



Universidad Norbert Wiener

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA**

**“VALIDACIÓN DE MÉTODO MICROBIOLÓGICO
CILINDRO-PLACA PARA CUANTIFICACIÓN DE
GENTAMICINA SULFATO EN DERMOLAB NF CREMA
DE LABORATORIOS VITAPHARMA S.A.C, LIMA 2018”**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Presentado por:

Br.: Huerto Huapaya, Carmen Aracelli

Br.: Vignolo Asencio, Luis Ernesto

Asesor:

Q.F Guevara Vicaña, Rita Aurora.

Lima – Perú

2019

Julia y Fortunato; gracias por su amor y esfuerzo espero me alcance la vida para regalarles un pedacito de todo lo grandioso que recibo día a día de ustedes.

A mi hermana Evelyn por ser mi gran ejemplo, no hay nadie en el mundo que pueda reemplazarte eres mi mejor complemento, a mi Tía Charo gracias por tu apoyo incondicional y por tu gran paciencia.

A mis sobrinos, aunque me cuesta verlos crecer, y entender que sus manitas ya no se pierden entre mis manos, cada paso que dan en la vida me hacen sentir tan feliz.

Mamamela a pesar de esta distancia física, gracias por cuidarme y espero que desde el cielo estés orgullosa de mí.

Br. Carmen Huerto H.

A Dios, y a la Santísima Cruz de Motupe, quienes me dieron la fortaleza y la fe para terminar este trabajo.

A mi abuelito, Luis Vignolo Castillo, por confiar en mi desde pequeño, sé que, desde el cielo, estarás feliz con este logro.

Con la mayor gratitud a mi padres y hermanos, las personas que más han influido en mi vida. Gracias por enseñarme desde niño a luchar para alcanzar mis metas. Mi triunfo es de ustedes.

A mi querida esposa Nelly y mi pequeño Joaquín, por su cariño, paciencia, apoyo incondicional, confianza, ahora más que nunca, gracias.

Br. Luis Vignolo A.

Agradecemos a la Universidad Privada Norbert Wiener, en especial a nuestra Facultad de Farmacia y Bioquímica por habernos acogido en sus instalaciones, por habernos brindando laboratorios con los estándares de calidad, que nos han permitido desarrollarnos de la mejor manera, así también a los docentes que nos han brindado sus enseñanzas y orientaciones, porque han contribuido en nuestro desarrollo profesional.

A nuestra asesora de tesis Q.F Guevara Vicaña, Rita Aurora, por su importante apoyo, consejos y sugerencias, y con sus conocimientos nos orientó a realizar este trabajo de investigación.

Al Q.F Edison Vera Vásquez, por brindarnos su apoyo técnico y experiencia en validación de técnicas analíticas, lo cual contribuyo en el presente trabajo.

A Laboratorios Vitapharma S.A.C, por brindarnos sus instalaciones, equipos, materiales y reactivos, lo cual nos permitió realizar el presente trabajo de investigación. Así mismo al Q.F Alfredo Castillo Calle por su gran apoyo técnico y amistad.

Al personal del área de Control de Calidad Microbiológico, por las facilidades brindadas y por permitirme ser parte de ese gran equipo de trabajo.

Y a todas aquellas personas importantes en nuestras vidas, por su presencia y por toda la ayuda brindada. Despidiéndonos con esta frase de Joaquín Sabina: *“Que no se nos pase la vida, esperando mejores tiempos”*.

Br. Huerto Huapaya Carmen Aracelli

Br. Vignolo Asencio, Luis Ernesto

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

	pág.
I. INTRODUCCION	1
1.1. Situación Problemática	2
1.2. Formulación del problema	2
1.3. Justificación	2
1.4. Objetivos	3
1.4.1. Objetivo General	3
1.4.2. Objetivo Específicos	3
1.5. Variables	3
1.6. Hipótesis	4
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes de la investigación	5
- Antecedentes Internacionales	5
- Antecedentes Nacionales	6
2.2. Bases Teóricas	6
2.2.1. Gentamicina Sulfato	6
a. Indicaciones terapéuticas	7
b. Mecanismo de Acción	7
2.2.2. Laboratorios Vitapharma S.A.C	8
2.2.3. Buenas Prácticas de Manufactura	8
2.2.4. Buenas Prácticas de Laboratorio	9
2.2.5. Control de Calidad	9
2.2.6. Método Analítico	10
2.2.7. Valoración Microbiológica de Antibióticos	10
2.2.7.1. Valoración en Cilindro – Placa	11
2.2.7.2. Microorganismos de Prueba	11
2.2.8. Validación de Métodos Analíticos	12
2.2.8.1. Objetivos de la Validación	12
2.2.8.2. Categorías de los Métodos Analíticos	13
2.2.8.3. Parámetros de Validación	14
1. Exactitud	14
2. Precisión	14
3. Selectividad y Especificidad	14

	pág.
4. Linealidad	15
5. Rango	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Tipo de Estudio	16
3.1.1 Diseño de Investigación	16
3.2. Muestra	16
3.3. Criterios de Inclusión y Exclusión	16
3.4. Metodología	17
3.4.1. Valoración Microbiológica	17
3.4.1.1 Materiales	17
3.4.1.2 Reactivos y/o productos	18
3.4.1.3 Equipos	19
3.4.1.4. Preparación de Estándares	20
3.4.1.5. Preparación de Muestras	21
3.4.1.6. Preparación de Inóculo	22
3.4.1.7. Análisis	23
3.4.1.8. Criterios de aceptación	25
3.4.2 Metodología para evaluar parámetros para validación	25
3.4.2.1. Selectividad y Especificidad	25
3.4.2.2 Exactitud	26
3.4.2.3 Linealidad	27
3.4.2.4 Precisión	28
3.4.2.5 Rango	28
3.4.2.6 Criterios de aceptación	28
3.5 Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos	30
3.5.1. Técnica operatoria	30
3.5.2. Instrumentos	30
3.5.3. Procedimientos de recolección de datos	30
3.5.4. Procesamiento de datos	30
IV. RESULTADOS	31
4.1 Análisis de datos obtenidos	31
4.1.1 Resultados de Ensayo de Selectividad y Especificidad	31
4.1.2 Resultados de Ensayo de Linealidad	34
4.1.3 Resultados de Ensayo de Exactitud	36
4.1.4 Resultados de Ensayo de Precisión	37
4.1.5 Rango	38

	pág.
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO	48

ÍNDICE DE TABLAS

	pág
Tabla 1. Parámetros a Validar en el Método Analítico	25
Tabla 2. Condiciones de la Muestra par Ensayo de Selectividad y Especificidad	25
Tabla 3. Condiciones del Estándar y Muestra para Exactitud	26
Tabla 4. Condiciones del Estándar y Muestra para Linealidad	27
Tabla 5. Criterios de Aceptación	29
Tabla 6. Resultados de Selectividad y Especificidad del Método	31
Tabla 7. Selectividad y Especificidad del Placebo	32
Tabla 8. Selectividad y Especificidad del Principio activo	33
Tabla 9. Selectividad y Especificidad de la muestra	33
Tabla 10. Resultados de Linealidad del Método	34
Tabla 11. Resultados de Exactitud del Método	36
Tabla 12. Resultados de Precisión del Método	37
Tabla 13: Resultados de Rango del Método	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Formula Estructural de Gentamicina Sulfato	7
Figura 2. Lista de Organismo de Prueba para Antibióticos	12
Figura 3. Categorías para la Validación de Métodos Analíticos	13
Figura 4. Preparación de Estándares de Gentamicina Sulfato	20
Figura 5. Preparación de Muestras de producto Dermolab NF crema	21
Figura 6. Preparación de Inóculo de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	22
Figura 7. Distribución de Muestras y Estándar en Cilindros en placa	23
Figura 8. Distribución de Placas con Dilución que contenga los Niveles de Prueba	24
Figura 9. Resultados de Normalidad de Residuales y Homocedasticidad de los residuales del Estándar	35
Figura 10. Resultados de Normalidad de Residuales y Homocedasticidad de los residuales de la muestra	35

ÍNDICE DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Matriz de consistencia	48
Anexo 2. Operacionalización de variables	49
Anexo 3. Carta de validación de los resultados obtenidos en la validación del método microbiológico	50
Anexo 4. Formato para reporte de valoración microbiológica	51
Anexo 5. Reporte de pesos y factores realizados para evolución de parámetros de validación	54
Anexo 6. Reporte del ensayo de selectividad y especificidad del método	61
Anexo 7. Reporte del ensayo de exactitud del método	70
Anexo 8. Reporte del ensayo de linealidad del método	73
Anexo 9. Reporte del ensayo de precisión: repetibilidad del método	78

RESUMEN

El presente estudio estandarizó un método Microbiológico Cilindro-Placa para cuantificar gentamicina y posteriormente validarlo, es decir, demostrar mediante evidencia documentada, en el área de Control de Calidad de Laboratorios Vitapharma S.A.C., que el producto Dermolab NF crema cumple con los requisitos exigidos para la validación del método. **Objetivo:** Realizar la validación del método microbiológico Cilindro – Placa para la cuantificación de Gentamicina Sulfato en Dermolab NF crema. **Métodos:** Se delineó y efectuó el proceso de validación a través del método difusión en agar y el microorganismo sometido a prueba fue *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. De esta manera, se pudo cuantificar su concentración (Valoración), evidenciando la capacidad de cumplir en forma consistente y reiterativa las especificaciones establecidas, que incluyen los requisitos exigidos en la determinación de parámetros analíticos de especificidad (selectividad), linealidad, rango, exactitud y la precisión manifestada en sus dos formas: repetibilidad y precisión intermedia. **Resultados:** Se comprobó mediante el diseño experimental, con la estimación estadística de los resultados experimentales y teniendo como principio los criterios de aceptación, que el método analítico es específico (ausencia de halo de inhibición con placebo), lineal ($r^2 = 0,98$ para estándar y $r^2 = 0,97$ para muestra, siendo la especificación mínimo 0,95), preciso (CV= 2,03% y 1,73%, siendo la especificación < 5%, tolerancia= 19,15% y 16,28 % siendo la especificación < 30% ; repetibilidad y precisión intermedia respectivamente) y exacto (Sesgo = 1,06%, siendo la especificación <3%, $G_{exp} = 0,511 < G_{tab} = 0,871$, $T_{exp} = 0,765 < T_{tab} = 2,306$), en el intervalo de concentraciones analizadas. **Conclusiones:** De esta manera se concluye con los ensayos ejecutados, que las propiedades de desempeño analítico corresponden a los requisitos para el uso del método analítico propuesto, proporcionándonos resultados confiables para ser utilizado en la verificación del cumplimiento de las especificaciones del producto.

Palabras clave: Valoración Microbiológica, Método Microbiológico, Validación, Gentamicina, *Staphylococcus epidermidis*, Parámetros analíticos.

ABSTRACT

The present study to standardized a microbiological method Cylinder – Plate to quantify gentamicin and subsequently validate it that is to say; show through documented evidence, in the area to quality control if laboratory Vitapharma S.A.C, than Dermolab NF cream product meets the requirements demanded for the method validation. **Objective:** Validate Cylinder – Plate Microbiological Method for the quantification of Gentamicin Sulfate in Dermolab NF cream. **Methods:** It was draft and carry out the process of validation through the “diffusion in agar” method and the tested microorganism was *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. In this way, Its concentration was quantified (titrated), evidencing the capacity of comply in consistent and reiterative form the established specifications, including the requirements demanded in the determination to analytical parameters of specificity (Selectivity), linearity, rank, accuracy and the precision expound in two forms: Repeatability and intermediate preciseness. **Results:** It was prove through the experimental design; with the estimate statistics evaluation of the experiemental results and having as begin for the criteria of acceptance, that the analytical method is specific (absence of inhibition halo with placebo), linear ($r^2 = 0.98$ for standard and $r^2 = 0.97$ for sample; being the specification minimum 0.95) precise (CV = 2.03% and 1,73% , being the specification < 5%, tolerance = 19,15% and 16,28% being the specification <30%; Repeatability and intermediate preciseness respectively) and exact (bias = 1,06%, being the specification <3% , $G_{exp} = 0.511 < G_{tab} = 0,871$, $T_{exp} = 0,765 < T_{tab} = 2,306$), in the range of analyze concentrations. **Conclusion:** In this way conclude with be available to the trait that analytical performance be appropriate the requirements to use of the scientific method proposed, providing us reliable results for used in the verification of compliance of the specifications of product.

Key Words: Microbiological assessment, Microbiological method, Validation, quality control, Gentamicin, *Staphylococcus epidermidis*, analytical parameters.

I. INTRODUCCIÓN

Desde la promulgación de la Ley de Productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios¹. En la industria Farmacéutica peruana, se inició un proceso de mayores exigencias cuya finalidad es el bienestar del paciente, teniendo en consideración que dichas mejoras se basaron en criterios técnicos internacionalmente recomendados para garantizar el acceso a productos seguros, eficaces y de calidad.¹

Los laboratorios farmacéuticos deben garantizar mediante ensayos fisicoquímicos y microbiológicos la calidad del producto, basándose en especificaciones, técnicas analíticas de referencia farmacopeica y/o método propio, en este último punto, tanto las Buenas Prácticas de Manufactura² y Buenas Prácticas de Laboratorio³ nos indican que cuando se trate de un método propio deberá validarse, para que nos proporcione un alto grado de confianza.

La metodología analítica que no se base en lo indicado o realice modificaciones en la monografía de las diversas farmacopeas u otras referencias nacionales e internaciones tendrá que ser validada previo a su aplicación. La validación debe abarcar, cuando amerite, evaluar la exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y robustez, según los manuales de Buenas Prácticas Farmacéuticas antes mencionados^{2,3}.

La Farmacopea de los Estados Unidos vigente (USP 41)⁴, contempla la técnica analítica para determinar la concentración de gentamicina en una crema, pero como monofármaco, sin embargo, en la fórmula del producto Dermolab NF crema, se tiene como activos también al Clotrimazol y Betametasona (como dipropionato).

Actualmente, Laboratorios Vitapharma S.A.C, manufactura y comercializa Dermolab crema, producto cuyo registro sanitario está próximo a vencer; por lo que el área de investigación y desarrollo lo reformulo, cumpliendo como producto piloto sus estudios de estabilidad, motivo por el cual la gerencia comercial decidió denominarlo como Dermolab NF crema.

El producto Dermolab crema se prescribe para el tratamiento de dermatomicosis, producida por hongos susceptibles al principio activo, asociado a dermatosis agudas y en presencia de piodermias por microorganismos sensibles.

La prueba de Valoración de Antibióticos es importante específicamente cuando se desea cuantificar la gentamicina sulfato en el producto Dermolab NF Crema, en laboratorios

Vitapharma S.A.C, el área de control de calidad planteó validar el método Microbiológico Cilindro-Placa para cuantificación de gentamicina sulfato, lo que servirá como sustento técnico para la inscripción del producto a la autoridad nacional del medicamento y en el laboratorio brindará confiabilidad en los ensayos que se realicen ya que será una importante herramienta para garantizar la calidad del producto .

1.1. Situación problemática

¿Cumple con los parámetros y especificaciones establecidas en las normas técnicas oficiales para la validación de un método analítico microbiológico Cilindro-Placa, para la cuantificación de Gentamicina sulfato en el producto Dermolab NF crema de Laboratorios Vitapharma S.A.C?

1.2. Formulación del problema

En el Laboratorio Vitapharma S.A.C, se inició la reformulación del producto Dermolab crema, cuyo producto piloto se denominó Dermolab NF crema ya que se realizó el cambio del activo Dexametasona por Betametasona, con lo que se deberá obtener un nuevo registro sanitario por ser un cambio mayor; para el proceso de obtención del registro se debe cumplir con todos los requisitos estipulados en la normativa vigente , motivo por el cual se desarrolla esta tesis ya que al ser un método analítico propio, amerita presentar la validación del método para que la autoridad reguladora proceda a evaluar y se pueda obtener el nuevo registro sanitario.

1.3. Justificación

La industria farmacéutica nacional, para estar facultada de fabricar, almacenar, comercializar y distribuir productos farmacéuticos, debe cumplir con la regulación sanitaria vigente, que asegura la calidad del producto farmacéutico. Esto se aplica por ejemplo mediante estudios de Estabilidad, validación de procesos, validación de técnicas analíticas, plan de gestión de riesgos, entre otros¹.

Los métodos analíticos que aplica el área de control de calidad, pueden basarse en referencia farmacopeica y/o método propio, en este último caso debe ser validado, tal como lo estipulan las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)² y las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)³, lo que garantiza que los ensayos y resultados analíticos que se emitan aseguren la calidad del producto.

Debido a que la empresa, realizó la reformulación del producto Dermolab crema que implicó el cambio de activo Betametasona por Dexametasona, considerado un cambio mayor, se debe solicitar a la autoridad reguladora un nuevo registro sanitario para el Producto que se

denominará Dermolab NF crema, dicho producto deberá cumplir con todos los requisitos para la obtención del nuevo registro, teniendo en consideración, que si se utilizan métodos propios estos deberán estar previamente validados.

La Validación de un método analítico, es muy relevante, debido a que nos da evidencia documentada y seguridad de que el método microbiológico Cilindro-placa para Cuantificación de Gentamicina sulfato nos proporcionará resultados confiables, los cuales permitirán tomar decisiones una vez que se emitan los resultados analíticos de los diferentes lotes que se fabriquen⁵.

Por lo expuesto, el presente trabajo se justifica porque resulta muy importante validar la técnica analítica microbiológica propuesta; ya que los parámetros evaluados y los resultados analíticos obtenidos, serán la base para la elaboración del reporte y certificado de validación que emitirá el área de control de calidad de Laboratorios Vitapharma S.A.C para ser presentados ante la autoridad nacional del medicamento.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general:

Realizar la validación del método microbiológico Cilindro-Placa para la cuantificación de Gentamicina sulfato en Dermolab NF crema.

1.4.2. Objetivos específicos:

1.4.2.1. Evaluar los parámetros para la validación del método microbiológico Cilindro-Placa para la cuantificación de Gentamicina sulfato en Dermolab NF crema, con sus respectivas especificaciones.

1.4.2.2. Comprobar la efectividad del Método Microbiológico Cilindro-Placa para la cuantificación de Gentamicina sulfato en Dermolab NF crema.

1.5. Variables

1.5.1 Variable Independiente: Validación de un método analítico.

1.5.2 Variable Dependiente: Cuantificación de Gentamicina sulfato.

1.6. Hipótesis

1.6.1. Hipótesis verdadera o de trabajo:

El método Microbiológico Cilindro-Placa para cuantificación de Gentamicina sulfato en el producto Dermolab NF crema, proporciona resultados confiables que se encuentran dentro de especificaciones señaladas en normas técnicas vigentes que permitirían su validación.

1.6.2. Hipótesis nula:

El método Microbiológico Cilindro-Placa para cuantificación de Gentamicina sulfato en el producto Dermolab NF crema, no proporciona resultados confiables, que se encuentran dentro de especificaciones señaladas en normas técnicas vigentes que no permitirían su validación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Estudios a nivel internacional

Andino A, Coronado L, Dolmus M. 2013. Realizaron en Nicaragua, una tesis de investigación de “Valoración de la Potencia de la Gentamicina en ampolla 20mg/mL por el Método Cilindro-Placa, en el Laboratorio de Control Microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas. En el período Febrero-diciembre 2013”. **Objetivo:** Valorar la potencia antibiótica de la Gentamicina en ampolla 20mg/mL en el laboratorio de Microbiología de la facultad de ciencias químicas. **Método:** Se utilizó la metodología de la USP 32 según capítulo referida a Valoración Microbiológica. **Resultados:** Se evidenció que el incremento de la concentración de Gentamicina provocó un agrandamiento en los diámetros medidos mostrando una buena correlación al lograr valores de $r^2 \geq 0,959$ y demostró que no hay variación entre los resultados o halos de inhibición ya que un 95% del F estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre los días y entre los operadores. **Conclusión:** Se validó la técnica propuesta para la valoración de muestras comerciales de gentamicina, estableciendo los factores críticos propios del ensayo como el pH de las soluciones y medio de cultivos, el tiempo de lectura e incubación⁶.

Mora J. En el año 2007. Realizó en Costa Rica el proyecto “Implementación y Desarrollo de la Técnica de Potencia Microbiológica de Antibióticos y su Impacto Económico en la Empresa Calox de Costa Rica, S.A.”, con el **Objetivo:** Determinar la actividad in vitro de los antibióticos gentamicina y neomicina sulfato en productos farmacéuticos. **Método:** Se utilizó la metodología de la USP 30 la cual realizó modificaciones para reducir el procedimiento, sin que esto altere los resultados finales. **Resultados:** Para los productos con neomicina se alcanzó resultados evidentes, para el producto con gentamicina se erró en la estandarización del método analítico con lo cual no se obtuvo halos de inhibición. **Conclusión:** Se obtuvo una disconformidad promedio de los resultados de 8,6% para determinar neomicina con los laboratorios de referencia, para Gentamicina al no obtener resultados no se realizó la comparación, esto debido a que no se contaba con los recursos técnicos que brindarían al realizar el método condiciones apropiadas requeridas, por ejemplo, la falta de los equipos adecuados, además, se requiere mayor tiempo de

investigación para lograr estandarizar la prueba, para que no se pueda sustituir él envió a los laboratorios externos para que realicen la prueba⁷.

2.1.2. Estudios a nivel nacional

García J. En el año 2013. En su tesis de investigación de “Determinación y cuantificación de Gentamicina sulfato en Multiderm Crema del Laboratorio Farminindustria S.A por potencia antibiótica”, con el **Objetivo:** Determinar la potencia antibiótica de la Gentamicina sulfato en Multiderm crema del Laboratorio Farminindustria S.A. **Método:** Se utilizó el método para valoraciones microbiológicas de antibióticos, descritas en la USP 35. **Resultados:** Se analizó el lote 10422212 de Multiderm crema, el cual fue comparado con el estándar secundario de Gentamicina sulfato, se obtuvo que la concentración que tenía era de 111,74mg de gentamicina sulfato, lo que era un resultado conforme, a las especificaciones del contenido de gentamicina sulfato del lote analizado. **Conclusión:** Se demostró con la evaluación estadística de los resultados experimentales y teniendo como base los criterios de aceptación permitidos, se concluyó que el método microbiológico placa-cilindro para determinación de la potencia antibiótica de Gentamicina sulfato en Multiderm crema del Laboratorio Farminindustria S.A fue óptimo para evidenciar la efectividad del antibiótica, estipulado en los requisitos de calidad de la USP 35⁸.

Pareja L. En el año 2012. Realizó una tesis sobre “Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de gentamicina en un producto farmacéutico en crema por potencia antibiótica”, cuyo **Objetivo:** Desarrollar y validar el método analítico para cuantificación de gentamicina en un producto farmacéutico crema por potencia antibiótica. **Método:** El método utilizado fue el capítulo <621> Valoración Microbiológica de Antibióticos de la USP 33. **Resultados:** Se demostró estadísticamente los resultados obtenidos en los análisis y contrastándolo con los criterios de aceptación estipulados en el método en evaluación. **Conclusión:** Esta investigación demostró que el método aplicado para la cuantificación de gentamicina sulfato, cumplió con los parámetros establecidos para su validación, lo que determina que es seguro y confiable para ser aplicado en la detección y cuantificación de Gentamicina en los productos farmacéuticos a valorar⁹.

2.2. Base teórica

2.2.1. Gentamicina sulfato

La gentamicina es un antibiótico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos. Es aislado de *Micromonospora purpurea*. Se utiliza primordialmente en preparaciones

dermatológicas y oftálmicas, acoplado con preparaciones llamadas polivalentes con antimicóticos y corticoides. Posee la desventaja de promover cepas resistentes. En Cuba se utiliza en crema al 0,1%, siendo fabricado en presentación de crema lavable con una estabilidad apropiada¹⁰.

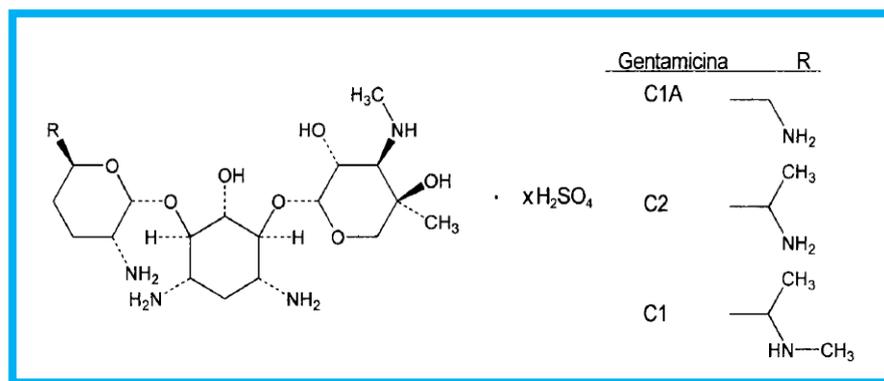


Figura 1. Fórmula Estructural de Gentamicina Sulfato¹¹.

a. Indicaciones terapéuticas

La gentamicina tópica se prescribe en el tratamiento de infecciones primarias (impétigo contagioso, foliculitis superficiales, ectima, forunculosis, pioderma gangrenoso, abscesos después de incisiones y drenaje, paroniquia, etc) y secundarias de piel (dermatosis sobreinfectadas: eccemas infectados, dermatitis de contacto infectadas, psoriasis pustular y sobreinfecciones bacterianas micóticas y virales, quistes cutáneos infectados, infecciones quirúrgicas menores)¹⁰.

La gentamicina proporciona un tratamiento tópico muy efectivo en las infecciones bacterianas primarias y secundarias de la piel¹².

b. Mecanismo de acción

La gentamicina se traslada activamente mediante la membrana de las células bacterianas inhibiendo la síntesis de proteínas. Se une irreversiblemente a la subunidad 30s del ribosoma. Al obstaculizar la síntesis normal de proteínas origina proteínas no funcionales en microorganismos susceptibles¹².

El ribosoma es el lugar de la célula donde se produce la biosíntesis de las proteínas. En las células procariotas, el ribosoma sedimenta a 70S, existiendo dos subunidades a 50S y 30S que están libres o combinadas. La subunidad 30S libre es la que inicia la síntesis de las proteínas tras la asociación con un factor de iniciación (IF – 3) con la participación del ARN mensajero¹².

La gentamicina es también resistente a las nucleotidil transferasas, enzimas que son capaces de adenilar los grupos hidroxilos secundarios en disposición ecuatorial¹³.

2.2.2. Laboratorios Vitapharma S.A.C

Laboratorios VitaPharma S.A.C, es una empresa peruana que inició sus operaciones en el 2008. Dedicada a la fabricación y comercialización de productos farmacéuticos, que trabaja en base a estándares internacionales de calidad, cumpliendo satisfactoriamente las Buenas Prácticas de Manufactura, las que garantizan la producción de productos farmacéuticos seguros y eficaces de alta calidad, los cuales son ofrecidos a los médicos, profesionales de salud y el público en general.

Cuenta con una planta de fabricación ubicada en el centro- industrial Las Praderas de Lurín, el cual fue creado con múltiples fines: disminuir la polución dentro de la ciudad de Lima, reducir la posible contaminación del medio ambiente, utilizando y re-utilizando recursos propios del lugar. Con lo que se encuentra en un entorno confiable que garantiza no solo la producción segura en términos de calidad, sino también en términos de polución y es eco-amigable.

Dentro de las áreas que posee se distinguen tres diferentes líneas de producción: sólidos (tabletas, tabletas recubiertas, capsulas, polvos, polvos para suspensión y gránulos), líquidos (soluciones, suspensiones y jarabes) y semilíquidos (cremas y geles)¹⁴.

2.2.3. Buenas Prácticas de Manufactura

El cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) por los fabricantes de productos farmacéuticos, garantiza que todos los lotes de los productos sean fabricados con materias primas de óptima calidad, cumpliendo con las especificaciones según la farmacopea tomada como referencia, así mismo que se han envasado y rotulado de forma idónea, que los productos son estables y tienen una biodisponibilidad aceptable durante su vida útil si se mantienen en las condiciones estipuladas en las normas de almacenamiento e indicaciones en el rotulado¹⁵.

Estas normas apuntan al muestreo, especificaciones y ensayo, así como, a los procedimientos de organización, documentación y autorización que aseguren que los ensayos necesarios y pertinentes realmente se efectúen, y que no se permita la circulación de los materiales, ni se autorice la venta o suministro de los productos, hasta que su calidad haya sido aprobada como satisfactoria¹⁶.

2.2.4. Buenas Prácticas de Laboratorio

Conjunto de normas que establecen los procedimientos operativos y prácticas adecuadas para garantizar que los datos generados por los laboratorios cuando realizan el control de calidad, sean confiables¹⁷.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), constituyen requisitos de aptitud de instalaciones, de métodos farmacopeicos verificados y métodos propios previamente validados, de reactivos en cuya etiqueta deberá hallarse la identificación del contenido del envase, su concentración o título, la fecha de preparación, de valoración y de vencimiento, así como las condiciones de almacenamiento. En lo que concierne a equipos deberán estar pertinentemente verificados, limpios y con un mantenimiento actualizado. Todo estará documentado o registrado. Por lo que es de vital importancia llevar al día Procedimientos Operativos Estándar, que son documentos que describen como llevar a cabo ciertas actividades o ensayos de rutina¹⁸.

2.2.5 Control de Calidad

Conjunto de procedimientos técnicos y actividades para muestreo, análisis que incluye la emisión de certificado de análisis para asegurar que los insumos, materiales y productos, del proceso de análisis, cumplen con las especificaciones preestablecidas para identidad, potencia, pureza y otras características que sean requeridas¹⁹.

El área de Control de Calidad debe ser independiente de otras áreas, en particular del área de Producción, y estar bajo la tutela de una persona calificada y experimentada. Debe contar con recursos suficientes para asegurar que los procedimientos de control de calidad pueden efectuarse con eficacia y confiabilidad¹⁸.

No sirve de nada tener habilitado un laboratorio o un área de control de calidad que detecte todos los defectos de un lote de medicamentos, si la producción es deficiente en sí misma y en consecuencia ese medicamento no cumplirá con su principal objetivo: llegar a manos de un paciente ofreciéndole eficacia y seguridad¹⁸.

2.2.6. Método analítico

Descripción detallada de las pautas indispensables para ejecutar cada prueba o ensayo analítico. Esto puede incluir, pero no está limitado a la muestra, el estándar y a la preparación de reactivos, el uso de equipos, la generación de la curva de calibración, el uso de las fórmulas para el cálculo, entre otros³.

Los métodos analíticos que no son de referencia farmacopeica deben ser validados de acuerdo a un protocolo de validación que incluye los parámetros de desempeño analítico que tienen que ser verificados para los diferentes tipos de procedimientos analíticos².

Un cambio relevante en el procedimiento para análisis o en la formulación del producto ensayado o en la síntesis del principio activo, necesitaría revalidación del procedimiento analítico en los parámetros de desempeño que se considere crítico².

La técnica analítica validada del producto terminado será válida tanto para el producto que se comercializa bajo la denominación DCI o bajo denominación de marca, considerando que ambas fórmulas contienen la misma composición cualitativa y cuantitativa¹⁹.

2.2.7. Valoración microbiológica de antibióticos

Las valoraciones microbiológicas son un caso peculiar de valoración biológica. Consisten en cuantificar la potencia o actividad de un determinado principio activo comparando las concentraciones de una muestra y de una preparación patrón o de referencia que produce el mismo efecto, obteniéndose así la potencia relativa cuantitativa. Basado en la comparación cuantitativa de la inhibición del crecimiento de un microorganismo de ensayo en un medio adecuado, producida como mínimo en dos preparaciones, de las cuales una es el estándar, el microorganismo debe ser susceptible al antibiótico a valorar y el medio de cultivo permitir un crecimiento rápido y abundante en ausencia del antibiótico²⁰.

En los antibióticos puede tenerse leves cambios químicos que derivan en la disminución de la actividad antimicrobiana que no puede mostrarse por métodos químicos, debido a esto, en caso de duda respecto a la actividad de un antibiótico los métodos de valoración microbiológica predominan sobre los métodos químicos²¹.

2.2.7.1. Valoración en Cilindro-Placa

Se basa en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical a través de una capa de agar solidificado en placa Petri. El crecimiento del microorganismo específico inoculado en agar resulta inhibido en un área circular o zona en torno al cilindro que contiene la solución del antibiótico²².

Este método es el más utilizado dada su exactitud y sensibilidad; puesto que, a través de una capa de agar solidificada en una placa de Petri hasta inhibir totalmente el crecimiento del microorganismo añadido en el medio de cultivo, en un área circular o zona de inhibición entorno al cilindro que contiene una solución del antibiótico. Las diferentes respuestas obtenidas (diámetros de los halos de inhibición) son proporcionales a las dosis de antibiótico utilizadas.

El tamaño de los halos de inhibición queda definido por la sensibilidad del microorganismo, su estado fisiológico, y número de células viables; el tipo de medio de cultivo (incluyendo el espesor del medio en la placa), las condiciones de incubación, fundamentalmente la temperatura, la velocidad de difusión de la sustancia y su concentración²⁰.

2.2.7.2. Microorganismo de prueba

Los microorganismos de ensayo codificados en las farmacopeas pueden ser bacterias y hongos, preferentemente no patógenos²⁰.

El microorganismo de ensayo para cada antibiótico se lista en una tabla para la valoración en cilindro-placa. Los microorganismos de prueba se especifican mediante su codificación en la American Type Culture Collection (Colección de Cultivos tipo de los Estados Unidos o ATCC)²².

En la Figura 2. Se observa los microorganismos de prueba y condiciones de incubación que se deben aplicar para la valoración microbiológica dependiendo el analito en estudio²².

Antibiótico	Organismo de Prueba	Número ^a ATCC	Condiciones de Incubación			Composición Sugerida del Inóculo	
			Medio ^b	Temperatura (°)	Tiempo	Medio ^b	Cantidad (mL/100 mL)
Amfotericina B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763	19	29-31	48 h	19	1,0
Bacitracina	<i>Micrococcus luteus</i>	10240	1	32-35	24 h	1	0,3
Bleomicina	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	607	36	36-37,5	48 h	35	1,0
Carbenicilina ^c	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25619	1	36-37,5	24 h	10	0,5
Cloxacilina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32-35	24 h	1	0,1
Colistimetato	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	1	32-35	24 h	10	0,1
Colistina	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	1	32-35	24 h	10	0,1
Dihidroestreptomina	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	32	32-35	5 días	5	Según se requiera
Eritromicina	<i>Micrococcus luteus</i>	9341	1	32-35	24 h	11	1,5
Gentamicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	1	32-35	24 h	11	0,03
Nafcilina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32-35	24 h	1	0,3
Neomicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	1	32-35	24 h	11	0,4
Novobiocina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	1	32-35	24 h	1	4,0

Figura 2. Lista de Organismos de Prueba para Antibióticos²².

2.2.8. Validación de métodos analíticos

La totalidad de la metodología analítica usada para análisis debe ser apropiada para el uso al que están propuestos, lo cual se evidencia por medio de la validación o verificación en caso de métodos farmacopeicos²³.

2.2.8.1. Objetivos de la validación²⁴.

- Evidencia que los métodos son óptimos para los ensayos propuestos en las condiciones predeterminadas. La validación es el instrumento que proporciona las evidencias documentarias.
- Labora con métodos que sean confiables y seguros en los resultados, lo cual conllevara a disminuir el número de errores y repeticiones, obteniendo un significativo ahorro de costos.
- Labora con métodos validados, permite no solo la competencia técnica del método sino incluso cumplir con las exigencias legales tanto del registro sanitario de especialidades farmacéuticas como el de las buenas prácticas de laboratorio, cuya finalidad es garantizar la calidad y eficacia del producto.

2.2.8.2. Categorías de los métodos analíticos²³.

En la validación de los métodos analíticos debe tenerse en consideración las siguientes categorías:

1. Categoría I: Pruebas cuantitativas del contenido del principio activo, son procedimientos químicos o microbiológicos que miden el analito presente en una muestra determinada.
2. Categoría II: Pruebas para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas.
3. Categoría III: Son pruebas fisicoquímicas que miden características propias del desempeño del medicamento. Las características de la validación son diferentes a las de las otras pruebas, aunque las pueden incluir.
4. Categoría IV: Pruebas de identificación. Aquellas que se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra.
5. Pruebas microbiológicas: Aquellas que se ejecutan para garantizar la calidad microbiana del medicamento.

En la Figura 3. Se observa los parámetros que se deben evaluar para la validación del método analítico dependiendo en que categoría se encuentre el ensayo en estudio²³.

Figura 3. Categorías para la Validación de Métodos analíticos²³.

Parámetro de desempeño analítico		Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
			Análisis Cuantitativo	Pruebas de límite		
Exactitud		SI	SI	*	SI**	NO
Precisión	Repetibilidad	SI	SI	NO	SI	NO
	Precisión intermedia	SI#	SI#	NO	SI#	NO
Especificidad		SI	SI	SI	SI**	SI
Límite de detección		NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación		NO	SI	NO	*	NO
Linealidad		SI	SI	NO	SI**	NO
Intervalo		SI	SI	*	*	NO

2.2.8.3. Parámetros de validación

1. 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 inóculo²⁴.

2. Precisión:

Aptitud de un método para suministrar resultados próximos entre sí. Grado de dispersión de los resultados analíticos, respecto a su valor medio. Se pueden estudiar a dos niveles:

- a) Repetibilidad: Evalúa la precisión del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (aparatos, reactivos, analista) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.
- b) Precisión intermedia: Evalúa la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (Analista, día, instrumento, etc) Es la precisión intralaboratorio²⁴.

3. Selectividad y Especificidad:

Aptitud de un método analítico para medir y/o determinar simultáneamente o independientemente los analitos de interés, de manera inequívoca, en presencia de otras sustancias que pueden estar presentes en la muestra repetidamente, el término especificidad se emplea como sinónimo de selectividad.

Este parámetro debe ser determinado previo a empezar un estudio de cualquier otro parámetro de validación, debido a que debe comprenderse en qué grado la respuesta del método es exclusivamente proporcionada por el analito, sin injerencia de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma²⁴.

4. Linealidad:

Aptitud del método para suministrar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un determinado rango. Para validación de una valoración de antibióticos consisten en:

1. Mostrar que la recta de regresión construida con el logaritmo de la dosis de antibiótico patrón y la respuesta cumple con los parámetros de regresión lineal y análisis de variancia.
2. Evidenciar que las dos rectas (Patrón y problema) cumplen con el test de coincidencia²⁴.

5. 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 linealidad²².

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de estudio

La presente tesis es de orientación aplicada, experimental y cuantitativa, debido a que los datos proporcionados al evaluar los parámetros para la validación, son analizados para verificar si el método analítico es reproducible.

3.1.1. Diseño de investigación

Observacional, Longitudinal y Prospectivo

3.2. Muestra

- Producto Dermolab NF crema, cincuenta (50) tubos colapsibles x 10g.
- Placebo de Betametasona 50mg + Clotrimazol 1g + Gentamicina 0,1g/100g crema
- Gentamicina Sulfato (Estándar de Referencia de USP), Frasco ámbar x 200mg.
- Cepa Microbiológica, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.Segundo Pasaje.

3.3. Criterios de inclusión y exclusión

3.3.1. Criterios de inclusión:

1. Producto Dermolab NF crema, que posee las características que declara Laboratorios Vitapharma S.A.C
2. Estándar de referencia de USP, con fecha vigente y con certificado de calidad del proveedor.
3. Cepa Microbiológica, con fecha vigente, con pruebas de promoción de crecimiento, con certificado de calidad del proveedor.

3.3.2. Criterios de exclusión :

1. Aquel que no cumpla las características señaladas en criterios de inclusión.

3.4. Metodología

- Se aplicó la metodología que indica USP 41 en el capítulo <81> Antibióticos-Valoraciones Microbiológicas y los parámetros que indica AEFI para evaluar la validación de valoración de Antibióticos por método Microbiológico de cilindro-placa; se realizaron algunas modificaciones, cuyo fin es reducir el procedimiento hasta donde sea viable, de tal forma que se pueda trabajar adecuadamente con los recursos que cuenta el laboratorio.
- El Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico de Laboratorios Vitapharma S.A.C generó un protocolo de validación de técnica analítica de cuantificación de gentamicina en el Producto Dermolab NF crema el cual se realizó en base a la técnica analítica TPT-CDC-524 “Dermolab NF Crema (Betametasona 0,05g + Clotrimazol 1g + Gentamicina 0,1g crema)”, siendo el punto de Gentamicina Sulfato no validada.
- Estos ensayos se llevaron a cabo en las salas de Microbiología del área de Control de Calidad de Laboratorios Vitapharma S.A.C.

3.4.1. Valoración microbiológica

3.4.1.1. Materiales

- a) Matraces volumétricos (Fiolas) de 10 mL, 100 mL y 1000 mL
- b) Pipeta volumétrica de 2 mL, 4 mL. y pipeta graduada de 5 mL y 10 mL.
- c) Probeta graduada de 25mL, 100 mL y 1000 mL.
- d) Peras de separación de 250 mL
- e) Cilindros de acero inoxidable de $8 + 0,1$ mm de diámetro externo, de $6 + 0,1$ mm de diámetro interno, de $10 + 0,1$ mm de altura, estériles.
- f) Frasco de vidrio: 250 mL y 500 mL y frasco Roux estéril
- g) Pinzas estériles y espátula.
- h) Alcohol 70% y 96%.
- i) Placas Petri desechables de 20 mm x 90 mm
- j) Perlas
- k) Bagueta de vidrio
- l) Asa de siembra
- m) Algodón
- n) Guantes estériles.
- o) Jeringas descartables de 3mL, 5mL, y 10mL.
- p) Tips estériles de: 10-100 μ L y 100-1000 μ L

3.4.1.2. Reactivos y/o Productos

REACTIVO / PRODUCTO	MARCA	LOTE	FECHA DE EXPIRA
Estándar: <i>Gentamicina sulfato</i>	USP	R084Q0	Vigente
Placebo de <i>Betametasona 50 mg + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0,1 g/100 g Crema</i>	Fabricado por: Laboratorios Vitapharma SAC	1110427P	2018-11-31
<i>Betametasona 50 mg + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0,1 g/100 g Crema</i>	Laboratorios Vitapharma SAC	1080418P	2020-08-31
<i>Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, 2° Pasaje</i>	Microbiologics	371-272	2019-10-31
Agar Antibiótico N° 1	Merck	VM744572	2021-05-11
Agar Antibiótico N° 11	Liofilchem	111816511	2020-11-17
Cloroformo p.a.	J.T. Baker	X27C56	2022-06-28
Fosfato Monobásico de potasio p.a.	Merck	AM1090173	2021-11-30
Fosfato Dibásico de potasio p.a.	Merck	AM0840604	2020-04-30
Ácido Fosfórico 85% p.a.	Merck	K47453273	2021-01-31
Cloruro de sodio p.a.	J.T. Baker	V13C76	2019-01-31
Hidróxido de Sodio	Macron	162881	2019-07-12
Ácido Clorhídrico	J.T. Baker	X45C16	2022-11-08
Hidróxido de Potasio	Merck	B1472533	2020-07-31

3.4.1.3. Equipos

EQUIPO	MARCA	MODELO	CODIGO	ULTIMA CALIBRACIÓN /CALIFICACIÓN
Balanza Analítica	Mettler	XPE205	0605D0403	Agosto-2018
Balanza Analítica	Radwag	XAG0/220/X	0604D0401	Marzo-2018
Balanza	UWE	DM-1100	0603D0401	Marzo -2018
Incubadora	Binder	BD53	0603D2904	Julio -2018
Incubadora	Boxun	SPX-150B-Z	0603D	Agosto-2018
Flujo Laminar	Boxun	N.I	0603D2501	Agosto-2018
Refrigeradora	Samsung	RT43ENSW	0603H0336	Junio-2018
Autoclave	Gemmy	SA-300VF	0603D0303	Julio -2018
Autoclave	Raypa	AES-75	0603D0304	Agosto-2018
Autoclave	Jibimed	TM-XA24D	0603D0305	Agosto-2018
Vernier	Caliper	---	0603D6501	Octubre -2017
Baño María	Memmert	WNB22	0607D7501	Agosto-2018
pH metro	Ohaus	STARTER 300	0603D8001	Abril-2018
Ultrasonido	Branson	CPX8800H	0607D7102	Octubre -2017
Micropipeta 10 – 100 µL	Capp	IE14064	0603P0103	Noviembre-2017
Micropipeta 100 – 1000 µL	Capp	JA10659	0603P0104	Noviembre -2017
Estufa	Boxun	GR-30	0605D2201	Julio -2018

- La preparación de la solución buffer, medios de cultivo se realizó acorde a lo estipulado en el capítulo <81> Antibióticos-Valoraciones Microbiológicas de la USP 41²².

3.4.1.4. Preparación de estándares

- Se transfirió aproximadamente una cantidad de Estándar de Gentamicina Sulfato equivalente a 10 mg de Gentamicina (el peso dependerá de la potencia del estándar utilizado), pesados con exactitud, a una fiola de 10 mL, disolver y enrasar a volumen con Solución Amortiguadora N.º 3; mezclar (Concentración de Solución Madre = 1 mg/mL). Esta solución puede mantenerse refrigerada durante 7 días.
- Se traspasó 4,0 mL de la solución madre a un fiola de 10 mL, enrasar a volumen con Solución Amortiguadora N.º 3 y homogenizar. A partir de esta solución preparar 5 diluciones (S1–S5), con un aumento de concentración entre diluciones sucesivas, en una proporción de 1:1,25 de la siguiente manera: Transferir cada uno de los siguientes volúmenes S1=64 uL, S2=80 uL, S3=100 uL, S4=125 uL y S5=156 uL a una fiola de 100 mL, enrasar a volumen con Solución Amortiguadora N.º 3 y mezclar (Concentración final S3 = 0,4 ug/mL), lo anteriormente expuesto, se puede visualizar en la Figura 4.

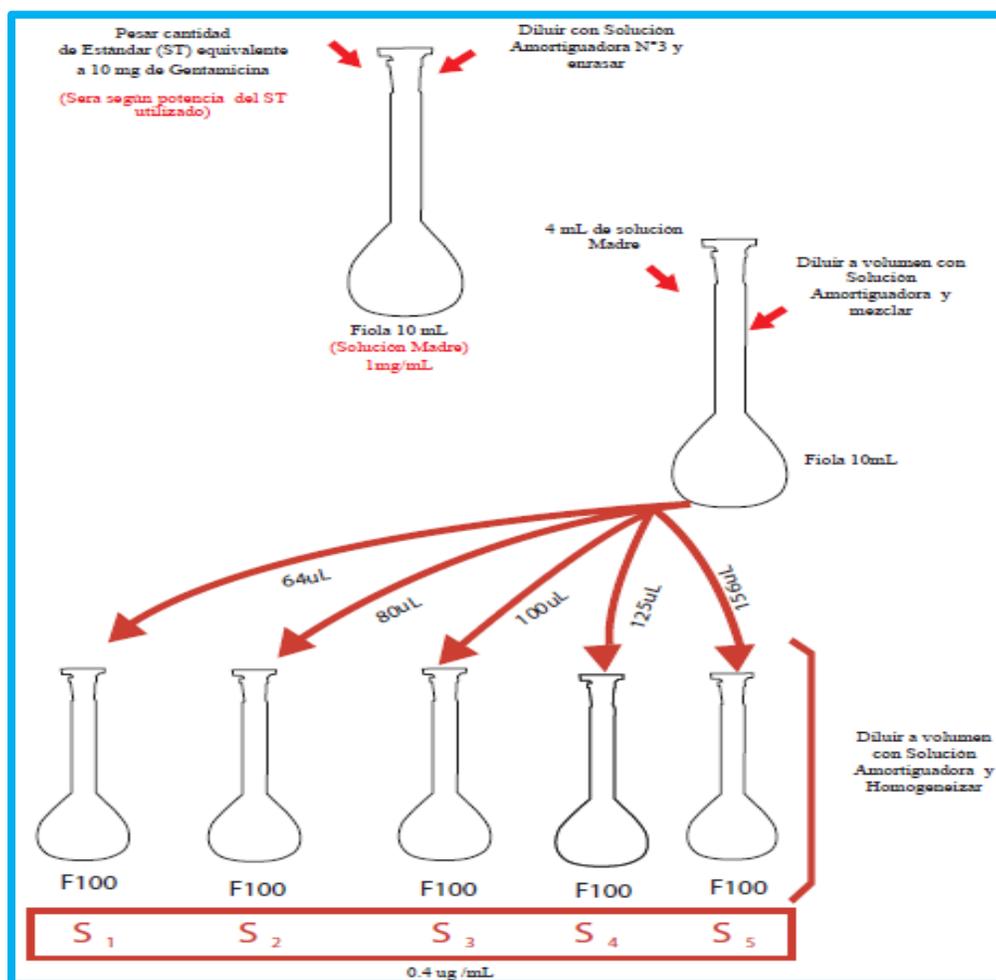


Figura 4. Preparación de Estándares de Gentamicina Sulfato

3.4.1.5. Preparación de muestras

- Se pesó aproximadamente 1 g de muestra (equivalente a 1 mg de Gentamicina) trasladándolo a una pera de separación. Agregando 30 mL de cloroformo y agitando hasta desintegrar completamente la muestra; luego agitar mecánicamente por 10 minutos y extraer con 4 porciones de 20 mL de Solución Amortiguadora N° 3. Unir los extractos acuosos en una fiola de 100 mL, enrasar a volumen con Solución Amortiguadora N° 3 y homogenizar. Traspasar 4,0 mL de esta solución a una fiola de 100 mL, enrasar a volumen con Solución Amortiguadora N° 3 y homogenizar.
- Preparar las muestras por duplicado. (Concentración final $M_x = 0,4 \text{ ug/mL}$), lo anteriormente expuesto, se puede visualizar en la **Figura 5**.

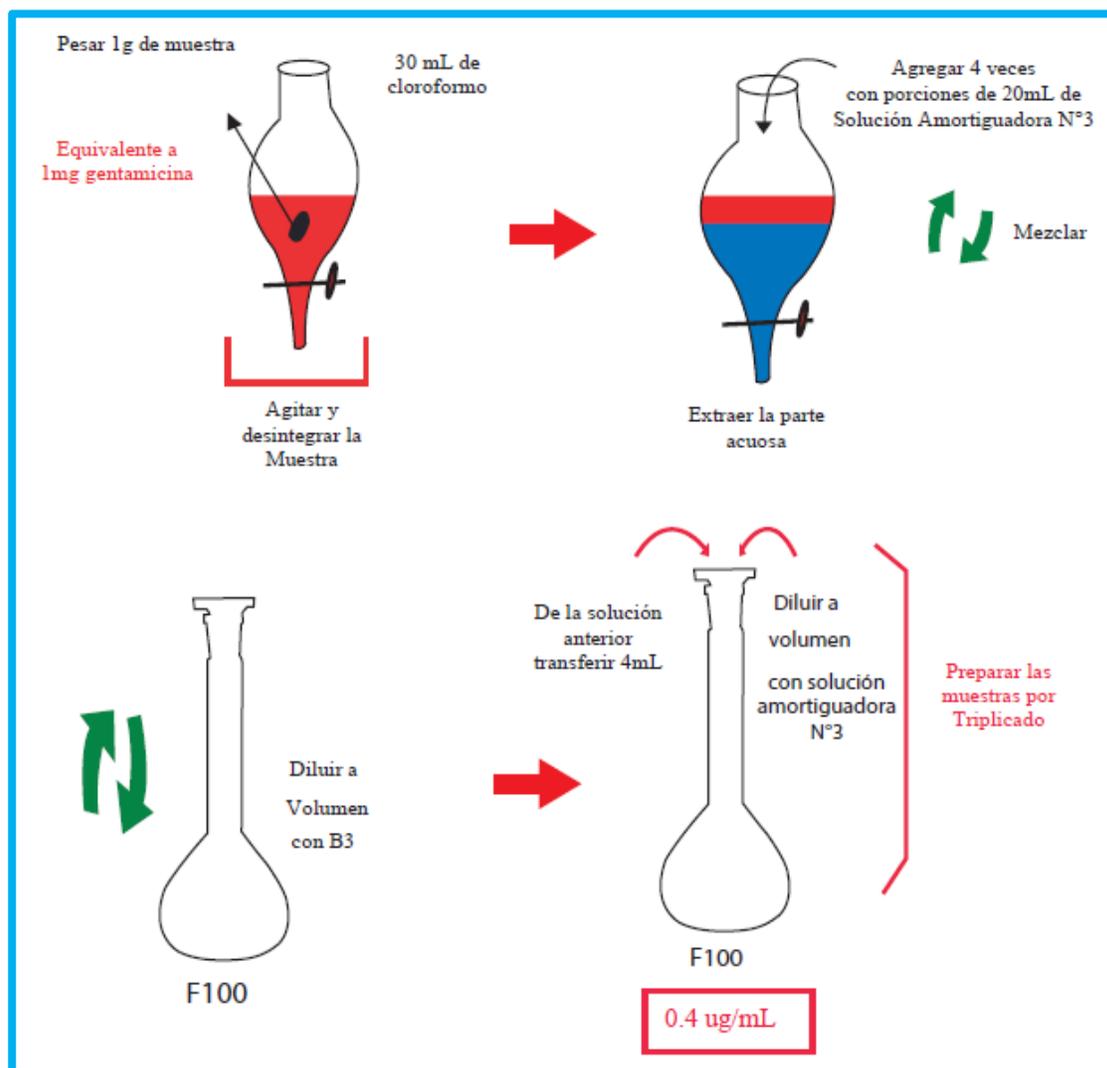


Figura 5. Preparación de Muestras del producto Dermolab NF crema

3.4.1.6. Preparación de inóculo

- De un cultivo proveniente del tercer pasaje de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 en tubo inclinado (aproximadamente 8 mL de Medio N°1) de 24 horas de crecimiento de 32°C a 35°C, suspender en microorganismo con 3 mL de Solución Salina SR estéril²².
- Se esparció la suspensión salina sobre la superficie de un frasco Roux que contenga 250 mL de Medio N°1. Incubar de 32°C a 35°C por 24 horas²².
- Después de incubar, recolectar el microorganismo del frasco de vidrio con alrededor de 50 mL de Solución Salina SR estéril, usando perlas de vidrio estériles. Pipetear y trasladar la suspensión a un frasco de vidrio estéril. Ésta es la suspensión madre²².
- Se preparó el inóculo agregando 30 uL de suspensión madre a un frasco de vidrio que contenga 100 mL de Medio N° 11 que se ha fundido y enfriado a 45°C – 50°C.
- Agitar la mezcla por rotación suave sin crear burbujas hasta obtener una suspensión homogénea, lo anteriormente expuesto, se puede visualizar en la Figura 6.
- Se consideró como cantidad apropiada de suspensión madre en el medio N°11 para la preparación del inóculo, cuando resulten en zonas satisfactorias de inhibición de aproximadamente 14-16mm de diámetro para la mediana de la concentración estándar (S₃); cuando los tamaños de las zonas de inhibición están fuera del intervalo de 11 a 19 mm no son apropiados, debido a que favorecen a la variabilidad de la valoración²².

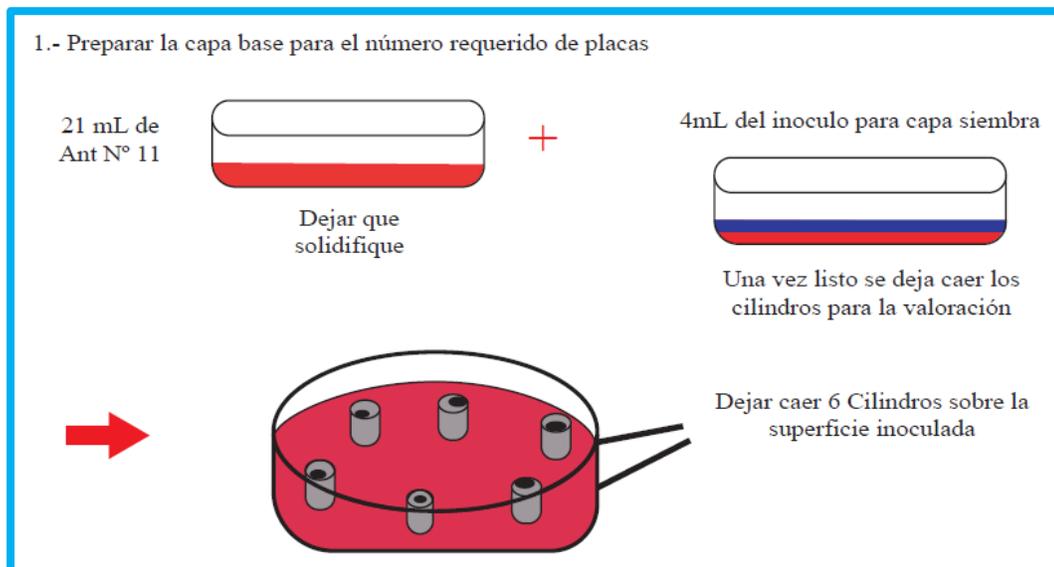


Figura 6. Preparación de Inóculo de *Staphylococcus epidermidis*

3.4.1.7. Análisis

- Se procederá de acuerdo a lo estipulado en la monografía <81> Antibióticos-Valoraciones Microbiológicas de la USP 41.
- Se agregó 200 uL a los 6 cilindros en cada placa Petri con diluciones que contienen los niveles de prueba (S1 – S5 y Mx) de la siguiente manera: Para derivar la curva estándar, colocar el volumen indicado en cilindros alternos en 3 placas petri con la dilución del estándar (S3) y cada uno de los nueve cilindros remanentes con la dilución del estándar (S1), la distribución que tuvieron las placas se puede visualizar en la Figura 7.

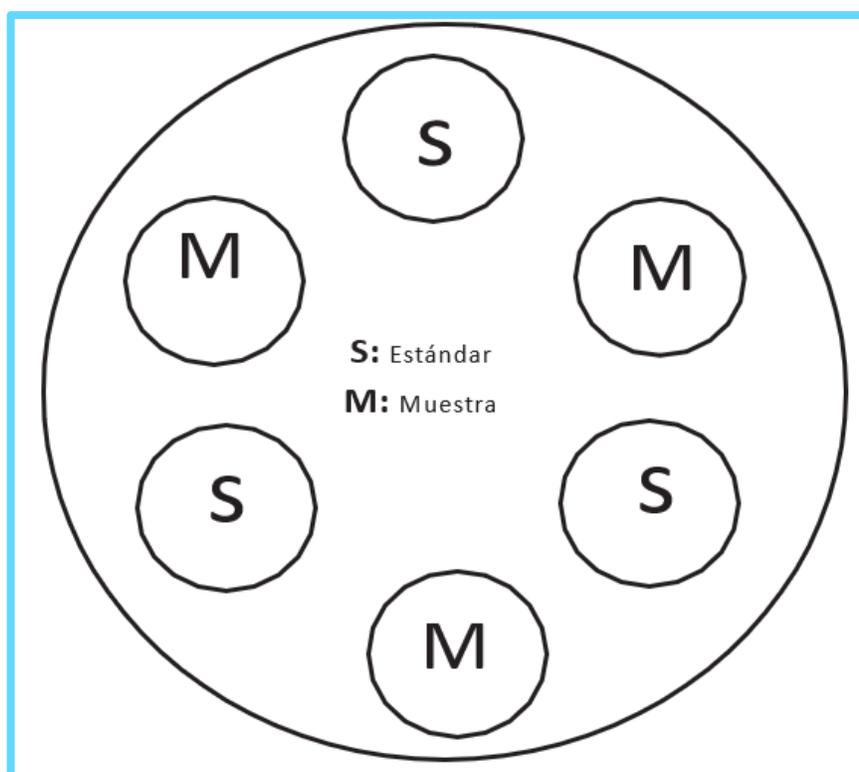


Figura 7. Distribución de Muestra y Estándar en Cilindros en placa.

- Volver a realizar el proceso para las otras tres diluciones de prueba del estándar (S2, S4 y S5). Para la muestra, colocar el volumen indicado en cilindros alternos en tres placas con la dilución del estándar (S3) y cada uno de los nueve cilindros remanentes con la dilución de muestra (Mx) e incubar de 36-37.5°C durante 16-18 horas, tal como se indica en la Figura 8.
- Los cálculos de la potencia del antibiótico se realizaron de acuerdo a lo estipulado en el capítulo <81> Antibióticos-Valoraciones Microbiológicas de la USP 41¹⁹.

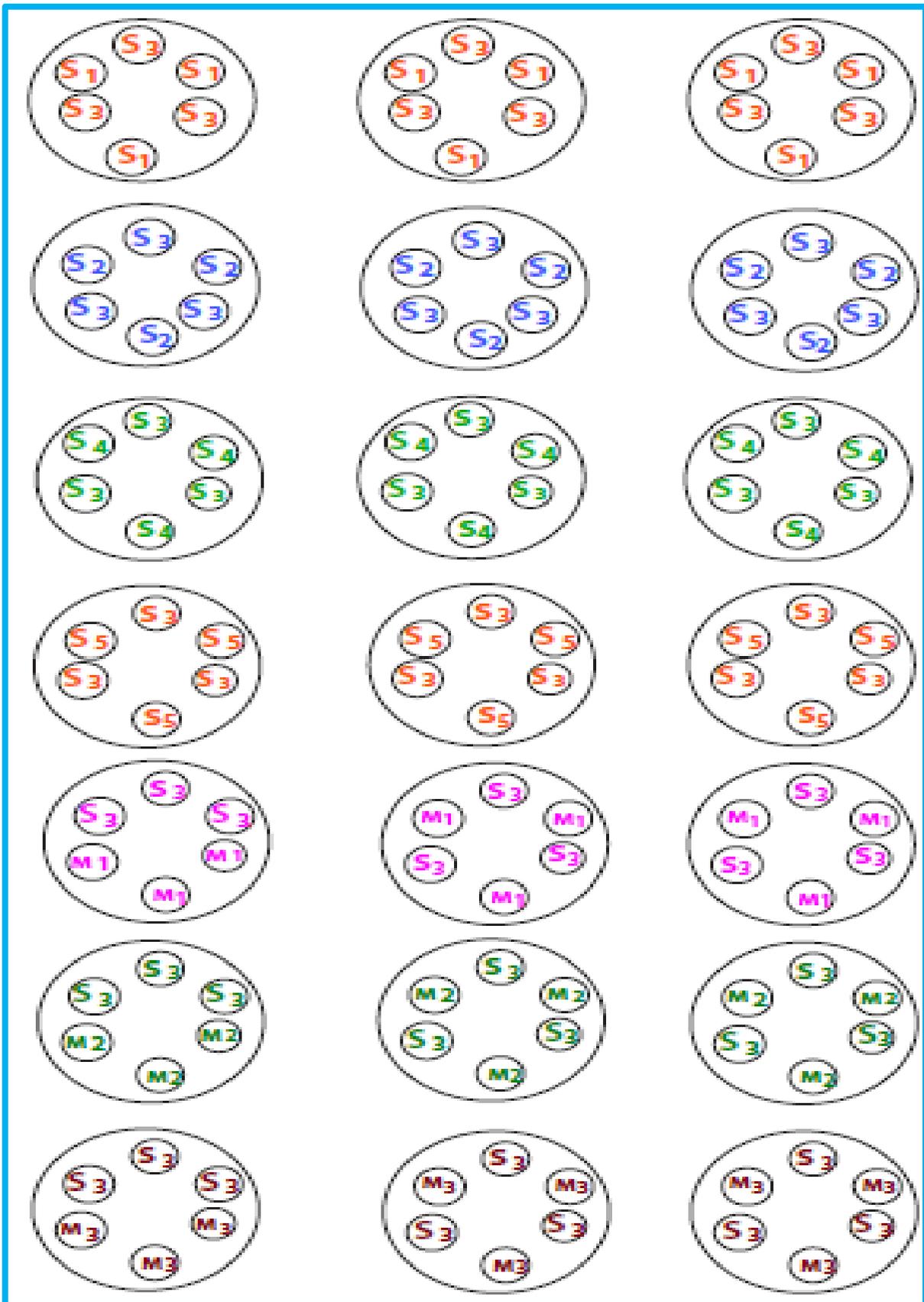


Figura 8. Distribución de placas con diluciones que contengan los niveles de prueba.

3.4.1.8. Criterios de aceptación

Para la lectura de los halos se tuvo en consideración que todos los halos de inhibición presentaron una forma circular y bordes bien definidos. Para la lectura de los estándares y la muestra, el valor máximo aceptable para la desviación estándar relativa no debe ser mayor de 10%, si sobrepasa este máximo los datos no serán adecuados y deberá realizarse un nuevo ensayo. El promedio de las muestras debe estar dentro del siguiente rango: 0,090 g – 0,135 g (90,0%-135,0%).

3.4.2. Metodología para evaluar parámetros para validación

Dentro de los parámetros considerados para la Validación se ha contemplado lo indicado en la Tabla 1:

Tabla 1. Parámetros a validar en el método analítico

PARÁMETROS A VALIDAR	
Selectividad y Especificidad	Exactitud
Linealidad	Precisión
Rango	

3.4.2.1. Selectividad y Especificidad

Tanto la muestra, principio activo y placebo fueron sometidos a condiciones de degradación forzada (Trabajar por duplicado).

Los ensayos se efectuaron en las condiciones de análisis que se indican, y fueron preparados a la concentración teórica tal como se indica en el método de análisis para la **Cuantificación de Gentamicina en DERMOLAB NF Crema**, de acuerdo a la Tabla 2:

Tabla 2. Condiciones de la muestra para ensayo de selectividad y especificidad

PRUEBA	SOLUCION REACTIVO	TEMPERATURA/ TIEMPO DE EXPOSICION
Termólisis	Diluyente	90 °C /30 minutos
Acelerada	Diluyente	105 °C / 4 horas

Se prepararon las muestras, principio activo y placebo tal cual, cada una por duplicado y según el método analítico.

3.4.2.2. Exactitud

Este parámetro se evaluó empleando el método de placebo cargado, que consiste en agregar una porción de analito sobre el placebo, similar a la concentración teórica del analito en 100 g de crema, esto es, 0,1 g de Gentamicina. La adición del principio activo se hizo en tres niveles de concentración los cuales fueron: 80%, 100% y 150%, tal como se indica en la Tabla 3 y tres determinaciones repetidas de cada concentración. Dichas muestras se realizaron por triplicado por cada concentración.

Tabla 3. Condiciones del estándar y muestra para ensayo de exactitud

Porcentaje	Peso teórico* equivalente a Gentamicina (mg)	Volu men Fiola (mL)	Volume n dilució n (mL)	Peso Placebo (g)	Volume n Fiola (mL)	Volume n dilució n (mL)	Volume n Fiola (mL)	Conc. Teórica Gentamicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
80	8,00	50	5,0	1,0000	100	4,0	100	0,320
100	10,00	50	5,0	1,0000	100	4,0	100	0,400
150	15,00	50	5,0	1,0000	100	4,0	100	0,600

* Se utiliza el principio activo Gentamicina sulfato.

Nota: El placebo corresponde a los excipientes a excepción del principio activo Gentamicina sulfato.

Con los resultados conseguidos se comprobó que se cumple los parámetros estadísticos que definen la exactitud:

- Homogeneidad de varianzas
- Test T de Student
- Determinación del sesgo o error determinado

3.4.2.3. Linealidad

Para evaluar este parámetro se preparó curvas de calibración del principio activo empleando estándares de referencia y de muestra de producto terminado, correspondientes a las concentraciones de: 64%, 80%, 100%, 125% y 156%, de acuerdo a como se indica en la Tabla

4. Posteriormente se compararon la curva del estándar con la del producto para ver si existe coincidencia entre ambas.

Las muestras se analizaron de acuerdo al método analítico, dichas muestras se realizaron por sextuplicado por cada concentración. Para el análisis de este parámetro se empleó también el programa Stat Plus.

Tabla 4. Condiciones del estándar y muestra para ensayo de linealidad

A. Con estándar de Gentamicina sulfato

Porcentaje	Peso teórico* equivalente a Gentamicina (mg)	Volu men Fiola (mL)	Volu men dilución (mL)	Volu men Fiola (mL)	Volu men dilución (μL)	Volu men Fiola (mL)	Conc. Teórica Gentamicina (μg/mL)
64	10,00	10	4,0	10	64	100	0,256
80	10,00	10	4,0	10	80	100	0,320
100	10,00	10	4,0	10	100	100	0,400
125	10,00	10	4,0	10	125	100	0,500
156	10,00	10	4,0	10	156	100	0,624

B. Con muestra de Producto Terminado

Porcentaje	Peso teórico* equivalente a Gentamicina (mg)	Volu men Fiola (mL)	Volu men dilución (mL)	Peso Placebo (g)	Volu men Fiola (mL)	Volu men dilución (mL)	Volu men Fiola (mL)	Conc. Teórica Gentamicina (μg/mL)
64	6,40	50	5,0	1,0000	100	4,0	100	0,256
80	8,00	50	5,0	1,0000	100	4,0	100	0,320
100	10,00	50	5,0	1,0000	100	4,0	100	0,400
125	12,50	50	5,0	1,0000	100	4,0	100	0,500
156	15,60	50	5,0	1,0000	100	4,0	100	0,624

Con lo cual se demostró:

- La recta de regresión construida con el logaritmo de la dosis del antibiótico patrón y la respuesta cumplió los parámetros de regresión lineal y análisis de varianza.
- Así mismo se efectuó el ensayo de comparación de las rectas patrón-problema.

3.4.2.4. Precisión

Se evaluó con referencia a los resultados alcanzados en la Repetibilidad y la precisión intermedia:

1. Repetibilidad

La verificación partió de una mezcla homogénea de crema realizada con las muestras a ensayar (muestra de concentración conocida). Se preparan 9 muestras independientes, según se indica en la técnica analítica.

2. Precisión intermedia

Tal como en la repetibilidad se inició de una mezcla homogénea de las muestras a ensayar (mismo lote de repetibilidad) y se prepararon 9 muestras individuales, según se indica en la técnica analítica.

En base a los resultados se calculó:

- Coeficiente de Variación
- La tolerancia, que expresa la variabilidad de método respecto al intervalo entre la especificación superior e inferior.

3.4.2.5. Rango

Se evaluó los resultados de linealidad, exactitud y precisión.

3.4.2.6. Criterios de aceptación

Los criterios de aceptación para la validación del método analítico en estudio se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Criterios de aceptación para validación del método analítico

PARAMETRO	ESPECIFICACIÓN
ESPECIFICIDAD	Placebo: El resultado no es cuantificable
	Estándar: No presenta interferencia
	Muestra: No presenta interferencia
PARAMETRO	ESPECIFICACIÓN
LINEALIDAD	“r ² ”: mínimo 0,95
	$y = bx \pm a$
	Análisis de varianza – F1: $p < 0,05$ (significativo)
	Análisis de varianza – F2: $p > 0,05$ (no significativo)
	Normalidad de los residuales: Debe cumplir
	Homogenidad de los residuales: Debe cumplir
	Test de Coincidencia (Conjunto): $F_{exp} < F_{tabla}$
PARAMETRO	ESPECIFICACIÓN
EXACTITUD	Porcentaje de recuperación: 95% - 105%
	Coefficiente de variación (CV): no mayor a 10%
	Homogenidad de Varianzas: $G_{exp} < G_{tabla}$
	Sesgo: < 3%
	Test de T de Student: $T_{exp} < T_{table}$
PRECISION	Repetibilidad:
	Coefficiente de variación (CV): < 5%
	Tolerancia: < 30%
	Precisión Intermedia
	Coefficiente de variación (CV): < 5%
	Tolerancia: < 30%
	Coefficiente de variación (CV) entre 2 analistas: no mayor a 6%
RANGO	64% - 156% de Gentamicina

Fuente: Adaptación a los parámetros solicitados por AEFI²⁴.

3.5. Instrumentos y procedimientos de recolección de datos

3.5.1. Técnica operatoria

Se parte de lo estipulado en el capítulo <81> Antibióticos-Valoraciones Microbiológicas de la USP 41. y lineamientos de validación según AEFI.

3.5.2. Instrumentos

El instrumento para recolectar datos es un formato denominado “FOR-CDC-087” Reporte de Valoración Microbiológica”, lo que es una hoja de cálculo de Excel de Microsoft, así mismo se ha generado plantillas de Excel para cada parámetro a analizar para la validación del método analítico.

3.5.3. Procedimiento de recolección de datos

Recolección de datos, mediante la lectura de los halos de inhibición que se obtuvieron en cada placa de ensayo, usando la técnica de valoración microbiológica, que se está validando.

3.5.4. Procesamiento de datos

- Se empleó Microsoft Excel 2016 y para Linealidad de método los datos han sido evaluados por StatPlus.
- Para realizar el procesamiento estadístico de los resultados y estimar cuantitativamente en base a los datos conseguidos mediante la medición de halos se procedió a interpolar con la curva de estandarización.
- Se trazó la curva empleando los promedios de todas las mediciones y una transformación logarítmica de las concentraciones en relación a la medición de halos de inhibición.
- Se utilizó el método de línea recta mediante el procesamiento de mínimos cuadrados y se realizó una plantilla para cada parámetro a validar, para corroborar la relación entre las concentraciones y los valores obtenidos.

IV. RESULTADOS

4.1. Análisis de datos obtenidos

El presente informe de validación, presenta y documenta los resultados obtenidos de todas las determinaciones de cada parámetro durante el proceso de validación del Método microbiológico de Cuantificación de Gentamicina del producto farmacéutico Dermolab NF Crema (Betametasona 0,05g+ Clotrimazol 1g + Gentamicina 0,1g /100g crema) por Método Microbiológico (Valoración en Cilindro-Placa), demostrando que este método analítico, realizándose de acuerdo a lo previamente diseñado y establecido, es adecuado para el propósito deseado mediante el cumplimiento de los parámetros determinados en la presente tesis, que servirá como sustento para presentarlo a la autoridad nacional del medicamento .

4.1.1. Resultados de ensayo de selectividad y especificidad

Tabla 6. Resultados de selectividad y especificidad del método

PARÀMETRO DE VALIDACIÒN	ESPECIFICACIÒN	RESULTADO
ESPECIFICIDAD Y/O SELECTIVIDAD	<ul style="list-style-type: none">• PLACEBO: No es cuantificable.	CONFORME
	<ul style="list-style-type: none">• ESTÁNDAR: No presenta interferencia.	CONFORME
	<ul style="list-style-type: none">• MUESTRA: No presenta interferencia.	CONFORME

a) Análisis de resultados

En la Tabla 6, se presentan los resultados del ensayo realizado para evaluar el parámetro de selectividad y especificidad del método analítico acorde a lo establecido en las condiciones de degradación estipulada en la Tabla 2, en donde tanto las muestras, el placebo y el principio activo fueron sometidas a condiciones externas de exposición a 90

°C por 30 minutos (Termólisis) y 105 °C por 4 horas (Acelerada); a su vez también se trabajaron en condiciones normales.

En el caso de las muestras placebo en condiciones tal cual, termólisis y acelerada, tal como se presenta en la Tabla 7, no se evidenció difusión de la sustancia en el medio de cultivo, es así que no aparecieron los halos de inhibición de crecimiento bacteriano, de manera que, no hubo respuesta cuantificable, siendo esto un dato importante ya que se demuestra que no hay interferencia durante el desarrollo de la técnica a validar.

Tabla 7. Selectividad y especificidad del método-placebo

Tipo de muestra	Muestra	Peso (mg)	Concentración (ug/mL)	Logaritmo natural muestra*	Concentración de muestra hallada (ug/ml)	% Gentamicina	Especificación	Observación
PLACEBO TAL CUAL (PB T/C)	M1	1001,40	0,400560	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0,000	No hay crecimiento de halo	El resultado no es cuantificable (0%) y no presenta interferencia.
	M2	1000,50	0,400200	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0,000		
PLACEBO SOMETIDO A TERMÓLISIS (PB TERM)	M1	1001,20	0,400480	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0,000	No hay crecimiento de halo	El resultado no es cuantificable (0%) y no presenta interferencia.
	M2	1000,90	0,400360	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0,000		
PLACEBO SOMETIDO A CALOR 105°C (PB ACEL)	M1	1000,70	0,400280	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0,000	No hay crecimiento de halo	El resultado no es cuantificable (0%) y no presenta interferencia.
	M2	1001,60	0,400640	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0,000		

En referencia a los ensayos realizados al principio activo en condiciones tal cual, termólisis y acelerada, se evidencia en los resultados obtenidos que no presentan interferencia para la recuperación de gentamicina, tal como se evidencia en la Tabla 8 obteniéndose el valor más bajo de porcentaje de recuperación del analito (73,977%) en las muestras sometidas a condiciones de 105 °C por 4 horas (Acelerada), de acuerdo al dato anterior podemos decir que hay una disminución de la actividad microbiana por efecto de la degradación de la gentamicina sulfato.

En los ensayos realizados a las muestras de Dermolab NF crema en condiciones tal cual, termólisis y acelerada, se evidencia en los resultados obtenidos en la tabla 9, que la muestra no presenta interferencia para la recuperación de gentamicina, obteniéndose el valor más bajo de porcentaje de recuperación del analito (68,787 %) en las muestras sometidas a condiciones de 105 °C por 4 horas (Acelerada), de acuerdo al dato anterior podemos decir que hay una disminución de la actividad microbiana por efecto de la degradación de la gentamicina sulfato.

Tabla 8. Selectividad y especificidad del método-principio activo

Tipo de muestra	Muestra	Peso (mg)	Concentración (ug/mL)	Logaritmo natural muestra*	Concentración de muestra hallada (ug/ml)	% Gentamicina	Especificación	Observación
PRINCIPIO ACTIVO TAL CUAL (PA T/C)	M1	14,70	0,394548	-0,903293	0,405233	102,708	No presenta interferencia	No presenta interferencia.
	M2	15,00	0,402600	-0,895401	0,408444	101,451		
PRINCIPIO ACTIVO SOMETIDO A TERMÓLISIS (PA TERM)	M1	15,00	0,402600	-0,923679	0,397056	98,623	No presenta interferencia	No presenta interferencia. Hay disminución de la actividad antimicrobiana por efecto de la degradación de la gentamicina sulfato.
	M2	15,20	0,407968	-0,926704	0,395856	97,031		
PRINCIPIO ACTIVO SOMETIDO A CALOR 105°C (PA ACEL)	M1	15,40	0,413336	-1,177716	0,307981	74,511	No presenta interferencia	No presenta interferencia. Hay disminución de la actividad antimicrobiana por efecto de la degradación de la gentamicina sulfato
	M2	15,50	0,416020	-1,178440	0,307759	73,977		

Tabla 9. Selectividad y especificidad del método-muestra

Tipo de muestra	Muestra	Peso (mg)	Concentración (ug/mL)	Logaritmo natural muestra*	Concentración de muestra hallada (ug/ml)	% Gentamicina	Especificación	Observación
MUESTRA TAL CUAL (M T/C)	M1	1006,00	0,402400	-0,899726	0,406681	101,064	No presenta interferencia	No presenta interferencia.
	M2	1006,50	0,402600	-0,882292	0,413833	102,790		
MUESTRA SOMETIDA A TERMÓLISIS (M TERM)	M1	1003,40	0,401360	-0,925897	0,396176	98,708	No presenta interferencia	No presenta interferencia. Hay disminución de la actividad antimicrobiana por efecto de la degradación de la gentamicina sulfato.
	M2	1003,00	0,401200	-0,941088	0,390203	92,259		
MUESTRA SOMETIDA A CALOR 105°C (M ACEL)	M1	1004,20	0,401680	-1,248718	0,286872	71,418	No presenta interferencia	No presenta interferencia. Hay disminución de la actividad antimicrobiana por efecto de la degradación de la gentamicina sulfato
	M2	1005,10	0,402040	-1,285358	0,276552	68,787		

4.1.2. Resultados de ensayo de linealidad

Tabla 10. Resultados de linealidad del método

PARÀMETRO DE VALIDACIÒN	ESPECIFICACIÒN	RESULTADO
LINEALIDAD	<p>A: ESTÀNDAR</p> <ul style="list-style-type: none"> • “r²”: mínimo 0,95 • $y = bx \pm a$ • Anàlisis de varianza - F1: $P < 0,05$ (significativo) • Anàlisis de varianza - F2: $P > 0,05$ (no significativo) • Normalidad de los residuales: Debe cumplir • Homogeneidad de los residuales: Debe cumplir 	<p>$r^2 = 0,97884$</p> <p>$y = 5,25608X + 20,18847$</p> <p>F1: $P = 0,000 < 0,05$</p> <p>F2: $P = 0,317 > 0,05$</p> <p>Ver Figura 9. de Normalidad de los residuales: Cumple</p> <p>Ver Figura 9. de Homogeneidad de los residuales: Cumple</p>
LINEALIDAD	<p>B: MUESTRA</p> <ul style="list-style-type: none"> • “r²”: mínimo 0,95 • $y = bx \pm a$ • Anàlisis varianza - F1: $P < 0,05$ (significativo) • Anàlisis varianza - F2: $P > 0,05$ (no significativo) • Normalidad de los residuales: Debe cumplir • Homocedasticidad de los residuales: Debe cumplir <p>C: ESTÀNDAR Y MUESTRA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test de Coincidencia (conjunto): Coincidencia de pendientes: $F_{exp} < F_{tabla}$ • Coincidencia de interceptos: $F_{exp} < F_{tabla}$ 	<p>$r^2 = 0,97026$</p> <p>$y = 5,08193X + 20,08982$</p> <p>F1: $P = 0,000 < 0,05$</p> <p>F2: $P = 0,431 > 0,05$</p> <p>Ver Figura 10. de Normalidad de los residuales: Cumple</p> <p>Ver Figura 10. de Homocedasticidad de los residuales: Cumple</p> <p>$1,38024 < 3,4668$</p> <p>$0,27988 < 3,4668$</p>

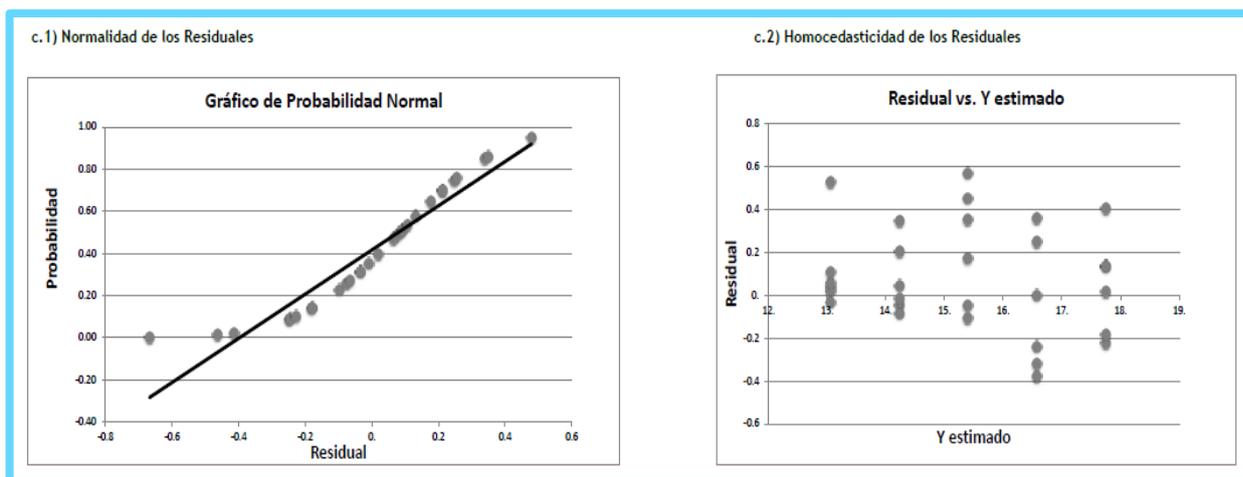


Figura 9. Resultados de Normalidad de Residuales y Homocedasticidad de los residuales del Estándar.

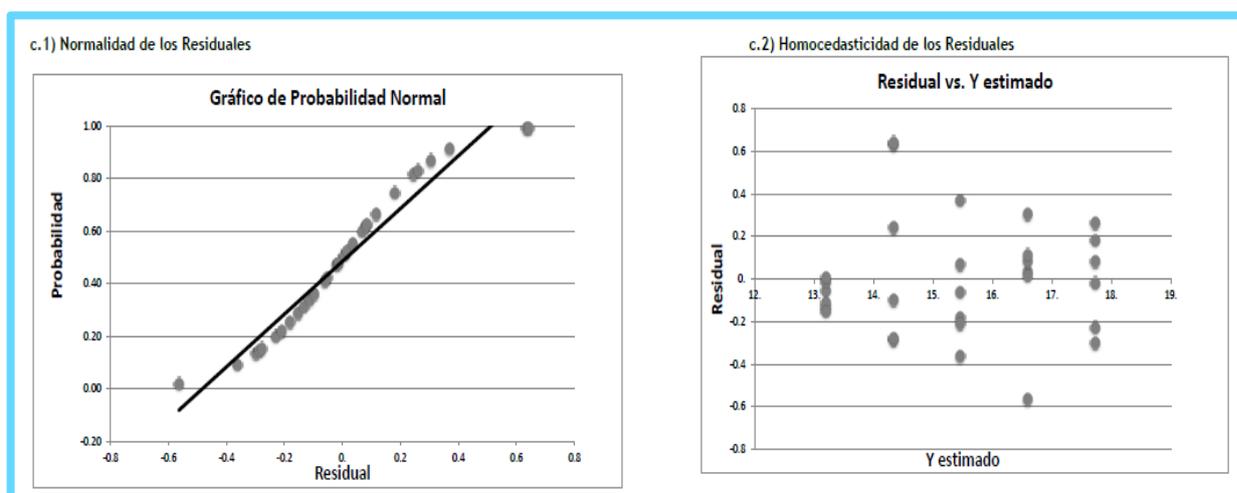


Figura 10. Resultados de Normalidad de Residuales y Homocedasticidad de los residuales de la muestra.

- **Análisis de resultados**

En la Tabla 10, presentan los resultados del ensayo realizado para evaluar el parámetro de linealidad del método analítico de acuerdo a las condiciones dadas en el Tabla 4.

En donde se puede observar que el coeficiente de determinación de muestra es de 0,97026 y 0,97884 del estándar, lo cual nos demuestra que está acorde con el criterio de aceptación que debe ser mínimo 0,95, y que coexiste una dependencia total entre ambas variables denominada relación directa: cuando el halo tiene un mayor diámetro (mm) la concentración (ug/mL) del principio activo es mayor, es decir cuando una variable aumenta, la otra también lo hace en idéntica proporción.

El análisis de varianza F_1 con un resultado de 0,000 tanto de la muestra como del estándar está cumpliendo con el criterio de aceptación que debe ser menor a 0,05.

El análisis de varianza F_2 para la muestra es de 0,431 y de 0,317 del estándar, resultados que se encuentran superiores al criterio de aceptación que nos indica que debe ser mayor a 0,05.

En lo que se refiere a Normalidad de los residuales y Homogenidad de residuales, la evaluación es conforme, ya que la observación de los gráficos del anexo N° 6, es conforme con el criterio de aceptación prediseñado.

El Test de Coincidencia nos proporcionan datos de la muestra y del estándar, donde en las pendientes ($F_{exp} < F_{tabla}$: $1,38024 < 3,4668$) y los interceptos ($F_{exp} < F_{tabla}$: $0,27988 < 3,4668$) no existen diferencias significativas, con lo cual se concluye que las rectas del estándar y la muestra son paralelas, tienen el mismo corte y son coincidentes.

4.1.3. Resultados de ensayo de exactitud

Tabla 11. Resultados de exactitud del método

PARÀMETRO DE VALIDACIÒN	ESPECIFICACIÒN	RESULTADO
EXACTITUD	• Porcentaje de recuperación: 95%-105%	99,679 %
	• Coeficiente de variación (CV): no mayor a 10%	1,258 %
	• Homogenidad de Varianzas: $G_{exp} < G_{tabla}$	$0,511 < 0,871$
	• Sesgo: $< 3 \%$	1,06 %
	• Test T de Student: $T_{exp} < T_{tabla}$	$0,765 < 2,306$

- **Análisis de resultados**

En la Tabla 11, visualizamos los resultados del ensayo realizado para evaluar el parámetro de exactitud del método analítico de acuerdo a las condiciones indicadas en la tabla 3.

Los porcentajes de recuperación por cada nivel estuvieron entre 98,055% y 102,040%, donde se obtuvo un resultado promedio de 99,679% de recuperación del activo, lo cual cumple con el criterio de aceptación que nos indica un porcentaje de recuperación que estipula entre 95%-105%.

El coeficiente de variación (CV) de las muestras en los tres niveles de concentración (80%, 100% y 150%), fue de 1,258 %, lo cual nos indica que se encuentra dentro del criterio de aceptación que es de no mayor al 10%.

En la Homogeneidad de varianza, el Gexperimental es menor que el Gtabla (0,511<0,871), lo cual nos indica que las varianzas son homogéneas.

El Valor obtenido del sesgo fue de 1,06%, lo cual se encuentra de los criterios de aceptación que indica un valor menor a 3%.

Conforme con la prueba de T de Student se alcanzó un valor Texp: 0,765 para gentamicina, lo que indica que el T exp es menor que el Ttabla (2,306), por lo tanto, no se encuentra diferencia relevante entre la recuperación media obtenida y el 100% por lo que la exactitud es conforme.

4.1.4. Resultados de ensayo de precisión

Tabla 12. Resultados de ensayo de precisión

PARÀMETRO DE VALIDACIÒN	ESPECIFICACIÒN	RESULTADO
PRECISION	Repetibilidad	
	• Coeficiente de variación (CV) < 5 %	2,031 %
	• Tolerancia: < 30 %	19,153 %
	Precisión Intermedia	
• Coeficiente de variación (CV) < 5 %	1,727 %	
• Tolerancia: < 30 %	16,279 %	
• Coeficiente de variación (CV) entre 2 analistas no mayor a 6%	2,074 %	

- **Análisis de resultados**

En el Tabla 12, se muestran los resultados de los análisis realizados para determinar el parámetro de Precisión (Repetibilidad y Precisión intermedia) del método analítico.

Tanto la repetibilidad como la precisión intermedia se evaluaron nueve muestras cada uno.

El resultado del coeficiente de variación (CV) que se obtuvo para la repetibilidad fue de 2,031%, y para precisión intermedia fue de 1,727%, siendo su criterio de aceptación menor a 5%, esto nos indica la precisión de estas, ya que fue realizado en diferentes condiciones, pero con una misma muestra, con lo cual no se evidencio una diferencia significativa entre los datos de las pruebas, siendo un método preciso.

Se obtuvo como resultado para repetibilidad una tolerancia de 19,153% y para precisión intermedia de 16,279%, lo cual cumple con el criterio de aceptación que indica que debe ser menor al 30%.

Se obtuvo un resultado de 2,074% para el coeficiente de variación (CV) entre 2 analistas lo cual nos indica que se encuentra dentro del criterio de aceptación que es no mayor a 6%, por lo cual no se evidenciaron diferencias significativas entre la media de ambos analistas, por lo cual, el método analítico fue repetitivo en diferentes días, en consecuencia, el método analítico garantiza repetibilidad en diferentes días y diferentes analistas.

4.1.5. Rango

Tabla 13. Rango

PARÀMETRO DE VALIDACIÒN	ESPECIFICACIÒN N	RESULTADO
RANGO	0,064 g – 0,156 g	CONFORME

- **Análisis de resultados**

En el tabla 13, se presenta la especificación propuesta para el parámetro de Rango del método analítico, esto como resultante de la evaluación del parámetro de linealidad para el analito del producto, en el cual la mínima cantidad de gentamicina en una muestra que pueda detectarse y/o cuantificarse mediante la formación de halos de inhibición es de 0,064g y la máxima es de 0,156 g, esta última debido a las condiciones analíticas los halos de inhibición superiores a esta concentración no se evidenciaban de forma circular y con bordes bien definidos, lo cual era una limitante para el cálculo de la potencia del antibiótico.

V. DISCUSIÓN

García J, en el 2013⁸. Realizó un estudio de investigación sobre “Determinación y cuantificación de Gentamicina sulfato en Multiderm Crema del Laboratorio Farminindustria S.A por Potencia Antibiótica”, donde indica que anteriormente realizaba ensayos de confrontación con *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, consiguiendo resultados insatisfactorios, por lo cual utilizaron como microorganismo de ensayo a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, precisamente por las características propias del microorganismo, y su sensibilidad frente a la actividad propia del antibiótico gentamicina sulfato.

En nuestro estudio para la validación de la Cuantificación de Gentamicina mediante el Método Microbiológico Cilindro-Placa en el producto terminado Dermolab NF crema (Betametasona 0,05g+ Clotrimazol 1g + Gentamicina 0,1g/100g) de Laboratorios Vitapharma S.A.C., se empleó el método de difusión en agar, utilizando la cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, puesto que este tipo de bacterias evidencia una destacada sensibilidad ante los aminoglucósidos, y también esta cepa está indicada para el análisis de este antibiótico en la monografía sobre valoración microbiológica en la USP vigente²².

García J, indica en el acondicionamiento de los estándares y las muestras se utilizó buffer N°3 a un pH= 8,0, ya que presentan mayor actividad a pH alcalino que en medios ácidos, potenciando aún más su acción ante los microorganismos⁸.

Según la USP 41, para la obtención del inóculo del microorganismo de prueba, se deberá diluir una cantidad apropiada de la suspensión de recolección con solución salina SR, usando el espectrofotómetro de UV-Visible, medir el porcentaje de transmitancia a 580nm, utilizándose para estandarizar el volumen de suspensión de recolección agregado a la capa de agar para siembra²².

Pareja L en el 2012⁹. Realizó su tesis sobre “Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de Gentamicina en un producto farmacéutico en crema por potencia antibiótica”, en donde para la preparación de placas de ensayo, dispensaba 21mL de Medio antibiótico N°11 sin inóculo para la capa base y para la capa siembra utiliza 4mL que contenía un inóculo con una concentración de 0,04 mL por cada 100 mL de medio.

En nuestro estudio, para el crecimiento previo del inóculo de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, se utilizó el Agar Antibiótico N°1 el cual tiene un pH de 6,6 +/- 0,1 y posterior a su tiempo de incubación se procede a recolectar el microorganismo con solución salina SR, que luego fue

transferido 30uL de la suspensión madre a un frasco que contenga 100 mL con Medio Antibiótico N°11 el cual tiene un pH de 8,3 +/- 0,1 que se utilizó dispensando 4mL para capa siembra en la placa Petri ,que sirvió en el proceso del análisis, para esto se preparó previamente la capa base usando 21 mL de Medio N°11 y se tuvo consideración el nivel de la superficie del trabajo en el proceso del plaqueo, ya que esto era un factor que podría intervenir en la formación de los halos de inhibición, lo cual demostró ser adecuado cumpliendo con los parámetros de Especificidad (Selectividad), Linealidad, Exactitud, Precisión (Repetibilidad y Precisión intermedia) y Rango.

El estudio realizado por Campos A, Francisco G, en el 2013²⁵. Denominado “Validación del Método analítico por Espectrofotometría Infrarrojo para la cuantificación de Simeticona 40mg en tabletas”, se determinó que su método es selectivo ya que los excipientes de la formula no interfirieron en la determinación del principio activo obteniéndose como resultado 0,78%, siendo el máximo permitido < 2%.

En algunas monografías, los términos especificidad y selectividad son iguales, pero en realidad existen diferencias. La selectividad es sometida a condiciones extremas de temperatura, luz, soluciones acidas y básicas²⁴.

Cuando evaluamos los parámetros de Especificidad y Selectividad, de acuerdo a lo indicado en la Tabla 2 y los resultados obtenidos de acuerdo a la Tabla 6 , se muestra evidencia que las muestras (Estándar , Muestra y Placebo), no resultaron ser afectadas luego de ser sometidas a condiciones externas, no presentando interferencias en la formación del halo de inhibición al cuantificar el principio activo en el estándar y muestra , en el caso del placebo los resultados no fueron cuantificables ya que no se observó halos de inhibición, por lo cual se puede determinar la especificidad del método analítico, observando la eficacia de detectar el analito de forma indiscutible sin injerencia de otro compuesto y/o sustancia química que puedan estar presentes en las muestras.

Al realizar la evaluación del parámetro de Linealidad, cumpliendo con lo estipulado en la Tabla 4 y los resultados obtenidos en la tabla 10, la curva elaborada entre el logaritmo de la concentración en la variable independiente (X), y el diámetro del halo (mm) en la variable dependiente (Y), demostró ser lineal en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 64% y 156%. Así mismo se evidencio como la recta de la regresión formada con el diámetro del halo y su respuesta en la concentración cumple con los parámetros establecidos del coeficiente de determinación, en la cual ninguno fue menor o igual a 0,95.

En el estudio realizado por Campos A, Francisco G, en el 2013²⁵. Denominado “Validación del Método analítico por Espectrofotometría Infrarrojo para la cuantificación de Simeticona 40mg en tabletas”, se determinó que su método cumple con el parámetro de linealidad, ya que demostró que el método produce resultados que son proporcionales a la concentración de trabajo del analito, en un intervalo definido de 80% a 120% con la evaluación estadística de los datos obteniendo un coeficiente de correlación de 0,999 lo que indica una significativa correlación lineal entre la concentración y el área de lectura que reporta el analito en análisis.

Pareja L. en el 2012⁹. En su tesis sobre “Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de Gentamicina en un producto farmacéutico en crema por potencia antibiótica”, se logra determinar que el método es exacto, ya que los resultados obtenidos durante el ensayo nos dan: un porcentaje de recuperación del 100%, un sesgo de 0,19% inferior al 3%, homogeneidad de varianzas de 0,073 resultado mayor a 0,05 de la especificación y por último obtenemos que el t-experimental es menor al t-tablas, cumpliendo con todos los parámetros establecidos para determinar la exactitud del método.

En la Exactitud, se procedió a de medir la dispersión de los datos se determinó la Homogeneidad de varianzas, la cual se realizó de acuerdo a lo indicado en la Tabla 3 y los resultados obtenidos que se encuentran en la tabla 11, cumple con los criterios de aceptación estipulados, así mismo no se obtuvo un valor de sesgo mayor al 3%, lo cual nos indica que se encuentra dentro de especificación.

De acuerdo con el Test T de Student se logró un valor T_{exp} : 0,765 para gentamicina, valor menor a lo que indica T_{tabla} , por lo tanto, o se encuentra una representativa diferencia entre la recuperación de la media obtenida y el 100% por lo tanto la exactitud es conforme.

La Precisión obtenida en el Método analítico de acuerdo a los resultados obtenidos según la tabla 12, se evidencio que los coeficientes de variación para la repetibilidad y precisión intermedia fueron de 2,301% y 1,727% para cada uno, evidenciando que cumple con los criterios de aceptación, y el coeficiente de variación entre 2 analistas es de 2,074 % , lo cual demuestra que no se observan diferencias significativas , por lo cual el método analítico es repetitivo y reproducible por ambos analistas y reproducible en distintos días por un mismo analista.

Nuñera A. y Romero Sindy, en el año 2012²⁶. Realizaron su tesis sobre “Validación del método analítico por Espectrofotometría UV/VIS para la cuantificación de Enalapril maleato 10mg tabletas recubiertas”, donde el valor del coeficiente de variación es de 0,59% siendo el valor máximo 2%, conforme a este resultado se observa que el método analítico aplicado es capaz de

dar valores cercanos entre si cuando se aplican en similares condiciones operativas por los analistas en distintos días.

Por lo expuesto, se considera que este estudio es un valioso aporte, ya que al validar el método microbiológico cilindro-placa para la cuantificación de Gentamicina en Dermolab NF crema, se tendrá pruebas documentarias para cumplir con las exigencias legales y las Buenas Prácticas farmacéuticas, obteniendo un método ofrece confianza y seguridad en los resultados que se puedan emitir, y a su vez garantizando la calidad y eficacia del producto.

VI. CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó la técnica analítica para cuantificación de Gentamicina Sulfato en el producto Dermolab NF crema por el Método Microbiológico Cilindro-Placa.

Se comprobó la efectividad del método microbiológico, verificando que el método microbiológico tiene la capacidad de proporcionar resultados confiables, cumpliendo en forma consistente y repetitiva los resultados, ya que se cumplió con los parámetros de validación establecidos para la validación de cuantificación de Gentamicina sulfato en crema.

Se comprobó la importancia en todo proceso de validación de método analítico de los materiales, equipos y reactivos, lo cual nos garantizó la trazabilidad de la información y la evidencia documentada.

VII. RECOMENDACIONES

1. Los analistas que realicen los ensayos Microbiológicos en el área de control de calidad, debe estar debidamente capacitados y entrenados para que pueda cumplir adecuadamente sus labores y nos garantice la confiabilidad de los resultados que emita.
2. Cuando se opte por realizar una determinada validación, tener en consideración las Normas oficiales y hacer un estudio previo de factibilidad para poder realizarlo, ya que se debe tener en cuenta los lotes que se producen al año en el laboratorio, de lo contrario evaluar realizar el análisis en un laboratorio externo acreditado con el cumplimiento de las Buenas Prácticas de laboratorio.
3. Cuando se tenga un cambio en la formulación cuali-cuantitativa del producto farmacéutico, se modifique el método analítico, equipos, se tendrá que realizar una revalidación, que nos pueda garantizar la obtención de resultados fiables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ley de los Productos Farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios (internet). Perú. Congreso de la República; 2009. Disponible en:
<http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Ley29459.pdf>
2. Manual de Buenas prácticas de Manufactura de productos farmacéuticos. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas DIGEMID. Ministerio de Salud, 2018.
3. Manual de Buenas prácticas de Laboratorio para el Control de Calidad de productos farmacéuticos. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas DIGEMID. Ministerio de Salud, 2018.
4. Farmacopea de los Estados Unidos. USP 41 NF 35. The USP Convention. Rockville, 2018. Sulfato de Gentamicina crema. :4852.
5. Volonté M, Quiroga P. Análisis farmacéutico. 1a ed.- Universidad Nacional de La Plata. 2013.:30.
6. Andino A, Coronado L, Téllez M. Valoración Microbiológica de la Potencia de la Gentamicina en ampolla 20 mg /ml por el Método Cilindro-Placa, en el Laboratorio de Control Microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas en el periodo Febrero-Diciembre 2013. Nicaragua 2013 (Tesis Químico Farmacéutico) León: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León, Facultad de Ciencias Químicas; 2013.
7. Mora J, Implementación y Desarrollo de la Técnica de Potencia Microbiológica de Antibióticos y su Impacto Económico en la Empresa Calox de Costa Rica, S.A. Costa Rica 2007 (Proyecto para optar el título de Ingeniería en Biotecnología) Catargo: Instituto Tecnológico Costa Rica, Escuela de Biología, 2007
8. García J. Determinación y cuantificación de Gentamicina sulfato en Multiderm Crema del Laboratorio Farminustria S.A por potencia antibiótica. Trujillo 2013(Tesis Químico Farmacéutico). Perú, Universidad Nacional de Trujillo;2013.
9. Pareja L. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de gentamicina en un producto farmacéutico en crema por potencia antibiótica. Cusco 2013 (Tesis Químico Farmacéutico). Perú. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2013.

10. Saénz E, Sánchez L. Antibióticos Tópicos. *Dermatología Peruana*.2005: 1:13.
11. United States Pharmacopoeia. USP 41 NF 35. The USP Convention. Rockville, 2018: Vol 2: 4850.
12. Vademecum.es (Internet). México: COFEPRIS; c2015-2018 (citado 20 Oct 2018) Equivalencia del Quadriderm; (apro.2p.) Disponible en:
<https://www.vademecum.es/equivalencia-lista-quadriderm+nf+crema-mexico->
13. Avendaño C. Introducción a la Química Farmacéutica. España: Mc Graw-Hill;2009.
14. Laboratorios VitaPharma. Área de Unidad de Gestión de la Calidad, Manual del Sistema de Gestión Integrado de la Calidad, MAN-UGC-001.Versión 01. Lima 2018.
15. Ministerio de Salud. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos.DIGEMID.1999(consultado el 8 de jul 2018) disponible en:
http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Normatividad/1999/RM_055-1999-SA.pdf
16. Camacho A, Arias J. Implementación y estandarización de la técnica para la determinación de potencia microbiológica de neomicina en crema tópica fabricada en una planta productora de medicamentos. Colombia 2002 (Tesis Microbióloga Industrial) Colombia, Pontificia Universidad Javeriana; 2002.
17. Ministerio de Salud. Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Calidad de Productos Farmacéuticos. DIGEMID.2013(consultado el 22 de jul 2018) disponible: en:
http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Publicaciones/DocumentosVarios/P32_2013-08-09_RM_485-2013.pdf
18. Volonté M, Quiroga P. Análisis farmacéutico. Cátedra Control de calidad de medicamentos. Argentina. Universidad Nacional de la Plata. Áreas de Ciencias Farmaceuticas.2013.
19. Ministerio de Salud. Manual de Buenas prácticas de Manufactura de productos farmacéuticos. DIGEMID.2018: 56. (consultado el 8 de Jul 2018) Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Normatividad/2018/DS-021-2018.pdf>

20. Asociación Argentina de Microbiología. Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos. Argentina. 2013. Cap. IV.5: 243 – 363.
21. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. NOM-001-SSA1-2010. Valoración Microbiológica de Antibióticos (MGA 0100). (consultado el 8 de Jul 2018) Disponible en: <https://www.farmacopea.org.mx/Repositorio/Documentos/2.pdf>
22. Farmacopea de los Estados Unidos. USP 41 NF 35. Antibióticos- Valoraciones Microbiológicas Capitulo <81>.2018:158-178.
23. Ministerio de Salud. Manual de Buenas prácticas de Laboratorio para el Control de Calidad de productos farmacéuticos. DIGEMID.2018:26-28.
24. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. AEFI. Validación de Métodos Analíticos. España.2011.
25. Campos A, Francisco G. Validación del método analítico por espectrofotometría infrarrojo para la cuantificación de Simeticona 40mg en tabletas. Trujillo 2013(Tesis Químico Farmacéutico) Perú, Universidad Nacional de Trujillo; 2013.
26. Nuñera M, Romero S. Validación del método analítico por espectrofotometría uv/vis para la cuantificación de enalapril maleato 10mg tabletas recubiertas. Trujillo 2012 (Tesis Químico Farmacéutico) Perú, Universidad Nacional de Trujillo; 2012.

ANEXO

Anexo N°1

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Planteamiento de Problema	Objetivos	Hipótesis	Justificación	Variable	Tipo de Variables	Técnicas, instrumentos de recolección de datos
<p>Problema General ¿Se cumplirán los parámetros y especificaciones establecidas en las normas técnicas oficiales para la validación de un método analítico microbiológico Cilindro – Placa, para la cuantificación de gentamicina sulfato en el producto Dermolab NF crema de Laboratorios Vitapharma S.AC.?</p>	<p>Objetivo General Realizar la Validación de la Técnica analítica microbiológica para la cuantificación de gentamicina sulfato en el producto Dermolab NF crema.</p> <p>Objetivos específicos O.E.1: Evaluar los parámetros para la Validación del Método Microbiológico Cilindro – Placa.</p> <p>O.E.2: Comprobar la efectividad de la técnica analítica para la cuantificación de gentamicina sulfato.</p>	<p>Hipótesis General El método Microbiológico Cilindro – Placa para cuantificación de gentamicina sulfato en el producto Dermolab NF crema, proporciona resultados confiables, que se encuentran dentro de especificaciones señaladas en normas técnicas vigentes.</p> <p>Hipótesis Nula El método microbiológico Cilindro – Placa para cuantificación de Gentamicina no proporciona resultados confiables.</p> <p>Hipótesis Especifica 1 La validación del método microbiológico cilindro – placa cumplirá con los parámetros para la cuantificación de Gentamicina Sulfato en el producto Dermolab NF.</p> <p>Hipótesis Especifica 2 El método microbiológico cilindro – placa cumplirá con los parámetros para la cuantificación de Gentamicina Sulfato en el producto Dermolab NF.</p>	<p>Contribuye a obtener resultados confiables del método de la validación del método analítico con evidencia documentada y de alto grado de seguridad cumpliendo con la regulación sanitaria vigente.</p>	<p>Variable independiente: Validación de un método microbiológico.</p> <p>Variable dependiente: Cuantificación de gentamicina sulfato.</p>	<p>Variable Cuantitativa</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Monografía <81> antibióticos – valoraciones microbiológicas de USP vigente (Farmacopea de los Estados Unidos). - Lineamientos de Validación según AEFI. - Formato “FOR-CDC-087” reporte de valoración microbiológica. - Lectura de halos de inhibición

Anexo N°2

OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable	Dimensión	Indicador	Valores	Criterios de medición	Tipo de Variable	Instrumentos
Validación del método microbiológico	Parámetros de Validación	Exactitud Precisión Selectividad y Especificidad Linealidad Rango	Porcentaje de recuperación Grado de dispersión Regresión lineal y análisis de varianza Expresión de valores derivados de estudios de linealidad	Razón	Variable Nominal	Adaptación a los parámetros solicitado por AEFI Test de T de Student
Cuantificación de gentamicina sulfato	Valoración microbiológica de Antibióticos.	Valoración Cilindro – Placa Microorganismo de Prueba	Concentración inhibitoria mínima / máxima Diámetro del halo de inhibición	Razón Razón	Variable Nominal	Monografía <81> Antibióticos- Valoraciones Microbiológicas de USP vigente (Farmacopea de los Estados Unidos) Formato FOR-CDC-087 Reporte de Valoración Microbiológica

Anexo N°3

Carta de Validación de los Resultados obtenidos en la Validación del Método Microbiológico



Lima, 10 de Septiembre del 2018

CERTIFICA

Mediante el presente documento Laboratorio VITA PHARMA S.A.C certifica que la metodología empleada por LUIS ERNESTO VIGNOLO ASECIO ,para la tesis que lleva por título "Validación de Método Microbiológico Cilindro-Placa para cuantificación de Gentamicina sulfato en Dermolab NF crema de Laboratorios Vitapharma S.A.C, Lima 2018". Reúne los requisitos suficientes y necesarios para ser considerado valido y confiable , por lo tanto apto para ser aplicado en los procesos analíticos propios de la Institución y lograr su objetivo principal que es de obtener el TÍTULO PROFESIONAL DE QUIMICO FARMACÈUTICO

Se extiende la presente para los fines correspondientes.

Atentamente,

VITA PHARMA S.A.C.


Q.F. René Farfán Sánchez
Jefe de Control de Calidad
C.Q.F.P. 16649

Q.F René Farfán Sánchez
Jefe de Control de Calidad
C.Q.F.P. 16649

Anexo N°4

FORMATO PARA REPORTE DE VALORACION MICROBIOLÓGICA

	<h2 style="margin: 0;">Reporte de Valoración Microbiológica</h2>
---	--

Fecha de Inicio de Análisis: _____
 Fecha de Fin de Análisis: _____

Descripción del Producto

Nombre del Producto: _____ Concentración: _____
 Nombre del Principio Activo: _____ Lote: _____
 Fecha de Expira: _____

Datos del Estandar

Nombre: _____ Tipo : _____ Lote : _____
 Potencia: _____ Expira: _____

Datos del Microorganismo de Prueba (Cepa)

Nombre: _____ ATCC : _____ No. de Pasaje : _____
 Lote: _____ Expira: _____

Diluciones del Estandar

Cálculo de Peso de Estándar

Solucion Stock

14.920 Peso de Estándar (Real)

Concentraciones

	Volumen(mL)		Concentración	
S1	0.064	4	=	0.000000 ug/mL
	100	10		
S2	0.080	4	=	0.000000 ug/mL
	100	10		
S3	0.100	4	=	0.000000 ug/mL
	100	10		
S4	0.125	4	=	0.000000 ug/mL
	100	10		
S5	0.156	4	=	0.000000 ug/mL
	100	10		

Muestra Problema

	Peso de Muestra	x	mL	=	Unidades
M	$\frac{\quad}{100}$		$\frac{4}{100}$		0.400000 ug/mL

M1 $\frac{\quad}{100}$ x $\frac{4}{100}$ = 0.000000 ug/mL

M2 $\frac{\quad}{100}$ x $\frac{4}{100}$ = 0.000000 ug/mL

M3 $\frac{\quad}{100}$ x $\frac{4}{100}$ = 0.000000 ug/mL

Observaciones:

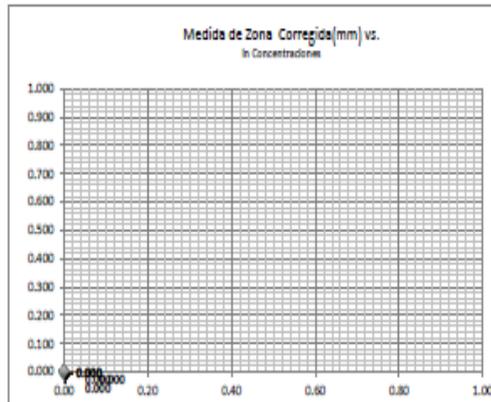
-----Producto Terminado-----



Reporte de Valoración Microbiológica

Estandar	Concentración (µg/mL)	Repetición de Placa	Referencia (S3)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
			Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media de Referencia (mm)	SD	%RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media Original (mm)	SD	%RSD	
S1	0.000000	1													
		2													
		3													
S2	0.000000	1													
		2													
		3													
S4	0.000000	1													
		2													
		3													
S5	0.000000	1													
		2													
		3													
			Promedio (Punto de Corrección)			0.000									
M1	DESCONOCIDA	1													
		2													
		3													
M2	DESCONOCIDA	1													
		2													
		3													
M3	DESCONOCIDA	1													
		2													
		3													

Conjunto de Estándares	Concentración estándar (µg/mL)	In concentración estándar	Mediciones de la Zona Corregida (mm)
S ₁	0.000000	#INUMI	0.000
S ₂	0.000000	#INUMI	0.000
Referencia (S ₃)	0.000000	#INUMI	0.000
S ₄	0.000000	#INUMI	0.000
S ₅	0.000000	#INUMI	0.000



Ecuación de la Recta ($Z = b \cdot \ln(C) + a$): $Z = \#INUMI \cdot \ln(C) + \#INUMI$

Pendiente (b) = #INUMI Z = Medición de zona corregida
 Intercepto (a) = #INUMI ln(C) = Logaritmo natural de la concentración hallada
 Coef. de Correlación (r) = #INUMI
 Coef. de Determinación (r²) = #INUMI ln(C) = (Z - a) / b
 Concentración de muestra hallada: $C = e^{(Z-a)/b}$

Medio de muestra corregida = Medio Original - (Medio de Referencia - Punto de Corrección)
 Gentamicina (g/100 g) = (Concentración de muestra hallada / Concentración de muestra teórica) x 100 / 1000

Muestra	Concentración muestra teórica (µg/mL)	In concentración muestra hallada [ln(C)]	Concentración de muestra hallada (µg/mL)	Gentamicina (g/100 g)	Promedio Gentamicina (g/100 g)	SD	%RSD
M1	0.000000	#INUMI	#INUMI	#INUMI	#INUMI	#INUMI	#INUMI
M2	0.000000	#INUMI	#INUMI	#INUMI			
M3	0.000000	#INUMI	#INUMI	#INUMI			

Resultado Final = #INUMI g/100 g

Especificación 0.090 g/100g - 0.135 g/100g

Analista : _____

Verificado por : _____

Fecha: _____

Anexo N°5

REPORTES DE PESOS Y FACTORES REALIZADO PARA EVALUCION DE PARAMETROS DE VALIDACION

Datos de Pesos y Factores para Ensayo de Especificidad de Placebo

	DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD
	REPORTE DE VALIDACION DE TECNICAS-MICROBIOLOGIA

ESPECIFICIDAD DE PLACEBO

ESTANDAR : Gentamicina sulfato
LOTE : R084Q0
POTENCIA (tal cual): 671 µg/mg
FECHA DE EXPIRA : Vigente

ESTÁNDAR	PESO (mg)	Vx	FACTOR
S1	14.87	0.064	0.255431
S2	14.87	0.080	0.319289
S3	14.87	0.100	0.399111
S4	14.87	0.125	0.498889
S5	14.87	0.156	0.622613

$$\text{Factor Estándar} = \frac{WSt \times 4 \times Vx \times PotSt}{10 \times 10 \times 100}$$

MUESTRA : PLACEBO de Betametasona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g/100 g
 Crema
LOTE : 1110427P
FECHA DE EXPIRA : Vigente

MUESTRA	PESO PLACEBO (mg)	FACTOR
PB T/C 1	1001.40	249.650489
PB T/C 2	1000.50	249.875062
PB TERM 1	1001.20	249.700360
PB TERM 2	1000.90	249.775202
PB ACEL 1	1000.70	249.825122
PB ACEL 2	1001.60	249.600639

$$\text{Factor Muestra (PB)} = \frac{100 \times 100 \times 100 \times 100}{W_{pb} \times 4 \times 1000 \times 0.1}$$

Datos de Pesos y Factores para Ensayo de Especificidad de Principio Activo

	DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD
	REPORTE DE VALIDACION DE TECNICAS-MICROBIOLOGIA

ESPECIFICIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO

ESTANDAR : Gentamicina sulfato
LOTE : R084Q0
POTENCIA (tal cual): 671 µg/mg
FECHA DE EXPIRA : Vigente

ESTÁNDAR	PESO (mg)	Vx	FACTOR
S1	15.00	0.064	0.257664
S2	15.00	0.080	0.322080
S3	15.00	0.100	0.402600
S4	15.00	0.125	0.503250
S5	15.00	0.156	0.628056

$$\text{Factor Estándar} = \frac{W_{St} \times 4 \times V_x \times Pot_{St}}{10 \times 10 \times 100}$$

PRINCIPIO ACTIVO : Gentamicina sulfato
LOTE : R084Q0
POTENCIA (tal cual): 671 µg/mg
FECHA DE EXPIRA : Vigente

MUESTRA	PESO (mg)	FACTOR MUESTRA
PA T/C 1	14.70	253.454586
PA T/C 2	15.00	248.385494
PA TERM. 1	15.00	248.385494
PA TERM. 2	15.20	245.117264
PA ACEL 1	15.40	241.933923
PA ACEL 2	15.50	240.373059

$$\text{Factor Muestra (PA)} = \frac{10 \times 10 \times 100 \times 100}{W_{PA} \times 4 \times 0.1 \times Pot_{PA}}$$

Datos de Pesos y Factores para Ensayo de Especificidad de la Muestra

	DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD
	REPORTE DE VALIDACION DE TECNICAS-MICROBIOLOGIA

ESPECIFICIDAD DE MUESTRA

ESTANDAR : Gentamicina sulfato
LOTE : R084Q0
POTENCIA (tal cual): 671 % T/C
FECHA DE EXPIRA : Vigente

ESTÁNDAR	PESO (mg)	Vx	FACTOR
S1	14.87	0.064	0.255431
S2	14.87	0.080	0.319289
S3	14.87	0.100	0.399111
S4	14.87	0.125	0.498889
S5	14.87	0.156	0.622613

$$\text{Factor Estándar} = \frac{\text{WSt} \times 4 \times \text{Vx} \times \text{PotSt}}{10 \times 10 \times 100}$$

MUESTRA : Betametasona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g/100 g
 Crema
LOTE : 1080418P
FECHA DE EXPIRA : Vigente

MUESTRA	PESO (mg)	FACTOR MUESTRA
M T/C 1	1005.00	248.756219
M T/C 2	1004.60	248.855266
M TERM 1	1003.00	249.252243
M TERM 2	1003.80	249.053596
M ACEL 1	1005.60	248.607796
M ACEL 2	1006.00	248.508946

$$\text{Factor Muestra (M)} = \frac{100 \times 100 \times 100 \times 100}{\text{W}_M \times 4 \times 1000 \times 0.1}$$

Datos de Pesos y Factores para Ensayo de Exactitud

	DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD
	REPORTE DE VALIDACION DE TECNICAS-MICROBIOLOGIA

EXACTITUD DEL METODO

ESTANDAR : Gentamicina sulfato
LOTE : R08400
POTENCIA (tal cual): 671 µg/mg
FECHA DE EXPIRA : Vigente

ESTÁNDAR	PESO (mg)	Vx	FACTOR
S1	14.99	0.064	0.257492
S2	14.99	0.080	0.321863
S3	14.99	0.100	0.402332
S4	14.99	0.125	0.502915
S5	14.99	0.156	0.627637

$$\text{Factor Estándar} = \frac{Wst \times 4 \times Vx \times PotSt}{10 \times 10 \times 100}$$

PRINCIPIO ACTIVO : Gentamicina sulfato
LOTE : R08400
POTENCIA (tal cual): 671 µg/mg
FECHA DE EXPIRA : Vigente

MUESTRA	PESO (mg)	PLACEBO (mg)	FACTOR MUESTRA
80%-M1	11.90	1000.10	313.090939
80%-M2	11.90	1000.10	313.090939
80%-M3	11.90	1000.10	313.090939
100%-M1	14.90	1000.60	250.052511
100%-M2	14.91	1000.70	249.884803
100%-M3	14.92	1000.60	249.717320
150%-M1	22.37	1000.40	166.552634
150%-M2	22.37	1000.50	166.552634
150%-M3	22.37	1000.40	166.552634

$$\text{Factor Muestra} = \frac{50 \times 100 \times 100 \times 100}{Wmp \times 5 \times 4 \times Potmp}$$

Datos de Pesos y Factores para Ensayo de Linealidad

	DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD
	REPORTE DE VALIDACION DE TECNICAS-MICROBIOLOGIA

LINEALIDAD

I. **ESTANDAR** : Gentamicina sulfato
LOTE : R084Q0
POTENCIA (tal cual): 671 µg/mg
FECHA DE EXPIRA : Vigente

ESTANDAR	PESO (mg)	Vx	FACTOR
ST 64%	15.00	0.064	0.257664
ST 80%	15.00	0.080	0.322080
ST 100%	15.00	0.100	0.402600
ST 125%	15.00	0.125	0.503250
ST 156%	15.00	0.156	0.628056

$$\text{Factor Estándar} = \frac{WSt \times 4 \times Vx \times PotSt}{10 \times 10 \times 100}$$

II. **MUESTRA** : Betametasona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g/100 g
 : Crema
LOTE : 1080418P
FECHA DE EXPIRA : Vigente

MUESTRA	PESO (mg)	Vx	FACTOR
M 64%	1000.50	0.256	0.256128
M 80%	1000.50	0.320	0.320160
M 100%	1000.50	0.400	0.400200
M 125%	1000.50	0.500	0.500250
M 156%	1000.50	0.625	0.625313

$$\text{Factor Estándar} = \frac{Wmp \times Vx \times 0.1 \times 1000}{100 \times 10 \times 100}$$

Datos de Pesos y Factores para Ensayo de Repetibilidad

	DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD
	REPORTE DE VALIDACION DE TECNICAS-MICROBIOLOGIA

REPETIBILIDAD

ESTANDAR : Gentamicina sulfato
LOTE : R08400
POTENCIA (tal cual): 671 µg/mg
FECHA DE EXPIRA : Vigente

ESTÁNDAR	PESO (mg)	Vx	FACTOR
S1	14.99	0.064	0.257492
S2	14.99	0.080	0.321865
S3	14.99	0.100	0.402332
S4	14.99	0.125	0.502915
S5	14.99	0.156	0.627637

$$\text{Factor Estándar} = \frac{W_{St} \times 4 \times V_x \times Pot_{St}}{10 \times 10 \times 100}$$

MUESTRA : Betametazona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g/100 g
 Crema
LOTE : 1080418P
FECHA DE EXPIRA : Vigente

MUESTRA	PESO (mg)	FACTOR MUESTRA
M1	1004.46	248.889951
M2	1004.42	248.899863
M3	1002.54	249.366609
M4	1002.55	249.364121
M5	1001.30	249.675422
M6	1001.06	249.735281
M7	1003.52	249.123087
M8	1003.13	249.219942
M9	1003.07	249.234849

$$\text{Factor Muestra (M)} = \frac{100 \times 100 \times 100 \times 100}{W_m \times 4 \times 1000 \times 0.1}$$

Datos de Pesos y Factores para Ensayo de Precision Intermedia

	DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD
	REPORTE DE VALIDACION DE TECNICAS-MICROBIOLOGIA

PRECISION INTERMEDIA

ESTANDAR : Gentamicina sulfato
LOTE : R084Q0
POTENCIA (tal cual): 671 µg/mg
FECHA DE EXPIRA : Vigente

ESTÁNDAR	PESO (mg)	Vx	FACTOR
S1	15.05	0.064	0.258523
S2	15.05	0.080	0.323154
S3	15.05	0.100	0.403942
S4	15.05	0.125	0.504928
S5	15.05	0.156	0.630150

$$\text{Factor Estándar} = \frac{W_{St} \times 4 \times V_x \times Pot_{St}}{10 \times 10 \times 100}$$

MUESTRA : Betametazona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g/100 g Crema
LOTE : 1080418P
FECHA DE EXPIRA : Vigente

MUESTRA	PESO (mg)	FACTOR MUESTRA
M1	1003.63	249.095782
M2	1003.48	249.133017
M3	1002.83	249.294497
M4	1002.20	249.451207
M5	1000.36	249.910032
M6	1000.12	249.970004
M7	1003.38	249.157846
M8	1003.15	249.214973
M9	1002.26	249.436274

$$\text{Factor Muestra (M)} = \frac{100 \times 100 \times 100 \times 100}{W_M \times 4 \times 1000 \times 0.1}$$

Anexo N°6

REPORTE DEL ENSAYO DE SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

Reporte del Ensayo de Selectividad y Especificidad del Placebo

VALORACION DE GENTAMICINA
 PRODUCTO Betametasona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g /100 g Crema
 METODO Microbiológico (Cilindro - Placa)
 TECNICA ANALITICA Técnica Interna

ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD DEL PLACEBO

Estándar de referencia	
Nombre	Gentamicina sulfato
Lote	R084Q0
Fecha de Expira	Vigente
Potencia (µg/mg tal cual)	671.00
Peso (Wst)	14.87 mg

PLACEBO	
Nombre:	Placebo de Betametasona 0.05g + Clotrimazol 1g + Gentamicina 0.1g/100 g Crema
Lote:	1110427P
Fecha de Expira:	Vigente

Diluciones			
Estándar	Wst	±	Vst
10	10	10	100

Donde:	mL
64% Vst=	0.064
80% Vst=	0.080
100% Vst=	0.100
125% Vst=	0.125
156% Vst=	0.156

Muestras	
Wimp	±
100	100

Datos Obtenidos

Estándar	Concentración (µg/mL)	Repetición de Placa	Referencia (S ₁)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
			Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	
S ₁	0.255431	1	14.20	14.11	14.23	14.057	0.311	2.209	12.44	12.74	12.63	12.606	0.237	1.878	12.686
		2	14.27	14.23	14.07				12.42	12.48	12.97				
		3	13.92	14.20	13.28				12.30	12.95	12.53				
S ₂	0.319289	1	13.79	13.63	14.07	14.040	0.254	1.807	13.35	13.96	13.49	13.612	0.359	2.641	13.709
		2	13.82	14.28	14.11				13.67	14.19	13.98				
		3	14.44	14.07	14.15				13.29	13.44	13.14				
S ₄	0.498889	1	14.07	14.62	13.98	14.173	0.196	1.362	14.58	14.84	14.44	14.908	0.333	2.235	14.871
		2	14.30	14.02	14.19				14.93	14.62	15.33				
		3	14.14	14.04	14.20				15.30	15.28	14.85				
S ₅	0.622613	1	14.35	14.11	14.60	14.275	0.302	2.113	15.55	15.54	15.50	15.751	0.240	1.523	15.612
		2	14.42	14.79	14.31				15.65	15.62	16.20				
		3	14.00	14.01	13.88				15.82	15.88	16.00				
Promedio						14.136									

Tipo de Muestra	Muestra	Peso (mg)	Repetición de Placa	Referencia (S ₁)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
				Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	
PLACEBO TAL CUAL (PB T/C)	M1	1001.40	1	12.62	12.68	12.54	12.367	0.267	2.152	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	#DIV/0!	No aplica
			2	12.32	11.99	12.11				0.00	0.00	0.00				
			3	12.08	12.52	12.62				0.00	0.00	0.00				
	M2	1000.50	1	12.32	12.07	11.91	12.147	0.192	1.578	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	#DIV/0!	
			2	11.98	12.07	12.03				0.00	0.00	0.00				
			3	12.15	12.52	12.27				0.00	0.00	0.00				
PLACEBO SOMETIDO A TERMÓLISIS (PB TERM)	M1	1001.20	1	12.64	12.13	12.18	12.277	0.149	1.213	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	#DIV/0!	No aplica
			2	12.24	12.31	12.31				0.00	0.00	0.00				
			3	12.18	12.27	12.24				0.00	0.00	0.00				
	M2	1000.90	1	12.20	12.18	11.67	12.164	0.294	2.420	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	#DIV/0!	
			2	12.36	12.28	11.67				0.00	0.00	0.00				
			3	12.36	12.28	12.48				0.00	0.00	0.00				
PLACEBO SOMETIDO A CALOR 105°C (PB ACEL)	M1	1000.70	1	12.24	12.35	12.38	12.243	0.109	0.891	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	#DIV/0!	No aplica
			2	12.27	12.34	12.03				0.00	0.00	0.00				
			3	12.18	12.23	12.17				0.00	0.00	0.00				
	M2	1001.60	1	12.65	12.88	12.10	12.412	0.251	2.020	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	#DIV/0!	
			2	12.43	12.31	12.59				0.00	0.00	0.00				
			3	12.18	12.26	12.31				0.00	0.00	0.00				

Evaluación de los Datos

Conjunto de Estándares	Concentración (µg/mL)	Logaritmo natural (concentración)	Mediciones de la Zona Corregida (mm)
S ₁	0.255431	-1.364803	12.686
S ₂	0.319289	-1.141660	13.709
Referencia (S ₁)	0.399111	-0.918516	14.136
S ₄	0.498889	-0.695373	14.871
S ₅	0.622613	-0.473830	15.612

Ecuación de la Recta: $Y = 4.66182X + 18.81180$ ($Y = bX + a$)

Pendiente (b) = 3.14836
 Intercepto (a) = 17.09552
 Coef. de Correlación (r) = 0.99379
 Coef. de Determinación (r²) = 0.98762

Tipo de Muestra	Muestra	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)	Logaritmo natural muestra*	Concentración de muestra hallada (µg/mL)	% Gentamicina	Especificación	Observación
PLACEBO TAL CUAL (PB T/C)	M1	1001.40	0.400560	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0.000	No hay crecimiento de halo	El resultado no es cuantificable (0 %) y no presenta interferencia.
	M2	1000.50	0.400200	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0.000		
PLACEBO SOMETIDO A TERMÓLISIS (PB TERM)	M1	1001.20	0.400480	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0.000	No hay crecimiento de halo	El resultado no es cuantificable (0 %) y no presenta interferencia.
	M2	1000.90	0.400360	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0.000		
PLACEBO SOMETIDO A CALOR 105°C (PB ACEL)	M1	1000.70	0.400280	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0.000	No hay crecimiento de halo	El resultado no es cuantificable (0 %) y no presenta interferencia.
	M2	1001.60	0.400640	#¡VALOR!	#¡VALOR!	0.000		

CONFORME

NO CONFORME

ANALISTA L.Vignolo
FECHA 2018-08-23

Reporte del Ensayo de Selectividad y Especificidad del Principio Activo

VALORACION DE GENTAMICINA
 PRODUCTO Betametasona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g /100 g Crema
 METODO Microbiológico (Cilindro – Placa)
 TECNICA ANALITICA Técnica Interna

ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO

Estándar de referencia	
Nombre	Gentamicina sulfato
Lote	R084Q0
Fecha de Expira	Vigente
Potencia (µg/mg tal cual)	671.00
Peso (Wst)	15.00 mg

PRINCIPIO ACTIVO	
Nombre	Gentamicina sulfato
Lote	R084Q0
Fecha de Expira	Vigente
Potencia (µg/mg tal cual)	671.00

Diluciones

Estándar				Donde:	mL	Muestras			
WSt	±	Vst	PotSt			WSt	±	0.1	PotSt
10	10	100		64% Vst=	0.064	10	10	100	
				80% Vst=	0.080				
				100% Vst=	0.100				
				125% Vst=	0.125				
				156% Vst=	0.156				

Datos Obtenidos

Estándar	Concentración (µg/mL)	Repetición de Placa	Referencia (S ₁)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
			Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	
S ₁	0.257664	1	14.20	14.01	14.04	14.307	0.318	2.220	12.71	12.68	12.73	12.617	0.237	1.877	12.783
		2	14.16	14.22	14.05				12.59	12.03	12.61				
		3	14.77	14.86	14.45				12.88	12.61	12.71				
S ₂	0.322080	1	14.80	14.56	14.49	14.383	0.264	1.833	13.85	13.42	13.60	13.483	0.287	2.131	13.573
		2	14.48	14.09	14.42				13.26	13.27	13.05				
		3	14.00	14.10	14.51				13.66	13.90	13.34				
S ₄	0.503250	1	15.07	15.14	14.00	14.530	0.370	2.549	14.92	14.90	15.58	14.973	0.320	2.138	14.916
		2	14.31	14.30	14.63				15.03	14.78	15.18				
		3	14.54	14.36	14.42				14.72	14.47	15.18				
S ₅	0.628056	1	14.58	14.51	14.78	14.671	0.306	2.088	15.84	15.43	16.20	16.074	0.581	3.615	15.876
		2	14.15	14.88	14.83				16.38	15.80	17.21				
		3	15.14	14.87	14.33				15.60	16.62	15.59				
			Promedio			14.473									

Tipo de Muestra	Muestra	Peso (mg)	Repetición de Placa	Referencia (S ₃)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
				Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	
PRINCIPIO ACTIVO TAL CUAL (PA T/C)	M1	14.70	1	14.33	15.09	14.48	14.632	0.282	1.931	14.43	14.56	14.88	14.507	0.290	1.998	14.347
			2	14.71	14.77	15.00				14.72	14.64	14.07				
			3	14.28	14.48	14.55				14.82	14.16	14.28				
	M2	15.00	1	14.24	14.74	14.70	14.518	0.243	1.673	14.56	14.43	14.34	14.419	0.191	1.327	
			2	14.56	14.61	14.41				14.28	14.62	14.04				
			3	14.27	14.90	14.23				14.60	14.33	14.57				
PRINCIPIO ACTIVO SOMETIDO A TERMÓLISIS (PA TERM)	M1	15.00	1	14.77	14.40	14.30	14.528	0.305	2.103	14.84	14.21	13.81	14.333	0.369	2.577	14.278
			2	14.26	14.19	14.41				14.04	14.93	14.49				
			3	14.54	14.74	15.14				14.15	14.40	14.13				
	M2	15.20	1	14.58	14.62	14.39	14.650	0.426	2.910	14.04	14.63	14.28	14.446	0.263	1.823	
			2	15.37	15.14	15.00				14.53	14.54	14.80				
			3	14.16	14.24	14.36				14.46	14.07	14.66				
PRINCIPIO ACTIVO SOMETIDO A CALOR 105°C (PA ACEL)	M1	15.40	1	14.89	14.94	14.60	14.538	0.311	2.140	13.61	13.98	13.10	13.486	0.272	2.014	13.420
			2	14.87	14.56	14.19				13.50	13.56	13.37				
			3	14.38	14.14	14.28				13.73	13.24	13.28				
	M2	15.50	1	15.03	15.10	14.07	14.689	0.387	2.637	13.52	13.72	13.20	13.633	0.294	2.154	
			2	14.92	14.34	14.65				13.48	13.66	13.38				
			3	14.66	14.30	15.14				13.59	14.10	14.05				

Evaluación de los Datos

Conjunto de Estándares	Concentración (µg/mL)	Logaritmo natural (concentración)	Mediciones de la Zona Corregida (mm)
S ₁	0.257664	-1.356099	12.783
S ₂	0.322080	-1.132955	13.573
Referencia (S ₃)	0.402600	-0.909812	14.473
S ₄	0.503250	-0.686668	14.916
S ₅	0.628056	-0.465126	15.876

Ecuación de la Recta: $Y = 5.50636X + 19.81408$ ($Y = bX + a$)

Pendiente (b) =	3.37920
Intercepto (a) =	17.39963
Coef. de Correlación (r) =	0.99545
Coef. de Determinación (r ²) =	0.99093

Tipo de Muestra	Muestra	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)	Logaritmo natural muestra*	Concentración de muestra hallada (µg/mL)	% Gentamicina	Especificación	Observación
PRINCIPIO ACTIVO TAL CUAL (PA T/C)	M1	14.70	0.394548	-0.903293	0.405233	102.708	No presenta interferencia	No presenta interferencia.
	M2	15.00	0.402600	-0.895401	0.408444	101.451		
PRINCIPIO ACTIVO SOMETIDO A TERMÓLISIS (PA TERM)	M1	15.00	0.402600	-0.923679	0.397056	98.623	No presenta interferencia	No presenta interferencia. Hay disminución de la actividad antimicrobiana por efecto de la degradación de la gentamicina sulfato.
	M2	15.20	0.407968	-0.926704	0.395856	97.031		
PRINCIPIO ACTIVO SOMETIDO A CALOR 105°C (PA ACEL)	M1	15.40	0.413336	-1.177716	0.307981	74.511	No presenta interferencia	No presenta interferencia. Hay disminución de la actividad antimicrobiana por efecto de la degradación de la gentamicina sulfato.
	M2	15.50	0.416020	-1.178440	0.307759	73.977		

CONFORME

NO CONFORME

ANALISTA L. Vignolo
FECHA 2018-06-25

Reporte del Ensayo de Selectividad y Especificidad de la Muestra

VALORACION DE GENTAMICINA
 PRODUCTO Betametazona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g /100 g Crema
 METODO Microbiológico (Cilindro – Placa)
 TECNICA ANALITICA Técnica Interna

ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD DE MUESTRA

Estándar de referencia	
Nombre	Gentamicina sulfato
Lote	R084Q0
Fecha de Expira	Vigente
Potencia (µg/mg tal cual)	671.00
Peso (Wst)	14.87 mg

MUESTRA	
Nombre:	Betametazona 0.05g + Clotrimazol 1g + Gentamicina 0.1g/100 g Crema
Lote:	1080418P
Fecha de Expira:	Vigente

Diluciones			
Estándar	±	Vst	PotSt
10	10	100	

Donde: mL

64% Vst=	0.064
80% Vst=	0.080
100% Vst=	0.100
125% Vst=	0.125
156% Vst=	0.156

Muestras	
WSt	±
100	100

Datos Obtenidos

Estándar	Concentración (µg/mL)	Repetición de Placa	Referencia (S ₁)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
			Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	
S ₁	0.255431	1	14.40	14.75	14.56	14.553	0.205	1.412	13.04	12.95	12.51	12.694	0.352	2.774	12.677
		2	14.25	14.35	14.62				12.21	12.96	13.06				
		3	14.91	14.64	14.50				12.64	12.67	12.12				
S ₂	0.319289	1	14.70	14.83	14.91	14.652	0.239	1.630	13.92	13.91	13.73	13.722	0.144	1.050	13.616
		2	14.57	14.90	14.28				13.56	13.68	13.52				
		3	14.28	14.76	14.64				13.71	13.84	13.63				
S ₄	0.498889	1	14.91	14.59	15.15	14.905	0.275	1.844	16.21	16.62	16.74	16.498	0.249	1.512	16.336
		2	14.80	15.08	15.27				16.68	16.16	16.59				
		3	14.95	14.40	15.00				16.37	16.84	16.27				
S ₅	0.622613	1	14.90	15.05	14.78	14.872	0.274	1.841	17.93	17.79	17.60	17.537	0.305	1.741	17.410
		2	14.57	15.19	15.22				17.16	17.81	17.19				
		3	14.80	14.95	14.39				17.54	17.68	17.13				
			Promedio			14.746									

Tipo de Muestra	Muestra	Peso (mg)	Repetición de Placa	Referencia (S ₃)						Media						Media de la Muestra Corregida
				Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	
MUESTRA TAL CUAL (M T/C)	M1	1006.00	1	14.30	14.90	14.64	14.648	0.278	1.895	15.19	14.85	15.08	15.039	0.147	0.978	15.137
			2	14.71	14.77	14.10				15.17	14.85	15.00				
			3	14.82	14.94	14.55				15.26	15.00	14.95				
	M2	1006.50	1	14.45	14.95	14.62	14.643	0.232	1.584	15.50	15.08	14.64	15.125	0.203	1.343	
			2	14.28	14.91	14.75				15.26	15.32	15.07				
			3	14.70	14.75	14.38				15.09	15.01	14.95				
MUESTRA SOMETIDO A TERMÓLISIS (M TERM)	M1	1003.40	1	14.14	14.92	14.80	14.696	0.279	1.902	14.85	14.82	15.16	14.951	0.257	1.716	15.001
			2	14.65	14.79	14.55				15.15	14.55	14.83				
			3	14.54	14.74	15.14				14.72	15.14	15.34				
	M2	1003.00	1	14.59	14.70	14.39	14.573	0.255	1.748	14.51	14.80	15.11	14.749	0.277	1.880	
			2	14.70	14.56	14.65				14.75	15.00	14.82				
			3	14.16	15.05	14.36				14.40	15.01	14.34				
MUESTRA SOMETIDO A CALOR 105°C (M ACEL)	M1	1004.20	1	14.92	15.05	15.18	14.818	0.359	2.425	13.34	13.82	13.28	13.394	0.229	1.712	13.322
			2	14.79	14.59	14.08				13.50	13.56	13.82				
			3	14.83	15.28	14.65				13.06	13.18	13.29				
	M2	1005.10	1	15.16	15.10	14.39	14.862	0.254	1.708	12.98	13.82	13.20	13.248	0.194	1.466	
			2	14.92	14.84	14.55				12.95	13.28	13.19				
			3	15.01	14.79	15.00				13.34	13.30	13.47				

Evaluación de los Datos

Conjunto de Estándares	Concentración (µg/mL)	Logaritmo natural (concentración)	Mediciones de la Zona Corregida (mm)
S ₁	0.255431	-1.364803	12.677
S ₂	0.319289	-1.141660	13.816
Referencia (S ₃)	0.399111	-0.918516	14.746
S ₄	0.498889	-0.695373	16.338
S ₅	0.622613	-0.473830	17.410

Ecuación de la Recta: $Y = 5.49173X + 19.92718$ ($Y = bX + a$)

Pendiente (b) =	5.20069
Intercepto (a) =	19.81594
Coef. de Correlación (r) =	0.99491
Coef. de Determinación (r ²) =	0.98984

Tipo de Muestra	Muestra	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)	Logaritmo natural muestra*	Concentración de muestra hallada (µg/mL)	% Gentamicina	Especificación	Observación
MUESTRA TAL CUAL (M T/C)	M1	1006.00	0.402400	-0.899726	0.406681	101.064	No presenta interferencia	No presenta interferencia.
	M2	1006.50	0.402600	-0.882292	0.413833	102.790		
MUESTRA SOMETIDO A TERMÓLISIS (M TERM)	M1	1003.40	0.401360	-0.925897	0.396176	98.708	No presenta interferencia	No presenta interferencia. Hay disminución de la actividad antimicrobiana por efecto de la degradación de la gentamicina sulfato.
	M2	1003.00	0.401200	-0.941088	0.390203	97.259		
MUESTRA SOMETIDO A CALOR 105°C (M ACEL)	M1	1004.20	0.401680	-1.248718	0.286872	71.418	No presenta interferencia	No presenta interferencia. Hay disminución de la actividad antimicrobiana por efecto de la degradación de la gentamicina sulfato.
	M2	1005.10	0.402040	-1.285358	0.276552	68.787		

CONFORME

NO CONFORME

ANALISTA L.Vignolo

FECHA 2018-08-24

Anexo N°7

REPORTE DEL ENSAYO DE EXACTITUD DEL MÉTODO

VALORACION DE PRODUCTO GENTAMICINA
PRODUCTO Betametazona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g /100 g Crema
METODO Microbiológico (Cilindro – Placa)
TECNICA ANALITICA Técnica Interna

Estándar de referencia	
Nombre	Gentamicina sulfato
Lote	R084Q0
Fecha de Expira	Vigente
Potencia (µg/mg tal cual)	671.00
Peso (Wst)	14.99 mg

Diluciones

Estándar				Donde:	mL	Muestras			
WSt	W	Vst	PotSt			Wimp	W	V	PotSt
10	10	100		64% Vst=	0.064	50	5	100	
				80% Vst=	0.080				
				100% Vst=	0.100				
				125% Vst=	0.125				
				156% Vst=	0.156				

Datos Obtenidos

Estándar	Concentración (µg/mL)	Repetición de Placa	Referencia (S ₁)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
			Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	
S ₁	0.257492	1	13.98	14.07	14.02	14.514	0.364	2.646	13.32	12.85	13.08	13.128	0.170	1.298	13.227
		2	14.99	14.73	14.59				13.00	13.33	13.30				
		3	14.82	14.70	14.73				13.11	12.97	13.19				
S ₂	0.321865	1	14.46	14.61	14.62	14.524	0.308	2.120	13.99	13.86	14.04	13.681	0.237	1.731	13.771
		2	13.91	14.80	14.76				13.41	13.68	13.63				
		3	14.70	14.73	14.13				13.38	13.55	13.59				
S ₄	0.502915	1	14.84	14.96	14.56	14.672	0.230	1.568	15.38	15.40	15.27	15.236	0.134	0.876	15.177
		2	14.60	14.85	14.70				15.15	15.18	15.33				
		3	14.81	14.53	14.20				14.97	15.26	15.18				
S ₅	0.627637	1	14.95	14.66	14.60	14.744	0.231	1.565	15.92	16.16	16.02	16.068	0.115	0.717	15.957
		2	14.58	14.47	15.14				16.24	16.15	16.23				
		3	14.96	14.53	14.81				15.98	15.99	16.10				
			Promedio			14.614									

Muestra	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)	Repetición de Placa	Referencia (S ₃)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
				Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	
80% - M1	11.90	0.319396	1	14.69	14.54	14.09	14.472	0.236	1.628	13.68	13.71	13.79	13.713	0.116	0.843	13.856
			2	14.58	14.39	14.57				13.59	13.74	13.65				
			3	14.22	14.33	14.84				13.85	13.88	13.53				
80% - M2	11.90	0.319396	1	15.01	14.25	14.66	14.573	0.394	2.702	13.92	13.82	13.71	13.738	0.141	1.026	13.778
			2	14.46	14.85	13.81				13.57	13.92	13.53				
			3	14.56	14.48	15.08				13.81	13.65	13.71				
80% - M3	11.90	0.319396	1	14.28	14.39	14.59	14.511	0.188	1.298	13.62	13.71	13.79	13.722	0.127	0.923	13.825
			2	14.75	14.62	14.38				13.92	13.85	13.66				
			3	14.26	14.59	14.74				13.80	13.52	13.64				
100% - M1	14.90	0.399916	1	14.13	14.41	14.26	14.444	0.203	1.409	14.29	14.36	14.21	14.424	0.231	1.604	14.594
			2	14.56	14.37	14.56				14.38	14.81	14.60				
			3	14.31	14.61	14.79				14.73	14.25	14.19				
100% - M2	14.91	0.400184	1	14.75	14.05	14.65	14.580	0.286	1.958	14.45	14.32	14.96	14.459	0.342	2.364	14.493
			2	14.34	14.89	14.56				14.29	14.35	14.38				
			3	14.38	14.65	14.95				14.57	13.86	14.95				
100% - M3	14.92	0.400453	1	14.49	14.30	14.19	14.604	0.283	1.941	14.71	14.66	14.19	14.520	0.206	1.421	14.529
			2	14.94	14.81	14.35				14.29	14.52	14.35				
			3	14.76	14.65	14.95				14.51	14.65	14.80				
150% - M1	22.37	0.600411	1	14.97	14.67	14.39	14.539	0.229	1.577	15.91	15.78	15.46	15.667	0.179	1.143	15.742
			2	14.47	14.31	14.75				15.63	15.57	15.91				
			3	14.62	14.29	14.38				15.41	15.61	15.72				
150% - M2	22.37	0.600411	1	14.50	14.68	14.32	14.595	0.237	1.622	15.57	15.70	15.38	15.788	0.236	1.497	15.807
			2	14.37	14.97	14.65				15.78	15.87	16.08				
			3	14.31	14.87	14.69				15.81	15.75	16.15				
150% - M3	22.37	0.600411	1	14.29	14.50	14.37	14.524	0.282	1.941	15.92	15.79	15.81	15.665	0.182	1.161	15.755
			2	14.95	14.10	14.64				15.36	15.60	15.74				
			3	14.88	14.65	14.33				15.48	15.53	15.75				

Evaluación de los Datos

Conjunto de Estándares	Concentración (µg/mL)	Logaritmo natural (concentración)	Mediciones de la Zona Corregida (mm)
S ₁	0.257492	-1.356766	13.227
S ₂	0.321865	-1.133622	13.771
Referencia (S ₃)	0.402332	-0.910479	14.614
S ₄	0.502915	-0.687335	15.177
S ₅	0.627637	-0.465793	15.957

Ecuación de la Recta: $Y = 5.54682X + 20.37703$ ($Y = bX + a$)

Pendiente (b) =	3.06155
Intercepto (a) =	17.35589
Coef. de Correlación (r) =	0.99786
Coef. de Determinación (r ²) =	0.99572

Muestra	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)	Logaritmo natural muestra*	Concentración de muestra hallada (µg/mL)	% Recuperación (x)	Varianza	Sesgo (b) b = /100-X/
80% - M1	11.90	0.319396	-1.135902	0.321132	100.544	1.571	0.544
80% - M2	11.90	0.319396	-1.160962	0.313185	98.055		1.945
80% - M3	11.90	0.319396	-1.145688	0.318005	99.564		0.436
100% - M1	14.90	0.399916	-0.896304	0.408075	102.040	2.937	2.040
100% - M2	14.91	0.400184	-0.929134	0.394896	98.678		1.322
100% - M3	14.92	0.400453	-0.917361	0.399572	99.780		0.220
150% - M1	22.37	0.600411	-0.523854	0.592234	98.638	1.241	1.362
150% - M2	22.37	0.600411	-0.502707	0.604891	100.746		0.746
150% - M3	22.37	0.600411	-0.519509	0.594512	99.068		0.932
Promedio					99.679	Promedio	1.061
CV					1.258		

* Obtenido a partir de la ecuación de la recta.

A. HOMOGENIDAD DE VARIANZAS

$\frac{G_{exp}}{G_{tabla}}$	$\frac{0.511}{0.871}$	G experimental es menor que G tabla: esto indica que las varianzas son homogéneas, para un p = 0,05; K= 3 y n = 3.
-----------------------------	-----------------------	--

B. DETERMINACION DEL SESGO O ERROR DETERMINADO

e%	1.06%
Especificación	< 3 %

C. TEST T DE STUDENT

$\frac{T_{exp}}{T_{tabla}}$	$\frac{0.765}{2.306}$	T exp es menor que T tabla: Esto indica que no hay diferencia entre la recuperación media obtenida y el 100 % para un p = 0.05 y (n-1) grados de libertad ; por lo que la exactitud es conforme.
-----------------------------	-----------------------	--

CONFORME

NO CONFORME

ANALISTA L.Vignolo
FECHA 2018-06-29

Anexo N°8

REPORTE DEL ENSAYO DE LINEALIDAD DEL MÉTODO

VALORACION DE PRODUCTO: GENTAMICINA
PRODUCTO: Betametasona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g /100 g Crema
METODO: Microbiológico (Cilindro - Placa)
TECNICA ANALITICA: Técnica Interna

Estándar de referencia	
Nombre	Gentamicina sulfato
Lote	R084Q0
Fecha de Expira	Vigente
Potencia (µg/mg tal cual)	671.00
Peso (Wst)	15.00 mg

Producto Terminado (Muestra)	
Nombre:	Betametasona 0.05g + Clotrimazol 1g + Gentamicina 0.1g/100 g Crema
Lote:	1080418P
Fecha de Expiración:	Vigente
Peso (Wmp)	1000.5

Diluciones

Estándar:				Donde:	mL	Muestra:		Donde:
Wst	4	Vst	PotSt	64% Vst=	0.064	Wmp	Vmp	64% Vmp=
10	10	100		80% Vst=	0.080	100	10	80% Vmp=
				100% Vst=	0.100			100% Vmp=
				125% Vst=	0.125			125% Vmp=
				156% Vst=	0.156			156% Vmp=

I. ESTÁNDAR

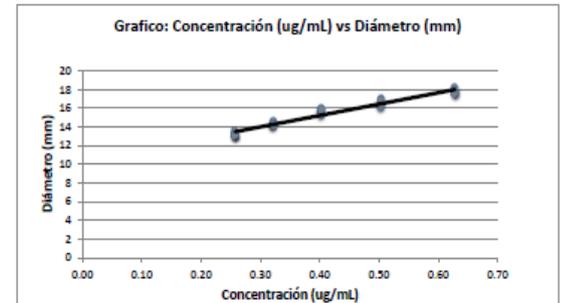
Concentración		LN	Diametro	Y Promedio	Y estimado	$(Y_e - Y_{promedio})^2$	$(Y - Y_e)^2$	$(Y_e - Y_{rc})^2$	$(Y - Y_{rc})^2$
(%)	(µg/mL)	X	Y	(Y _{rc})	(Y _e)				
64%	0.26	-1.36	13.10	13.18167	13.20105	5.23777	0.01021	0.00038	0.00667
	0.26	-1.36	13.08		13.20105	5.23777	0.01465	0.00038	0.01034
	0.26	-1.36	13.59		13.20105	5.23777	0.15128	0.00038	0.16674
	0.26	-1.36	13.12		13.20105	5.23777	0.00657	0.00038	0.00380
	0.26	-1.36	13.17		13.20105	5.23777	0.00096	0.00038	0.00014
	0.26	-1.36	13.03		13.20105	5.23777	0.02926	0.00038	0.02300
80%	0.32	-1.13	14.19	14.31000	14.34618	1.30756	0.02439	0.00131	0.01440
	0.32	-1.13	14.44		14.34618	1.30756	0.00880	0.00131	0.01690
	0.32	-1.13	14.58		14.34618	1.30756	0.05467	0.00131	0.07290
	0.32	-1.13	14.22		14.34618	1.30756	0.01592	0.00131	0.00810
	0.32	-1.13	14.15		14.34618	1.30756	0.03849	0.00131	0.02560
	0.32	-1.13	14.28		14.34618	1.30756	0.00438	0.00131	0.00090
100%	0.40	-0.91	15.86	15.64000	15.49131	0.00000	0.13593	0.02211	0.04840
	0.40	-0.91	15.30		15.49131	0.00000	0.03660	0.02211	0.11560
	0.40	-0.91	15.58		15.49131	0.00000	0.00787	0.02211	0.00360
	0.40	-0.91	15.36		15.49131	0.00000	0.01724	0.02211	0.07840
	0.40	-0.91	15.98		15.49131	0.00000	0.23882	0.02211	0.11560
	0.40	-0.91	15.76		15.49131	0.00000	0.07219	0.02211	0.01440
125%	0.50	-0.69	16.34	16.52500	16.63644	1.31509	0.08788	0.01242	0.03423
	0.50	-0.69	16.58		16.63644	1.31509	0.00319	0.01242	0.00302
	0.50	-0.69	16.20		16.63644	1.31509	0.19048	0.01242	0.10563
	0.50	-0.69	16.26		16.63644	1.31509	0.14171	0.01242	0.07023
	0.50	-0.69	16.94		16.63644	1.31509	0.09215	0.01242	0.17222
	0.50	-0.69	16.83		16.63644	1.31509	0.03747	0.01242	0.09302
156%	0.63	-0.47	18.15	17.79167	17.77335	5.21523	0.14186	0.00034	0.12840
	0.63	-0.47	17.76		17.77335	5.21523	0.00018	0.00034	0.00100
	0.63	-0.47	17.88		17.77335	5.21523	0.01137	0.00034	0.00780
	0.63	-0.47	17.88		17.77335	5.21523	0.01137	0.00034	0.00780
	0.63	-0.47	17.52		17.77335	5.21523	0.06419	0.00034	0.07380
	0.63	-0.47	17.56		17.77335	5.21523	0.04552	0.00034	0.05367
SUMA	12.68	-27.30	464.69	77.44833	464.69000	78.45389	1.69560	0.21929	1.47632
PROMEDIO (Ypromedio)			15.48967						

EVALUACION DE DATOS

a) Análisis de Regresión

Ecuación de la Recta: $Y = 5.25608X + 20.18847$ ($Y = bX + a$)

Predictor	Coefficiente	StDev	t exp	t tablas	P
Intercepto (a)	20.16029	0.14345	140.740	2.048	0.E+0
Pendiente (b)	5.13181	0.1496	35.134	2.048	0.E+0
Coeficiente de Correlación (r)		0.98937			
Coeficiente de Determinación (r ²)		0.97884			

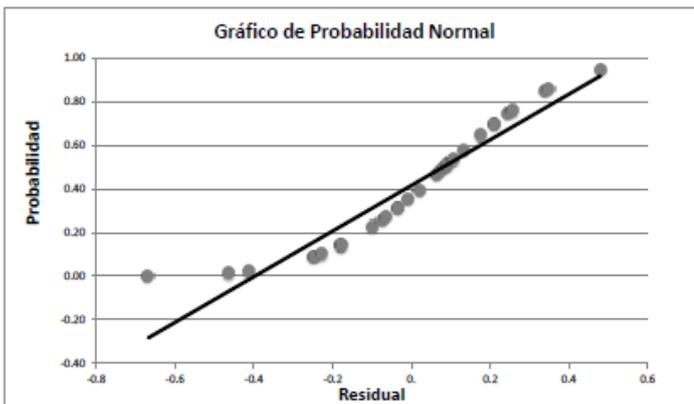


b) Análisis de la Varianza

Fuentes	gl	SS	MS	F exp	F tabla	P
Regresión	1	78.45389	78.45389	1295.53	4.19597	0.000
Error	28	1.6956	0.06056			
Falta de Ajuste	3	0.21929	0.07310	1.24	2.99124	0.317
Error exp.	25	1.47632	0.05905			
Total	29	80.1495				

c) Diagnóstico de Modelo de Residuales

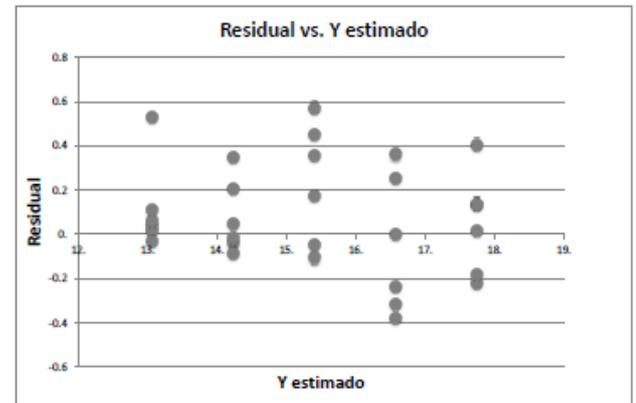
c.1) Normalidad de los Residuales



Especificación: Los residuales deben ajustarse a una ley normal. Debe detectarse un alineamiento de los residuos a la recta.

Resultado: Cumple

c.2) Homocedasticidad de los Residuales



Especificación: Los residuales no adoptan ningún patrón consistente.

Resultado: Cumple

II. MUESTRA

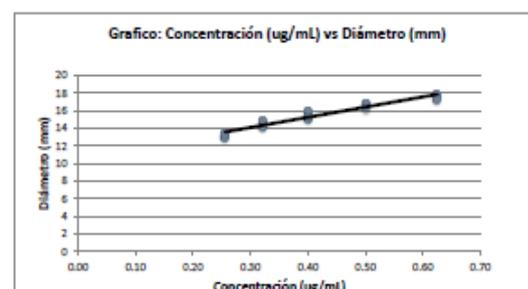
Concentración		LN Concentración	Dímetro (mm)	Y Promedio concentración (Y _{PC})	Y estimado (Y _e)	(Y _e - Y _{Promedio}) ²	(Y - Y _e) ²	(Y _e - Y _{PC}) ²	(Y - Y _{PC}) ²
(%)	(µg/mL)	X	Y						
64%	0.26	-1.36	13.18	13.22000	13.31833	4.76112	0.01914	0.00967	0.00160
	0.26	-1.36	13.34		13.31833	4.76112	0.00047	0.00967	0.01440
	0.26	-1.36	12.98		13.31833	4.76112	0.11447	0.00967	0.05760
	0.26	-1.36	13.36		13.31833	4.76112	0.00174	0.00967	0.01960
	0.26	-1.36	13.17		13.31833	4.76112	0.02200	0.00967	0.00250
	0.26	-1.36	13.29		13.31833	4.76112	0.00080	0.00967	0.00490
80%	0.32	-1.14	14.34	14.54333	14.40933	1.19028	0.00481	0.01796	0.04134
	0.32	-1.14	14.20		14.40933	1.19028	0.04382	0.01796	0.11788
	0.32	-1.14	14.71		14.40933	1.19028	0.09040	0.01796	0.02778
	0.32	-1.14	14.25		14.40933	1.19028	0.02539	0.01796	0.08604
	0.32	-1.14	14.92		14.40933	1.19028	0.26078	0.01796	0.14188
	0.32	-1.14	14.84		14.40933	1.19028	0.18547	0.01796	0.08801
100%	0.40	-0.92	15.18	15.46333	15.50033	0.00000	0.10261	0.00137	0.08028
	0.40	-0.92	15.89		15.50033	0.00000	0.15184	0.00137	0.18204
	0.40	-0.92	15.55		15.50033	0.00000	0.00247	0.00137	0.00751
	0.40	-0.92	15.01		15.50033	0.00000	0.24043	0.00137	0.20551
	0.40	-0.92	15.87		15.50033	0.00000	0.13665	0.00137	0.16538
	0.40	-0.92	15.28		15.50033	0.00000	0.04855	0.00137	0.03361
125%	0.50	-0.69	16.81	16.65667	16.59133	1.19028	0.04782	0.00427	0.02351
	0.50	-0.69	16.57		16.59133	1.19028	0.00046	0.00427	0.00751
	0.50	-0.69	16.60		16.59133	1.19028	0.00008	0.00427	0.00321
	0.50	-0.69	16.78		16.59133	1.19028	0.03560	0.00427	0.01521
	0.50	-0.69	16.90		16.59133	1.19028	0.09528	0.00427	0.05921
	0.50	-0.69	16.28		16.59133	1.19028	0.09693	0.00427	0.14188
156%	0.63	-0.47	17.18	17.61833	17.68233	4.76112	0.25234	0.00410	0.19214
	0.63	-0.47	17.62		17.68233	4.76112	0.00389	0.00410	0.00000
	0.63	-0.47	17.63		17.68233	4.76112	0.00274	0.00410	0.00014
	0.63	-0.47	17.95		17.68233	4.76112	0.07165	0.00410	0.11000
	0.63	-0.47	17.92		17.68233	4.76112	0.05649	0.00410	0.09100
	0.63	-0.47	17.41		17.68233	4.76112	0.07417	0.00410	0.04340
SUMA	12.61	-27.47	465.01	77.50167	465.01000	71.41686	2.18924	0.22415	1.96508
PROMEDIO (Y _{promedio})			15.50033						

EVALUACION DE DATOS

a) Análisis de Regresión

$$Y = 5.08193X + 20.08982 \quad (Y = bX + a)$$

Predictor	Coficiente	StDev	t exp	t tablas	P
Intercepto (a)	19.97784	0.154	130.457	2.048	0.E+0
Pendiente (b)	4.88923	0.15974	31.813	2.048	0.E+0
Coficiente de Correlación (r)		0.98502			
Coficiente de Determinación (r ²)		0.97026			

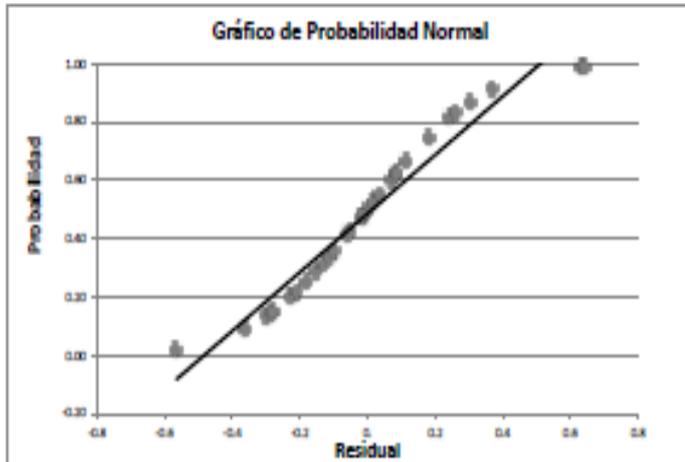


b) Análisis de la Varianza

Fuentes	gl	SS	MS	F exp	F tabla	P
Regresión	1	71.41686	71.41686	913.41	4.19597	0.000
Error	28	2.18924	0.07819			
Falta de Ajuste	3	0.22415	0.07472	0.95	2.99124	0.431
Error exp.	25	1.96508	0.07860			
Total	29	73.6061				

c) Diagnóstico de Modelo de Residuales

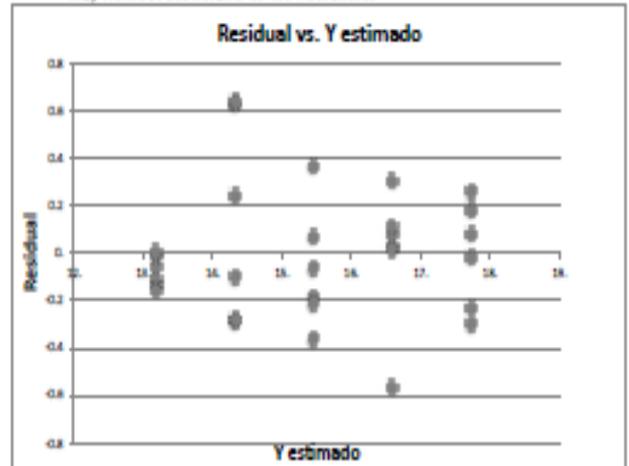
c.1) Normalidad de los Residuales



Especificación: Los residuales deben ajustarse a una ley normal. Debe detectarse un alineamiento de los residuos a la recta.

Resultado: Cumple

c.2) Homocedasticidad de los Residuales



Especificación: Los residuales no adoptan ningún patrón consistente.

Resultado: Cumple

COMPARACION DE LAS DOS RECTAS DE REGRESIÓN (ESTÁNDAR Y MUESTRA)

a) Hipótesis de Paralelismo ¿Las dos rectas tienen la misma pendiente?

F-Test Two-Sample for Variances

Descriptive Statistics		
VAR	$b_{muestra}$	$b_{estándar}$
Sample size	6	6
Mean	5.08193	5.25608
Variance	0.01162	0.04849
Standard Deviation	0.10782	0.22021
Mean Standard Error	0.04402	0.0899

Summary

F_{exp}	4.17168	F Critical value (5%) (F tablas)	5.05033
p-level 1-tailed	0.07153	p-level 2-tailed	0.14305
HD (5%)?	accepted		

Conclusión:

$F_{exp} < F_{tablas}$ (4.17168 < 5.05033) Por lo tanto se comprueba que las varianzas de las pendientes del estándar y de la muestra son iguales.

$$H_0: b_{estándar} = b_{muestra}$$

Comparing Means [t-test assuming equal variances (homoscedastic)]

Descriptive Statistics			
VAR	Sample size	Mean	Variance
	6	5.25608	0.04849
	6	5.08193	0.01162

Summary

Degrees Of Freedom	10	Hypothesized Mean Difference	
Test Statistics	1.73982	Pooled Variance	

Two-tailed distribution

p-level	0.11252	t Critical Value (5%)	
---------	---------	-----------------------	--

One-tailed distribution

p-level	0.05626	t Critical Value (5%)	
---------	---------	-----------------------	--

Conclusión:

$t_{exp} < t_{tablas}$ (1.73982 < 2.2281) Se acepta la Hipótesis Nula por lo tanto las medias de las pendientes del estándar y de la muestra no difieren significativamente.

b) Hipótesis de igual punto de corte: ¿Las dos rectas tienen el mismo Intercepto?

$$H_0: a_{estándar} = a_{muestra}$$

F-Test Two-Sample for Variances

Descriptive Statistics

VAR	a _{muestra}	a _{estándar}
Sample size	6	6
Mean	20.08982	20.18847
Variance	0.04209	0.06451
Standard Deviation	0.20515	0.25398
Mean Standard Error	0.08375	0.10369

Summary

F	1.53265	F Critical value (5%)	5.05033
p-level 1-tailed	0.3254	p-level 2-tailed	0.65081
H0 (5%)?	accepted		

Conclusión:

F_{exp} < F_{tablas} (1.53265 < 5.05033) Por lo tanto se comprueba que las varianzas de las pendientes del estándar y de la muestra son iguales.

Comparing Means [t-test assuming equal variances (homoscedastic)]

Descriptive Statistics

VAR	Sample size	Mean	Variance
	6	20.18847	0.06451
	6	20.08982	0.04209

Summary

Degrees Of Freedom 10 Hypothesized Mean Difference
Test Statistics 0.74007 Pooled Variance

Two-tailed distribution

p-level 0.47627 t Critical Value (5%)

One-tailed distribution

p-level 0.23814 t Critical Value (5%)

Conclusión: Se acepta la Hipótesis Nula por lo tanto las medias de t_{exp} < t_{tablas} los interceptos del estándar y de la muestra no difieren (0.74013 < 2.2281) significativamente.

c) Hipótesis de Coincidencia:

¿Las dos rectas coinciden?

a_T y b_T son el intercepto y pendiente respectivamente de la recta con todos los elementos.

c.1) Las pendientes son iguales :

$$H_0: b_{\text{estándar}} = b_{\text{muestra}} = b_T$$

Analysis of Variance (One-Way)

Summary

Groups	Sample size	Sum	Mean	Variance
pendiente estándar	6	31.53648	5.25608	0.04849
pendiente muestra	6	30.49158	5.08193	0.01162
pendiente total	12	62.02806	5.169	0.0356

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	p-level	F crit
Between Groups	0.09098	2	0.04549	1.38024	0.27341	3.4668
Within Groups	0.69215	21	0.03296			
Total	0.78313	23				

Conclusión:

F_{exp} < F_{tablas} (1.38024 < 3.4668)

Se acepta la hipótesis nula; no existen diferencias significativas entre las medias de las pendientes para un nivel de significación de 0.05 y 2 y 21 grados de libertad.

c.2) Los interceptos son iguales :

$$H_0: a_{\text{estándar}} = a_{\text{muestra}} = a_T$$

Analysis of Variance (One-Way)

Summary

Groups	Sample size	Sum	Mean	Variance
intercepto estándar	6	121.1308	20.18847	0.06451
intercepto muestra	6	120.53894	20.08982	0.04209
pendiente total	12	241.66975	20.13915	0.05111

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	p-level	F crit
Between Groups	0.02919	2	0.0146	0.27988	0.75865	3.4668
Within Groups	1.09515	21	0.05215			
Total	1.12434	23				

Conclusión:

F_{exp} < F_{tablas} (0.27988 < 3.4668)

Se acepta la hipótesis nula; no existen diferencias significativas entre las medias de las pendientes para un nivel de significación de 0.05 y 2 y 21 grados de libertad.

Resultado:

El cálculo estadístico concluye que las rectas del estándar y muestra son paralelas, tienen el mismo punto de corte y son coincidentes

CONFORME

NO CONFORME

ANALISTA

L.Vignolo

FECHA

2018-08-28

Anexo N°9

REPORTE DEL ENSAYO DE PRECISION: REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

VALORACION DE PRODUCTO: GENTAMICINA
METODO: Betametasona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g /100 g Crema
TECNICA ANALITICA: Microbiológico (Cilindro – Placa)
 Técnica Interna

Estándar de referencia	
Nombre	Gentamicina sulfato
Lote	R084Q0
Fecha de Expira	Vigente
Potencia (µg/mg tal cual)	671.00
Peso (Wst)	14.99 mg

PRODUCTO	
Nombre:	Betametasona 0.05g + Clotrimazol 1g + Gentamicina 0.1g/100 g Crema
Lote:	1080418P
Fecha de Expira:	Vigente

Diluciones

Estándar				Donde:	mL	Muestras	
Wst	µ	Vst	PotSt	64% Vst=	0.064	Wmp	µ
10	10	100		80% Vst=	0.080	100	100
				100% Vst=	0.100		
				125% Vst=	0.125		
				156% Vst=	0.156		

Datos Obtenidos

Estándar	Concentración (µg/mL)	Repetición de Placa	Referencia (S ₁)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
			Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	
S ₁	0.257492	1	14.19	13.70	13.73	13.871	0.413	2.979	12.48	12.33	12.48	12.439	0.315	2.536	12.266
		2	14.71	13.92	13.33				13.15	12.41	12.45				
		3	14.01	13.82	13.43				12.43	12.28	11.94				
S ₂	0.321865	1	13.46	13.83	13.50	13.671	0.257	1.881	12.50	13.02	13.50	13.149	0.324	2.467	13.176
		2	13.30	13.84	14.11				13.27	13.10	13.31				
		3	13.46	13.71	13.83				12.84	13.49	13.31				
S ₄	0.502915	1	13.90	13.47	13.94	13.633	0.329	2.415	13.70	14.24	13.99	14.042	0.316	2.254	14.107
		2	13.56	13.91	13.26				13.76	14.04	14.10				
		3	13.05	13.64	13.97				13.75	14.73	14.07				
S ₅	0.627637	1	13.74	13.27	13.59	13.616	0.297	2.182	14.40	14.77	14.42	14.677	0.197	1.340	14.759
		2	14.08	13.92	13.54				14.81	14.51	14.91				
		3	13.12	13.71	13.57				14.62	14.75	14.90				
Promedio						13.698									

Muestra	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)	Repetición de Placa	Referencia (S ₁)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
				Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	
M1	1004.46	0.401784	1	13.69	13.27	13.55	13.562	0.228	1.678	13.36	14.15	13.57	13.520	0.380	2.814	13.656
			2	13.84	13.48	13.92				13.69	14.02	13.43				
			3	13.26	13.47	13.58				13.05	13.09	13.32				
M2	1004.42	0.401768	1	13.62	13.84	13.71	13.506	0.292	2.165	13.35	13.63	13.48	13.512	0.235	1.743	13.704
			2	13.29	13.09	13.27				13.75	13.64	13.07				
			3	13.30	13.48	13.95				13.50	13.84	13.35				
M3	1002.54	0.401016	1	13.27	13.47	13.52	13.608	0.191	1.403	13.16	14.08	14.05	13.653	0.404	2.961	13.743
			2	13.82	13.51	13.84				13.51	13.06	13.80				
			3	13.60	13.64	13.81				14.01	13.92	13.29				
M4	1002.55	0.401020	1	13.71	14.28	13.39	13.584	0.359	2.641	14.22	13.17	13.37	13.655	0.392	2.872	13.768
			2	13.28	13.60	13.65				13.32	14.09	13.59				
			3	13.15	13.28	13.92				13.38	14.12	13.63				
M5	1001.30	0.400520	1	13.42	14.10	14.26	13.791	0.302	2.188	14.16	14.08	14.05	13.746	0.344	2.503	13.652
			2	13.95	13.41	13.80				14.06	13.51	13.60				
			3	13.71	13.96	13.52				13.51	13.54	13.20				
M6	1001.06	0.400424	1	13.54	13.20	13.94	13.831	0.301	2.175	13.72	13.99	14.09	13.800	0.307	2.228	13.667
			2	14.15	14.00	13.93				13.50	14.31	13.78				
			3	14.05	13.69	13.98				13.71	13.28	13.82				
M7	1003.52	0.401408	1	13.96	13.56	14.10	13.603	0.368	2.706	14.02	13.13	13.26	13.597	0.287	2.112	13.691
			2	13.82	13.92	13.47				13.66	13.45	13.56				
			3	13.28	13.02	13.29				13.72	13.65	13.92				
M8	1003.13	0.401252	1	14.00	14.08	13.85	13.749	0.269	1.960	13.40	13.98	14.27	13.791	0.388	2.814	13.740
			2	13.96	13.75	13.28				13.90	13.45	13.36				
			3	13.82	13.42	13.59				14.21	14.16	13.39				
M9	1003.07	0.401228	1	13.60	14.05	13.63	13.911	0.225	1.617	14.13	13.58	13.43	13.810	0.314	2.275	13.597
			2	13.69	13.98	14.08				13.91	14.02	13.40				
			3	14.26	13.92	13.99				14.29	13.90	13.63				

Evaluación de los Datos

Conjunto de Estándares	Concentración (µg/mL)	Logaritmo natural (concentración)	Mediciones de la Zona Corregida (mm)
S ₁	0.257492	-1.356766	12.266
S ₂	0.321865	-1.133622	13.176
Referencia (S ₃)	0.402332	-0.910479	13.698
S ₄	0.502915	-0.687335	14.107
S ₅	0.627637	-0.465793	14.759

Ecuación de la Recta: $Y = 4.92241X + 19.10647$ ($Y = bX + a$)

Pendiente (b) = 2.65584
Intercepto (a) = 16.01983
Coef. de Correlación (r) = 0.99043
Coef. de Determinación (r²) = 0.98096

Muestra	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)	Logaritmo natural muestra*	Concentración de muestra hallada (µg/mL)	% Gentamicina	Promedio	CV (%)	Variabilidad de los Resultados* (%) $S_r = CV/\sqrt{n}$	Tolerancia** (%) $6S_r \times 100/(LS-LI)$
M1	1004.46	0.401784	-0.890165	0.410588	102.191	103.738	2.031	1.436	19.153
M2	1004.42	0.401768	-0.871841	0.418181	104.055				
M3	1002.54	0.401016	-0.857357	0.424282	105.802				
M4	1002.55	0.401020	-0.847701	0.428399	106.827				
M5	1001.30	0.400520	-0.891399	0.410082	102.387				
M6	1001.06	0.400424	-0.885856	0.412361	102.981				
M7	1003.52	0.401408	-0.876736	0.416139	103.670				
M8	1003.13	0.401252	-0.858579	0.423764	105.610				
M9	1003.07	0.401228	-0.912322	0.401591	100.090				

* En la realización de la valoración se efectúan dos réplicas y el resultado es la media de las 2 valoraciones. Por tanto, la variabilidad es la que corresponde a la distribución muestral de las medias para $n = 2$

** La tolerancia expresa la variabilidad del método respecto al intervalo entre las especificaciones superior e inferior (Especificación del producto: LS = 135 % y LI = 90 %)

CONFORME

NO CONFORME

ANALISTA LVignolo
FECHA 2018-09-01

REPORTE DEL ENSAYO DE PRECISION: PRECISION INTERMEDIA DEL MÉTODO

VALORACION DE PRODUCTO: GENTAMICINA
METODO: Betametasona 0.05 g + Clotrimazol 1 g + Gentamicina 0.1 g /100 g Crema
TECNICA ANALITICA: Microbiológico (Cilindro – Placa)
 Técnica Interna

Estándar de referencia	
Nombre	Gentamicina sulfato
Lote	R084Q0
Fecha de Expira	Vigente
Potencia (µg/mg; tal cual)	671,00
Peso (Wst)	15.05 mg

PRODUCTO	
Nombre:	Betametasona 0.05g + Clotrimazol 1g + Gentamicina 0.1g/100 g Crema
Lote:	1080418P
Fecha de Expira:	Vigente

Diluciones

Estándar	Donde:	mL	Muestras
WSt	64% Vst=	0.064	Wmp
10	80% Vst=	0.080	4
10	100% Vst=	0.100	100
Vst	125% Vst=	0.125	100
100	156% Vst=	0.156	
PotSt			

Datos Obtenidos

Estándar	Concentración (µg/mL)	Repetición de Placa	Referencia (S ₁)						Media						Media de la Muestra Corregida (mm)
			Zona 1 (mm)	Zona 3 (mm)	Zona 5 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	Zona 2 (mm)	Zona 4 (mm)	Zona 6 (mm)	Media (mm)	SD	% RSD	
S ₁	0.237718	1	14.61	14.60	14.74	14.604	0.209	1.432	13.35	13.38	13.47	13.402	0.232	1.729	13.236
		2	14.98	14.37	14.72				13.90	13.14	13.59				
		3	14.27	14.51	14.64				13.24	13.20	13.35				
S ₂	0.297147	1	13.86	14.13	14.12	14.310	0.353	2.466	14.06	13.74	13.54	13.875	0.199	1.432	14.004
		2	14.78	14.61	14.05				14.04	13.82	13.72				
		3	14.04	14.37	14.83				13.79	14.13	14.03				
S ₄	0.464293	1	14.61	14.08	14.36	14.470	0.288	1.992	14.89	14.75	15.11	14.918	0.329	2.203	14.887
		2	14.57	14.55	14.03				14.64	15.62	14.47				
		3	14.86	14.80	14.37				14.95	14.80	15.03				
S ₅	0.579437	1	14.30	14.27	14.15	14.371	0.239	1.663	15.24	15.72	15.42	15.339	0.262	1.707	15.406
		2	13.94	14.52	14.50				15.22	15.55	15.48				
		3	14.74	14.37	14.55				15.19	14.81	15.42				
Promedio															14.439

Muestra	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)	Logaritmo natural muestra*	Concentración de muestra hallada (µg/mL)	% Gentamicina	Promedio	CV (%)	Variabilidad de los Resultados* (%) $S_r = CV/\sqrt{n}$	Tolerancia** (%) $6S_r \times 100/(LS-LI)$
M1	1003.63	0.401452	-0.887863	0.411534	102.511	101.796	1.727	1.221	16.279
M2	1003.48	0.401392	-0.898267	0.407275	101.466				
M3	1002.83	0.401132	-0.923556	0.397104	98.996				
M4	1002.20	0.400880	-0.909146	0.402868	100.496				
M5	1000.36	0.400144	-0.909904	0.402563	100.604				
M6	1000.12	0.400048	-0.871509	0.418320	104.567				
M7	1003.38	0.401352	-0.884450	0.412941	102.888				
M8	1003.15	0.401260	-0.903647	0.405089	100.954				
M9	1002.26	0.400904	-0.877861	0.415671	103.683				

* En la realización de la valoración se efectúan dos réplicas y el resultado es la media de las 2 valoraciones. Por tanto, la variabilidad es la que corresponde a la distribución muestral de las medias para n = 2

** La tolerancia expresa la variabilidad del método respecto al intervalo entre las especificaciones superior e inferior (Especificación del producto: LS = 135 % y LI = 90 %)

Comparación entre los dos Analistas

RESULTADOS		
% GENTAMICINA		
	1er Analista*	2do Analista**
	102.191	102.511
	104.085	101.466
	105.802	98.996
	106.827	100.496
	102.387	100.604
	102.981	104.567
	103.670	102.888
	105.610	100.954
	100.090	103.683
PROMEDIO	103.738	101.796
CV (%)	2.031	1.727

* Datos Obtenidos del ensayo de repetibilidad de método

** Datos Obtenidos del ensayo de precisión intermedia

PROMEDIO TOTAL ANALISTAS	102.767
CV (%)	2.074

CONFORME:

NO CONFORME:

PRIMER ANALISTA Analista 1
FECHA 2018-09-01

SEGUNDO ANALISTA Analista 2
FECHA 2018-09-02