

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA**



**“Desarrollo y Validación de una Técnica Analítica
por el Método Cilindro-Placa para la cuantificación
de Amikacina en inyectable. Lima-2010”.**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICA

Bach. EDITH EVELING CONISLLA CÁCERES

AYACUCHO - PERÚ

2010

*A mis padres con todo el amor y gratitud por ser los
guías de mi camino.*

A mi hermano Eder con amor.

AGRADECIMIENTO

A mi Alma Mater la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, primera casa superior de estudios en nuestra ciudad, por ser forjadora de nuestra formación y realización profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica que permitió formarme profesionalmente.

A los docentes San Cristobalinos por su valiosa enseñanza y orientación formando profesionales, día a día, muy competentes para el mercado laboral.

Al Servicio de Control de Calidad de los Laboratorios de Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, cuyos profesionales me brindaron el espacio y apoyo para la realización de este trabajo.

A mis asesores Mg. Maricela López Sierralta (asesor interno) y MgCs. León Faustino Villegas Sánchez y Q.F. Jack Carlos Dávila Hernández (asesores externos) por su orientación y enseñanzas, a los jurados por los consejos impartidos.

A mis padres por ser ellos mi ejemplo de vida, por el apoyo incondicional y las fuerzas que me brindaron durante todo el tiempo de mi formación profesional y para la ejecución, culminación de este trabajo.

A mi hermano Eder, por la comprensión durante los años de mi formación.

A Wilton por su apoyo incondicional en todo momento, gracias.

A mi familia y amigos que me apoyaron, aconsejaron en el trayecto de mi formación profesional.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Calidad	5
2.3. Buenas Prácticas de Laboratorio BPL o GPL.....	6
2.4. Gestión de Calidad	6
2.5. Control de Calidad	7
2.6. Desarrollo del Método Analítico.....	7
2.7. Valoraciones Biológicas	8
2.8. Validación	9
2.9. Características de un Método Analítico	10
2.10. Validación de un Método Analítico	12
2.11. Amikacina	16
2.12. Inyectable.....	17
2.13. <i>Bacillus subtilis</i>	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Lugar de ejecución	19
3.2. Población	19
3.3. Muestra	19
3.4. Desarrollo de la Técnica Analítica por el Método de Análisis Cilindro- placa.....	20
3.5. Diseño Metodológico	23
3.6. Análisis estadístico	27
IV. RESULTADOS	34
V. DISCUSIÓN	44
VI. CONCLUSIONES	51
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	57

Título : “Desarrollo y Validación de una Técnica Analítica por el Método Cilindro-Placa para la cuantificación de Amikacina en inyectable. Lima - 2010”.

Autor : Bach. Edith Eveling Conislla Cáceres.

Asesores: Mg. Maricela López Sierralta. (Asesor interno)

MgCs. León Faustino Villegas Sánchez. (Asesor externo)

RESUMEN

Se realizó el desarrollo y validación del método analítico para la cuantificación de Amikacina, para ser utilizado en el control de calidad de productos farmacéuticos (ampollas) con este principio activo. En el presente trabajo se describió y desarrolló el proceso de validación por valoración microbiológica de antibióticos en cilindro –placa (difusión en agar), para la determinación de amikacina. Los parámetros analíticos fueron especificidad, linealidad, exactitud y precisión expresadas en sus dos formas: repetibilidad y precisión intermedia.

Durante el desarrollo de la técnica se obtuvieron datos que cumplen con especificaciones de la USP 32, hallando la cantidad de suspensión de microorganismo: 1mL/100mL de medio, con una concentración %Transmitancia de 70+/- 10, a una longitud de onda de 600nm, para obtener halos de inhibición que se encuentren entre 12-16mm de diámetro, para realizar las valoraciones.

Se demostró mediante diseño experimental, con la evaluación estadística de los resultados experimentales y teniendo como base los criterios de aceptación permitidos, que el método analítico es específico al no encontrar halo de inhibición en el diluyente y placebo; lineal obteniendo un coeficiente de correlación mayor a 0.95 y cumpliendo el análisis estadístico para la pendiente, ordenada y variabilidad de factores, en un rango de 64-156%; exacto obteniendo un porcentaje de recuperación, 100.65, 100.13, 99.72% en los tres análisis realizados, en un rango de 100 -150%, cumpliendo el análisis estadístico propuesto; preciso al hallar el coeficiente de variación menor a 5%, en sus dos expresiones (Repetibilidad CV=1.27 y 1.04% para cada analista, precisión intermedia CV= 0,98%).

De esta manera los estudios realizados establecen las características de desempeño analítico que cumple con los requisitos para la aplicación analítica propuesta siendo confiable para su utilización en el control de calidad.

I. INTRODUCCIÓN

La misión de la Industria Farmacéutica es producir medicamentos de calidad de total garantía exigiendo una mejora a diario en el desarrollo de sus técnicas surgiendo así el concepto de Validación de Métodos Analíticos, cuya finalidad es demostrar la calidad de los procesos de desarrollo industriales y analíticos de sus productos.

El Laboratorio de Control de Calidad, es el ente encargado de comprobar y garantizar que los medicamentos, material médico-quirúrgico, alimentos, etc., sean fabricado de acuerdo a las especificaciones de identidad pureza, potencia, actividad terapéutica, seguridad, estabilidad y demás características establecidas por las normas internacionales estandarizadas, para lo cual deben de cumplir diversas exigencias establecidas por la diferentes organizaciones como las ISO (17025), Organización Mundial de la Salud (OMS).

La validación es parte integral de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) asegurando la fabricación de productos en forma uniforme, controlada y de calidad.

En la actualidad los Laboratorios de Control de Calidad deben de cumplir con las exigencias de mercado en cuanto a los reportes de conformidad de los diferentes productos analizados. La validación de Técnicas Analíticas es un factor muy

importante para garantizar la homogeneidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

La validación de Métodos Microbiológicos, en la actualidad, está siendo muy impulsada, ya que con el tiempo se está contando con mejor tecnología aunque su complejidad hace difícil la determinación de sus parámetros.

La USP-32 describe el análisis cuantitativo del principio activo Amikacina, utilizando una técnica por Cromatografía Líquida de Alta Presión con un detector de arreglo de diodos, con la cual no se cuenta en laboratorio, y un segundo método microbiológico "Potencia Antibiótica-Turbidimétrica" cuya estandarización es muy difícil y poco confiable, por las razones descritas se tiene la necesidad de desarrollar un método alternativo para dicho análisis en el laboratorio.

El objetivo de la Validación es establecer una evidencia documentada que garantice la reproducibilidad de los resultados a través del tiempo con un método analítico confiable, homogéneo y práctico, tomando en cuenta parámetros recomendados por la Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria (AEFI).

Para proporcionar evidencia de la eficacia del análisis de cuantificación, se planteó los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Desarrollar y Validar la técnica analítica por el Método Cilindro-Placa para la cuantificación de Amikacina en inyectable.

Objetivos Específicos:

- Determinar la concentración de suspensión a agregar.
- Determinar la cantidad de suspensión a agregar.
- Determinar la concentración del estándar.

- Determinar la especificidad de la técnica analítica para la cuantificación por el Método Cilindro-Placa de Amikacina en inyectable.
- Determinar la linealidad de la técnica analítica para la cuantificación por el Método Cilindro-Placa de Amikacina en inyectable.
- Determinar la exactitud de la técnica analítica para la cuantificación por el Método Cilindro-Placa de Amikacina en inyectable.
- Determinar la precisión de la técnica analítica para la cuantificación por el Método Cilindro-Placa de Amikacina en inyectable.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

García (2001), en su tesis doctoral de: Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos, plantea el estudio de la filosofía de la validación farmacéutica, las diferentes metodologías y aplicaciones hasta el momento, desarrollo farmacotécnico (optimización del proceso– cualificación del proceso), validación prospectiva y retrospectiva; donde señala que la validación es aplicable a procesos, sistemas y métodos, estableciendo evidencia documentada de que un proceso o producto está dentro de las especificaciones predeterminadas.

La Farmacopea Británica (2000), en el Apéndice de Ensayos Biológicos de Antibióticos describe el método cilindro placa para la cuantificación de Kanamicina, haciendo uso del microorganismo *Bacillus subtilis*.

Mora (2007), en su trabajo de tesis titulado: Implementación y desarrollo de la técnica de Potencia Microbiológica de antibióticos y su impacto económico en la empresa Calox de Costa Rica. S.A., precisó los pasos a seguir para el desarrollo de la técnica analítica para la cuantificación de antibióticos.

Velandia (2008), en su trabajo titulado: Validación del Método Analítico para la cuantificación de Bacitracina en el Laboratorio de Control de Calidad de una Industria Farmacéutica Veterinaria determinó mediante análisis estadístico que el

método analítico es apropiado para la determinación del antibiótico Bacitracina por el Método Cilindro -Placa.

Leyva (2009), en su tesis titulada: Desarrollo y validación de un Método Analítico para la cuantificación por H.P.L.C de Clenbuterol clorhidrato en solución oral-gotas y análisis comparativo de productos comercializados en el Perú, precisó los parámetros necesarios para garantizar la optimización del método analítico.

Prado (2008), en su tesis: Desarrollo y Validación de la Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H.P.L.C.) para la Determinación de contenido de Ciprofloxacino 3 mg/mL y Dexametasona 1mg/mL, en Suspensión Oftálmica señala las características de desarrollo de un método analítico.

2.2. CALIDAD

Según la Organización de Estandarización (ISO), el concepto de calidad se refiere a la totalidad de las características de una entidad que le confiere la aptitud para satisfacer las necesidades explícitas e implícitas de los consumidores o clientes (Compañó, 2002).

Es el grado de satisfacción que ofrecen las características del producto en relación con las exigencias del consumidor al que se destina. Los atributos o características fundamentales de un producto farmacéutico, especialmente en el caso de una forma farmacéutica, útil para su consumo por el individuo enfermo son las siguientes:

- Identidad
- Pureza
- Potencia o riqueza
- Eficacia
- Seguridad

- Estabilidad

En términos sencillos es hacer las cosas correctamente en cada proceso, previniendo errores y hacerlo bien desde la primera vez hasta el final, para la satisfacción del cliente (Vila, 1997).

2.3. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO BPL

Son normas y procedimiento de operación oficiales consideradas como requerimientos mínimos para promover la calidad e integridad de un producto, nacen de la necesidad de contar con datos analíticos de confianza y un seguimiento de todo el proceso. Las BPL pretenden asegurar la calidad de los datos de los análisis, además facilitar el comportamiento adecuado del estudio, promueve su exacto y completo reporte de los medios por los cuales se puede verificar la integridad de los mismos (AEFI, 2001).

Es un conjunto de normas y reglas de procedimientos operacionales y prácticas establecidas y promulgadas por determinados organismos como la Organization for Economic Cooperation and Development (OCDE), o la Food and Drug Administration (FDA), y de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), que se consideran de obligado cumplimiento para asegurar la calidad e integridad de los datos producidos en determinados tipos de investigación o estudios.

2.4. GARANTÍA DE CALIDAD

Son un conjunto de medidas que se adoptan para asegurar que los productos farmacéuticos sean de calidad requerida, para el uso al que están destinados. "La creación y aplicación de un sistema que debe de dar garantía y demuestre que los métodos y medios empleados en todas las etapas de un análisis, estudio o investigación se han realizado cumpliendo las BPL". Por lo tanto la garantía de calidad es un sistema que debe garantizar el "cómo" se han realizado todas las

operaciones técnicas y administrativas alrededor de un análisis o estudio. (DIGEMID, 1999), (ISO/IEC 17025, 2005).

2.5. CONTROL DE CALIDAD

Conjunto de procedimientos, técnicas y actividades operativas, destinadas a medir, confrontar y verificar que un producto cumpla con las características y especificaciones planificadas; con una serie de ensayos, análisis o medidas que se realizan sobre un determinado producto para ver si cumple con la calidad especificada (UPCH 2009).

El Laboratorio de Calidad es importante en la industria farmacéutica, porque controla y garantiza que los medicamentos, material médico quirúrgico, etc.; sean fabricados de acuerdo a las especificaciones de identidad, pureza, potencia, actividad terapéutica, seguridad, estabilidad y demás características; establecidas por las normas internacionales, en especial por la Farmacopea de los Estados Unidos, que es la norma oficial de mayor uso y/o por el propio laboratorio fabricante (UPCH, 2004).

2.6. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

El desarrollo del Método analítico se da para cumplir las necesidades ya sea de un laboratorio de control de calidad o un cliente, al no encontrar un Método en las Literaturas oficiales, es posible adaptar un método ya existente y hacerlos adecuado para una nueva aplicación (Soso, 2010).

Para desarrollar un Método analítico se debe tener en cuenta aspectos como costos de inversión, tiempo de análisis, etc. El Método analítico tiene que ser totalmente adaptado para el cumplimiento de los fines u objetivos trazados (ICP, 2007).

2.7. VALORACIONES BIOLÓGICAS

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto como de inhibición y magnificación, y se evalúan por las reacciones de los microorganismos de prueba (muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos). Implican los ensayos cuantitativos de las drogas por métodos biológicos al igual que las aplicaciones de las pruebas biológicas cualitativas (Rémington, 2000).

2.7.1. VALORACIONES MICROBIOLÓGICAS

La actividad de los antibióticos puede demostrarse por su efecto inhibitor sobre los microorganismos. La reducción de la actividad antimicrobiana también revela cambios sutiles no comprobables mediante métodos químicos, en consecuencia, las valoraciones microbiológicas o biológicas siguen siendo por lo general, el estándar para disipar dudas en cuanto a la posible pérdida de actividad (USP 32, 2009).

La potencia antibiótica se estima mediante la comparación de la actividad de un producto (Problema) y la de una muestra de referencia (patrón) en presencia de un microorganismo testigo (AEFI, 2001).

2.7.1.1. MÉTODO CILINDRO-PLACA

Basada en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical a través de una capa de agar solidificada en un plato o placa de Petri hasta inhibir totalmente el crecimiento del microorganismo añadido, en un área circular o zona de inhibición en torno al cilindro que contiene una solución de antibiótico (USP 32, 2009) (Rémington, 2000).

El diseño más simple para esta prueba es un ensayo con una curva estándar. Para ello se prepara el patrón a cinco concentraciones o dosis (A, B, C, D), que mantengan entre si una relación logarítmica, y una solución de prueba a ensayar a una concentración teórica equivalente a la intermedia del patrón (AEFI, 2001). La USP 32 (2009), considera que el diámetro de los halos de inhibición de la curva tiene que encontrarse entre 12-16.

La aptitud del sistema para este método se debe considerar la dimensión de los cilindros de acero, que deben tener una variación de 0.1 mm (USP 32, 2009).

2.8. VALIDACIÓN

Establecimiento de evidencia documentada que demuestra con un alto grado de seguridad, que un proceso específico entregará, de manera consistente (reproducible), un producto que cumpla sus especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos (ICH, 2008).

“Validación es la confirmación por examinación y la provisión de evidencia objetiva de que los particulares requisitos para un uso especial previsto son satisfechos” (ISO/IEC 17025, 2005).

La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) define la validación como “la planificación, ejecución, verificación y documentación de un plan que asegura que un equipo, procedimiento, proceso, actividad o servicio, cumple con las especificaciones establecidas previamente y lo hace de forma reproducible y homogénea a lo largo del tiempo.

En un laboratorio de análisis se debe considerar la validación de:

- Métodos de limpieza.
- Procesos de fabricación.
- Métodos analíticos. (Castro, 1999)

2.8.1. TIPOS DE VALIDACIÓN

A. VALIDACIÓN PROSPECTIVA

Se aplica cuando se desarrolla un nuevo método analítico y se lleva a cabo de acuerdo con un protocolo establecido y planificado. Comprende el estudio de todos los criterios para demostrar el buen funcionamiento e idoneidad del método.

B. VALIDACIÓN RETROSPECTIVA

Para métodos repetidamente utilizados y no validados anteriormente y de los que se tiene documentación suficiente para la bondad del método.

C. REVALIDACIÓN

Repetición parcial o total de una validación debido a cambios efectuados que pueden afectar a la bondad del Método Validado (DIGEMID, 1999), (Castro, 1999).

2.9. CARACTERÍSTICAS DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Las características de un método deben definirse y usarse experimentalmente de forma que cualquier analista pueda interpretarlos correctamente. Se consideran los siguientes:

A. FIABILIDAD

Demuestra la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.

- Proporcionalidad entre la concentración del analito y respuesta del instrumento. Este concepto se relaciona con los parámetros de linealidad, intervalo o rango y sensibilidad.

- Dispersión de una serie de resultados alrededor del valor medio central. Concepto relacionado con los parámetros de precisión, repetibilidad, reproducibilidad y robustez.
- Diferencia del valor hallado en el análisis y el valor verdadero. Concepto relacionado con los parámetros de exactitud y recuperación.
- Cantidad mínima de analito requerido para obtener un resultado significativo. Concepto relacionado con los parámetros de sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación.
- Capacidad del método para determinar el analito sin interferencias de impurezas, excipientes u otras sustancias presentes en la muestra. Concepto relacionado con los parámetros de selectividad y especificidad (Castro, 1999).

B. PRACTICABILIDAD

Este parámetro se evalúa en la fase de desarrollo del método analítico: tiempo, costo, tamaño de la muestra, calificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, precisión exigible, selectividad, condiciones de seguridad entre otras (AEFI, 2001).

Los criterios de importancia primordiales de un laboratorio de análisis son: el tiempo de preparación de la muestra y de utilización de aparatos y el tiempo global de estos, que van a decidir si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable en la práctica (Castro, 1999).

C. IDONEIDAD

Es el conjunto de ensayos que permiten comprobar en el momento de utilización del método que el sistema (analista, reactivos e instrumentos) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. La comprobación de la idoneidad forma parte integral del método y debe

realizarse cada día al inicio del análisis (dependiendo de la duración de este, será conveniente realizarlo, a intervalos de tiempo), para comprobar el correcto funcionamiento del sistema. (AEFI, 2001).

2.10. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

La validación de un método analítico es el proceso que establece mediante estudio en laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (USP 32, 2009). Las siete tesis basadas en una propuesta de Sucker resumen aspectos importantes de la validación de métodos analíticos:

- Validación es un instrumento de trabajo, entre otros, para el aseguramiento de la calidad.
- La validación debe estar orientada específicamente al producto y a los objetivos. La responsabilidad acerca de la naturaleza y la extensión de la validación recae en el químico analítico.
- Validación significa hacer lo necesario, pero evitando exceso. Todos los parámetros críticos del método deben ser validados, pero no aquellos que sean aleatorios o que no sean esenciales.
- Lo mejor es iniciar la validación de un método por el resultado final y luego retroceder en el desarrollo del análisis hasta la primera etapa.
- La validación no puede realizarse chequeando los resultados en una lista de verificación.
- No existe un análisis químico sin error (valor real). En la medida de lo posible se debe determinar relevancia estadística y de allí, la incertidumbre de la medición.
- En la validación de métodos se debe establecer el tipo y la frecuencia de los controles a realizar con la finalidad de minimizar los costos generales del

análisis, pero manteniendo el necesario aseguramiento de la calidad de los resultados.

La principal conclusión de estas tesis es que se trata de un conjunto de procedimientos que debe ser establecido "a medida" (orientada a determinados objetivos) por un químico analítico y que debe estar orientado a asegurar (obtener y demostrar objetivamente) la calidad requerida (acordada) de los resultados de un análisis (ICH, 2008).

2.10.1. DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE UNA DETERMINACIÓN: (USP 32, 2009)

Las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta valoraciones subjetivas de atributos, por esta amplia variedad se tiene la necesidad de realizar esquemas de validación, las categorías de prueba mas habituales para las que se exige datos de validación se describen a continuación:

- **Categoría I:** Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- **Categoría II:** Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.
- **Categoría III:** Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación de fármacos).
- **Categoría IV:** Pruebas de identificación.

Cuadro N° 01: Características de Desempeño Analítico

Características de desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativo	Pruebas de Limite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Limite de Detección	No	No	Si	*	No
Limite de Cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos USP-32/NF-27

2.10.2. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO

a) Especificidad – Selectividad: Capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes en la matriz, así como también la presencia de productos de degradación e impurezas (ICH, 2008)(UPCH, 2009) (USP 32, 2009).

b) Linealidad e Intervalo:

- **Linealidad:** Es la capacidad del método para obtener resultados directamente proporcionales o ya sea por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado (ICH, 2008) (USP 32, 2009).

$$y = bx + a$$

Donde **x:** concentración; **y:** respuesta; **b:** pendiente y **a:** término independiente.

- **Intervalo:** Es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito, en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad (USP 32, 2009).

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Se establece inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido; si existe una relación lineal, los resultados de la prueba deben establecerse mediante métodos estadísticos (ICH, 2008) (UPCH, 2009) (USP 32, 2009).

La I.C.H. recomienda que para establecer la linealidad se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones.

c) Exactitud: La exactitud es la proximidad de los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento y el valor verdadero.

- Uno de los procedimientos existente para determinar la exactitud del método de análisis consiste en añadir cantidades conocidas de analito a tres alícuotas de esta muestra.

- La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad del analito añadida a la muestra (USP 32, 2009).

d) Precisión: Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. Es expresada como la desviación estándar de una serie de resultados. La precisión abarca también:

- **Repetibilidad:** estudia la variabilidad del método, efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, (por un mismo analista, mismo instrumento operativo, mismos reactivos) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto (AEFI, 2001).

- **Precisión Intermedia:** estudia la variabilidad del método, efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, entre otros) pero en un mismo laboratorio. El objeto del estudio de la precisión intermedia es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre una misma muestra, en un mismo laboratorio, pero en condiciones operativas diferentes (AEFI, 2001).

2.11. AMIKACINA

Es un antibiótico de amplio espectro, que ejerce una actividad bactericida, en muchos microorganismos resistentes a otros antibióticos (Litter, 1992)

Es un derivado semisintético preparado a partir de kanamicina A por acilación del grupo 1-amino de la fracción desoxiestreptamina con ácido 2-hidroxi-4-aminobutírico (Goodman&Gilman, 2002).

La Amikacina tiene los grupos 3'-hidroxil que no es atacada por la mayoría de las 3'-o-fosfotransferasas ni por la mayoría de otras enzimas inactivadoras, por ello representa, junto con la pentisomicina y la 1-Namino hidroxil propionil-5-sisomicina, los amino glucósidos de mayor valor en el tratamiento de enfermedades que pone en riesgo la vida por *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacteriaceas resistentes a otros antibióticos (Jawetz, 1990).

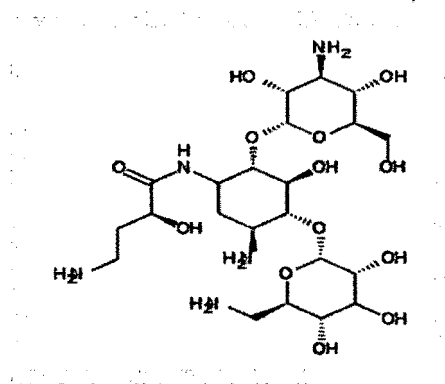


Gráfico Nº 01: Estructura de la Amikacina

Fuente: MEDCICLOPEDIA, 2009

Formula Molecular : $C_{22}H_{43}N_5O_{13}$

Peso molecular : 585.603 g/mol

Descripción : Polvo blanco amorfo

Solubilidad : Totalmente soluble en agua.

Categoría : Antibacteriano de amplio espectro.

Conservación : En envases impermeables, protegidos de la luz, humedad y en refrigeración (The Index Merck, 2001).

2.12. INYECTABLE

Son las soluciones, suspensiones o emulsiones estériles, que contienen uno o más fármacos, preparados por disolución o suspensión del principio activo y otros aditivos, en agua para inyección o en un líquido no acuoso o en una mezcla de líquidos miscibles entre sí, envasados en recipientes adecuados, que se destinan para ser introducidas al organismo parenteralmente, por diferentes vías: subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intrarraquídea, epidural e intraarticular con el fin de tratar, aliviar, curar, prevenir ó diagnosticar los estados patológicos del hombre. Estos preparados farmacéuticos se pueden administrar en pequeños ó grandes volúmenes y en cualquiera de los casos, la forma farmacéutica reviste una gran importancia, para obtener una calidad adecuada del producto (Rémington, 2000).

2.13. *Bacillus subtilis*

Son bacilos gram positivo, que se agrupan formando cadenas, son microorganismos "saprofitos" que prevalecen en el suelo, el aire, el agua y sobre diversos vegetales (Uriarte, 2003).

Los microorganismos típicos miden 1 x 3 a 4 um tienen terminaciones cuadradas. Utilizan fuentes de nitrógeno y de carbono sencillas, las esporas son

resistentes a los cambios de temperatura, calor seco y diversos desinfectantes químicos durante periodos moderados (Madigan, 2004).

El *Bacillus subtilis* excreta una mezcla compleja llamada subtisilina, que inhibe el crecimiento de otros microorganismos (Jacques, 1976).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo se realizó en el Área de Microbiología, del Servicio de Control de Calidad de los Laboratorios de Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia durante los meses de enero - abril del 2010.

3.2. POBLACIÓN

500 Inyectables que contienen Amikacina 500mg/2mL. que se encontraron en el mercado farmacéutico del lote 090328.

3.3. MUESTRA

100 unidades del producto terminado de Inyectable de Amikacina de 500mg/2mL.

3.3.1. TÉCNICA DE MUESTREO

Tipo de muestreo fue no probabilístico; es decir la muestra fue tomada al azar.

3.3.2. UNIDAD MUESTRAL

Inyectable de Amikacina de 500mg/2mL.

3.3.3. UNIDAD EXPERIMENTAL

Bacillus subtilis ATCC 6633 sub especie *espeziizini*.

3.3.4. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Aspecto : Solución acuosa de color cristalino, libre de partículas extrañas visibles.

Volumen : 2 mL por cada ampolla.

Composición: cada ampolla contiene 500 mg / 2 mL.

3.3.5. ESTÁNDAR DE REFERENCIA

Nombre : Amikacina Sulfato.

Lote : 090301

Proveedor : Corporación INFARMASA S.A.

Potencia : 665.70 ug/mg Amikacina T/C

3.4. DESARROLLO DE LA TÉCNICA POR EL MÉTODO DE ANÁLISIS CILINDRO-PLACA

3.4.1. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE VALORACIÓN

Se utilizaron placas de 90 x 20 mm estériles y con la ayuda de una pipeta estéril se agregó 21 mL de Agar Tripticasa Soja (TSA) que se encontraba a una temperatura de 45-50°C sobre una superficie plana, se dejó solidificar.

3.4.2. PREPARACIÓN DEL DILUYENTE

Se esterilizó agua destilada utilizando la autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos, se dejó enfriar.

3.4.2. PREPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN, CANTIDAD DE SUSPENSIÓN MICROBIANA, Y CONCENTRACIÓN DEL ESTÁNDAR

- **Cultivo Bacteriano:** Se repicó la cepa de un cultivo de segunda generación a una placa que contenía 15-20 mL de (TSA) solidificado y se incubó por 18 a 24 horas a una temperatura de 30-35 °C.
- **Preparación de suspensión del microorganismo:** Se preparó 3 frascos de 50 mL de Solución Salina Estéril (SSE) y se le adicionó a cada frasco colonias de *Bacillus subtilis*, se agitó fuertemente y se dejó decantar, el sobrenadante se llevó a una Transmitancia de 60, 70 y 80% a una longitud de onda de 600 nm.
- **Cantidad de Suspensión de microorganismo para el inóculo:** De cada suspensión del microorganismo se tomó 0.5 y 1 mL y se agregó a 100 mL de TSA que se encontraba a una temperatura de 45°C se agitó sin formar espuma por separado y se utilizó 4 mL para obtener la capa inóculo.
- **Determinación de la concentración del estándar:** Se pesó cuidadosamente una cantidad aproximada de 16 mg de Amikacina Sulfato estándar, llevándolo a una fiola de 10 mL; se añadió una cantidad de 5 mL de diluyente se agitó y se enrasó luego se realizó diluciones para obtener concentraciones de 1, 10, 15 ug/mL.

3.4.3. PREPARACIÓN DE LA CAPA INÓCULO

Sobre la capa base se agregó 4 mL del inóculo con movimientos de atrás hacia delante formando una película homogénea de inóculo.

3.4.4. RECEPTÁCULOS DE VALORACIÓN

Se utilizó cilindros de acero inoxidable con las siguientes características:

- Diámetro externo : 8 mm.
- Diámetro interno : 6 mm.
- Altura : 10 mm.

3.4.5. DISEÑO DE VALORACIÓN

Se colocó los cilindros y se realizó la valoración agregando 100 uL de los estándares que se enfrentan con el estándar del punto medio (S3) siguiendo el siguiente esquema:

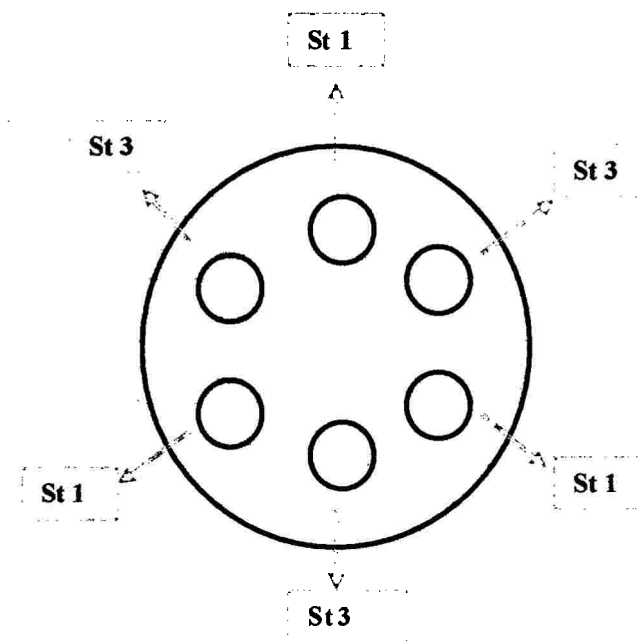


Gráfico N° 02: Diagrama de Diseño de Valoración

Se dio un tiempo de difusión de 1 hora antes de incubar las placas,

Se llevó a incubación a una temperatura de $36 \pm 2^\circ\text{C}$ por un periodo de 16 horas.

Culminado el periodo de incubación se realizó las lecturas de los halos de inhibición, retirando los cilindros.

Los cálculos se realizan por el Método de Diseño de Curva de Valoración.

3.5. DISEÑO METODOLÓGICO

3.4.2. ESPECIFICIDAD – SELECTIVIDAD

- **Preparación del Estándar**

Se pesó cuidadosamente una cantidad aproximada de 16 mg de Amikacina Sulfato estándar llevándolo a una fiola de 10 mL, se añadió una cantidad de diluyente se agitó cuidadosamente, y se enrasó con diluyente.

Finalmente se procedió a tomar 500 uL y se llevó a una fiola de 50 mL y se enrasó con diluyente, para finalmente obtener una concentración conocida de aproximadamente 10 ug/mL y se procedió a agitar, se realizó la valoración por triplicado.

- **Preparación de la muestra**

Se tomó cuidadosamente 5 mL de solución de inyectable de Amikacina Sulfato llevándola a una fiola de 50 mL, se añadió una cantidad de diluyente se agitó cuidadosamente, y se enrasó con diluyente.

Se procedió a tomar 1 mL y se llevó a una fiola de 25 mL y se enrasó con diluyente, para luego tomar 1 mL de esta solución y se llevo a una fiola de 100 mL y se enrasó con diluyente para finalmente obtener una concentración conocida de 10 ug/mL se procedió a agitar, la valoración se realizó por triplicado.

- **Interferencia**

Se utilizó el diluyente y se procedió a realizar la valoración.

- Se sembró 100 uL del estándar, muestra y diluyente.

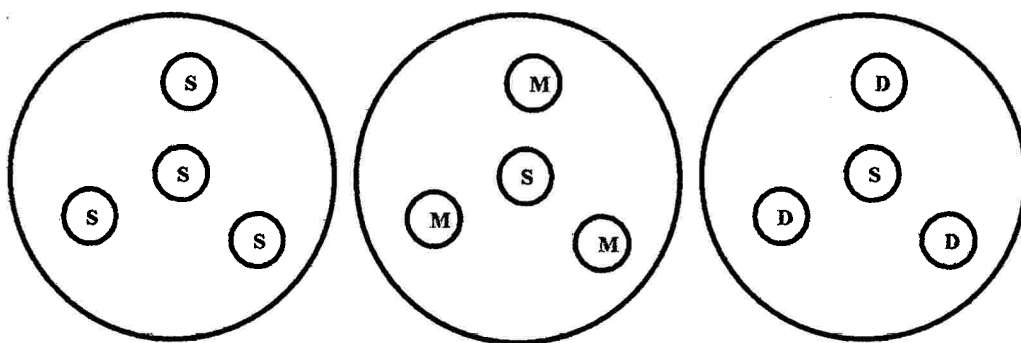


Gráfico N° 03: Diseño de Valoración para la especificidad-selectividad.

3.4.3. LINEALIDAD

A. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para el estudio de la linealidad del sistema se preparó una curva de calibración con un intervalo de concentración de 6.4 hasta 15.6 ug/mL que incluyó 8 niveles de concentraciones diferentes (6.4, 8, 9, 10, 11, 12, 12.5 y 15.6 ug/mL) del estándar de referencia secundario de Amikacina Sulfato, estos niveles contiene el intervalo establecido 80, 90, 100, 110, 120 % incluyendo tres puntos extras de 64, 125 y 156%.

Se preparó tres soluciones de estándares madre pesando aproximadamente 16 mg y se colocó en una fiola de 10 mL para cada una, se realizó diluciones para obtener las concentraciones descritas en el párrafo anterior.

El análisis se realizó por triplicado en cada concentración

B. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para el estudio de la linealidad del método se preparó tres concentraciones de la muestra 80, 100, 120 % con una concentración final de 8, 10, 12 ug/mL respectivamente.

Se preparó realizando una mezcla de 10 ampollas y tomando 2 mL que se colocó a una fiola de 100 mL se agregó diluyente, se agitó y enrasó con diluyente, y se realizó diluciones para obtener las concentraciones arriba mencionadas.

El análisis se realizó por triplicado en cada concentración.

3.4.4. EXACTITUD

Para la determinación de este parámetro se utilizó el Método de Adición de Patrón o Estándar de Referencia. Para lo cual se utilizó tres muestras diferentes, realizando una curva.

- **Preparación del estándar:** Se pesó aproximadamente 16 mg y se colocó en una fiola de 10 mL, y se realizaron diluciones en una proporción de 1:25 obteniendo cinco concentraciones siendo el punto medio el estándar que tuvo una concentración de 10 ug/mL
- **Solución de Muestra al 100 %:** Esta concentración se preparó tomando 5 mL de muestra y llevándola a una fiola de 50 mL, y se diluyó hasta obtener una concentración de 10 ug/mL, y se procedió con la valoración. Este procedimiento se realizó por triplicado y se realizó tres determinaciones de cada uno.
- **Solución de Muestra al 125 %:** Esta concentración se preparó tomando 5 mL de muestra y llevándola a una fiola de 50 mL, se realizaron dos diluciones consecutivas: 1/25 y 1/50 a esta última dilución se agregó 2.5 ug de estándar y se enrasó con diluyente obteniéndose una concentración final de 12.5 ug/mL. Este procedimiento se realizó por triplicado y se realizó tres determinaciones de cada uno.

- **Solución de Muestra al 150 %:** Esta concentración se preparó tomando 5 mL de muestra y llevándola a una fiola de 50 mL, se realizaron dos diluciones consecutivas: 1/25 y 1/50 a esta última dilución se agregó 5 ug de estándar y se enrasó con diluyente obteniéndose una concentración final de 15 ug/mL. Este procedimiento se realizó por triplicado y se realizó tres determinaciones de cada uno.

Se realiza la valoración siguiendo la Fig. N° 02: Diagrama de valoración, para cada concentración de estándar y muestras.

3.4.5. PRECISIÓN

Para la determinación de este parámetro se evaluó:

A. REPETIBILIDAD

Se preparó la muestra al 100 % de concentración.

- **Preparación del estándar:** Se pesó aproximadamente 16 mg y se colocó en una fiola de 10 mL, y se realizaron diluciones en una proporción de 1:1.25 obteniendo cinco concentraciones siendo el punto medio el estándar que tuvo una concentración de 10 ug/mL

- **Solución de Muestra:** Se preparó tomando 5 mL de muestra y llevándola a una fiola de 50 mL, y se diluyó hasta obtener una concentración de 10 ug/mL, y se procedió con la valoración.

Se realizó nueve determinaciones.

B. PRECISIÓN INTERMEDIA

Se preparó la muestra al 100 % de concentración por dos analistas diferentes en días diferentes.

- **Preparación del estándar:** Se pesó aproximadamente 16 mg y se colocó en una fiola de 10 mL , y se realizaron diluciones en una proporción de 1:1.25 obteniendo cinco concentraciones siendo el punto medio el estándar que tuvo una concentración de 10 ug/mL

- **Solución de Muestra:** Se preparó tomando 5 mL de muestra y llevándola a una fiola de 50 mL, y se diluyó hasta obtener una concentración de 10 ug/mL, y se procedió con la valoración.

Cada analista realizó nueve determinaciones en tres días diferentes regularmente.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.6.1. LINEALIDAD

Para la determinación de la linealidad se realizó el cálculo de la recta de regresión lineal:

Utilizando la ecuación de la Recta:

$$y = bx + a$$

- x :** Concentración de analito.
- y :** Halo de inhibición.
- b :** Pendiente de la recta
- a :** Valor del intercepto con el eje "y".

De donde "b" se obtiene:

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

Y "a" se obtiene:

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Para determinar la linealidad de la técnica se realizó diferentes tratamientos estadísticos de acuerdo a las exigencias de la bibliografía:

- **Análisis del coeficiente de correlación "r":**

El coeficiente de correlación "r" refleja el grado de relación o ligazón existente entre las variables X (concentración) e Y (respuesta). Si es cercano a la unidad significa que existe una correlación con una probabilidad elevada.

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

El coeficiente de determinación r^2 : indica la proporción de la varianza total de "Y".

El test de hipótesis para el coeficiente de regresión "r":

H_0 : r es igual a 0 entonces no hay correlación x e y

H_1 : r es diferente a 0 hay correlación entre x e y.

$$t_{exp} = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Criterio de aceptación: Si el valor de "t" experimental es mayor que el "t" de tabla, para (n - 2) grados de libertad y un nivel de significancia del 95% (probabilidad $\alpha = 0.05$), entonces existe una correlación lineal significativa entre X e Y ($r \neq 0$), por lo tanto se rechaza la hipótesis nula.

- **Análisis de linealidad de la pendiente "b":**

Se realizó el análisis estadístico de la pendiente con un test de linealidad de la pendiente utilizando el **t Student** para demostrar que "b" es diferente de cero:

Se determinó primeramente la varianza del error experimental: S^2_{yx}

$$S^2_{yx} = \frac{\sum y^2 - a \cdot \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

La varianza de la pendiente: S^2_b

$$S^2_b = \frac{S^2_{yx}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Y los límites de confianza de pendiente se calcularon con:

$$b \pm t_{tab} \cdot S_b$$

"t de tabla" para G.L (n - 2); $\alpha = 0.05$.

El test de hipótesis para la pendiente "b":

H_0 : b es igual a 0, entonces la recta es paralela al eje de las abscisas.

H_1 : b es diferente a 0, entonces la recta no es paralela al eje de las abscisas.

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

Criterio de aceptación: $t_{exp} > t_{tab}$ para $\alpha = 0.05$ y $(n - 2)$ grados de libertad, indicando la que "b" es diferente de cero y rechazando la hipótesis nula H_0 .

• **Análisis de linealidad del termino independiente "a":**

Se realizó la significación estadística de la varianza del termino independiente "a" utilizando el **t de Student** para demostrar que "a" no es significativamente diferente de cero:

La varianza del intercepto "a": S_a^2

$$S_a^2 = S_b^2 \frac{\sum x^2}{n}$$

Y los limites de confianza:

$$a \pm t_{tab} \cdot S_a$$

"t de tabla" para G.L $(n - 2)$; $\alpha = 0.05$.

Si los limites no incluyen el 0 el método analítico presenta sesgo es decir no cumple la condición de proporcionalidad.

El test de hipótesis para el termino independiente "a":

H_0 : a es igual a 0, entonces la recta pasa por el origen de las coordenadas.

H_1 : a es diferente a 0, entonces la recta no pasa por el origen de las coordenadas.

$$t_{exp} = \frac{|a|}{s_a}$$

Criterio de aceptación: $t_{exp} < t_{tab}$ para $\alpha = 0.05$ y $(n - 2)$ grados de libertad, indicando que "a" no es significativamente diferente de cero y se acepta la hipótesis nula H_0 .

- **Análisis de la Linealidad de los factores:**

En una calibración lineal los factores (f) de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente, coeficientes de variación superiores al 5% indican falta de linealidad.

Donde:

$$f = \frac{Y}{X}$$

Desviación estándar de f = S_f

Coefficiente de variación de f = S_f / f

Planteamiento de la **Hipótesis**:

H_0 : las varianzas son semejantes

H_1 : las varianzas son diferentes.

Se utilizó el **Test de Cochran** para analizar las variaciones entre las varianzas del factor de linealidad.

$$G_{exp} = \frac{S^2_{max}}{S^2_1 + S^2_2 + \dots + S^2_k}$$

G tabla: para $\alpha = 0.05$; K= niveles; n = repeticiones por cada nivel.

Criterio de aceptación: $G_{exp} < G_{tabla}$, se acepta la H_0 , para un nivel de confianza del 95 %, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

3.6.2. EXACTITUD

Para la evaluación estadística de la exactitud se trabajó en base al porcentaje de Recuperación (%R):

- **Análisis de las Varianzas “s”:**

Se utilizó el **Test de Cochram** para analizar las variaciones entre las variancias del factor concentración.

$$G_{exp} = \frac{S^2_{max}}{S^2_1 + S^2_2 + \dots + S^2_k}$$

G tabla: para $\alpha = 0.05$; K= niveles; n = repeticiones por cada nivel.

Criterio de aceptación: $G_{exp} < G_{tabla}$, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

- **Análisis del porcentaje de Recuperación “%R”:**

Estadísticamente se determinó mediante la aplicación del **t de Student**

H_0 : existe diferencia entre la recuperación media y 100

H_1 : no existe diferencia entre la recuperación media y 100

$$t_{exp} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{DSR}$$

Dónde:

R : Porcentaje de recuperación promedio.

n : Número de datos o mediciones.

DSR : desviación estándar relativa del total de mediciones.

Criterio de aceptación: $t_{exp} < t_{tab}$ para $\alpha = 0.05$ y $(n - 1)$ grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula H_0 .

- **Determinación del sesgo o error sistemático:**

$$\%E = \frac{b}{\text{Valor de Referencia}} \times 100$$

Dónde:

b : sesgo $b = |100 - \%Recuperación|$

Criterio de aceptación: Inferior al 3%.

3.6.3. PRECISIÓN:

La evaluación estadística de la precisión se realizó de la siguiente manera:

- **Expresión matemática:**

La precisión se expresa matemáticamente, calculando la dispersión de los datos respecto a la media:

Desviación estándar: s

Desviación estándar relativa **DSR**, o coeficiente de Variación **CV**

IV. RESULTADOS

Cuadro N° 02: Determinación de la concentración del estándar, cantidad y concentración de suspensión bacteriana. Laboratorio de Control de Calidad-UPCH. Lima 2010.

ug/mL st	%TSusp. Bacteriana	mLdeSusp. Bacteriana/1 00mLmedio	Halos de inhibición		
			1	2	3
1	60	0,5	-----	-----	-----
		1	-----	-----	-----
	70	0,5	-----	-----	-----
		1	-----	-----	-----
	80	0,5	-----	-----	-----
		1	-----	-----	-----
10	60	0,5	12,00	14,50	13,85
		1	13,95	13,45	15,00
	70	0,5	13,95	12,85	14,00
		1	14,10	13,85	13,75
	80	0,5	15,00	14,75	14,15
		1	14,75	14,10	13,50
15	60	0,5	15,95	16,00	16,15
		1	16,20	15,35	15,35
	70	0,5	15,95	16,00	16,25
		1	16,05	15,25	15,95
	80	0,5	16,25	16,35	16,70
		1	16,45	16,25	16,40

Cuadro N° 03: Halos de inhibición (mm) para la evaluación de la Especificidad del Método Analítico. Laboratorio de Control de Calidad- UPCH. Lima 2010.

Número de Muestras	Halos de Inhibición (mm)				
	Estándar 10 ug/mL	Muestra 10 ug/mL	Diluyente	Placebo	Especificación*
1	13,20	13,00	0	0	Conforme
2	13,25	13,25	0	0	Conforme
3	13,20	13,15	0	0	Conforme

* El diluyente y placebo no debe produce Halo de Inhibición

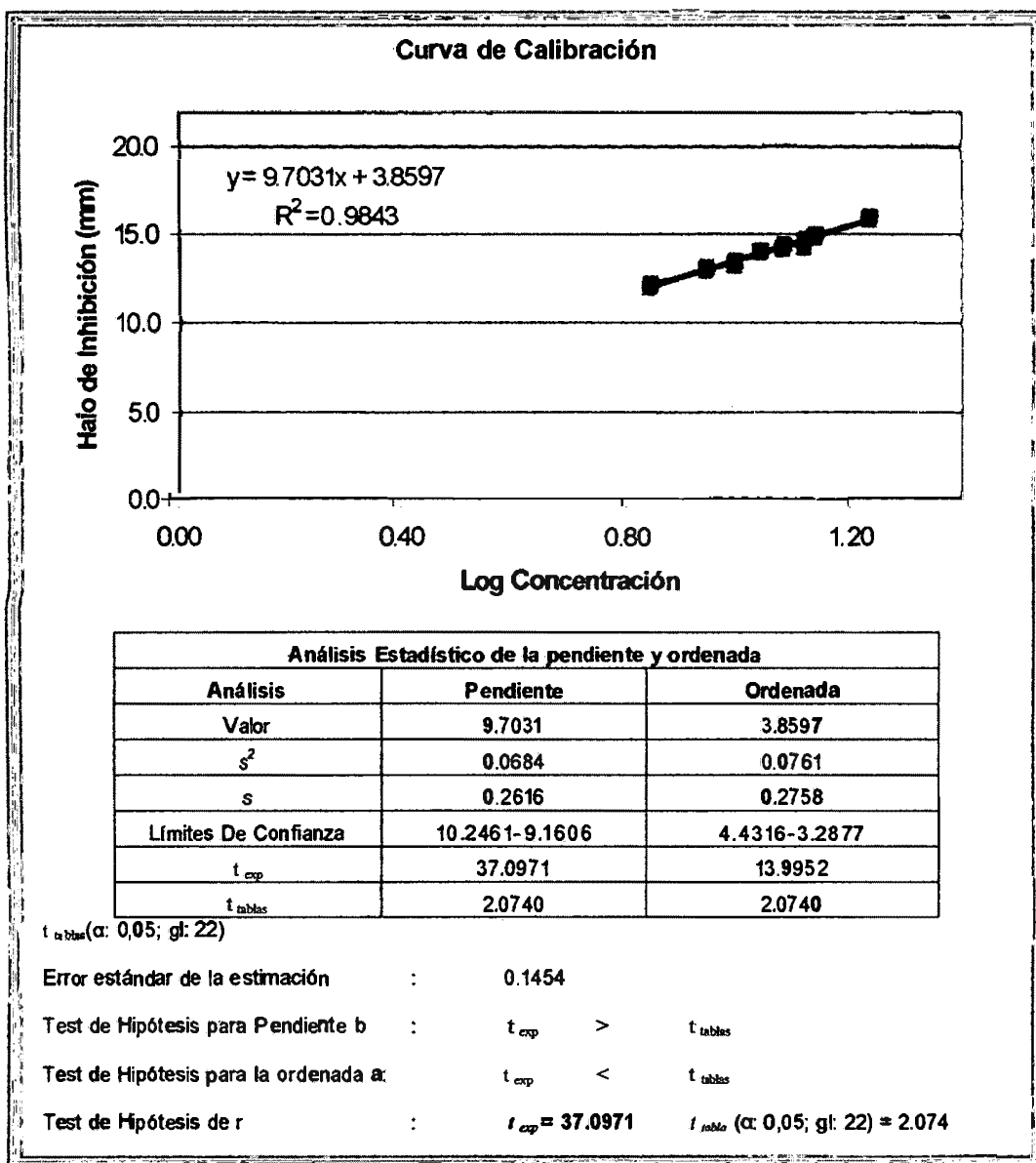


Gráfico N° 04: Curva de Regresión lineal y análisis estadístico de la ecuación de la recta de las soluciones estándar de Amikacina en el rango 64% - 156% para la evaluación de la linealidad del sistema. Laboratorio de Control de Calidad-UPCH. Lima 2010.

Cuadro N° 04: Variabilidad de los factores de respuesta de las soluciones estándar de Amikacina en el rango de 64 - 156% para evaluar la linealidad del sistema. Laboratorio de Control de Calidad- UPCH. Lima 2010.

%	Dato	X (Concentración ug/mL)	Y Halos (mm)	Factor "P" Y/X	PROMEDIO	S	S ²
64	1	0.844291	12.028	14.246	14.3602	0.1266	0.01603
	2	0.844291	12.106	14.3381			
	3	0.846955	12.278	14.4964			
80	1	0.941213	12.972	13.7824	13.8443	0.0633	0.00400
	2	0.941213	13.028	13.8415			
	3	0.943841	13.128	13.9089			
90	1	0.992377	13.294	13.3966	13.4797	0.1160	0.01346
	2	0.992377	13.328	13.4302			
	3	0.995021	13.544	13.6122			
100	1	1.038103	13.950	13.4377	13.4667	0.0409	0.0017
	2	1.038103	13.963	13.451			
	3	1.040761	14.065	13.5142			
110	1	1.079507	14.244	13.1953	13.2428	0.1100	0.0121
	2	1.079507	14.211	13.1644			
	3	1.082139	14.467	13.3686			
120	1	1.117304	14.278	12.7788	12.9789	0.1808	0.0327
	2	1.117304	14.556	13.0274			
	3	1.119948	14.706	13.1306			
125	1	1.135037	14.806	13.0441	13.1253	0.0728	0.00530
	2	1.135037	14.922	13.1469			
	3	1.137671	15.000	13.1848			
156	1	1.231240	15.850	12.8732	12.9511	0.0725	0.00526
	2	1.231240	15.961	12.9634			
	3	1.233884	16.061	13.0167			
Promedio f				13.431			
Desviación estándar (s) f				0.4656			
Coefficiente de variación (C.V.) f				3.4663			
G_{exp}				0.3612			

$G_{\text{tabla}}(\alpha: 0.05; k: 8; n: 3) = 0.515$

Especificación Test de Cochran: $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$

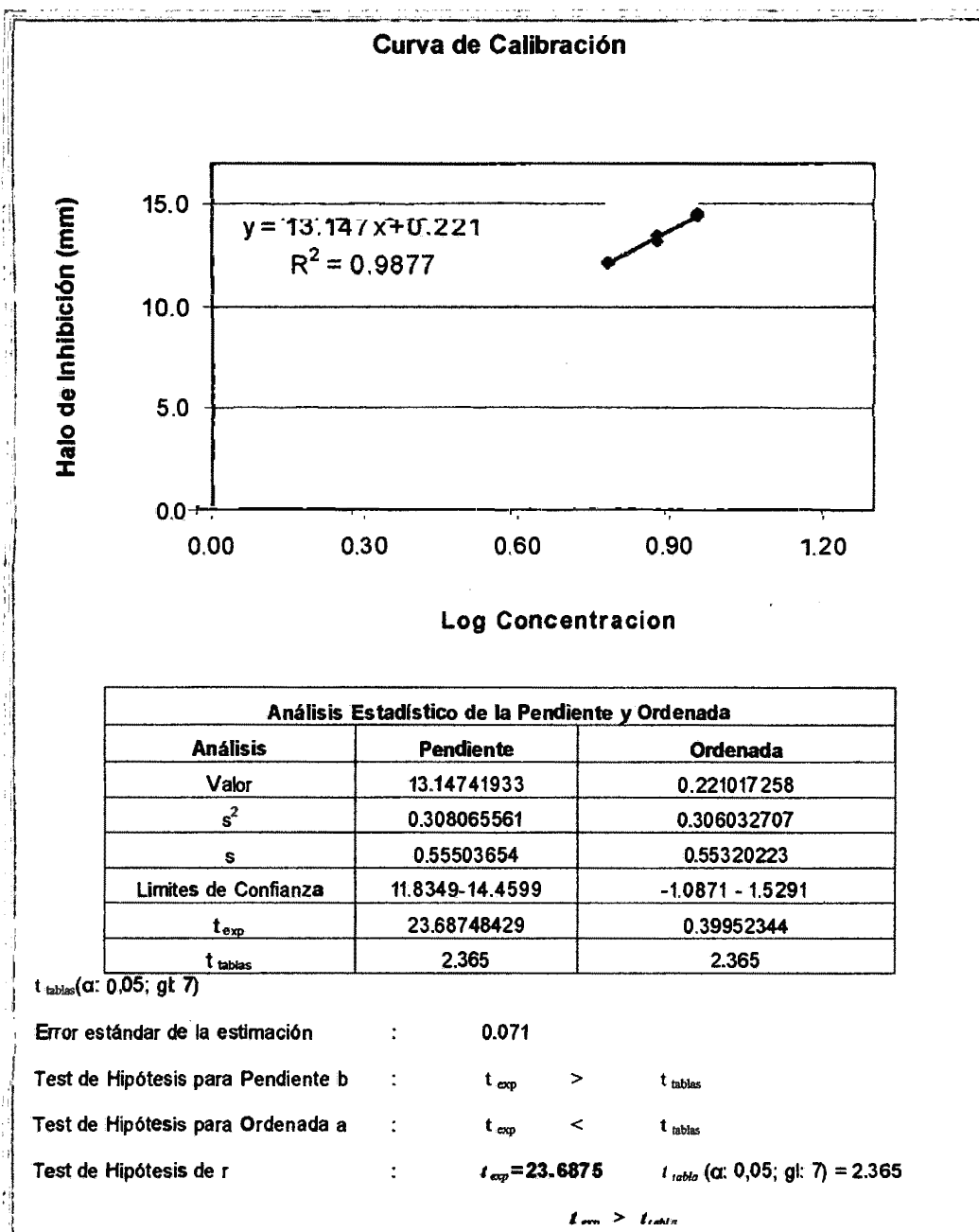


Gráfico N° 05: Curva de Regresión lineal y análisis estadístico de la ecuación de la recta de las soluciones de la muestra de Amikacina en el rango 80 - 120%, para la evaluación de la linealidad del método. Laboratorio de Control de Calidad- UPCH. Lima 2010.

Cuadro N° 05: Variabilidad de los factores de respuesta de las soluciones de la muestra de Amikacina en el rango de 80 - 120% para evaluar la linealidad.

Laboratorio de Control de Calidad- UPCH. Lima 2010

%	Dato	X (Concentración ug/mL)	Y Halos (mm)	Factorf Y/X	Promedio	s	s ²
80	1	0.903	12.106	13.4046	13.4272	0.0391	0.0015
	2	0.903	12.167	13.4723			
	3	0.903	12.106	13.4046			
100	1	1.000	13.211	13.2111	13.2981	0.1804	0.0325
	2	1.000	13.506	13.5056			
	3	1.000	13.178	13.1778			
120	1	1.079	14.528	13.4619	13.3881	0.0679	0.0046
	2	1.079	14.383	13.3281			
	3	1.079	14.433	13.3743			
Promediof				13.3711			
Desviación estándar (s) f				0.1138			
Coefficiente de variación (C.V.) f				0.8512			
G_{exp}				0.8411			

$G_{tabla} (\alpha: 0.05; k: 3; n: 3) = 0.870$

Especificación Test de Cochram: $G_{exp} < G_{tabla}$

Cuadro N° 06: Varianzas de la cantidad recuperada en función a la cantidad añadida de Amikacina, para la determinación de la exactitud. Laboratorio de Control de Calidad- UPCH. Lima 2010.

Soluciones	Concentración %	Test de Igualdad de Varianzas											Análisis estadístico			
		Cantidad Añadida			Cantidad Hallada			Promedio	s	s ²	G _{exp}					
		N° Muestras			N° Muestras											
1	2	3	1	2	3	1	2	3								
Sol. Madre 1	100	0	0	0	0.041	0.084	0.071	0.065	0.022050	0.000486	0.03631					
	125	2.444	2.444	2.444	2.440	2.480	2.463	2.461	0.020070	0.000403						
	150	4.991	4.991	4.991	4.963	4.924	4.963	4.950	0.022520	0.000507						
Sol. Madre 2	100	0	0	0	0.150	0.047	0.084	0.094	0.052176	0.002722	0.57580					
	125	2.530	2.530	2.530	2.665	2.555	2.549	2.590	0.065310	0.004265						
	150	4.958	4.958	4.958	4.938	4.948	4.909	4.932	0.020257	0.000410						
Sol. Madre 3	100	0	0	0	0.104	0.038	0.015	0.052	0.046199	0.002134	0.57950					
	125	2.531	2.531	2.531	2.530	2.449	2.547	2.509	0.052367	0.002742						
	150	4.958	4.958	4.958	5.002	5.936	4.928	4.968	0.083680	0.007002						

G_{tablas} (α=0.05; k=3; n=3): 0.870

Especificación Test de Cochram: G_{exp} < G_{tabla}

Cuadro N° 07: Porcentaje de analito recuperado en función de la cantidad agregada del analito de Amikacina, para la determinación de la exactitud. Laboratorio de Control de Calidad- UPCH. Lima 2010.

Soluciones	% Real	% de Recuperación			Promedio	Desviación estándar (s)	Coeficiente de Variación (C.V.)	Test Student t
		N° Muestras						
		1	2	3				
Sol. Madre 1	100	100.41	100.84	100.71	100.17	0.47	0.46	1.0886
	125	99.97	100.27	100.15				
	150	99.81	98.55	99.2				
Sol. Madre 2	100	101.55	100.47	100.84	100.41	0.57	0.56	2.1973
	125	101.08	100.16	100.15				
	150	99.87	99.93	99.67				
Sol. Madre 3	100	101.04	100.38	100.15	100.09	0.4	0.4	0.6992
	125	100.21	99.75	100.13				
	150	99.62	100.24	99.32				
Promedio					100.22			
Desviación estándar (s)					0.17			
Coeficiente de Variación (C.V.)					0.17			
% Error					0.22			

$t_{\text{tabla}} (\alpha=0.05; GL=8) = 2.306$

Especificación Test de Hipótesis : $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$

Cuadro N° 08: Porcentaje de analito hallado en el análisis de contenido de las muestras realizadas por los Analistas para evaluar la Repetibilidad para la determinación de la precisión. Laboratorio de Control de Calidad- UPCH. Lima 2010.

		DIA 1
ANALISTA 1	MUESTRA 1	99.15
	MUESTRA2	100.84
	MUESTRA3	100.71
	MUESTRA4	101.55
	MUESTRA5	102.53
	MUESTRA6	100.84
	MUESTRA 7	98.23
	MUESTRA 8	99.75
	MUESTRA 9	100.15
	Promedio	100.42
	Desviación Estándar	1.28
	Coefficiente de Variación	1.27
ANALISTA 2	MUESTRA 1	100.40
	MUESTRA2	102.56
	MUESTRA 3	101.58
	MUESTRA4	99.41
	MUESTRA5	100.75
	MUESTRA6	102.09
	MUESTRA 7	99.65
	MUESTRA8	100.74
	MUESTRA9	101.17
	Promedio	100.93
	Desviación Estándar	1.05
	Coefficiente de Variación	1.04

Cuadro N° 09: Porcentaje de analito hallado en el análisis de contenido de las muestras para evaluar la Precisión Intermedia para la determinación de la precisión del método. Laboratorio de Control de Calidad- UPCH. Lima 2010.

ESTADISTICA ANALISTA	CONCENTRACION EN %			ESTADISTICA POR DIA		
	D 1	D 2	D 3	PROMEDIO	s	C.V
ANALISTA 1	100.42	99.30	98.95	99.56	0.77	0.77
ANALISTA2	100.93	99.12	101.17	100.41	1.12	1.12
X	100.68	99.21	100.06	ESTADISTICA GENERAL	X	99.98
s	0.36	0.13	1.57		s	0.98
C.V	0.36	0.13	1.57		CV	0.98

V. DISCUSION

En el Cuadro N° 02 observamos la concentración de la suspensión de microorganismos, se encuentra en un rango de 70 +/- 10 % de trasmitancia a una longitud de onda de 600 nm, y la cantidad agregada de suspensión fue de 1 mL por cada 100 mL de Agar Tripticasa. Ya que se obtuvo un buen crecimiento con el estándar a una concentración de 10 ug/mL obteniendo halos de inhibición de 12-16 mm encontrándose entre los valores recomendados por la USP-32 (2009).

Evaluando el Cuadro N° 03 y el Gráfico N° 09 (Anexo 4) observamos la presencia de halo de inhibición del estándar en el medio de la placa, y la ausencia de halo de inhibición del diluyente y placebo, indicando que estos no ejercen una actividad antimicrobiana, que influya en los resultados.

El Cuadro N° 10 (Anexo 5) nos muestra las concentraciones y halos de inhibición con los cuales se elaboró la curva de regresión lineal para la linealidad del sistema en un rango de 6.4 ug/mL – 15.6 ug/mL (64% - 156%), mostrándose la curva en el Gráfico N° 04, obteniendo la ecuación de la recta $Y = 3.8597 + 9.7030X$, la regresión lineal es el diseño del modelo matemático, representado como una ecuación, que permite establecer o simular el comportamiento de la variable dependiente con respecto a la variable independiente, en donde se tiene

un Coeficiente de Correlación “r” de **0.9921** y el Coeficiente de Determinación “r²” de **0.9843**, este último es nuestro índice estadístico que mide la relación lineal entre nuestras dos variables cuantitativas, el coeficiente de correlación es cercano a uno existiendo una correlación positiva casi perfecta cumpliendo lo indicado en la USP 32 (2009), al igual que Quattrochi (1992) los documentos de la ICH (2008) y la AEFI (2001) indican que no es suficiente determinar dicho índice, si no recomiendan realizar el análisis de un test estadístico, para lo cual se realizó el Test Student, obteniéndose para el coeficiente de correlación un $t_{exp} = 37.0971$ que viene a ser mayor que el $t_{tabla} = 2.074$ para 22 grados de libertad y una probabilidad de 0.05, rechazando la Ho: r es igual a 0 entonces no hay correlación x e y. esto nos indica que el coeficiente de correlación diferente de cero, por lo tanto existe una correlación entre las variables.

La AEFI 2001 recomienda para la evaluación de la linealidad realizar un análisis estadístico a la pendiente, ordenada, y los factores de respuesta, el Gráfico N° 04 también nos muestra el resumen de variabilidad de la pendiente y la ordenada en el rango 6.4 ug/mL – 15.6 ug/mL (64% - 156%), mediante un análisis de Regresión - Análisis de varianza, obteniéndose para la pendiente “b” un $t_{exp} = 37.0971$ que es mayor que el $t_{tablas} = 2.0740$, para 22 grados de libertad y una probabilidad de 0.05, rechazando H₀: b es igual a 0, entonces la recta es paralela al eje de las abscisas. También nos presenta los límites de confianza para la pendiente **10.2461 - 9.1606** que no incluyen a el cero, y el test para la ordenada $t_{exp} = 13.9952$ que es mayor que el $t_{tablas} = 2.0740$, rechazando la Ho: a es igual a 0, entonces la recta pasa por el origen de las coordenadas, este resultado indica que la ordenada no pasa por el eje de las abscisas, y se entiende que existe un error sistemático, que para validaciones de métodos microbiológicos no es significativo, (AEFI, 2001). El Cuadro N° 04

nos presenta la Variabilidad de los factores de respuesta de las soluciones estándar de Amikacina en el rango de 6.4 ug/mL – 15.6 ug/mL (64% - 156%), teniendo un coeficiente de variación de **3,4663 %**, que para validaciones de métodos microbiológicos está dentro de los criterios de aceptación que es menor a 5%, ya que valores superiores serian indicativos de una posible falta de linealidad (AEFI, 2001), en comparación con las validaciones de métodos físicos químicos cuyo criterio de aceptación son menores del 2% (USP 32, 2009), se realizó un test estadístico (Test de Cochran) para evaluar la homogeneidad de las varianzas y determinar si el factor de concentración tiene influencia en los resultados, obteniendo $G_{exp} = 0.3612$ en comparación con el $G_{tabla} (\alpha: 0.05; k: 8; n: 3) = 0.515$, en donde G_{exp} es menor G_{tabla} , aceptando la H_0 : las varianzas son semejantes.

El Cuadro Nº 11 (Anexo 6) nos muestra las concentraciones y halos de inhibición con los cuales se elaboró la curva de regresión lineal para la linealidad del método en un rango de 8 ug/mL–12 ug/mL (80%-120%), mostrándose la curva en el Gráfico Nº 05, obteniendo la ecuación de la recta $Y = 0.2210 + 13.1474X$, la regresión lineal es el diseño del modelo matemático, representado como una ecuación, que permite establecer o simular el comportamiento de la variable dependiente con respecto a la variable independiente, en la cual se obtuvieron: Coeficiente de Correlación “r” **0.9938** y el Coeficiente de Determinación “ r^2 ” de **0.9877**, este último es nuestro índice estadístico que mide la relación lineal entre nuestras dos variables cuantitativas, el coeficiente de correlación es cercano a uno existiendo una correlación positiva casi perfecta cumpliendo lo indicado en la USP 32, 2009, según los documentos de la ICH (2008) y la AEFI (2001) no es suficiente determinar dicho índice, si no recomiendan realizar el análisis de un test estadístico, para lo cual se realizó el Test Student, obteniéndose para el

coeficiente de correlación un $t_{exp} = 23.6875$ que viene a ser mayor que el $t_{tabla} = 2.365$ con un nivel de confianza de 95%, rechazando la H_0 : r es igual a 0 entonces no hay correlación x e y . esto nos indica que el coeficiente de correlación es diferente de cero, por lo tanto existe una correlación entre las variables. El análisis estadístico, mediante un análisis de Regresión - Análisis de varianza, se obtuvo para la pendiente "b" un $t_{exp} = 23.6874$ que es mayor que el $t_{tablas} = 2.365$, con un nivel de confianza de 95%, rechazando H_0 : b es igual a 0, entonces la recta es paralela al eje de las abscisas. También nos presenta los límites de confianza para la pendiente **11.8349-14.4599** que no incluyen a el cero, y el test para la ordenada $t_{exp} = 0.3995$ que es menor que el $t_{tablas} = 2.365$, aceptando la H_0 : a es igual a 0, entonces la recta pasa por el origen de las coordenadas, este resultado indica que la ordenada pasa por el eje de las abscisas, que en comparación con el resultado obtenido para la ordenada en la linealidad del sistema, se tiene un error sistemático mínimo, esto se debe al intervalo en el cual se desarrolló a linealidad del método, que es de tres puntos, en comparación del intervalo de la linealidad del sistema , cinco puntos, es decir que a mayor puntos en el intervalo, el error sistemático aumenta, ya sea por el comportamiento de los microorganismos a diferentes concentraciones obteniendo respuestas idénticas o iguales (Reyes, 2007). El Cuadro N° 05 nos presenta la Variabilidad de los factores de respuesta de las soluciones de muestra de Amikacina en el rango de 8 ug/mL – 12 ug/mL (80% - 120%), teniendo un coeficiente de variación de **0,8512** %, cumpliendo las especificaciones, menor a 5%, ya que valores superiores serian indicativos de una posible falta de linealidad (AEFI, 2001), se realizó un test estadístico (Test de Cochran) para evaluar la homogeneidad de las varianzas y determinar si el

factor de concentración tiene influencia en los resultados, obteniendo $G_{exp} = 0.8411$ en comparación con el $G_{tabla} (\alpha: 0.05; k: 3; n: 3) = 0.870$, en donde G_{exp} es menor G_{tabla} , aceptando la H_0 : las varianzas son semejantes.

Para la determinación de la exactitud, como forma de medir la dispersión de los datos se determinó la homogeneidad de las varianzas. La varianza es una medida de dispersión que nos permite conocer que tanto se dispersan los datos alrededor de su promedio, o media. Los valores obtenidos en cada uno de los tratamientos para cada solución madre, nos permite identificar la diferencia promedio que hay entre cada uno de los valores respecto a su punto central, en las tres soluciones madres preparadas se obtuvieron dispersiones pequeñas, mostrándose en el Cuadro N° 06 y a partir del estudio de homogeneidad de varianzas por medio del test de Cochran se obtuvieron para cada solución madre analizada, los valores $G_{exp} = 0.3631$, $G_{exp} = 0.5758$, $G_{exp} = 0.5795$ respectivamente para cada solución madre, que son inferiores al de tablas $G_{tablas} (\alpha=0.05; k=3; n=3): 0.870$, es decir que las varianzas son homogéneas La hipótesis de igualdad de varianzas no se rechaza por que el valor G obtenido no es superior al correspondiente valor G dado por la tabla de la prueba de Cochran.

De acuerdo a la prueba t de Student se obtuvieron valores $t_{exp} = 1.0886$, $t_{exp} = 2.1973$, $t_{exp} = 0.6992$, indicados en el Cuadro N° 07, que son menores a $t_{tabla} (\alpha=0.05; GL= 8) = 2.306$, lo que indica que no existe diferencia significativa entre la recuperación de la media obtenida y el 100%, rechazando la H_0 .

La exactitud es la capacidad que tiene el método para generar mediciones que se acerquen al valor verdadero (USP 32, 2009), por esta razón se analizan tres concentraciones diferentes para observar su porcentaje de recuperación en cada una de ellas. El porcentaje de recuperación esperado de acuerdo a la AEFI

(2001), debe encontrarse entre 97-103% con un error relativo \pm 3%. En cada tratamiento de cada solución madre se encontraron porcentajes dentro de lo estimado. Los valores obtenidos del sesgo es error sistemático, que se produce de igual modo en todas las mediciones que se realizan de la magnitud. Esto puede estar originado en un defecto del instrumento, en una particularidad del operador o del proceso de medición, entre otros (AEFI, 2001). Ninguno de los valores obtenidos del %E fueron superiores al 3% lo que indica que se encuentran dentro de los criterios de aceptación.

La precisión obtenida expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre los datos mediciones de halos (mm) de los múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Se evaluó la precisión por medio de la repetibilidad que es la precisión obtenida por un mismo analista en un intervalo de tiempo (mismo día) bajo las mismas condiciones de operación, con una misma muestra homogénea. (Taylor, 1993). Y la precisión intermedia que viene a ser la precisión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas y en diferentes días.

En el Cuadro Nº 08, se muestra los resultados de la evaluación de la repetibilidad para cada analista, obteniendo una desviación estándar “s” de 1,28 y 1,05; y un Coeficiente de Variación “C.V” de 1,28 y 1,04 respectivamente, la desviación estándar obtenida nos indica el grado de dispersión de los datos del valor promedio o de la media. Valores grandes de la desviación estándar indican que los datos están lejos de la media y valores pequeños de la desviación estándar indican que los datos están agrupados cerca de la media (AEFI, 2001). Los valores obtenidos son relativamente pequeños indicando que existe una agrupación de datos muy cercana a la media, la desviación estándar en cada grupo (cuadro) nos indica la precisión de estas, ya que nos indican que tan lejos están del valor real o media al ser realizado por diferentes analistas. Las

desviaciones estándar obtenidas fueron de valores pequeños lo que indicó que no se observó una diferencia significativa entre cada análisis realizado en un mismo día por un mismo analista.

El Coeficiente de Variación obtenido en ambos Cuadros no fue mayor a 5% cumpliendo con el parámetro establecido.

El Coeficiente de Variación nos indica la relación que existe entre la desviación de una muestra y su media. Al dividir la dispersión típica entre su medias convierte en un valor de unidad de medida. Si comparamos en varios grupos de mediciones, tendrá menor dispersión aquella que tenga menor coeficiente de variación (AEFI, 2001).

En el Cuadro Nº 09 nos muestra la evaluación estadística para la precisión intermedia las Desviaciones Estándar “s” obtenidas son pequeñas, lo cual indicó que no se observó una diferencia significativa entre ambos analistas en días diferentes. Los Coeficientes de Variación son menores al 5% cumpliendo el parámetro establecido.

VI. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló y validó la técnica analítica por el Método Cilindro-Placa para la cuantificación de Amikacina en inyectable.
2. La concentración de suspensión del microorganismo determinada fue 70 +/- 10% de Transmitancia una longitud de onda de 600 nm.
3. El volumen de suspensión bacteriana determinada fue de 1 mL por cada 100 mL de medio de cultivo (Agar Tripticasa).
4. La concentración del estándar determinado fue de 10 ug/mL.
5. La técnica analítica es específica para la determinación de Amikacina por el método de Cilindro Placa obteniendo 0 mm de halo de inhibición para el diluyente y el placebo.
6. La Técnica Analítica por el Método Cilindro-Placa para la cuantificación de Amikacina en inyectable es lineal a la concentración logarítmica de 0.8 – 1.2 (64%-156%), obteniendo un coeficiente de Determinación 0.9843 y 0.9877, Linealidad del sistema y linealidad del método respectivamente, siendo $t_{exp} > t_{tablas}$ para el coeficiente de correlación y la pendiente, y un $t_{exp} < t_{tablas}$ para la ordenada.
7. Se determinó la exactitud de la Técnica Analítica por el Método Cilindro-Placa para la cuantificación de Amikacina en inyectable demostrando un $G_{exp} <$

G_{tablas} en la variabilidad de los promedios de recuperación, y un %Recuperación de 100.17%, 100.41%, 100.09%, para cada Solución, y un $t_{exp} < t_{tablas}$ para cada uno.

8. La Técnica Analítica por el Método Cilindro-Placa para la cuantificación de Amikacina en inyectable es precisa obteniendo valores de Coeficiente de Variación de 1.27 y 1.04 para cada analista, en la evaluación de la Repetibilidad y 0.98 en la evaluación de la Precisión Intermedia.

VII. RECOMENDACIONES

1. Para el correcto desarrollo y validación de la técnica en interés se requiere contar con un ambiente adecuado para evitar contaminaciones e interferencias, al igual que tener los suficientes materiales, debidamente calibrados, y un personal altamente calificado.
2. Realizar específicamente estudios de estabilidad del producto, para observar si la técnica validada es óptima para producto, en presencia de residuos de degradación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **AEFI 2001**, Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria, Validación de Métodos Analíticos – Monografía Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad.
2. **British Pharmacopeia 2000**, Tomo IV, Appendix XIVA, Biological Assay of Antibiotics.
3. **Castro, M. 1999**, Validación de Métodos Analíticos. Comisión de Normas de Buenas Prácticas de Fabricación y de Control de Calidad, 1^{ra} Edición, Editorial sección Catalana-USA.
4. **Compañó, R. (2002)**, Garantía de la Calidad en los Laboratorios Analíticos. 3ra edición, Editorial Síntesis S.A. España.
5. **DIGEMID 1999**, Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. Ministerio de Salud.
6. **García, E. 2001**. “Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos”, Barcelona – España
7. **Goodman & Gilman, 2002**, Bases Farmacológicas de la Terapéutica, tomo I, II, Editorial Medica Panamericana. 10^o Edición, México.
8. **ICH 2008**, International Conference on Harmonization, Q2(R1), Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology.
9. **ICP-PUCCP, 2007**, Instituto de Corrosión y Protección, Curso: Química Analítica y validación de Métodos de Ensayo.
10. **ISO/IEC 17025 2005**, Norma Internacional, Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayos y de Calibración.
11. **Jacques, C.1976**, Microbiología general, 1^{ra} Edición, Editorial Alhambra S.A, España.
12. **Jawetz, E. 1990**, Microbiología Medica, Editorial El Manual Moderno S.A. de CV México.
13. **Leyva, M. 2009**, Desarrollo y Validación de un Método Analítico para la cuantificación por H.P.L.C de Clenbuterol Clorhidrato en solución oral-gotas y análisis comparativo de productos comercializados en el Perú. Tesis para obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
14. **Litter, M. 1992**, Compendio de Farmacología, 4^{ta} Edición, Editorial Ateneo Buenos Aires.

15. **Madigan, M. 2004**, Biología de los microorganismos, 10^{ma} Edición, Editorial Pearson Educación S.A. Madrid.
16. **MEDCICLOPEDIA, 2009**, Vademécum. Diccionario ilustrado de términos médicos. Ciencias Básicas – Farmacología. Amikacina. Disponible en : <http://www.igb.es/cbasicas/farma/farma02/d009k.htm>
17. **Mora, J. 2007**, Implementación y desarrollo de la técnica de Potencia Microbiológica de antibióticos y su impacto económico en la empresa Calox de Costa Rica. S.A., Tesis para optar el Título de Ingeniería en Biotecnología con el Grado Académico de Bachillerato Universitario. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
18. **Prado, C. 2008**, Desarrollo y Validación de la Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H.P.L.C.) para la Determinación de contenido de Ciprofloxacino 3 mg/mL y Dexametasona 1mg/mL, en Suspensión Oftálmica. Tesis para obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
19. **Quattrocchi, O. 1992**, Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, 1^{ra} Edición, Editorial Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires
20. **Rémington 2000**, Farmacia, 20^o Edición, Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires-Argentina.
21. **Reyes, C. 2007**, Procedimientos para la Validación de Métodos Analíticos. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
22. **Taylor, J. 1993**, Validation of Analytical Methods. Analytical Chemistry. Vol. 55. N6.
23. **The Index Merck 2001**, 13^{va} Edición, Editorial Staff. USA.
24. **Soso, A., Rimini A. (2010)**. Protocolo de Validación para Cuantificación. Disponible en : <http://www.sld.cu.com>
25. **UPCH 2004**, Manual de Organizaciones y funciones. Servicio de Control de Calidad. Lima
26. **UPCH 2009**, Curso Internacional, Validación de Métodos Analíticos en Producto Terminado: Ensayos de Control y Estudios de Estabilidad. Lima.
27. **Uriarte, V. 2003**, Farmacología Clínica, Editorial Trilles 1^{ra} Edición, México.
28. **USP 32, 2009**, Farmacopea de los Estados Unidos de América Formulario Nacional (NF27). Impreso en los Estados Unidos de América por United Book Press, Baltimore, Maryland.

29. **Velandia, J. (2008).** Validación del Método Analítico para la cuantificación de Bacitracina en el Laboratorio de Control de Calidad de una Industria Farmacéutica Veterinaria. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para adoptar el Título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia.
30. **Vila, L. 1997,** Tecnología Farmacéutica, vol. II, Editorial Síntesis S.A. España.

ANEXOS

ANEXO1

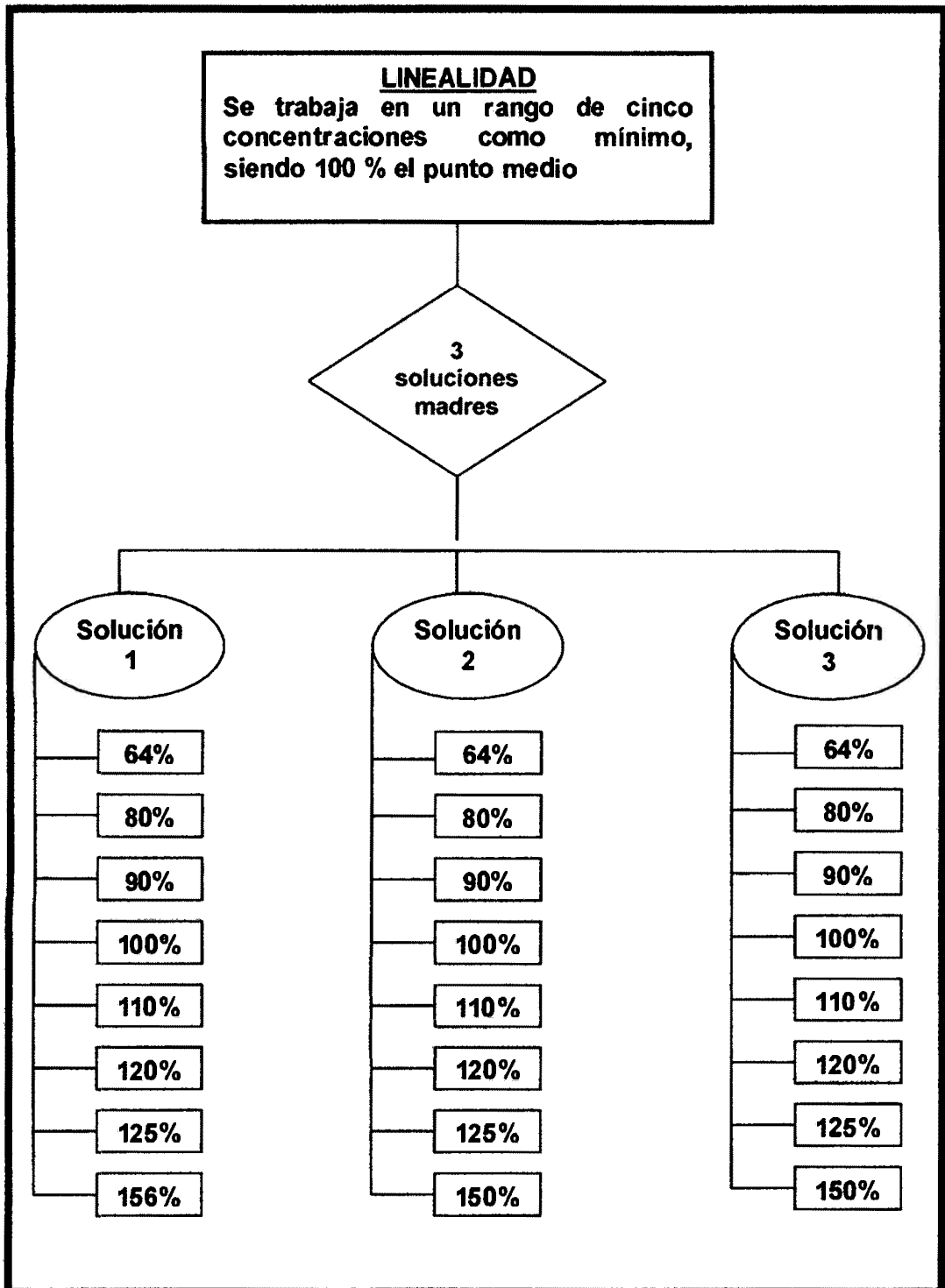


Gráfico N° 06: Diagrama de flujo para la Determinación de la Linealidad

ANEXO2

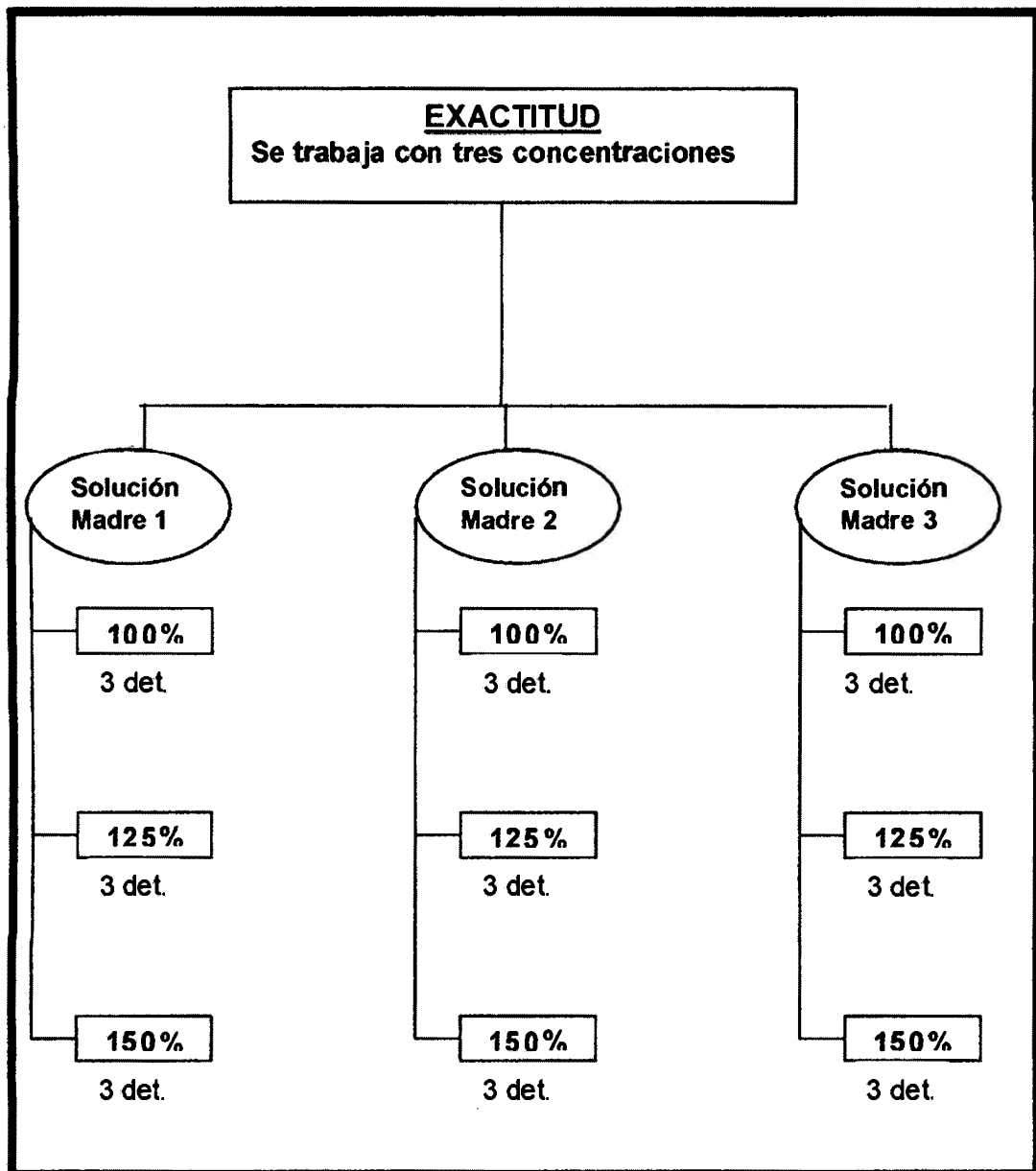


Gráfico N° 07: Diagrama de Flujo para la Determinación de la Exactitud

ANEXO3

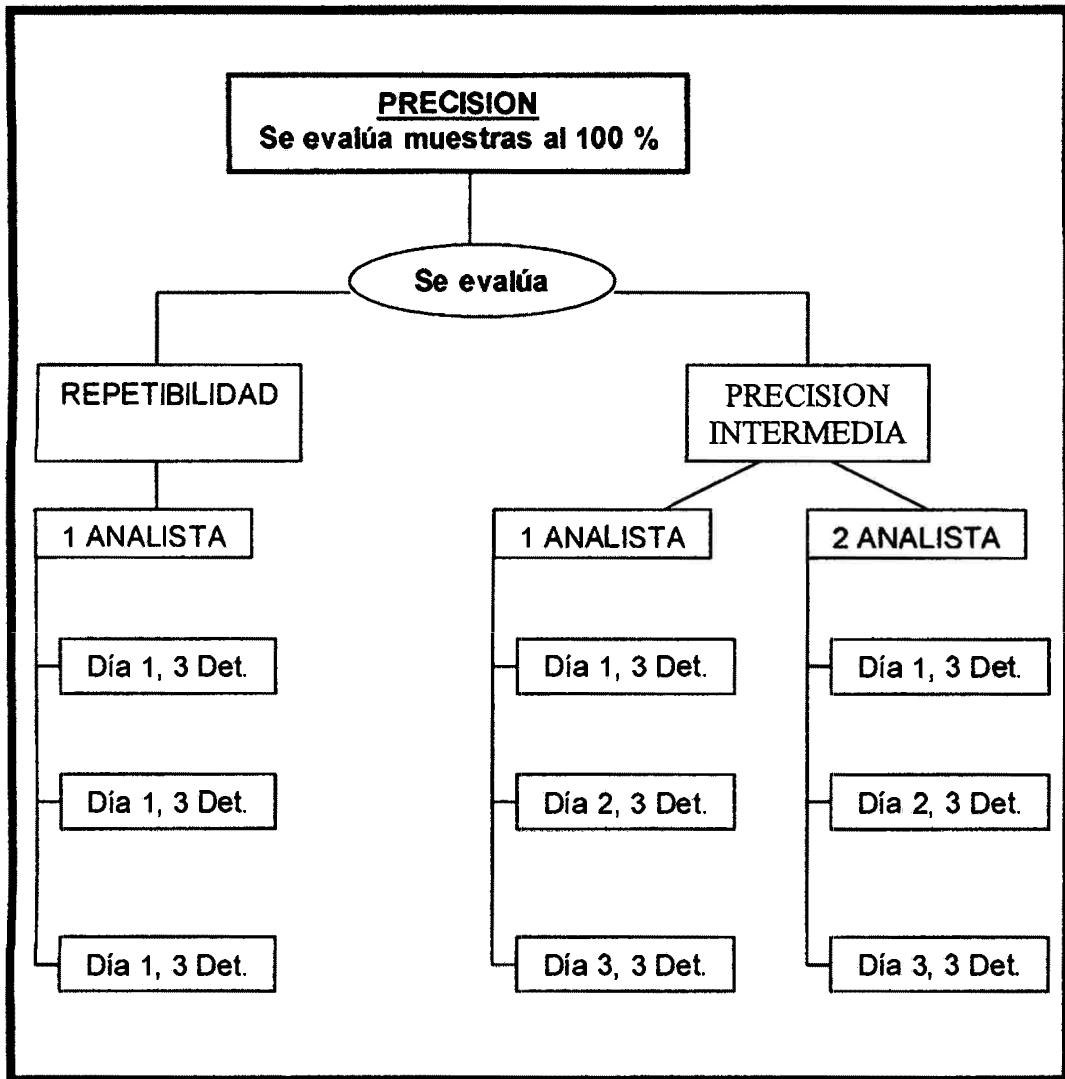


Gráfico N° 08: Diagrama de Flujo para la determinación de la Precisión

ANEXO4

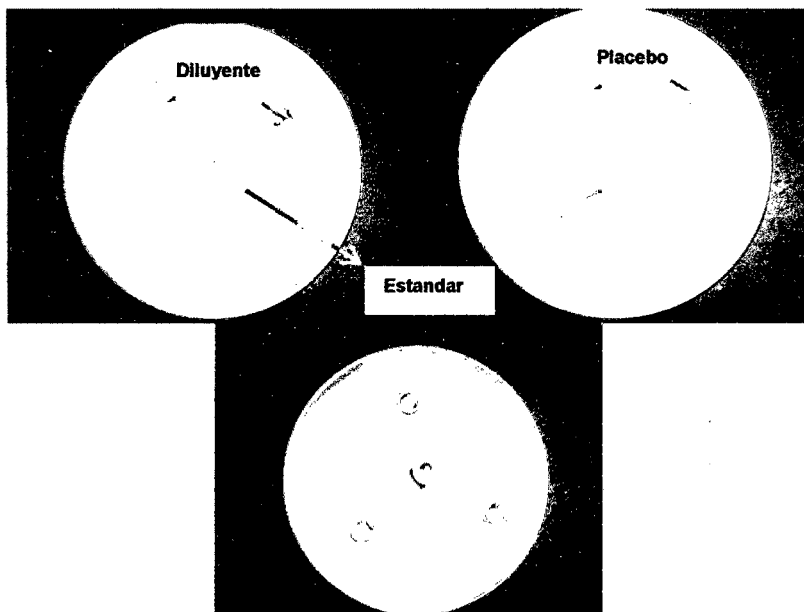


Gráfico N° 09: Halos de Inhibición del diluyente frente al halo de inhibición del estándar. Laboratorio de Control de Calidad-UPCH. Lima 2010

ANEXO5

Cuadro N° 10: Concentraciones y Halos de Inhibición para efectuar la curva de regresión lineal de las soluciones estándar de Amikacina en el rango de 64 - 156%. Laboratorio de Control de Calidad-UPCH. Lima 2010.

S	%	Dato	X(Log Concentración)	Y Halos (mm)	X ²	Y ²	XY
S1	64	1	0.844291	12.028	0.713	144.667	10.155
		2	0.844291	12.106	0.713	146.544	10.221
		3	0.846955	12.278	0.717	150.744	10.399
S2	80	1	0.941213	12.972	0.886	168.279	12.210
		2	0.941213	13.028	0.886	169.723	12.262
		3	0.943841	13.128	0.891	172.339	12.391
S3	90	1	0.992377	13.294	0.985	176.742	13.193
		2	0.992377	13.328	0.985	177.630	13.226
		3	0.995021	13.544	0.990	183.452	13.477
S4	100	1	1.038103	13.950	1.078	194.594	14.481
		2	1.038103	13.963	1.078	194.979	14.496
		3	1.040761	14.065	1.083	197.826	14.638
S5	110	1	1.079507	14.244	1.165	202.904	15.377
		2	1.079507	14.211	1.165	201.956	15.341
		3	1.082139	14.467	1.171	209.284	15.655
S6	120	1	1.117304	14.278	1.248	203.855	15.953
		2	1.117304	14.556	1.248	211.864	16.263
		3	1.119948	14.706	1.254	216.253	16.469
S7	125	1	1.135037	14.806	1.288	219.204	16.805
		2	1.135037	14.922	1.288	222.673	16.937
		3	1.137671	15.000	1.294	225.000	17.065
S8	156	1	1.231240	15.850	1.516	251.223	19.515
		2	1.231240	15.961	1.516	254.757	19.652
		3	1.233884	16.061	1.522	257.959	19.818
SUMATORIA			25.158364	336.745	26.682	4754.452	355.998
PROMEDIO			1.048265	14.031	1.112	198.102	14.833

ANEXO 6

Cuadro N° 11: Concentraciones y Halos de Inhibición para efectuar la curva de regresión lineal de las soluciones de la muestra de Amikacina en el rango de 80 - 120%. Laboratorio de Control de Calidad-UPCH. Lima 2010.

S	%	Dato	X (Concentración ug/mL)	Y Halos (mm)	X ²	Y ²	XY
P1	80	1	0.903	12.089	0.816	146.141	10.917
		2	0.903	12.067	0.816	145.604	10.897
		3	0.903	12.089	0.816	146.141	10.917
P2	100	1	1.000	13.228	1.000	174.974	13.228
		2	1.000	13.239	1.000	175.268	13.239
		3	1.000	13.217	1.000	174.680	13.217
P3	120	1	1.079	14.428	1.165	208.161	15.570
		2	1.079	14.394	1.165	207.200	15.534
		3	1.079	14.372	1.165	206.561	15.510
SUMATORIA			8.947	119.122	8.941	1584.731	119.030
PROMEDIO			0.994	13.236	0.999	176.081	13.226

ANEXO 7

Cuadro N° 12: Datos de los Estándares para la determinación de la Linealidad del Sistema. Laboratorio de Control de Calidad-UPCH. Lima 2010

DATOS DEL ESTANDAR				
Soluciones	Pesomg	Potencia ug/mg	Dilución mL	
1ra Solución	16.4	665.7	10	
2da Solución	16.4			
3ra Solución	16.5			
Estándar	Dilución (uL)	Enrase	Concentración (ug/mL)	Porcentaje
S1	64	100	6.4	64
S2	80	100	8.0	80
S3	90	100	9.0	90
S4	100	100	10.0	100
S5	110	100	11.0	110
S6	120	100	12.0	120
S7	125	100	12.5	125
S8	156	100	15.6	156

ANEXO 8

Cuadro N° 13: Dilución de la Muestra para la determinación de la Linealidad del Método. Laboratorio de Control de Calidad-UPCH. Lima 2010

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
DILUCION 1 (mL)	5	5	5
ENRASE mL	50	50	50
DILUCION 2 (mL)	0.8	1	1.2
ENRASE mL	100	100	100
CONCENTRACION ug/mL	8	10	12
PORCENTAJE	80	100	120

ANEXO 9

Cuadro N° 14: Datos del Estándar para la Evaluación de la Exactitud. Laboratorio de Control de Calidad-UPCH. Lima 2010.

Datos del Estándar para la Elaboración de la Curva de Valoración									
Estándar	Pesos del Estándar (mg)			Dilución 1 (mL)	Alicuota (mL)	Dilución 2 (mL)	Concentraciones de Soluciones madres ug/mL		
	Peso 1	Peso 2	Peso 3				1	2	3
S1					0.64		6.945	7.03	7.072
S2					0.80		6.681	8.787	8.84
S3	16.3	16.5	16.6	10	1.00	100	10.851	10.984	11.051
S4					1.25		13.564	13.73	13.924
S5					1.56		16.927	17.135	17.239
Datos del Estándar para agregar a la Dilución de la Muestra									
Muestra %	Pesos del Estándar (mg)			Dilución 1 (mL)	Alicuota (mL)	Dilución 2 (mL)	Concentración Final del Estándar en la muestra ug/mL		
	Peso 1	Peso 2	Peso 3				1	2	3
100					0		0.000	0.000	0.000
125	15.3	15.2	15.2	10	0.125	50	2.444	2.530	2.530
150					0.245		4.991	4.958	4.958