3. Diagrama de absorción de luz explicado por la ley de Bouguer-Lambert-Beer	61
Figura 4 Diagrama de absorción de luz explicado por la ley de Bouguer-Lambert-Beer	61
Figura 5 Partes del espectroscopio Evolution 60s	62
Figura 6 Equipo utilizado para la cuantificación de la cepa (espectroscopio Evolution 60s)	62
Figura 7 Distribución de los discos con la solución estándar para la prueba de potencia antibiótica	63
Gráfica 1. Resultados de linealidad para Neomicina	40
Gráfica 2. Resultados de linealidad para Gentamicina	41

INTRODUCCIÓN

Ante la necesidad de un método propio para la cuantificación de antibióticos presentes en productos semisólidos tópicos específicamente Gentamicina Sulfato y Neomicina Sulfato que se fabrican en la farmacéutica de interés, se realiza una investigación que ayudará a determinar la capacidad antimicrobiana de un antibiótico presente en un semisólido cuantificando la inhibición del microorganismo *S. epidermidis*. El procedimiento propuesto toma en cuenta un estándar con una concentración denominada S3 y 5 diluciones de la muestra para inocular la cepa ATCC de *S. epidermidis* en placas que contienen agar 11 colocando en cada placa 6 discos en blanco, 5 de ellos dispensados por una dilución de la muestra y 1 del estándar llevando a incubación por 48 horas para la medición y cuantificación de los halos obtenidos.

El método se basa en fundamentos microbiológicos siendo una prueba in vitro, convirtiendo los halos inhibitorios en cifras cuantificables, cumpliendo con parámetros estadísticos para su validación.

CAPÍTULO I

MARCO METODOLÓGICO

1.1 Justificación de la investigación

El propósito es implementar un método de potencia antibiótica disco-placa para cuantificar la acción de los antibióticos de interés contenidos en cremas siendo para esta investigación Neomicina Sulfato y Gentamicina Sulfato por lo que se propone un método microbiológico in vitro, en el cual se observa la acción de ambos antibióticos frente al microorganismo *Staphylococcus epidermidis* al crear una inhibición, utilizando placas de agar inoculadas con *S. epidermidis* en discos de papel filtro con el antibiótico de interés para obtener cifras cuantificables de los halos inhibitorios que permitan cumplir con parámetros aceptados dándole validez al método.

1.2 Planteamiento del problema

1.2.1 Definición del problema

Se ha observado que la farmacéutica de interés no cuenta con un método propio para la cuantificación de antibióticos contenidos en cremas tópicas provocando la retención en bodega del producto terminado lo que representa pérdidas económicas al retrasar la distribución.

1.2.2 Delimitación del Problema

El método será aplicable a productos farmacéuticos semisólidos de uso tópico que incluyan Neomicina Sulfato y Gentamicina Sulfato en su formulación.

1.2.3. Unidad de Análisis

Metodología cuantitativa

1.2.4 Tamaño de la muestra

1 tubo de 30g de crema Neomicina Sulfato contenida en su formulación (Clostebol 5mg + Neomicina Sulfato 0.5% (3.5mg), crema tópica.

1 tubo de 30g de crema Gentamicina Sulfato contenida en su formulación (Gentamicina base equivalente a 1.205 mg de gentamicina sulfato 1.0 mg + Betametasona + Clotrimazol).

1.2.5 Ámbito geográfico

Se realizará en un laboratorio farmacéutico en Villa Nueva Guatemala.

1.3 Hipótesis

1.3.1 Hipótesis verdadera

Implementar el método alternativo disco-Placa como método microbiológico demostrando su validez al cumplir los parámetros de desempeño.

1.3.2 Hipótesis nula

Al implementar el método disco-Placa como método alternativo microbiológico no se demuestra su validez por incumplimiento en los parámetros de desempeño.

1.4 Objetivos de la Investigación

1.4.1 Objetivo General

Implementar y validar un método alternativo para la cuantificación de los antibióticos gentamicina sulfato y neomicina sulfato contenidos en cremas tópicas producidas en la planta farmacéutica; cumpliendo con los parámetros estadísticos para su validación.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de los antibióticos contenidos en una crema tópica cuantificando halos de inhibición.
- Lograr la validación del método cumpliendo con los valores de los parámetros de desempeño.

1.5 Métodos, técnicas e instrumentos

1.5.1 Método

Sistema para la cuantificación de potencia antibiótica de Neomicina en Clostebol (5 mg) + Neomicina Sulfato 0.5 % (3.50 mg), crema tópica.

Sistema para la cuantificación de potencia antibiótica de Gentamicina base (equivalente a 1.205 mg de gentamicina sulfato) 1.0 mg + Betametasona (0.5 mg) + Clotrimazol (10 mg), crema tópica.

1.5.2 Técnicas

Documentales: Consultas bibliográficas en distintas farmacopeas, tesis con temas relacionados.

Experimental: Llevando a cabo la demostración del uso de discos de papel filtro.

1.5.3 Instrumentos

Farmacopeas

Computadoras

Fotografías

Métodos internos de la institución

1.6 Recursos

1.6.1 Recursos humanos

Investigadores: Ana Karen Pop Lara, Carlos Fernando Cardona Morales

Coordinador de la investigación: Licenciado Gerbert Solís

Redacción del método: Ana Karen Pop Lara, Carlos Fernando Cardona Morales

Información de materiales: Licenciada Ana Lucrecia Aquino (PCL).

1.6.2 Recursos materiales

- Agar antibiótico No 11 Merck
- Alcohol al 70%
- Balanza analítica
- Balanza semianalítica
- Balones aforados
- Cajas Petri

- Campana de flujo laminar
- Cepas ATCC
- Crema con Neomicina Sulfato como principio activo
- Crema con Gentamicina Sulfato como principio activo
- Discos de papel filtro estériles
- Estándar de Neomicina Sulfato
- Estándar de Gentamicina Sulfato
- Estándar de McFarland 0.5
- Guantes
- Hisopos
- Incubadora
- Magnetos
- Pinzas
- Pipetas automáticas de 1-200 μ L
- Solución amortiguadora
- Solución Salina
- Tips
- Vernier

1.6.3 Recursos financieros

La institución farmacéutica asume los costos que genera la investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

1. Marco histórico

Antibiótico, se deriva del latín biotícus (de los seres vivos) que prácticamente son sustancias con una estructura química derivados de un ser vivo o actualmente derivado sintético; que mata o inhibe el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles.

Fue en 1928 cuando un médico británico, cultivo una bacteria (*Staphylococcus aureus*) en un agar, el cual fue contaminado por un hongo que en ese momento se cataloga como accidental, al observar que alrededor del hongo no contaba con crecimiento bacteriano se sorprendió Alexander Fleming con lo que comenzó a investigar el porqué de lo sucedido con lo que concluyó que el hongo secreta una sustancia química la cual impedía el crecimiento de la bacteria. (Acuña L., 2002)

La técnica de tubo-dilución es un método derivado del Doctor Rammelkamp (método de ensayo de penicilina). Rammelkamp descubrió que un estreptococo era el causante de la fiebre reumática (Case Western Reserve University, 2000). En 1940 Rammelkamp realiza una prueba in vitro de la resistencia de la penicilina ante *Staphylococcus aureus* evaluando la efectividad del antibiótico en las diluciones del estafilococo.

En 1955 se trabajaba en la valoración de potencia antibiótica por medio de curvas de sensibilidad antibiótica para lo que se emplea el método disco-placa-cultivo de disoluciones con concentraciones continuas, en placas de agar triptosa, discos de papel filtro determinando la potencia por medio de progresiones aritméticas y geométricas empleando tan solo dos placas para cada concentración; que por un gráfico trazado en papel milimetrado se

relacionan los antibióticos estándar con los antibióticos muestra. (Morales & Velazco, 1955)

2. Antecedentes

En condiciones adecuadas los antibióticos pueden demostrar su efecto inhibitorio sobre microorganismos a través de medios químicos, siendo estos estandarizados según la USP para la valoración microbiológica pudiendo ser de dos técnicas generales: valoración cilindro-placa y turbidimétrica.

La valoración cilindro-placa tiene su fundamento en la difusión del antibiótico desde un cilindro colocado en forma vertical por medio de una capa de agar solidificado en una placa Petri, teniendo en el agar un crecimiento de un microorganismo correspondiente según lo recomienda la USP, deberá ser inhibido en un radio entorno al cilindro que contiene la solución con el antibiótico. (United States Pharmacopeial Convention, 2017)

La valoración turbidimétrica por otro lado es una valoración que tiene como objeto inhibir el crecimiento de un microorganismo como en la técnica cilindro placa con la diferencia que la solución del antibiótico debe ser uniforme en un medio fluido favoreciendo el crecimiento del microorganismo cuando este no contenga al antibiótico.

Se debe tener en cuenta conceptos principales para la comprensión de las técnicas descritas anteriormente:

Unidades y estándares de referencia, la potencia de antibióticos es descrita por unidades (U) o en microgramos de actividad. Ya sea en cualquiera de las dos formas “unidades” o “ μg ” se establece un Estándar Maestro Federal de los Estados Unidos para los antibióticos calibrando en referencia al estándar maestro.

Se hace mención que desde un principio se consideraba que un antibiótico estándar de referencia constaba en su totalidad de una unidad química y se le

asignaba una potencia de 1000 µg/mg o ya con el paso del tiempo las mejoras hicieron que los antibióticos superarán la potencia de 1000 µg/mg que en este caso se le asignaba la potencia según el peso de la sustancia pura, pero se debe tener en cuenta que los µg equivalen a una unidad cuando: el antibiótico se presenta como una sal o en su forma libre, cuando la sustancia antibiótica consta en su estructura de componentes que son químicamente parecidos pero tienen una diferencia en la actividad antibiótica o cuando las potencias de una rama del antibiótico se definen en términos de un antibiótico estándar pues es único en la rama y se define como heterogéneo.

La USP aconseja seguir los procedimientos de limpieza y desinfección para aparatos, controlar la temperatura y microorganismos a utilizar, así como el almacenamiento de estos.

El control termostático es necesario en varias etapas de un ensayo microbiano, cuando se cultiva un microorganismo y se prepara su inóculo, y durante la incubación en ensayos de placa y tubo (USP 32).

Los microorganismos a utilizar en esta prueba se especifican según el antibiótico a probar pudiendo obtenerse de la American Type Culture Collection (ATCC) y como se puede observar en la Tabla 6, esto para asegurar el desempeño de los organismos de prueba estableciendo condiciones de almacenamiento durante su validación haciendo salvedad que si durante el crecimiento del microorganismo se notan cambios en las características del organismo este se desecha.

Las cepas ATCC son microorganismos liofilizados certificados que son usados en diferentes áreas, para el control de calidad en el área microbiológica. Están previstas para utilizarlas como control, verificar métodos, reactivos, comprobar el crecimiento en medios o identificación de microorganismos. (Microbiologics, Inc, 2018)

Las cepas ATCC se pueden clasificar según la función desempeñada:

- Referencia: para contar con un microorganismo verdadero y certificado.

- Trabajo: se obtienen a partir de cepas de referencia.
- Reserva: Son cepas idénticas obtenidas de un subcultivo de las cepas de referencia.

Los laboratorios, para garantizar la trazabilidad de sus resultados, deben utilizar cepas de referencia de microorganismos, obtenidos directamente de una colección nacional o internacional reconocida y certificada. (Técnicas de control metrológico, 2020)

Tienen como principio brindar resultados confiables, trazables a los métodos tradicionales con el fin de almacenarlos y mantener la colección de cultivos de inventario de referencia. Teniendo una composición en gránulos conteniendo una población pura de un determinado microorganismo con una estructura que produce estabilidad que esta incluye gelatina, leche, ácido ascórbico, carbohidrato y carbón. (Microbiologics, Inc, 2018)

Las Colecciones de Cultivos son entidades que:

- Recolectan microorganismos procedentes de distintas fuentes.
- Suministran cepas certificadas.
- Permiten el depósito y conservación de microorganismos a largo plazo.
- Realizan funciones de identificación, confirmando siempre los microorganismos que acceden a la colección ya identificados.

En algunos casos las colecciones también pueden ofrecer servicios de depósito internacional para patente, (trabajando siempre de acuerdo con los procedimientos establecidos en el Tratado de Budapest sobre Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Propósitos de Procedimiento de Patentes) de asesoría, consultoría o formación. (Técnicas de control metrológico, 2020)

La ATCC (American Type Culture Collection) y su colección es quizá hasta ahora una de las más conocidas; iniciando con prestación de servicios en 1925 con cultivos tipo ATCC. (Técnicas de control metrológico, 2020). Las cepas ATCC se utilizan como control de calidad ante un estudio en el que se deba contar con una referencia certificada y cuantitativa sobre la morfología o

cantidad de un microorganismo con el fin de lograr trazabilidad, intervalos de confianza altos.

En la valoración de cilindro-placa debe medirse los diámetros de los halos sin hacer comparación entre placas solo tomando en cuenta los halos de los estándares que van en cada placa. Por otro lado, en la valoración turbidimétrica se espera evitar un sesgo sistemático colocando tubos duplicados estando separados en gradillas diferentes, con el objetivo de minimizar la influencia de la temperatura sobre los duplicados siendo sensible a ligeras variaciones de temperatura. Al momento de incubar se debe colocar al menos tres tubos con la concentración estándar y la concentración de la muestra en una sola gradilla comparando los valores de turbidez exclusivamente dentro de las gradillas.

Se deben realizar cinco concentraciones para el diseño de la valoración previamente recomendada y una sola concentración para la preparación de la muestra. Para la valoración en cilindro-placa se incluyen únicamente dos tratamientos, el tratamiento de referencia que no es más que la mediana de los niveles del estándar (S3) y una de las otras cuatro concentraciones del estándar (S1, S2, S4, y S5) o la muestra (U3). La concentración de la muestra es una aproximación de la concentración deseada, se debe diluir con el fin de llegar a alcanzar la concentración de la mediana de referencia del estándar (S3). Siendo el objetivo de la dilución de la mediana de referencia que el resultado al momento de graficar en la curva estándar caiga dentro de esta curva.

La prueba determina la potencia relativa de U3, en función de la curva estándar, teniendo en cuenta que la potencia relativa debe ser aproximadamente 100%. La potencia final de la muestra se obtiene multiplicando el resultado de U3 (muestra) por el factor que se utilizó para la dilución. Aunque una valoración debe considerarse preliminar si el valor que se calculó es inferior al 80% o superior al 125%, esto puede ser un indicador en el que se concluye que la solución madre es incorrecta. En el caso que esto llegara a suceder la USP ofrece una alternativa en la que se ajuste la potencia supuesta de la muestra basándose en el valor de la potencia preliminar y de

ahí partir para repetir la valoración. De lo contrario la potencia se derivará de una porción de la curva donde las respuestas del estándar y la muestra no sean paralelas.

Las pruebas microbiológicas suelen poseer variables ya sea intravaloración e intervaloración de tal modo que se requieren dos o más valoraciones independientes para obtener una estimación confiable de la muestra. Se inicia con la solución madre seguido de las diluciones de esta solución, preparadas por separado se recomienda llevar a cabo otro día las valoraciones adicionales, realizando cálculos de la valoración e incertidumbre máxima esto por medio de operaciones que se mencionan más adelante. La USP hace referencia a que el resultado combinado de una serie de valoraciones independientes más pequeñas a lo largo de diversos días es una estimación de la potencia antibiótica más confiable que la obtenida de una sola valoración grande con el mismo número total de placas o de tubos según sea el caso, tomando en cuenta que las valoraciones adicionales o una menor variabilidad permite que el producto cumpla con intervalos de especificación más estrechos. Reduciendo esta variabilidad que pueda existir en las valoraciones se logrará que el límite de confianza requerido sea con menos valoraciones.

1. Método Cilindro-Placa USP

Se recomienda el uso de cajas Petri de plástico desechables o de vidrio con un tamaño aproximado de 20 x 100 mm con su respectiva tapa. Se debe contar con unos cilindros de acero inoxidable o bien de porcelana con un diámetro total de 8 ± 0.1 mm de diámetro externo y contar con 6 ± 0.1 mm de diámetro interno con 10 ± 0.1 mm de altura. Debiendo limpiar los cilindros con una solución ácida (ácido nítrico 2N o ácido crómico) con la cual se les dará un baño con el fin de limpiarlos como lo recomienda la USP en su capítulo 1051.

Para la preparación de la solución madre se debe disolver una cantidad adecuada del estándar de referencia que se obtenga de la USP en la solución amortiguadora B3 la cual está contenida por dos sustancias según se observa en la Tabla 7, diluyendo a la concentración especificada. Se debe almacenar a una temperatura de 2° - 8° C para obtener un tiempo de vida útil de 14 días. En

el día de la prueba se deben preparar a partir de la solución madre cinco diluciones sucesivas, que por lo general la USP recomienda de 1:1.25 usando la solución amortiguadora correspondiente a Gentamicina Sulfato y Neomicina Sulfato (B3).

A las soluciones muestras deben de asignarles una potencia que será la supuesta por unidad de peso o volumen, e igualmente en el día de la prueba se deben preparar a partir de la solución madre cinco diluciones sucesivas como se observa en las Tablas 8 y 9, a modo de obtener la concentración mediana de la Neomicina Sulfato (1.0 µg/mL) y Gentamicina Sulfato (0.1 µg/mL) que será sustancialmente similar a la concentración mediana del estándar de referencia de la USP.

Los inóculos se preparan suspendiendo el organismo (*S. epidermidis*) para obtener un cultivo (cultivo o slant) en 3mL de solución salina estéril, se pueden usar perlas vidrio para facilitar la suspensión, deben esparcirse los 3 mL en placas o en frascos Roux en el medio que indique la USP que en este caso corresponde el medio 11 el cual deber ser preparado como se indica en la Tabla 10 y esto se realiza con el fin de obtener un cultivo puro.

Incubar las placas de 32 a 35 °C por 24 horas o en caso se presentará un inconveniente hasta que el crecimiento de la cepa sea evidente. Se recomienda trasvasar el microorganismo de las placas Petri o frascos Roux a un frasco estéril que contenga 50 mL de solución salina, y por medio de una varilla de vidrio o perlas de vidrio estériles hacer el traspaso de los microorganismos a la solución salina. Pipetear y transferir la suspensión a un frasco de vidrio estéril y como resultado obtendremos la suspensión de recolección.

Diluir una cantidad apropiada de la suspensión de recolección de la solución salina, con ayuda de un espectrofotómetro de UV-visible medir el porcentaje de transmitancia a 580 nm. El valor deseado es aproximadamente del 25% de transmitancia a los 580 nm. Este valor se usa para estandarizar el volumen de

suspensión de recolección agregando a la capa de agar para la siembra respectiva.

Se debe comenzar agregando al agar los volúmenes que sugiere la USP que son 0.04 mL/100 mL estas determinarán la verificación del método ya que se agregarán a las placas y se espera que se logren zonas inhibitorias de aproximadamente 14-16 mm de diámetro esto para la medida de concentración estándar. Se hace una salvedad que si el rango del intervalo obtenido es de 11 a 19 mm estos no serán adecuados, si el porcentaje de la transmitancia que se le realizó con anterioridad es mayor a 25% se puede usar un cociente para normalizar la adición de microorganismos a la capa de siembra. Este factor que se utilice en la normalización se puede determinar dividiendo por 25 el porcentaje de transmitancia obtenido de la dilución, claro que se puede multiplicar este factor por la cantidad sugerida de inóculo para obtener el volumen en mL de suspensión que se requerirá para agregar a las cajas Petri. En última instancia ajustar diariamente el inóculo para obtener la relación concentración-respuesta óptima.

Como alternativa se puede determinar en la verificación del método la suspensión de recolección que se habrá de añadir al inóculo comenzando con el volumen sugerido que resulten en una demarcación satisfactoria de las zonas de inhibición (14 - 16 mm) esto para la mediana de la referencia estándar concedida por la USP, que produzcan una relación de concentración-respuesta reproducible. Preparar el inóculo agregando una porción de la suspensión madre a una cantidad de agar previamente fundido y a un rango de temperatura de 45° a 50°C. Agitando la mezcla con una rotación suave evitando la aparición de burbujas con el fin de obtener una mezcla homogénea.

Para el análisis preparar una capa base para el número requerido de placas petri para la valoración del método de potencia antibiótica, utilizando el medio 11 a un volumen en cada placa de 21 mL, dejando que se solidifique de forma que se obtenga una capa de base lisa con una profundidad uniforme. Preparar una cantidad adecuada de inóculo para la siembra (Neomicina 0.4 mL, Gentamicina 0.03 mL), realizando ajustes que sean necesarios apoyándose en

el análisis de ensayo preparatorio. Inclinar la placa hacia atrás y hacia adelante para esparcir el inóculo uniformemente sobre toda la superficie de la placa y dejar que esta sea absorbida.

Transcurrido lo anterior se colocan los seis cilindros ya sean de porcelana o de acero inoxidable sobre la superficie inoculada a una altura de 12mm, con ayuda de un instrumento de medición asegurar el espaciamiento uniforme con un radio de 2.8 cm y tapar las placas evitando así la contaminación de factores externos. Seguidamente llenar los cilindros en cada placa con las diluciones preparadas que contengan los 5 niveles de prueba (S1-S5 y U3). Los estándares son (S1-S5) y solo se evaluará un nivel de muestra (U3) el cual corresponde a S3 de la dilución estándar. Para la obtención de los valores que formarán la curva estándar se deben llenar los cilindros alternos en tres placas con la dilución correspondiente a la mediana de la dilución de prueba del estándar y cada uno de los nueve cilindros restantes con las otras cuatro diluciones de pruebas del estándar. Repetir el proceso para que las tres diluciones del estándar. Para la muestra llenar cilindros alternos en tres placas con la dilución correspondiente a la mediana de la dilución (S3) y llenar los nueve cilindros remanentes con la dilución de prueba correspondiente a la muestra (U3).

Incubar las placas de 36° a 37.5°C de 16 a 18 horas y retirar los cilindros, realizar la debida medición de los diámetros obtenidos y registrar las zonas de inhibición del crecimiento con una aproximación de 0.1 mm.

2. Método Turbidimétrico USP

En turbidimetría hay que tener en cuenta que utilizar el equipo en condiciones específicas afectan considerablemente el método por ello se sugiere controlar la circulación de aire o agua, la mayor capacidad térmica del agua representa una ventaja sobre el aire circulante.

La medición de absorbancia o transmitancia se da en una banda de frecuencia muy estrecha por lo cual es necesario contar con un espectrofotómetro adecuado para variar o restringir la longitud de onda usando filtros de 580 nm

o 530 nm, como alternativa se puede emplear un espectrofotómetro de onda variable y ajustar a una longitud de onda de 580 a 530 nm.

Se recomienda modificar para que acepte el tubo en el que se llevará a cabo la incubación, para que acepte una celda modificada equipada con drenaje que facilite el cambio rápido del contenido y para que contenga una celda de flujo para un análisis de flujo continuo. Todo esto se ajusta automáticamente en el equipo dejando a cero con un caldo no inoculado de aspecto transparente, preparado según las especificaciones de cada antibiótico, incluyendo la misma cantidad de dilución de pruebas que se encuentra en cada muestra. Durante la preparación de los inóculos se puede medir tanto la absorbancia como la transmitancia.

Los tubos de ensayo a utilizar pueden ser de vidrio o plástico de 16 x 125 mm o de 18 x 150 mm, aunque hay que tomar en cuenta que los tubos deben estar exentos de defectos como rayones superficiales, rajaduras u otros defectos externos que pudieran afectar la lectura, por lo contrario, limpiar cuidadosamente los tubos a utilizar eliminando residuos de antibióticos, así como restos de soluciones de limpieza. Esterilizar los tubos antes de usarlos.

Para preparar la solución madre, disolver una cantidad estándar de referencia USP de un antibiótico determinado o todo el contenido de un vial de estándar de referencia. Se disuelve en la solución amortiguadora B3 llegando a la concentración de 1.0 µg/mL. Almacenar entre 2 - 8°C y usar dentro del periodo de 7 días. En el día de la valoración preparar partiendo de la solución madre cinco o más diluciones de prueba, con aumento de concentración entre las diluciones sucesivas con una proporción de 1:1.25. Pueda que se requiera soluciones sucesivas más cercanas con la solución madre para la valoración turbidimétrica, usar un diluyente final especificado de manera tal que la mediana de los niveles del estándar de referencia USP que es representado por S3 tenga una concentración de 1.0 µg/mL como se mencionó con anterioridad.

Asignar una potencia supuesta por unidad de peso o de volumen a la muestra que se desee hallar la concentración y en el día de la valoración preparar la solución madre de la misma manera en la que se preparó el estándar de referencia que indica la USP. Diluir la solución madre de la muestra en el diluyente final que es especificado en la USP que sería B3 especificando a una concentración nominal igual al estándar (1.0 µg/mL) que se denominará U3.

Los inóculos llevan una preparación en la cual se suspende el microorganismo que se utilizará para la prueba, obtenido de un cultivo o cultivo inclinado (slant) reciente en 3 mL de solución salina estéril. Al igual que la técnica cilindro-placa se pueden usar perlas de vidrio para la suspensión, se esparce en la placa de agar la suspensión salina sobre dos o más placas de agar o en la superficie de un frasco Roux que contenga 250 mL del medio 11, incubar durante 16 a 18°C o hasta el crecimiento sea evidente el crecimiento.

Después de incubar, recolectar el organismo de las placas o frascos Roux con 50 mL de solución salina y con ayuda de una varilla de vidrio o perlas estériles suspenderse. Pipetear y transferir la suspensión a un frasco de vidrio estéril por lo que se obtiene la suspensión de recolección. Determinar durante la verificación del método la cantidad de suspensión de recolección que se usará como el inóculo, comenzando con el volumen sugerido (2 mL/100 mL), así mismo preparar una S3 extra como prueba de crecimiento. Incubar las pruebas de ensayo durante el tiempo establecido (16 - 24 hrs), ajustar la cantidad de inóculo a diario, si fuera necesario para obtener la relación de concentración-respuesta óptima a partir del organismo de prueba en los tubos que se usarán para la valoración.

Una vez completados los periodos de incubación los tubos que tienen la concentración mediana del estándar de referencia de la USP deben presentar los valores de absorbancia indicados por la USP que en este caso para la Neomicina Sulfato y Gentamicina Sulfato serían 0.3. Determinar la duración exacta de incubación de los tubos, observando el crecimiento en la concentración de referencia del estándar de referencia de la USP (S3).

En el día de la prueba preparar la concentración a utilizar del antibiótico, diluyendo soluciones madres del estándar y de cada muestra, preparando cinco niveles cada uno por triplicado tanto del estándar (S1-S5) y solo un nivel de prueba (S3) que este último igualmente irá en triplicado (hasta 20 muestras de S3).

Colocar en gradillas los tubos de ensayo, incluyendo en cada gradilla de 1 a 2 tubos de control que deben contener 1 mL de diluyente que el correspondiente en este caso es la solución amortiguadora B3; el diluyente no debe contener el antibiótico. Agregar los volúmenes de las diluciones tanto del estándar como los de muestra (1 mL por cada dilución), distribuyendo aleatoriamente un set completo, incluyendo los controles y colocar la gradilla completada inmediatamente en un baño de maría o en la incubadora de 36° a 37.5°C durante 4 - 5 horas.

Después de incubar, inhibir inmediatamente el crecimiento del organismo, agregando 0.5 mL de formaldehído diluido en cada tubo.

3. Cálculos

La USP indica los cálculos a realizar para encontrar la concentración de la muestra, esta es la potencia antibiótica la cual se calcula por la interpolación de una recta estándar o patrón obtenida por la conversión logarítmica y ajustada por cuadrados mínimos. Aunque se nos hace considerar conceptos al momento de interpretar los resultados a obtener de la prueba de potencia antibiótica.

Hay que tomar en cuenta que las relaciones biológicas no son lineales en cuanto a concentración - respuesta, por lo que se debe ajustar los datos a una línea recta, evaluando un intervalo de concentración estrecho en el cual puedan alinearse los resultados, estos se considerarán válidos si la potencia calculada es 80 - 150% de la potencia asumida al preparar la solución madre. En caso la potencia calculada está fuera del rango establecido se debe ajustar

la potencia asumida de la muestra según corresponda y repetir la valoración para obtener un resultado válido.

Se sugiere que el medio más efectivo para reducir la variabilidad del valor uniforme sería la media geométrica de la potencia del antibiótico de todos los ensayos y duplicados, que son los ensayos independientes del procedimiento de valoración. El resultado combinado de una serie de valoraciones independientes más pequeñas realizadas a lo largo de varios días es una estimación de potencia más confiable que la obtenida de una sola valoración grande con el mismo número de placas o tubos. Se requieren tres o más valoraciones independientes para encontrar la potencia antibiótica.

El número de valoraciones requeridas para obtener una estimación confiable en cuanto a la potencia antibiótica depende del intervalo de especificación que corresponda, así como de la variabilidad de la valoración. El cálculo del límite de confianza que se describe a continuación se establece a partir de varios logaritmos de las potencias que son aproximadamente iguales en precisión. Si el valor calculado para la amplitud del intervalo de confianza W , fuese muy amplio no sería posible determinar un valor con respecto a si la potencia antibiótica cumple con el porcentaje establecido.

El laboratorio debe determinar desde un inicio sus procedimientos estándar con un valor máximo aceptable para la amplitud del intervalo de confianza. El límite máximo se debe delimitar durante el desarrollo y confirmarse durante la validación o verificación. Si llegara el límite a exceder se debe llevar a cabo determinaciones de potencia independientes con el fin de cumplir con el requisito del límite.

4. Valoración cilindro-placa

En las tablas 11 y 12 se presentan los datos que se recolectaron a lo largo del ensayo. Se muestra cada una de las 12 placas donde las zonas 1, 3 y 5 corresponden a la concentración de referencia y las restantes son para una de las 4 concentraciones según se indique.

Paso 1: realizar cálculos iniciales y realizar la verificación de aptitud de variabilidad. Para cada 3 placas promediar los 9 valores de referencia y promediar los 9 valores estándar como se observa en la Tabla 11. Para cada conjunto de 3 placas, determinar la desviación estándar de los 9 valores de referencia y de la desviación estándar de los 9 estándar. Para cada desviación estándar, determinar la desviación estándar relativa correspondiente.

Para el criterio de aptitud de variabilidad, se debe determinar un valor máximo esto debe hacerlo cada laboratorio para la desviación estándar relativa. Si alguna de las 8 desviaciones estándar relativas teniendo en consideración que son 4 para la referencia y 4 para el estándar, llegan a sobrepasar el máximo determinado, los datos de la valoración no podrán ser adecuados y deben desecharse (límite sugerido para la desviación relativa es no más de 10%).

Paso 2: Realizar una corrección de variación entre placas. Esta debe aplicarse para convertir la medición de zona promedio obtenida para cada concentración al valor que se obtendría si la medición de la concentración de referencia promedio para dicho conjunto de tres placas repetidas fuera la misma que el valor del punto de corrección.

Paso 3: Determinar la línea curva estándar. Se debe generar la línea de la curva estándar, graficando las mediciones de la curva, hay que determinar la regresión lineal no ponderada con los valores de dos formas usando un software especializado o con cálculos manuales que se indican a continuación. En el laboratorio debe determinarse un valor mínimo del coeficiente de determinación ($\%R^2$) para una regresión aceptable. La regresión es aceptable sólo si el $\%R^2$ obtenido excede el valor determinado (no siendo menos del 95%).

5. Regresión lineal

Tiene como objetivo poder explicar la relación que existe entre variables, una dependiente y la otra independiente, o dicho de otra manera explicar la relación entre la variable "Y" y una variable explicativa como "X". (Carrollo Limeres, 2011- 2012)

Según el capítulo 18 del libro de estadística JMMarín indica que la regresión lineal es una técnica utilizada en la rama de la estadística utilizada para estudiar la relación existente entre variables adaptándose a varias situaciones como una investigación social, un análisis para predecir varios fenómenos (socioeconómicos hasta comportamiento humano). Comúnmente se ha utilizado para indagar en mercados prediciendo cuál será el número de ventas de un determinado producto, en física es utilizado para relacionar variables o para calibrar medidas; siendo dos variables es una regresión simple o en el caso de más de dos variables es una regresión múltiple. (JMMarín, 2010)

En este modelo de regresión lineal se trata de explicar la relación que puede existir entre la variable dependiente y la independiente (variable respuesta y la variable explicativa).

Teniendo como base que alfa es la ordenada en el origen que pasa cuando "X" es igual a cero y el valor de "Y" toma un número diferente de cero, beta es la pendiente de la recta teniendo como función indicar cómo cambia "Y" al incrementar "X" y la "e" pues es una variable que determina una magnitud (error) la cual influyen en "X" y "Y". (Carrollo Limeres, 2011- 2012)

6. Intervalo de confianza

Es una técnica que es utilizada para determinar inferencia estadística permitiendo calcular dos valores alrededor de una media muestral que será un límite superior y un límite inferior. Estos valores se anotarán en un rango con el cual se podrá determinar una probabilidad en un parámetro poblacional. El intervalo de confianza es = media \pm de error (Marco Sanjuan, 2017).

R^2 o Coeficiente de determinación, o de correlación de cuadrado ajustado

Es una herramienta de la estadística con la cual se predicen futuros resultados en modelos estadísticos como en una regresión. El R^2 es el indicador que nos permitirá conocer cómo de bien se pueden predecir los resultados.

El R^2 ajustado es el porcentaje de variación en variables de respuesta que es explicado por su relación con una o más variables predictoras, ajustado para el número de predictores en el modelo. En contexto, a medida que incluyamos más variables en el modelo, el R^2 aumentará por lo que puede hacernos pensar que el modelo es mejor porque incluye más variables.

Para comprobar si es cierto que nuestro modelo es mejor por la inclusión de nuevas variables debemos analizar el R^2 ajustado. (Blog estadístico, 2016)

7. Descripción de microorganismos

9.1 Estafilococo

Son células esféricas grampositivo, que poseen una formación en racimos irregulares similares a gradientes (racimo de uva). Desarrollándose rápidamente en muchos medios como la facilidad de actividad metabólica fermentando carbohidratos, producen coloraciones desde blanco hasta un intenso color amarillo. Siendo algunos partes de la microbiota normal de mucosas o de la misma piel; teniendo en este género más de cuarenta y cuatro especies siendo de mayor importancia debido a la frecuencia de apareamiento *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus*. De 20 a 50% de los seres humanos son portadores nasales de *S. aureus*. Los estafilococos también se encuentran regularmente en la ropa, ropa de cama y otros fómites en ambientes humanos. (McGraw Hill,2020)

9.2 *Staphylococcus epidermidis*

Por datos estadísticos se calcula que cerca del 75% de las infecciones causadas por estafilococos con coagulasa negativa son provocadas por *S. epidermidis*; siendo este parte de la microbiota normal tanto en la piel humana, sistema respiratorio o gastrointestinal. Estos no forman esporas, no poseen movilidad, bajo el efecto de penicilina los estafilococos llegan a sufrir lisis siendo este el proceso de ruptura de la membrana celular provocado por lisinas, degradando los fosfolípidos de la membrana, quedando este expuesto al espacio extracelular.

Crece en varios medios bacteriológicos en condiciones aerobias o microaerófilas a 37 °C, pero forma pigmento mejor a una temperatura ambiente (20 – 25 °C). Las colonias en medios sólidos son redondas, lisas, levantadas y brillantes. (McGraw Hill, 2020)

CAPÍTULO III

MÉTODO PROPUESTO DE POTENCIA ANTIBIÓTICA EN DISCO-PLACA PARA NEOMICINA SULFATO Y GENTAMICINA SULFATO

El propósito del método es determinar la capacidad antimicrobiana de un antibiótico inhibiendo el crecimiento de una bacteria en específico. Teniendo como alcance determinar la efectividad de un antibiótico como principio activo en un semisólido. El método está planteado en cinco etapas: la preparación inicial, preparación del estándar, preparación de la muestra, preparación del inóculo y por último la siembra como tal.

1. Preparación inicial

Compuesta de la preparación de la solución amortiguadora la cual consiste en agregar a un frasco de vidrio con tapa 1000 mL de agua desmineralizada con el fin de no alterar la carga iónica de la solución, 16.73 gramos de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) así como 0.523 gramos de fosfato monobásico de potasio (K_2HPO_4) logrando un pH de 8.0 ± 0.1 como se establece en la USP 40 (81). Siendo el caso que no cumpliera con el pH establecido se ajustará agregando KH_2PO_4 . Al llegar al pH establecido autoclavear. Otra preparación es solución salina que consiste en agregarle a 1000 mL de agua desmineralizada 8.5 gramos de cloruro de sodio llegando a un pH de 7.0 ± 0.1 esto para diluir las colonias de *S. epidermidis*. La solución salina es utilizada como diluyente isotónico con el fin de disolver las bacterias proporcionando una concentración adecuada en este caso 0.5 en la escala de McFarland conservando su integridad y viabilidad.

2. Preparación del estándar: consiste en realizar una solución madre disolviendo 10 mg del estándar de referencia USP en 25 mL de buffer B3 preparado con anterioridad para Neomicina Sulfato y disolviendo 4 mg en 50 mL para Gentamicina Sulfato. El estándar utilizado en este procedimiento es Merck con el producto Neomicina Sulfato y Gentamicina Sulfato de la marca Sigma-Aldrich Inc de Estados Unidos con certificado de análisis según el lote correspondiente de producción cumpliendo con la normativa ISO 17025 siendo esta una norma orientada a la evaluación de la conformidad en la cual se

describe los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, cumpliendo de la mano los requerimientos de ISO 9000.

El certificado de análisis como se observa en la figura 1 contiene datos de referencia como: Certificado de pureza del producto, acreditaciones, trazabilidad del método de prueba, así como gráficos de la prueba in vitro ante las cepas ATCC y las gráficas de análisis infrarrojo por espectrofotometría. Por lo que lo convierte en un estándar confiable para el sostenimiento del método, así como su validación.

La concentración obtenida de la solución madre para la Neomicina Sulfato es el equivalente a 0.04 mg/mL y para Gentamicina Sulfato es el equivalente a 0.08 mg/mL con una vida útil de 30 días, teniendo como objetivo la realización de puntos arriba y abajo para la linealidad de la gráfica; calculadas las diluciones sucesivas de 1:1.25 tomando como base los datos registrados en las tablas 11 y 12.

3. Preparación de la muestra

Pesar el equivalente al estándar del principio activo presente en la crema esto de la media para la comparación cuantitativa. Este paso debe realizarse en un balón de aforo, matraz o bien conocido como fiola esto debido a que nos indica un volumen con gran exactitud y precisión. Agregar 3 mL de polisorbato 80 ya que este es una clase de emulsionante el cual tiene la capacidad de mezclar dos compuestos que son poco miscibles y es mencionado en el tratamiento de muestras oleosas según la USP Referencia. La explicación es que el polisorbato 80 tiene la capacidad de influir en la tensión superficial de ambas fases, la soluble en agua y la insoluble; puesto que poseen en su estructura molecular una cola hidrófoba y la cabeza hidrófila que al contacto con las moléculas de una mezcla la parte hidrofóbica sobresale del nivel del agua mientras que la hidrofílica queda en el fondo; al añadir un emulsificante este ayuda a ser miscible la mezcla obteniendo las llamadas micelas con un aspecto turbio debido a que las fases dispersan la luz a medida que pasa a través de la emulsión por lo cual se hace visible cuando se torna en un tono blanquecino;

logrando homogeneización por la entrada de energía mecánica por agitación o exposición ultrasónica. Con el tiempo las emulsiones tienden a volver al estado inicial ya que recuperan su forma estable. (Colina L, 2011)

Al instante agregar 10 mL de buffer para tener un espacio considerable para ejercer una fuerza mecánica eso para lograr una emulsión, después sonicar por 15 minutos, aforar el balón con buffer.

4. Preparación del inóculo

McFarland es una escala de turbidez la cual es utilizada como patrones de turbidez en la preparación de diluciones con suspensión de microorganismos; en especial el patrón 0.5 McFarland que se aplica en pruebas de susceptibilidad microbiana en la preparación de inóculos bacterianos específicos.

Origen de la escala McFarland

Uno de los primeros usos documentados de la turbidez para la determinación de poblaciones bacterianas en un volumen fue en la preparación de vacunas. En 1907 Both McFarland introdujo el primer estándar de turbidez para uso en bacteriología, utilizando una suspensión que contenía una mezcla de sulfato de bario preparado con una mezcla de ácido sulfúrico; calculando el número de bacterias según lo determinado en los recuentos de placa. Esta mezcla de químicos genera precipitación para formar una solución de turbidez reproducible. El patrón 0.5 de McFarland corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de *E. coli* de 1.5×10^8 células $\times mL^3$.

La realización de pruebas de sensibilidad requiere la hidratación y el uso de inóculos estándar según la Figura 2, agar estándar con concentraciones estándar como lo es McFarland esto para pruebas de difusión en disco para microorganismos anaerobios. Especificando la efectividad de un antibiótico bacteriano o bien pruebas de susceptibilidad. (Becton, Dickinson y Compañía, 2005).

Como la medición de carga bacteriana en la escala de McFarland es visual se llegó a un acuerdo de cuantificar la presencia de la bacteria por medio de espectrofotometría UV; por lo que se debe hacer un barrido de la muestra y verificar a los 573 nm teniendo un promedio de 0.204 (± 0.002) nm.

Los procesos que se realizan son medidas directas a determinada sustancia o especie que llega a absorber radiación, o procesos como la cromatografía y electroforesis. La evolución de estos procedimientos basados en comparaciones visuales y fotómetros que se emplean desde filtros para la selección de longitudes de onda hasta el equipo más reciente los cuales permiten tener en intervalos cortos de tiempo gráficas en computadoras para su impresión ha sido significativa, aunque el principio sigue siendo el mismo basándose en la ley de Lambert Beer (P. Rocha & G. Teixeira, 2004).

La ley de Lambert Beer fue descubierta de formas diferentes e independientes en primer lugar por el matemático y astrónomo francés Pierre Bouguer en 1729, luego por el filósofo y matemático alemán Johann Heinrich Lambert en 1760 y por último por el físico y matemático alemán August Beer en 1852; completando así el nombre de la ley descubierta Ley de Lambert Beer Bouguer. La ley basa sus principios en un método matemático usado para expresar el modo de absorción de la luz, en la ley Beer afirma que la totalidad de la luz que emana una muestra puede disminuir debido a tres condiciones, siendo estas:

- El número de materiales de absorción en su trayectoria llamada concentración.
- Las distancias en que la luz atraviesa la muestra, denominado trayecto óptico.
- Las probabilidades que existen es que el fotón de esa amplitud particular pueda absorberse por el material, conocido como coeficiente de extinción. (Universidad Veracruzana, 2014)

La ley se expresa como: **$A = Ecd$**

Donde **A** es la absorbancia, **E** es el coeficiente molar de extinción, **d** es el recorrido en centímetros y **c** que es la concentración molar. A medida que la luz atraviesa un medio que la absorbe la cantidad de luz absorbida en cualquier volumen corresponde a la intensidad de luz que incide, este se multiplicará por el coeficiente de la absorción. Provocando frecuentemente un haz de luz que repercute significativamente a medida que atraviesa el medio absorbente creando una relación.

Donde $T = 10^{-Ecd}$

T es de transmitancia, **E** es el coeficiente molar de extinción, **d** es el recorrido en centímetros y **c** que es la concentración molar, esto se refiere a una relación de luz final de la muestra dividido la luz inicial de la muestra teniendo esta relación se crea el concepto de transmitancia. Al trazar la relación esta no sería lineal, aunque con el logaritmo base 10 la transmitancia sería lineal con la concentración. Logrando una unificación $A = -\log_{10}(I/I^{\circ})$ como lo muestran las figuras 3 y 4.

El principio de un equipo monocromador como el utilizado, selecciona fotones procedentes de una fuente (estándar) de manera que en la muestra se determinen los fotones de una determinada longitud de onda siendo estas en realidad un intervalo de longitudes de onda muy estrecha. Esto es generado por un sistema de espejos que permite que la radiación de la longitud de onda pase al mismo tiempo por un blanco (siendo este el disolvente) y por la muestra que es disolvente más la cantidad de cepa comparado visualmente con McFarland siendo detectados medirán las potencias de la radiación que sale del blanco **P°** y de la muestra **P** que al fraccionarlo el cociente **P/P°** es la potencia transmitida por la muestra a lo que se conoce como Transmitancia (**T**).

La transmitancia es la cantidad de energía que atraviesa la muestra en un rango de tiempo. Esta se puede explicar cómo si es igual a 1 es que no absorbe nada de radiación y 0 si la absorbió toda. De la transmitancia se deriva la absorbancia que es definida como el logaritmo negativo de la transmitancia, la

utilidad de la absorbancia radica en la proporción que absorbe de radiación basada en la ley de Beer. De la expresión anterior se relaciona la longitud del camino óptico (la turbidez de la muestra), la concentración de la muestra y el coeficiente de absorción molar.

Como se puede observar en la figura 5 y 6 el Evolution 60s es el equipo que cuantificó la absorbancia de la solución salina en la que se diluyó una concentración parecida a la McFarland que por medio de lámpara de xenón poseyendo una alta densidad obteniendo un doble haz ultravioleta ofrece un resultado más verídico.

5. Procedimiento de siembra

- Verter en 250 mL de agar antibiótico 11 los 10 mL de solución salina con la concentración de *S. epidermidis*, esto a una temperatura de $35 (\pm 2.0)$ °C para no tener pérdida de los microorganismos. Llenar con 20 mL aproximadamente en cada caja petri, esperar a que se solidifiquen.
- Colocar los discos como se muestra en la Figura 7 y 8 dejando 2.8 cm de diámetro para evitar halos equívocos; dispensar 20 μ L de las diluciones en cada disco (20 μ L capacidad óptima). Dispensar en cada caja las diluciones según se indica en la Tabla 8 y 9 para Neomicina y Gentamicina respectivamente.
- Incubar a $34 (\pm 2.0)$ °C, pasadas 48 hrs proceder a medir los halos e incluirlos en las tablas electrónicas para la cuantificación de la concentración teórica.

6. Validación del método

Es una serie de cálculos estadísticos que verifican el método propuesto por medio de parámetros de desempeño con el cual se produce un dictamen de cumplimiento o incumplimiento de las especificaciones.

6.1 Descripción de parámetros de validación

a. Especificidad

Se define la especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede hacerse agregando al fármaco o producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o impurezas en concentraciones adecuadas, y demostrando que el resultado del análisis no resulta afectado por la presencia de materiales extraños.

b. Linealidad

Dentro de este término se incluye la proporcionalidad entre concentraciones de analito y respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones del analito, para los cuales el método es satisfactorio. Linealidad es la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado.

c. Precisión (repetibilidad)

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente en una muestra.

La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. La reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios.

d. Exactitud

Manifiesta la cercanía entre el valor que es aceptado comúnmente como valor verdadero, valor nominal, teórico o un valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente. Capacidad del método analítico para suministrar resultados lo más cercanos posibles al valor teórico o nominal. En microbiología se define como el porcentaje de recuperación frente al valor del inóculo.

e. Rango

Es una expresión de los valores mínimos y máximos de analito que han demostrado ser determinados en el producto. El rango especificado es normalmente derivado de estudios de linealidad.

6.2 Evaluación y cálculos estadísticos

a. Especificidad

Procedimiento

Se evaluó la matriz de excipientes, con el agregado de Clostebol Acetato, la cual no contiene el ingrediente activo evaluado, Neomicina sulfato. Se preparó la muestra en forma individual y se evaluó por sextuplicado.

Se evaluó la matriz de excipientes, con el agregado de betametasona base y clotrimazol, la cual no contiene el ingrediente activo evaluado, gentamicina base (equivalente a 1.2054 mg de gentamicina sulfato). Se preparó la muestra en forma individual y se evaluó por sextuplicado.

Criterio de aceptación

En los resultados entre la matriz de excipientes y el estándar, no debe haber una interferencia mayor del 1 % para ambos antibióticos.

b. Linealidad del sistema

Procedimiento

Se preparan 5 concentraciones de placebo enriquecido con estándar, aproximadamente siendo estas para neomicina: 7.50, 8.75, 11.25 y 12.5 U/mL, y para gentamicina 2.56, 3.20, 4.00, 5.20 y 6.25 µg/mL, las cuales se analizan mediante el método a validar. El análisis se realizó bajo las mismas condiciones de operación y el por el mismo analista.

Cálculos estadísticos

Se determinó la ecuación de la regresión lineal ($Y = a + bx$), la cual fue calculada por el método de mínimos cuadrados basado en las lecturas (y) versus concentración (x). La evaluación fue realizada con $p = 0.05$.

Criterios de aceptación

El valor del coeficiente de determinación (R^2) mayor o igual a 0.980 para ambos antibióticos.

c. Precisión

Procedimiento

Se preparan 5 concentraciones de placebo enriquecido con estándar, aproximadamente; siendo estas para neomicina: 7.50, 8.75, 11.25 y 12.5 U/mL, para gentamicina 2.56, 3.20, 4.00, 5.20 y 6.25 µg/mL, las cuales se analizan mediante el método a validar. El análisis se realizó bajo las mismas condiciones de operación y el por el mismo analista.

Cálculos estadísticos

Se calcula el coeficiente de variación promedio (%CV).

Criterio de aceptación

El coeficiente de variación promedio (%CV) no debe ser mayor al 5.0% para Neomicina y 10% para Gentamicina.

d. Exactitud

Se establecen 3 diferentes concentraciones del placebo enriquecido y se realiza el cálculo del porcentaje de recuperación, dividiendo la concentración obtenida experimentalmente entre el valor teórico esperado. Este resultado se multiplica por 100 y se expresa como un porcentaje.

Criterio de aceptación

Teniendo en cuenta un 5% de error, el porcentaje de recuperación debe estar entre 95 a 105%.

e. Rango

El rango se establece si los otros indicadores se aceptan según la prueba correspondiente.

Criterio de aceptación

Aceptación de todos los parámetros incluidos en la validación.

6.3 Resultados

Resumen de los resultados obtenidos en los parámetros de desempeño (Tablas, gráficos y cromatogramas)

Tabla 1 Resultados de especificidad

No.	Halos placebo (mm)	Halos estándar Neomicina (mm)	Halos estándar Gentamicina (mm)	Interferencia %
1	0.00	17.3	18.5	0.00
2	0.00	17.4	18.6	0.00
3	0.00	17.4	18.6	0.00
4	0.00	17.4	18.4	0.00
5	0.00	17.3	18.5	0.00
6	0.00	17.5	18.6	0.00
Promedio	0.00	17.4	18.5	0.00

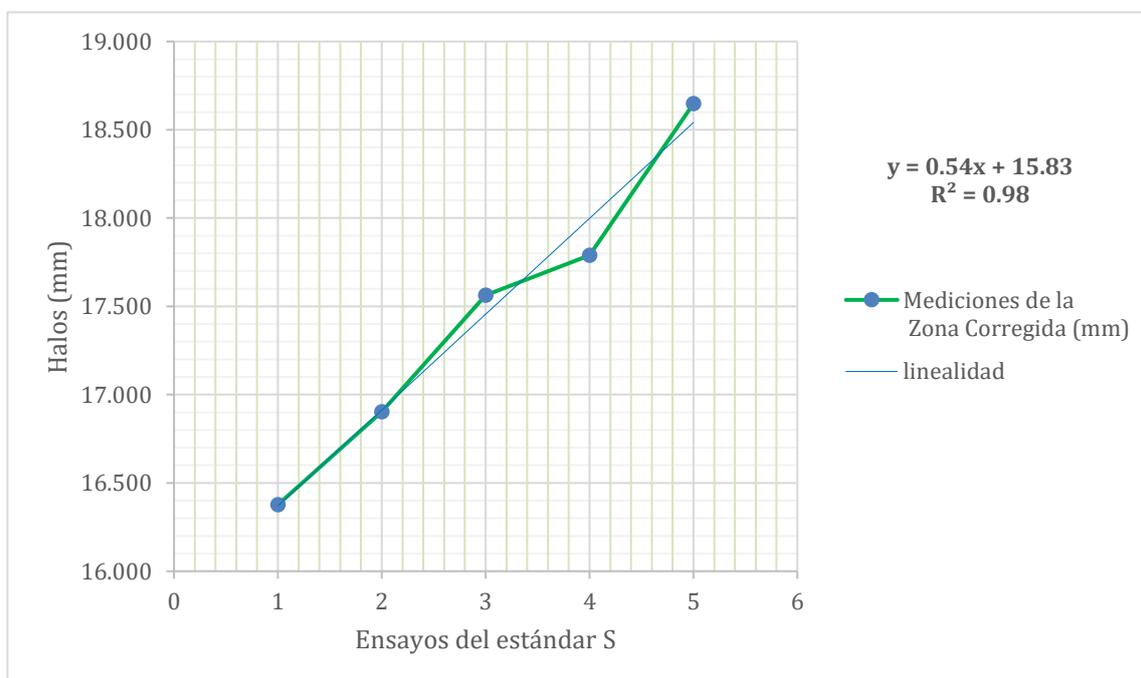
Tabla 2. Resultados de linealidad

Neomicina			
No.	Conjunto de estándares	de Concentración U/mL	Mediciones de la zona corregida (mm)
1	S1	7.50	16.4
2	S2	8.75	16.9
3	S3	10.0	17.6
4	S4	11.25	17.8
5	S5	12.50	18.6

Continuación de la Tabla 2. Resultados de linealidad

Gentamicina			
No.	Conjunto estándares de	Concentración U/mL	Mediciones de la zona corregida (mm)
1	S1	0.016	16.7
2	S2	0.028	17.1
3	S3	0.040	18.7
4	S4	0.052	19.4
5	S5	0.064	21.1

Gráfica 1. Resultados de linealidad para Neomicina



Gráfica 2. Resultados de linealidad para Gentamicina

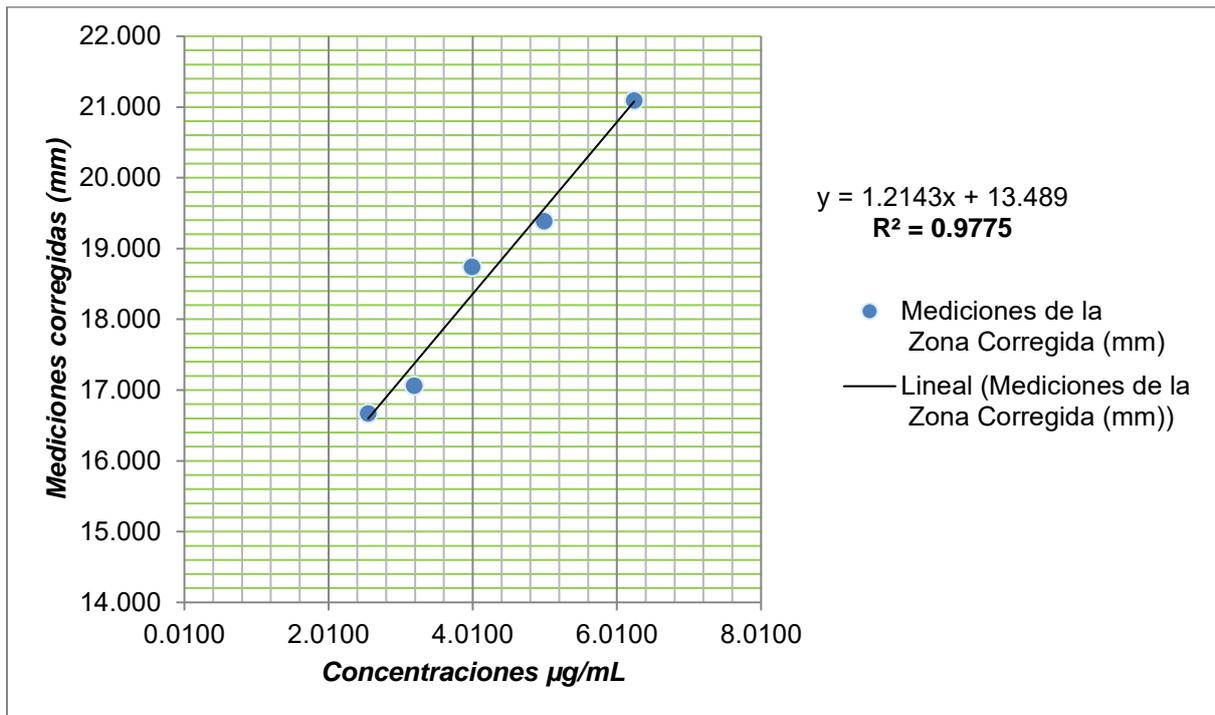


Tabla 3. Resultados de precisión

Neomicina			
Estándar	Halo promedio (mm)	SD	CV %
S1	17.4	0.199	1.1
S2	17.9	0.778	4.4
S3	17.6	0.331	1.9
S4	17.5	0.284	1.6
S5	17.5	0.344	2

Continuación de la Tabla 3. Resultados de precisión

Gentamicina			
Estándar	Halo promedio (mm)	SD	CV %
S1	16.7	0.16	1.0
S2	17.6	0.17	1.0
S3	18.7	0.48	2.6
S4	19.4	0.09	0.5
S5	21.1	0.08	0.4

Tabla 4 Resultados de exactitud

Neomicina			
Estándar	Concentración T U/mL	Concentración Exp U/mL	Recuperación (%)
S1	7.5	7.8	104.0
S3	11.25	10.7	94.7
S5	12.5	13.1	105.0
	Promedio		102.13

Gentamicina			
Estándar	Concentración T U/mL	Concentración Exp U/mL	Recuperación (%)
S1	2.6	7.8	103.8
S3	4.0	10.7	102.5
S5	6.3	13.1	104.9
	Promedio		103.7

Tabla 5. Resultados de la validación

Neomicina			
Parámetro evaluado	Criterio de aceptación	Resultados obtenidos	Dictamen
Especificidad	Interferencia menor al 1%	0.00%	Aceptable
Linealidad	Coefficiente de correlación (R^2) \geq 0.980	0.98	Aceptable
Precisión (repetibilidad)	El coeficiente de variación (%CV) no debe ser mayor al 5.0%.	2.2%	Aceptable
Exactitud	Debe encontrarse entre 95 – 105 %	100.06%	Aceptable
Rango	Deben cumplir todos los parámetros	Los parámetros cumplen 7.5 – 12.5 U/mL	Aceptable

Gentamicina			
Parámetro evaluado	Criterio de aceptación	Resultados obtenidos	Dictamen
Especificidad	Interferencia menor al 1%	0.00%	Aceptable
Linealidad	Coefficiente de correlación (R^2) \geq 0.980	0.978	Aceptable
Precisión (repetibilidad)	El coeficiente de variación (%CV) no debe ser mayor al 5.0%.	2.2%	Aceptable
Exactitud	Debe encontrarse entre 95 – 105 %	100.06%	Aceptable
Rango	Deben cumplir todos los parámetros	Los parámetros cumplen 0.016 - 0.064 U/mL	Aceptable

DISCUSIÓN

Se decide utilizar el método de disco-placa para evaluar la potencia antibiótica de Neomicina sulfato y Gentamicina sulfato en productos semisólidos ya que es un método que nos permitió cuantificar y evaluar la acción del antibiótico frente a microorganismos *S. epidermidis* creando halos de inhibición para convertirlos en cifras cuantificables utilizando las siguientes concentraciones para neomicina: 7.50, 8.75, 11.25 y 12.5 U/mL, y para gentamicina: 2.56, 3.20, 4.00, 5.20 y 6.25 µg/mL y así poder cumplir con los parámetros para dar validez al método de disco-placa.

Los parámetros de desempeño fueron satisfactorios teniendo la especificidad sin interferencias dado que se experimentó el método con un placebo obteniendo mediciones sin inhibición en comparación con las inhibiciones obtenidas con el estándar tanto de gentamicina sulfato como neomicina sulfato. La linealidad obtenida en los resultados de cada antibiótico fue de $R^2 = 0.980$ para neomicina y $R^2 = 0.977$ para gentamicina cumpliendo con el criterio de aceptación que nos indica debe ser un coeficiente de correlación (R^2) ≥ 0.980 ; los valores obtenidos se consideran lineales puesto que el R^2 dio como resultado 98% en el caso de neomicina sulfato; por lo que se considera el método con capacidad de replicación, al igual que gentamicina sulfato con un R^2 del 97% que por ambos casos al graficarlos se visualizó el trazo de la linealidad. Se considera precisión al grado de concordancia entre resultados; siendo una medida de repetibilidad las condiciones en las que se trabajó tanto los placebos como las muestras fueron similares, realizadas por el mismo analista con repetición de tres veces de las cuales se calculó la desviación estándar, así como el coeficiente de variación obtenido que fue de 2.2% para ambos antibióticos cumpliendo con lo establecido siendo menor de 5%. La exactitud cumple los parámetros puesto que los índices de recuperación de los distintos antibióticos analizados fueron de 100.06% quedando dentro del rango establecido de 95 – 105 %. Al cumplir los parámetros anteriores se demuestra la validez del método disco-placa para el análisis cuantificable de antibióticos en productos semisólidos, en este caso gentamicina sulfato y neomicina sulfato demostrando el cumplimiento de la hipótesis verdadera planteada al inicio de la investigación. El método disco-placa tiene ventaja sobre otros métodos por la facilidad en cuanto la metodología debido a que es como realizar una

siembra, aparte que la acción del antibiótico a evaluarse frente a un microorganismo es in vivo, aunque posee una gran desventaja a la vez al tratarse in vivo es la variabilidad en la cuantificación debido al comportamiento inexacto de un microorganismo vivo; pudiendo afectar el crecimiento por factores externos como ambiente, forma de hidratar, temperatura, cantidad de agar, etc.

CONCLUSIONES

- Los métodos disco-placa implementados para la cuantificación de la potencia antibiótica tanto para gentamicina sulfato como para neomicina sulfato en su forma farmacéutica de semisólido cumplen con los distintos criterios de aceptación para considerarlo validado, logrando la implementación de un método para la cuantificación de antibióticos presentes en cremas tópicas fabricadas en la farmacéutica.
- Se determinó que las distintas concentraciones de los antibióticos contenidos en una crema tópica se cuantifican por la medición de halos de inhibición obteniendo un porcentaje de recuperación entre 95 a 105% del antibiótico contenido en las preparaciones tópicas; logrando así mismo la aceptación en los parámetros de desempeño evaluados para la validación del método.
- El sistema analítico para la cuantificación de potencia antibiótica de Neomicina UESulfato en Clostebol Acetato + Neomicina Sulfato 0.5 % crema tópica; cumple con los criterios de aceptación para considerarlo como validado.
- El sistema analítico para la cuantificación de potencia antibiótica de Gentamicina Sulfato, Clostebol acetato y Clotrimazol crema tópica; cumple con los criterios de aceptación para considerarlo como validado.

RECOMENDACIÓN

Se recomienda que al momento de hacer la preparación de muestras se intente obtener una solución lo más homogénea posible al momento de agregar el polisorbato debido a que la matriz del producto es difícil de disolver y de no obtener una solución homogénea sería un interferente al momento de servir en los discos; provocando el taponamiento de los tips o bien dando falsos resultados. Al igual se recomienda indagar sobre emulsificadores dado que se podría mejorar esa parte de la preparación.

BIBLIOGRAFÍA

- United States Pharmacopeial Convention . (2017). *Pruebas y valoraciones biológicas*. United States Pharmacopeia.
- 10, S. (2008). *Guía para el análisis*. Recuperado el 24 de abril de 2021, de <http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/jmmarin/esp/GuiaSPSS/verguia.pdf>
- Acuña L., D. G. (enero de 2002). *Descubrimiento de la Penicilina*. Recuperado el 21 de abril de 2021, de http://www.clc.cl/clcprod/media/contenidos/pdf/MED_13_4/DescubrimientoPenicilina.pdf
- Becton, Dickinson y Compañía. (febrero de 2005). *Patrón de Turbidez BBL preparado*. Recuperado el 15 de diciembre de 2021, de [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)_es.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf)
- Blog estadístico. (5 de septiembre de 2016). *R cuadrado o coeficiente de determinación o de correlación múltiple y R cuadrado ajustado*. Recuperado el 20 de abril de 2021, de <http://elestadistico.blogspot.com/2016/09/r-cuadrado-o-coeficiente-de.html>
- Carrollo Limeres, C. (2011- 2012). *Regresión Lineal Simple*. Recuperado el 21 de abril de 2021, de USC departamento de estadística e investigación operativa: http://eio.usc.es/eipc1/BASE/BASEMASTER/FORMULARIOS-PHP-DPTO/MATERIALES/Mat_50140116_Regr_%20simple_2011_12.pdf
- Case Western Reserve University. (2000). *Encyclopedia of Cleveland History*. Recuperado el 18 de abril de 2021, de Rammelkamp, Charles; Henry JR.: <https://case.edu/ech/articles/r/rammelkamp-charles-henry-jr>
- Colina Irezabal, L. (2011). *Reducción de tamaño de líquidos*. Recuperado el 2 de noviembre de 2021, de Emulsificación y homogenización: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/mlci/red_tam_liquidos_emuls.pdf
- Collins, A. M., Craig, G., Zaiman, E., & Roy, T. (1954). *A Comparison Between Disk-Plate and Tube-Dilution Methods for Antibiotic Sensitivity Testing of Bacteria*. Canadá: Jstor.
- JMMarín. (2010). *Capítulo 18 Análisis de regresión lineal*. Recuperado el 21 de abril de 2021, de SPSS 10:

<http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/jmmarin/esp/GuiaSPSS/18reglin.pdf>

- Marco Sanjuan, F. j. (02 de octubre de 2017). *Intervalo de confianza*. Recuperado el 27 de abril de 2021, de <https://economipedia.com/definiciones/intervalo-de-confianza.html>
- Microbiologics, Inc. (20 de Julio de 2017). *Instrucciones de Uso Microbiologics*. Recuperado el 2021 de abril de 27, de https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=386&c=915960&h=a270d64eb6a9c15062ed&_xt=.pdf
- Microbiologics, Inc. (17 de diciembre de 2018). *Spanish Latin American LYFO DISK*. Recuperado el 27 de abril de 2021, de https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=530&c=915960&h=fe0261b9ecb4cb8f6a9c&_xt=.pdf
- Morales, J., & Velazco, C. (1955). *Curvas estándar y determinación de potencia antibiótica*. Lima, Perú: División de control del instituto nacional de salud pública.
- Morales, J., & Velazco, C. (1955). Curvas estándar y determinación de potencia antibiótica. *Revista de medicina experimental*, 92-102.
- P. Rocha, F. R., & G. Teixeira, L. S. (17 de junio de 2004). *ESTRATEGIAS PARA AUMENTO DE SENSIBILIDAD EM ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VI*. Recuperado el 9 de enero de 2022, de <https://www.scielo.br/j/qn/a/wLY84pzVXSZ68nnq5pczd5L/?lang=pt&format=pdf>
- Rammelkap, C. H., & Keefer, C. S. (1 de abril de 1940). *Experimental Biology and medicine*. Recuperado el 18 de abril de 2021, de Sage Journals: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.3181/00379727-43-11296>
- Técnicas de control metrológico. (09 de enero de 2020). *Qué son las cepas ATCC*. Recuperado el 27 de abril de 2021, de <https://www.tcmetrologia.com/blog/que-son-las-cepas-atcc/>
- Thermo Scientific. (2011). *Espectroscopía Molecular*. Recuperado el 28 de enero de 2022, de http://www.tecnofrom.com/modulomoduloPromociones/noti_16/file.pdf

- Universidad Veracruzana. (20 de septiembre de 2014). *LEY DE BOUGUER-LAMBERT-BEER*. Recuperado el 09 de enero de 2022, de <https://www.uv.mx/personal/aherrera/files/2014/05/L.-Ley-de-Bouguer-Lambert-Beer-0.pdf>

ANEXOS

Tabla 6. Organismos de prueba para antibióticos para analizar en los métodos de disco placa y turbidimétrico.

Antibiótico	Organismo de prueba	ATCC - Número
Amikacina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Anfotericina B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763
Bacitracina	<i>Micrococcus luteus</i>	10240
Bleomicina	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	607
Candidina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763
Capreomicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031
Carbenicilina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25619
Cefalotina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Cefapirina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Cloranfenicol	<i>Escherichia coli</i>	10536
Clortetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Cloxacilina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Colistimetato de sodio	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617
Colistina	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617
Cicloserina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Demeclociclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Dihidroestreptomicina (CP)	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
Dihidroestreptomicina (T)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031
Doxiciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Eritromicina	<i>Micrococcus luteus</i>	9341
Gentamicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Gramicidina	<i>Enterococcus hirae</i>	10541
Kanamicina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737

Metaciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Nafcilina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Neomicina (CP)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Neomicina (T)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031
Netilmicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Novobiocina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Nistatina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601
Oxitetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Paromomicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Penicilina G	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Polimixina B	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617
Rolitetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Sisomicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Espectinomicina	<i>Escherichia coli</i>	10536
Estreptomomicina (T)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031
Tetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Tiostrepton (T)	<i>Enterococcus hirae</i>	10541
Tobramicina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
Troleandomicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031
Tilosina	<i>Staphylococcus aureus</i>	9144
Vancomicina	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
*Colección americana de cultivos tipo, 10801 University Boulevard, Manassas VA 20110-2209. (http://www.atcc.org).		

Nota: Esta tabla nos muestra la cepa que se tiene para los antibióticos de Neomicina y Gentamicina que fueron los utilizados para la implementación del método alternativo propuesto.

Tabla 7 Ingredientes para la preparación de la solución amortiguadora B3

Solución amortiguadora B.3		
Concentración de Fosfato Dibásico de Potasio (g/L)	Concentración de Fosfato Monobásico de Potasio (g/L)	pH después de la esterilización
16.73	0.5	8.0 ± 0.1

Nota: Esta tabla nos muestra la concentración que se requiere de cada ingrediente y el pH final que debe presentar la solución amortiguadora.

Tabla 8. Concentraciones requeridas para las diluciones estándar de la potencia antibiótica para Neomicina Sulfato

Solución	Cantidad a agregar en μL de la solución madre [0.1 mg/mL]	mL a agregar para las diluciones	Potencia Teórica a obtener	Concentración final
Solución 1	750	10 mL	B.3	7.5 $\mu\text{g/mL}$
Solución 2	875	10 mL	B.3	8.75 $\mu\text{g/mL}$
Solución 3	1000	10 mL	B.3	10.0 $\mu\text{g/mL}$
Solución 4	1125	10 mL	B.3	11.2 $\mu\text{g/mL}$
Solución 5	1250	10 mL	B.3	12.5 $\mu\text{g/mL}$

Nota: Esta tabla nos muestra las concentraciones obtenidas de las diluciones estándar a partir de un volumen de la solución madre de Neomicina Sulfato.

Tabla 9. Concentraciones requeridas para las diluciones estándar de la potencia antibiótica para Gentamicina Sulfato

Solución	Cantidad a agregar en μL de la solución madre [0.1 mg/mL]	mL a agregar para las diluciones	Potencia Teórica a obtener	Concentración final
Solución 1	640	20 mL	B.3	2.56 $\mu\text{g/mL}$
Solución 2	800	20 mL	B.3	3.20 $\mu\text{g/mL}$
Solución 3	1000	20 mL	B.3	4.00 $\mu\text{g/mL}$
Solución 4	1250	20 mL	B.3	5.00 $\mu\text{g/mL}$
Solución 5	1560	20 mL	B.3	6.25 $\mu\text{g/mL}$

Nota: Esta tabla nos muestra las concentraciones obtenidas de las diluciones estándar a partir de un volumen de la solución madre de Gentamicina Sulfato.

Tabla 10. Ingredientes para la preparación del medio 11

Agar medio 11	Cantidad
Peptona	6.0 g
Digerido pancreático de caseína	4.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Extracto de carne	1.5 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1000.0 g
pH después de la esterilización	8.3 \pm 0.1

Nota: Esta tabla muestra la cantidad exacta de cada ingrediente para la preparación del medio 11.

Tabla 11. Datos de valoración Disco-placa experimentales para Neomicina Sulfato

Estándar U/mL	Concentraciones U/mL	Repetición de Placa	Referencia (S3)						Media						Media de la muestra corregida (mm)
			zona 1 (mm)	zona 3 (mm)	zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	%R SD	zona 2 (mm)	zona 4 (mm)	zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	%RSD	
S1	7.50	1	17.30	17.32	17.30	17.37	0.199	1.1	16.35	16.30	16.30	16.18	0.318	2.0	16.377
		2	17.30	17.30	17.30				16.30	16.50	15.50				
		3	17.90	17.30	17.30				16.30	16.30	15.80				
S2	8.75	1	18.00	19.60	17.30	17.88	0.778	4.4	17.30	17.30	17.40	17.22	0.273	1.6	16.903
		2	17.40	17.30	17.33				17.30	16.50	17.30				
		3	18.10	18.50	17.40				17.30	17.30	17.30				
S4	11.25	1	17.30	17.30	17.33	17.45	0.284	1.6	17.70	17.70	17.70	17.68	0.192	1.1	17.789
		2	17.32	17.30	17.31				17.70	17.90	17.20				
		3	18.00	17.30	17.90				17.80	17.70	17.70				
S5	12.5000	1	17.30	17.30	17.90	17.55	0.344	2.0	18.50	19.30	18.50	18.63	0.283	1.5	18.648
		2	18.00	17.30	17.33				18.50	18.50	18.50				
		3	17.30	17.40	18.10				18.50	18.90	18.50				
17.562															
U3	Desconocida	1	17.40	17.30	17.33	17.34	0.048	0.3	17.50	17.40	17.50	17.57	0.245	1.4	17.792
		2	17.40	17.30	17.30				17.50	17.50	17.60				
		3	17.30	17.30	17.40				17.50	17.40	18.20				

Nota: La tabla nos muestra los valores obtenidos de la experimentación realizada para Neomicina Sulfato con el método Disco-placa.

Tabla 12. Datos de valoración Disco-placa experimentales para Gentamicina Sulfato

Estándar U/mL	Concentraciones µg/mL	Repetición de Placa	Referencia (S3)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
			zona 1 (mm)	zona 3 (mm)	zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	%R SD	zona 2 (mm)	zona 4 (mm)	zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	%RSD	
S1	2.5600	1	18.10	19.42	18.50	18.443	0.522	2.8	16.20	16.50	16.30	16.372	0.160	1.0	16.672
		2	18.00	18.17	18.80				16.25	16.70	16.30				
		3	18.00	18.00	19.00				16.50	16.30	16.30				
S2	3.2000	1	19.09	18.99	18.69	19.068	0.477	2.5	17.32	17.50	17.70	17.387	0.174	1.0	17.062
		2	19.11	18.50	18.60				17.21	17.30	17.30				
		3	19.75	19.88	19.00				17.60	17.20	17.35				
S4	5.0000	1	19.10	18.20	18.50	18.689	0.437	2.3	19.35	19.23	19.25	19.332	0.090	0.5	19.387
		2	19.00	19.00	19.10				19.23	19.35	19.31				
		3	18.30	18.00	19.00				19.42	19.50	19.35				
S5	6.2500	1	18.50	18.99	18.60	18.773	0.501	2.7	21.00	21.10	21.10	21.122	0.083	0.4	21.092
		2	18.00	18.17	19.60				21.20	21.00	21.23				
		3	19.00	19.10	19.00				21.20	21.13	21.14				
						18.743	0.484	2.6							
U3	4.0000	1	19.40	19.42	19.97	19.674	0.496	2.5	19.37	18.17	21.16	19.649	0.793	4.0	18.718
		2	19.70	19.36	20.10				19.50	19.88	19.87				
		3	19.01	20.66	19.45				19.14	19.88	19.87				

Nota: La tabla nos muestra los valores obtenidos de la experimentación realizada para Gentamicina Sulfato con el método Disco-placa.

Figura 1 Certificado cepa ATCC



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>Specifications Microorganism Name: Staphylococcus epidermidis Catalog Number: 0371 Lot Number: 371-418** Reference Number: ATCC® 12228™* Passage from Reference: 3 (7) Mean Assay Value (MAV): 58 CFU per 0.1 ml</p>	<p>Expiration Date: 2023/5/31 Release Information: Quality Control Technologist: Alexandra D Quevi Release Date: 2021/6/18</p>
--	---

<p>Macroscopic Features: Two colony types; small to medium, circular, convex, entire edge, smooth, glistening; one type is white and the other is gray to translucent.</p>	<p>Performance</p>	<p>Medium: SBAP</p>
<p>Microscopic Features: Gram positive cocci usually in pairs and tetrads.</p>		<p>Method: Gram Stain (1)</p>

ID System: MALDI-TOF (1)
 See attached ID System results document.


 Amanda Kuperus
 Director of Quality Control
 AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.

(7) The Mean Assay Value (MAV) stated above may deviate from the end-user's MAV based on variables inherent to each laboratory environment, such as methods, media type, equipment, pipettes, and individual technician technique.

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identifier in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2021-06-15T15:41:31.121 adq

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
F10 (+++) (A)	371-418	Staphylococcus epidermidis	2.29

Comments:

n/a



Statistical Analysis Certificate

Microorganism Name: Staphylococcus epidermidis
Reference #: ATCC® 12228™*
Catalog #: 0371
Lot #: 371-418**
Expiration Date: 2023/5/31
(7) Mean Assay Value (MAV): 58 CFU per 0.1 ml
Standard Deviation: 6.5E+00
Coefficient of Variation: 11%
99% Confidence Interval of 5.3E+01 to 6.3E+01 CFU
95% Confidence Interval of 5.4E+01 to 6.2E+01 CFU

Method used to determine Mean Assay Value: Spiral Plate Method
Medium Employed: TSA
Incubation Time and Temp: 24-48 hrs at 34-38 degrees C

Amanda Kuperus
Director of Quality Control
AUTHORIZED SIGNATURE

(7) The Mean Assay Value (MAV) stated above may deviate from the end-user's MAV based on variables inherent to each laboratory environment, such as methods, media type, equipment, pipettes, and individual technician technique.

The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. The information included in this Statistical Analysis Certificate is strictly based on the product's lot number. A product lot number may be assigned to multiple packaging configurations. As a result, this certificate only lists the lot number and does not include a product description.

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

Nota: Fuente propia.

Figura 2 Pasos para hidratar una cepa liofilizada



ez accu shot™
GROWTH PROMOTION TESTING



ez accu shot™
GROWTH PROMOTION TESTING
Select

INSTRUCCIONES ILUSTRADAS

- 1

Retire 1 vial de líquido hidratante y 1 bolsa de papel aluminio con la microesfera liofilizada del almacenamiento refrigerado. Deje la bolsa y el líquido hidratante sin abrir hasta que alcancen la temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos).


- 2

Abra la bolsa de papel aluminio y retire el vial con 1 microesfera liofilizada.


- 3

Retire la tapa del vial con la microesfera y la del vial de líquido hidratante. Vuelque 1 microesfera en el vial de líquido hidratante. Solo se debe utilizar 1 microesfera para obtener la concentración de exposición de entre 10 y 100 UFC por cada 0,1 ml en medios no selectivos. Inmediatamente vuelva a tapar el vial de líquido hidratante.

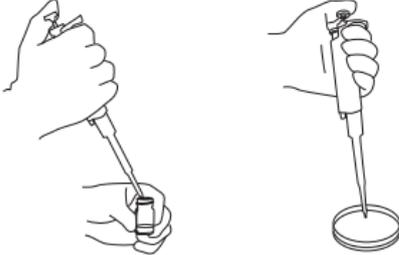

- 4

Agite en vórtex el material hidratado hasta que la microesfera se haya disuelto por completo y la suspensión sea homogénea.


- 5

Con una pipeta estéril, transfiera 0,1 ml de la suspensión hidratada al material que se está exponiendo (0,1 ml contiene de 10 a 100 UFC).

Nota: La suspensión restante se puede refrigerar y utilizar por un máximo de 8 horas, excepto por el número de catálogo 0488A, que debe utilizarse dentro de un plazo de 30 minutos después de la hidratación. Pruebe la suspensión de inmediato después de retirarla del refrigerador.

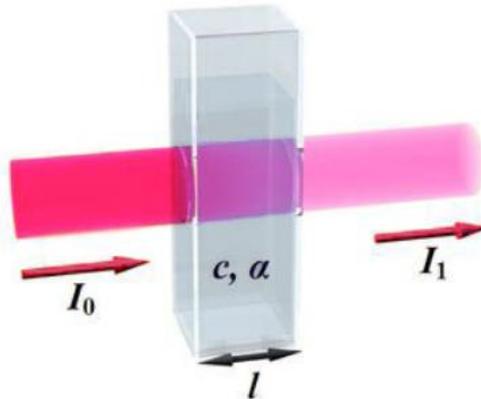

- 6

Continúe con el procedimiento de exposición de acuerdo con el protocolo del laboratorio. Refrigerar la suspensión a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C si se volverá a utilizar. Deseche cualquier material hidratado restante de acuerdo con el protocolo del laboratorio para la eliminación de materiales de riesgo biológico.



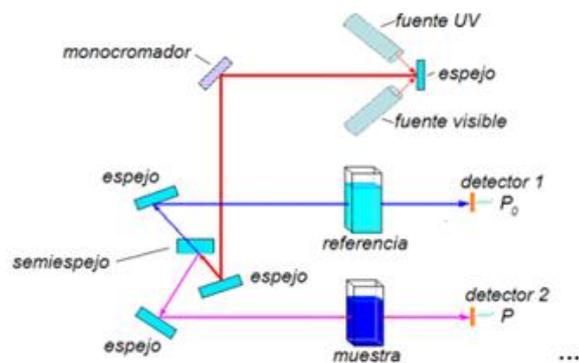
Nota: Adaptado de: Microbiologics, [media.nl \(microbiologics.com\)](http://media.nl(microbiologics.com)) España.

Figura 3. Diagrama de absorción de luz explicado por la ley de Bouguer-Lambert-Beer



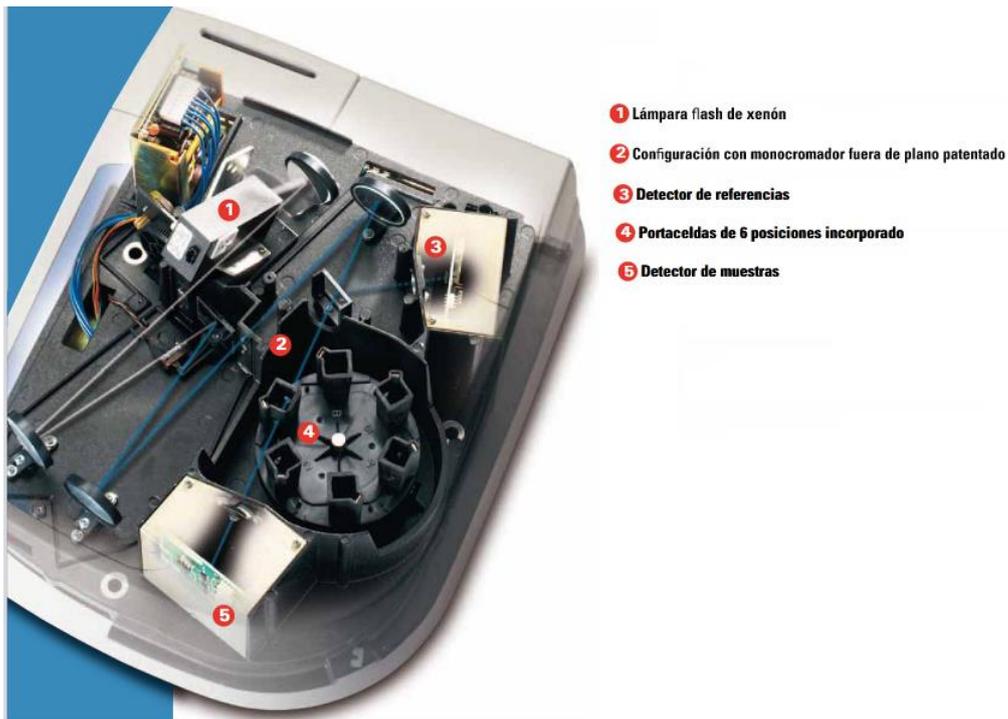
Nota: Adaptado de: Espectrometría UV - visible II: El Espectrofotometro, por JMGAV, 2012, <https://triplenlace.com/2012/12/04/especrofotometria-uv-visible-ii-el-espectrometro/>

Figura 4 Diagrama de absorción de luz explicado por la ley de Bouguer-Lambert-Beer



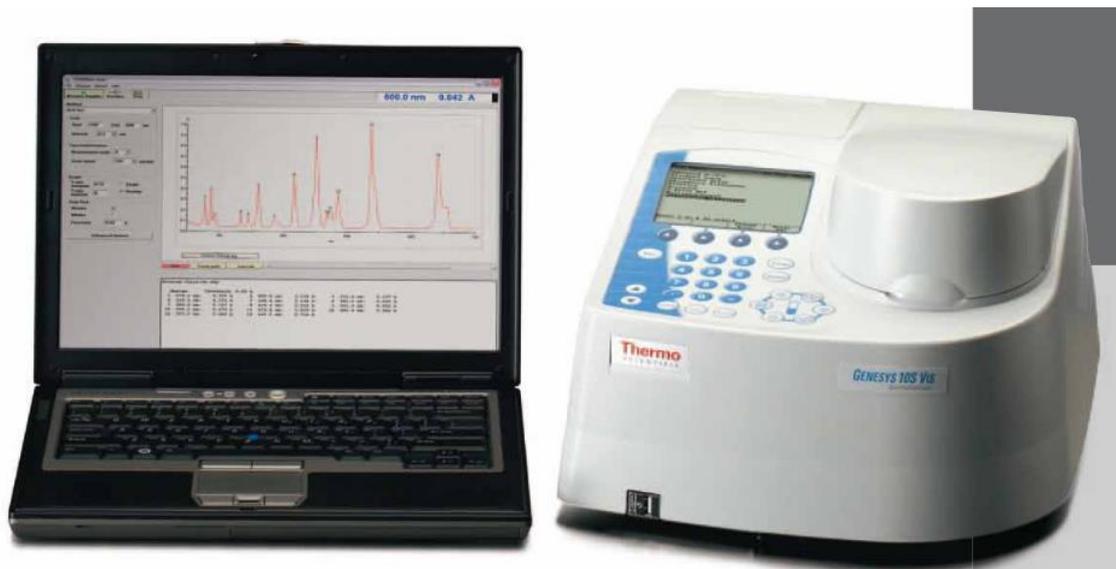
Nota: Adaptado de: Espectroscopía molecular, por: Thermo Scientific, US 6.414.753 B1, http://www.tecnofrom.com/modulomoduloPromociones/noti_16/file.pdf

Figura 5 Partes del espectroscopio Evolution 60s



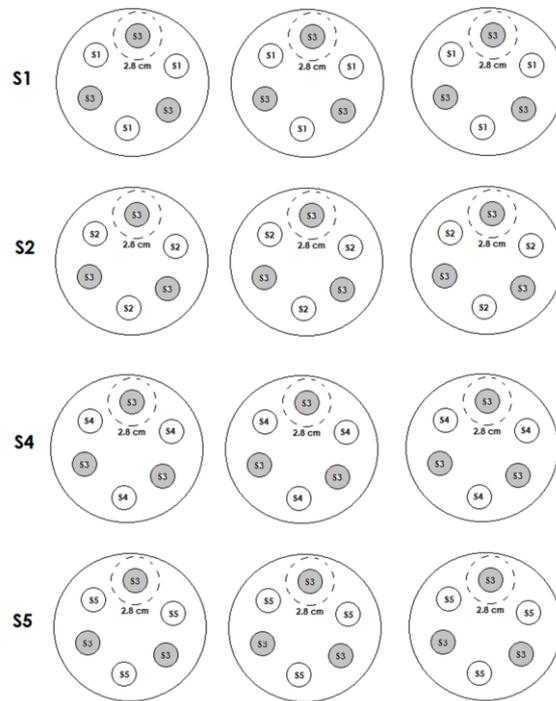
Nota: Adaptado de: Espectroscopía molecular, por: Thermo Scientific, US 6.414.753 B1, http://www.tecnofrom.com/modulomoduloPromociones/noti_16/file.pdf

Figura 6 Equipo utilizado para la cuantificación de la cepa (espectroscopio Evolution 60s)



Nota: Adaptado de: Espectroscopía molecular, por: Thermo Scientific, US 6.414.753 B1, http://www.tecnofrom.com/modulomoduloPromociones/noti_16/file.pdf

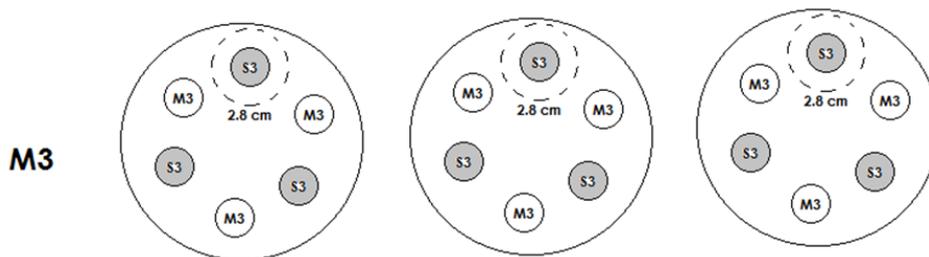
Figura 7 Distribución de los discos con la solución estándar para la prueba de potencia antibiótica



Nota: Fuente propia.

Figura 8

Distribución de los discos con la solución muestra para la prueba de potencia antibiótica



Nota: Fuente propia.