



## Validación de método microbiológico cilindro placa para la determinación de potencia antimicrobiana de la gentamicina en un producto farmacéutico inyectable veterinario.

### Validation of microbiological method cylinder plate for the determination of antimicrobial potency of gentamicin in a veterinary injectable pharmaceutical product.

Marmolejo-Ruiz, G. S.<sup>1</sup>, Alba-Romero, J. J.<sup>1</sup>, Ocampo-López, J. S.<sup>3</sup>, Rico-del-Río, A. E.<sup>3</sup>, Lozano-Moran, M.<sup>3</sup>, Téllez -López, M. Á.<sup>2</sup>, Hernández-González, S. I.\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio B de Investigación del Departamento de Bacteriología Médica Diagnóstica y Salud Pública. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123 s/n, Fracc. Filadelfia. C.P. 35010, Gómez Palacio, Durango, México.

<sup>2</sup> Departamento de Farmacia y Productos Naturales. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123 s/n, Fracc. Filadelfia, C.P. 35010, Gómez Palacio, Durango, México.

<sup>3</sup> Laboratorio de Control de Calidad Interno de Comercializadora Pecuaria de México S.A. de C.V. Calle Indé No. 824, Parque Industrial Carlos A. Herrera Araluce, C.P. 35079, Gómez Palacio, Durango, México.

\*Autor de correspondencia: Dra. Sandra Isabel González Hernández  
Correo: [sandra.hernandez@ujed.mx](mailto:sandra.hernandez@ujed.mx)

#### RESUMEN

La industria farmacéutica se centra en el desarrollo y distribución de medicamentos mediante la investigación y desarrollo de nuevos fármacos, con énfasis en la innovación y la minimización de efectos secundarios. Sin embargo, estos avances enfrentan a desafíos científicos, sociales y económicos, junto con regulaciones de calidad. El objetivo de esta investigación fue determinar la potencia antimicrobiana de un producto farmacéutico inyectable con gentamicina como principio activo mediante el método Cilindro Placa, así como diseñar y validar la metodología. La metodología utilizada tiene como referencia el método general de análisis, valoración microbiológica de antibióticos de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Lo que demuestra que el producto farmacéutico inyectable veterinario con contenido neto de 100 mL donde el 20% corresponde a Gentamicina como principio activo, el producto obtuvo una potencia antimicrobiana de 95.83%, por lo tanto, inhibe el crecimiento del microorganismo de prueba, *Staphylococcus epidermidis*. Mediante la implementación de este método validado, se garantiza la fiabilidad de los resultados..

**Palabras clave:** Industria farmacéutica, Cilindro Placa, Gentamicina, Potencia antimicrobiana.

#### ABSTRACT

The pharmaceutical industry focuses on the development and distribution of medications through the research and development of new drugs, emphasizing innovation and the minimization of side effects. However, these advancements face scientific, social, and economic challenges, along with quality regulations. The objective of this research was to determine the antimicrobial potency of an injectable pharmaceutical product with gentamicin as the active ingredient using the Cylinder Plate method, as well as to design and validate the methodology. The methodology used references the general analysis method, microbiological evaluation of antibiotics from the Mexican Pharmacopoeia. This demonstrates that the veterinary injectable pharmaceutical product with a net content of 100 mL, where 20% corresponds to Gentamicin as the active ingredient, achieved an antimicrobial potency of 95.83%, thus inhibiting the growth of the test microorganism, *Staphylococcus epidermidis*. By implementing this validated method, the reliability of the results is ensured.

**Keywords:** Pharmaceutical industry, Cylinder Plate, Gentamicin, Antimicrobial potency.

## INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica incluye actividades, procesos y operaciones relacionadas con el descubrimiento, desarrollo, producción y distribución de productos médicos y medicamentos, (Gligo, N., et al., 2023), sus pilares fundamentales son la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos, teniendo como horizonte la innovación y el tratamiento terapéutico con el menor número de efectos secundarios, (Inostroza-Ruiz L., et al., 2023), además, los laboratorios farmacéuticos deben garantizar mediante ensayos fisicoquímicos y microbiológicos la calidad del producto, la metodología empleada tiene que estar validada, cuando se amerite, evaluar la exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y robustez, según manuales de Buenas Prácticas Farmacéuticas, esto es para que proporcione un alto grado de confianza, (DIGEMID, 2018).

En México, como en el resto del mundo, la investigación por instituciones académicas y farmacéuticas ha seguido la tendencia general de la globalización y se ha movido inexorablemente a niveles de países de medianos y bajos ingresos. En 2019, las compañías farmacéuticas invirtieron 83 billones de dólares en investigación y desarrollo (diez veces más que en 1980). Es incuestionable, dado el monto destinado a la investigación en nuestro país (0.4 % del producto interno bruto, alrededor de 49 330 millones de pesos, comparado con 3.4 % de Japón o 2.7 % de Estados Unidos), indica una necesidad de llevar a cabo investigación financiada por la industria farmacéutica, (Mimenza-Alvarado A. J., et al., 2023).

La introducción de los antibióticos en el uso clínico fue el mayor avance médico del siglo XX, los antibióticos además de tratar enfermedades infecciosas hicieron posible la implementación de nuevas tecnologías, prolongo la expectativa de la vida humana y posibilitó procedimientos médicos, (Hutchings, M. I., et al., 2019), al tiempo que garantizaba la seguridad alimentaria y mejoraba la salud pública, (de la Fuente-Nunez, C., et al., 2023). Actualmente la resistencia a los antibióticos es una de las amenazas más graves para la salud pública mundial del siglo XXI, una vez que se introduce un nuevo fármaco en la clínica, la resistencia a los antibióticos puede surgir rápidamente a través de una fuerte presión selectiva poco después de la inducción, (Wang, C.H., et al., 2020). Un tema alarmante es la seguridad alimentaria ya que es vulnerada por el uso indiscriminado de los antibióticos en animales lo que origina un desarrollo de resistencia a los antimicrobianos (representan un grupo altamente diverso de moléculas que pueden detener el crecimiento (efecto bacteriostático) o provocar la muerte (efecto bactericida), específicamente de bacterias,

(Duijkeren., et al., 2018). Las bacterias son microorganismos que han vuelto resistentes a múltiples medicamentos, lo que las hace extremadamente difíciles de tratar, (Barrios-Villa, E., 2024), la cual está relacionada con el principio activo o con las propiedades farmacocinéticas del antibiótico que seguirá diferentes rutas de distribución dentro del organismo o en los tejidos del animal dejando residuos que dependen del tipo antimicrobiano, no se respetan los Límites Máximos de Residuos, el tiempo de carencia de los antibióticos administrados, los efectos de los antibióticos en los animales y las normativas regulatorias de uso de los antibióticos veterinarios, (Tejada Rodríguez, E. J., & Arreguín, A., 2024). Es de importancia resaltar que a través de los años la gestión de calidad ha sido objeto de varias investigaciones relacionándola con otros factores de crecimiento, (Díaz Muñoz, G. A., & Salazar Duque, D. A., 2021). Actualmente, los investigadores realizan estudios para obtener datos y desarrollar métodos, (Li, X., et al., 2019), los cuales, se deben someter a un análisis estadístico con el fin de trazar gráficos, evaluar el comportamiento del proceso, llevar un monitoreo y comprender cuándo tomar medidas y mantener el proceso bajo un estado de control, (Bar R., 2019). En México se recurre cada vez más a organizaciones privadas que ofrecen sus servicios para la gestión de procesos de la investigación farmacéutica, (Santillán-Doherty, P., & Pérez-Padilla, R., 2023).

Por lo expuesto, es de gran interés tener dentro del Laboratorio de Control de Calidad metodologías, instrumentos, equipos y personal capacitado que permitan determinar la veracidad y validez de los productos farmacéuticos. Dentro de la calidad de los productos farmacéuticos es de importancia la determinación de su potencia antimicrobiana, existen diferentes metodologías para evaluar este aspecto, una de ellas es el: método Cilindro Placa el cual se fundamenta en la difusión del antibiótico desde un punto de aplicación, se evalúa el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento microbiano alrededor de los cilindros, este diámetro se relaciona directamente con la potencia antimicrobiana de las sustancias probadas, (FEUM 13ª edición 2021), es importante resaltar que 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 químicos, (USP 41, 2018).

El objetivo de esta investigación fue determinar la potencia antimicrobiana de un producto farmacéutico inyectable veterinario con principio activo la gentamicina por el método cilindro en placa (el cual es un antibiótico aminoglucósido bactericida que ejerce actividad contra bacilos gramnegativos

y cocos grampositivos, cuyo mecanismo de acción es activamente oxígeno-dependiente; y que luego de su difusión y posterior ingreso a la membrana externa bacteriana, para alcanzar el espacio periplasmático, es penetrar la membrana interna citoplasmática, alterando su funcionamiento al unirse a los polisomas (subunidad ribosómica 30s) provocando un error en la lectura del RNA-mensajero y produciendo una proteína anómala, la cual unido a las alternativas funcionales de la membrana induce a la pérdida de sodio, potasio y otros componentes esenciales; produciendo así, la muerte bacteriana, (Ploog, J. T., et al., 2009), (Krause, K.M., et al., 2016).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizó la capacidad antimicrobiana de un producto farmacéutico con Gentamicina como principio activo. La metodología utilizada para el método Cilindro Placa (difusión en agar) tiene como referencia el MGA 0100, Valoración Microbiológica de Antibióticos de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 13a edición, (2021) y para evaluar y establecer los lineamientos y criterios para la evaluación del desempeño del método de prueba tiene como referencia el CCAYAC-P-062, Guía para la Evaluación del Desempeño de Métodos de Prueba Microbiológicos para análisis de alimentos, (2012), el cual forma parte de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). La investigación se llevó a cabo en colaboración con la industria privada en el Laboratorio de Control de Calidad en el área de Microbiología de la Comercializadora Pecuaria de México S.A de C.V. y el Laboratorio B de Investigación del departamento de Bacteriología Médica Diagnóstica y Salud Pública de la Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas unidad Gómez Palacio, Durango.

Se trabajo bajo protocolos de bioseguridad establecidos dentro del Laboratorio de Control de Calidad de la Comercializadora Pecuaria de México S.A de C.V. para la manipulación de microorganismos y productos farmacéuticos.

### Preparación de las diluciones de la Solución de Referencia (SRef)

Se preparó la solución madre de la solución de referencia (SRef) utilizando el disolvente inicial para Gentamicina con un estándar de 595.63 UI/mg. Para ello, se empleó la solución amortiguadora N°3 con el fin de obtener la concentración final de la solución madre (1 mg de Gentamicina), la cual tiene una duración de 30 días en refrigeración. A partir de la solución madre se prepara una concentración central (c) 0.1

µg/mL posteriormente se realizan las soluciones de prueba de referencia con las siguientes concentraciones, las cuales competirán con la concentración central (c), dos de estas estarán por debajo (a: 0.64 µg/100 mL; b: 0.8 µg/100 mL) y dos por encima (d: 1.25 µg/100 mL; e: 1.56 µg/100 mL).

### Preparación de la suspensión del microorganismo de ensayo

*Material biológico:* se utilizó la cepa de Staphylococcus epidermidis la cual se obtuvo de las colecciones estandarizadas de la American Type Culture Collection (ATCC 12228) a partir de la cepa se realizó un cultivo de origen se sembró por agotamiento en placas con agar soya tripticaseína para su recuperación, incubándose por 24 h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

*Preparación del inóculo:* a partir del cultivo reciente se realizó una suspensión de la cepa en 3mL de solución salina al 0.9%. Esta suspensión se dispersó sobre la superficie de una placa con medio de cultivo para antibióticos N°1 y se incubó por 24 h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Al concluir la incubación, se recolectó el microorganismo en un frasco con rosca conteniendo 50 mL de solución salina 0.9%, obteniendo la suspensión madre.

### Preparación de placas

Se prepararon placas de valoración utilizando cajas de Petri de 90 mm x 15 mm; para cada muestra se utilizaron tres placas, se llenaron tres cilindros de cada placa con la concentración central (c) y en forma alterna llenar con otros tres con la muestra preparada y las soluciones de referencia como lo describe el MGA 0100, Valoración Microbiológica de Antibióticos de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 13a edición, pág. 279-280 (2021). Al finalizar, se llevó a incubar las placas de valoración por 18 h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Por consecutivo, se realizó una lectura del diámetro de las zonas de inhibición.

### Valoración del método

Los datos obtenidos de la prueba se analizaron estadísticamente determinando las siguientes especificaciones: cálculo de potencia antimicrobiana, repetibilidad, reproducibilidad, recuperación, sesgo.

## RESULTADOS

### Potencia antimicrobiana

En Tabla 1, se observan datos obtenidos para calcular la potencia antimicrobiana, para los cálculos iniciales, se

obtuvieron nueve datos de cada suma de las diluciones de SRef (a, b, d, e) y nueve datos de la muestra (m). Para el caso de la concentración central (c) se cuenta con 36 valores. Para todos los casos se determinó el promedio ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV). Posteriormente

se realizó una corrección de variación de los halos de inhibición, como se describe en el MGA 0100, Valoración Microbiológica de Antibióticos de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 13a edición, pág. 280-283, (2021); como resultado se obtiene la curva dosis-respuesta.

Tabla 1. Valoración del método Cilindro Placa para Gentamicina. Datos para curva dosis-respuesta de SRef.

Solución	Concentración ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ )	Placa 1 (mm)    Placa 2 (mm)    Placa 3 (mm)									$\bar{x}$	$\sigma$	CV %
C <sub>a</sub>	1	13.2	13.4	13.3	13.4	14.7	13.7	14.7	14.4	14.6	13.933	0.6146	4.411
A	0.64	12.9	12.6	12.8	13.0	12.9	12.9	12.9	12.9	12.8	12.856	0.1066	0.829
C <sub>b</sub>	1	13.8	13.3	13.8	13.2	14.6	13.5	14.4	14.3	14.0	13.878	0.4637	3.342
B	0.8	13.3	13.2	13.3	13.5	13.2	13.1	13.3	13.5	13.3	13.3	0.1247	0.938
C <sub>d</sub>	1	13.6	14.3	13.8	14.0	13.5	13.3	14.0	14.1	14.7	13.922	0.4049	2.908
D	1.25	14.1	14.6	14.4	14.2	14.6	14.7	14.8	14.0	14.3	14.411	0.2643	1.834
C <sub>e</sub>	1	14.0	14.1	14.0	14.3	13.6	13.9	14.4	14.6	14.2	14.122	0.278	1.969
E	1.56	16.2	14.9	15.1	15.1	16.2	15.6	14.8	15.1	15.5	15.389	0.4954	3.219
C36											13.976 4	0.1693	1.211 4
Muestra: producto farmacéutico inyectable veterinario con Gentamicina													
Cmuestra		14.4	14.6	14.9	14.9	14.3	14.7	14.8	14.2	14	14.533	0.324	2.23
Muestra		14.8	14.4	14.3	14.2	14.8	14.1	14.8	14.5	14.1	14.444	0.2793	1.934

Donde  $\bar{x}$  es el promedio,  $\sigma$  es desviación estándar, CV el coeficiente de variación, SRef es la solución de referencia de Gentamicina, C es la concentración central, a, b, d, e las concentraciones de SRef.

De acuerdo a la FEUM, 13a edición, (2021), para los criterios de aptitud de variabilidad recomienda determinar un valor máximo aceptable para el coeficiente de variación, en este caso el límite sugerido para el coeficiente de variación (CV) es no más de 10%, pero, si sobrepasan ese máximo predeterminado los datos de la valoración no son adecuados y deben desecharse.

En la Tabla 2 se utilizó la medición de la zona promedio corregida en la ecuación de la línea de la curva dosis-respuesta (se graficaron las mediciones corregidas de los halos de inhibición en función del logaritmo de los valores de la concentración de la SRef) con el fin de determinar el logaritmo de la concentración de la muestra.

En la Figura 1 se observa la ecuación de la recta obtenida y el coeficiente porcentual ( $R^2$ ) de la muestra, el cual sirve como criterio de aceptación de la prueba.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la potencia antimicrobiana de la muestra del producto farmacéutico inyectable veterinario con Gentamicina.

#### Análisis estadístico

En esta investigación, se establecieron lineamientos y criterios de evaluación del desempeño del método de prueba basándose en los Criterios de Validación de Métodos Microbiológicos de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC-P-062, Guía para la Evaluación del Desempeño de Métodos de Prueba Microbiológicos para análisis de alimentos, 2012), el cual forma parte de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

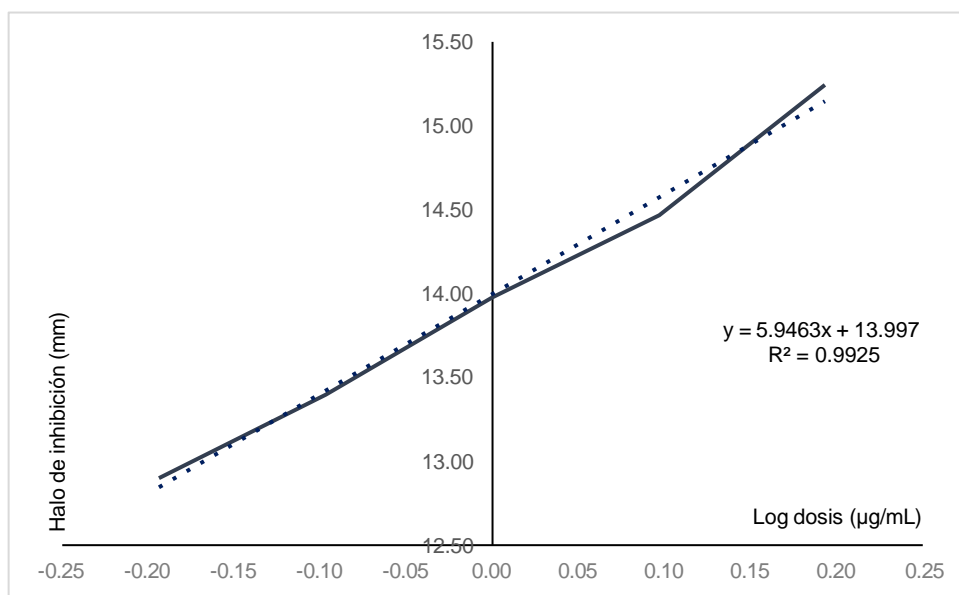
A continuación, se presenta un resumen de los resultados obtenidos de la potencia antimicrobiana del producto farmacéutico inyectable veterinario con Gentamicina en 10 repeticiones para la validación del método en días distintos (A y B), en el cual también se calculó el promedio y la desviación estándar, como se puede observar en la tabla 4. En

la tabla 5, se presentan los resultados y criterios de aceptación de la validación de acuerdo a los lineamientos establecidos para el desempeño del método.

**Tabla 2.-** Datos logarítmicos para la curva dosis-respuesta

Datos logarítmicos de la concentración del producto farmacéutico inyectable veterinario con Gentamicina		Datos graficados de SRef de Gentamicina		
		X	Y	
m	13.8875	a	-0.1938	12.8994
f	5.9463	b	-0.0969	13.3984
g	13.9974	c	0	13.9764
		d	0.0969	14.4654
		e	0.1931	15.2434

Donde la muestra corregida es (m), la ordenada al origen es (f) y la pendiente es (g). La ordenada al origen y la pendiente se obtuvieron de los datos graficados: Y (halo de inhibición corregido) y X (logaritmo de la concentración de las diluciones del SRef (a, b, c, d, e)).



**Figura 1.-** Grafica de la curva dosis-respuesta de la SRef de Gentamicina y del producto farmacéutico inyectable veterinario con Gentamicina

El límite sugerido según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 13ª edición, 2021, para el coeficiente porcentual de la muestra (R<sup>2</sup>) es no menos del 95%.

**Tabla 3.-** Resultados de la valoración microbiológica (potencia antimicrobiana) del producto farmacéutico inyectable veterinario con Gentamicina

Log (m)	-0.0185
Concentración de la muestra	0.9583
Porcentaje de concentración	95.83

Tabla 4.- Datos obtenidos en los días A y B

Día A			Día B		
No. Ensayo	Log de la concentración (µg /mL)	Resultado de potencia %	No. Ensayo	Log de la concentración (µg /mL)	Resultado de potencia %
1	1.9256	84.25	1	1.9861	96.84
2	1.9618	91.58	2	1.9426	87.62
3	2.0183	104.30	3	1.9774	94.92
4	1.9473	88.57	4	1.9745	94.29
5	1.9401	87.11	5	1.9469	88.50
6	1.9937	98.55	6	2.0208	104.91
7	1.9661	92.50	7	2.0121	102.83
8	1.9531	89.76	8	1.9629	91.81
9	2.0067	101.55	9	1.9484	88.79
10	1.9372	86.53	10	1.9585	90.89
$\bar{x}$	1.9650		$\bar{x}$	1.9730	
$\sigma$	0.0297		$\sigma$	0.0256	

Donde  $\bar{x}$  es el promedio,  $\sigma$  es desviación estándar.

**Tabla 5.- Resultados y criterios de aceptación de la validación del producto farmacéutico inyectable veterinario con Gentamicina**

Microorganismo de referencia <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228			
Parámetro de Validación	Criterio de Aceptación	Valor Obtenido	Aceptación o Rechazo
Repetibilidad	$r < 3$	Día A 1.02	Aceptación
		Día B 1.03	
Reproducibilidad	$R < 3$	1.04	Aceptación
Recuperación	Entre 90 y 100% log	Día A 98.65	Aceptación
		Día B 98.25	
Sesgo	Diferencia absoluta de lo inoculado y lo recuperado es $< 0.3\log$	Día A 0.027 log	Aceptación
		Día B 0.035 log	

Donde: r es repetibilidad, R es reproducibilidad.

La recuperación al ser expresado en porcentaje, se toma la concentración central de la SRef como 100% y el sesgo indica la diferencia absoluta de lo recuperado y lo inoculado es  $< 0.3\log$ .

## DISCUSIÓN

### Potencia antimicrobiana

En la figura 1 se puede observar la curva dosis-respuesta de la SRef de Gentamicina y del producto farmacéutico inyectable veterinario con Gentamicina para la cual se utilizaron los datos de la tabla 2. En este ensayo el rango de aceptación para  $R^2$  es no menos del 95%, para una regresión aceptable ocurre solo si el porcentaje (%) de  $R^2$  obtenido excede el valor predeterminado, por lo que los valores se consideran válidos y se puede proseguir al cálculo final de la potencia antimicrobiana.

Cunha, E.K.A., & Estrela, M.A.A., (2021), en su estudio de sobre la amoxicilina realizo un análisis de regresión lineal simple con el propósito de verificar la linealidad del método para el rango de concentración establecido de (0,05mg/mL a 0,40 mg/mL), la estadística de regresión demostró una relación lineal estadísticamente significativa ( $R^2 = 0,9975$ ), dando como valor al coeficiente de regresión 95% basándose en la Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (2019).

De acuerdo a la tabla 3 donde se muestran los resultados de la potencia antimicrobiana de la muestra, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 13a edición, (2021) hace mención sobre el criterio de aceptación en un rango de 80 a 125 %, si el coeficiente porcentual de la muestra excede el límite sugerido del 95%, el análisis es aceptable. En nuestro trabajo la potencia obtenida para el producto farmacéutico veterinario con Gentamicina fue de 95.83%, el cual es aceptable. Lo que demuestra que el producto farmacéutico veterinario inhibe el crecimiento del microorganismo de prueba, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

La United States Pharmacopeia (2022) describe los resultados para la valoración de Gentamicina en solución inyectable, bajo la clasificación de venta genérica y de marca, obtiene un porcentaje de la cantidad declarada de Gentamicina, dentro de las especificaciones vigentes de la Farmacopea tiene un rango de 90,0% – 125,0%. En otro estudio Loor A. (2020) obtuvo para la Gentamicina un porcentaje promedio que fue de 102,02% para la clasificación genérica, y 103,83% para la de marca.

### Análisis estadístico

Mahmoudi, A., *et al.*, (2020) comenta que, la metodología analítica es fundamental para el control de calidad de una forma farmacéutica y que se basa en varios factores. Actualmente, los investigadores realizan estudios para obtener datos y desarrollar métodos, (Li, X., *et al.*, 2019), una

selección de validación de método involucra evidencias que cumplan los requisitos para un uso en específico, garantizando la calidad, confianza y seguridad de los resultados analíticos obtenidos, (Díaz Muñoz, G. A., & Salazar Duque, D. A., (2021)).

De acuerdo a la norma oficial ISO/IEC 17025:2017, se debe validar los métodos no normalizados, métodos desarrollados y métodos normalizados utilizados dentro del laboratorio, la validación debe ser amplia, para los datos resultantes se deben aplicar técnicas estadísticas y se deben de registrar de manera que las tendencias sean detectables.

En esta investigación, se establecieron lineamientos y criterios de evaluación del desempeño del método de prueba basándose en el CCAYAC-P-062, Guía para la Evaluación del Desempeño de Métodos de Prueba Microbiológicos para análisis de alimentos, (2012), el cual forma parte de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

### Repetibilidad y Reproducibilidad

Se determino analizando 10 réplicas del producto farmacéutico inyectable con principio activo de Gentamicina la cual nos indicó la variación del mismo analista en diferentes días usando la metodología de Cilindro Placa en busca de la potencia antimicrobiana, bajo las mismas condiciones. Los datos obtenidos se pueden observar en la tabla 4 y 5.

Se midió la variabilidad del método cuando se ejecutó por un solo analista. Obteniendo resultados aceptables dentro de los criterios de aceptación verificando que existe concordancia (aproximación) entre los resultados realizado en las mismas condiciones (de repetibilidad, mismo analista, mismos medios, mismos equipos, misma área de trabajo). Al cumplir nos indica que el método es un ensayo repetitivo y reproducible, además de demostrar confiabilidad del analista. Estos resultados cumplen con el criterio de aceptación que es menor a 3, lo cual indica que la variación entre una misma serie analítica es aceptable y contribuye a la precisión de la técnica analítica.

Pop Lara, A. K., & Cardona Morales, C. F. (2024) considera precisión al grado de concordancia entre resultados; siendo una medida de repetibilidad las condiciones en las que se trabajó las muestras, realizadas por el mismo analista con repetición de tres veces de las cuales se calculó la desviación estándar, así como el coeficiente de variación obteniendo como resultado un resultado de  $R < 2.2$  para la Gentamicina cumpliendo con un criterio establecido en su trabajo de  $R < 5$ .

## Recuperación

En la tabla 5, la recuperación se midió en función del porcentaje de actividad respecto a la sustancia de referencia utilizada, partiendo del entendimiento de que existe un número verdadero de partículas (desconocido) del cual se recupera el 100% o menos. La recuperación está asociada con los errores sistemáticos.

Samayoa Ordoñez, A. D., & Hernández De León, S. D. (2024) en su estudio de validación, obtuvieron una media de porcentaje de recuperación de 94.46%, dicho resultado se encontró dentro del rango aceptable para este parámetro, que es de 90 a 110%.

## Sesgo

En la tabla 5, el sesgo se llevó a cabo la suma de todos los errores sistemáticos inherentes al método. Este error representa la totalidad de la medida o su estimación en relación con un valor de referencia, es decir, la discrepancia entre el resultado esperado del método utilizado y un valor de referencia aceptado. Se expresa como la diferencia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor verdadero aceptado.

En el trabajo de Juárez López, C. J., & Ramos Ramírez, W. A. (2023) para la determinación del parámetro de sesgo con muestra de clorhexidina 4% en presencia de *Escherichia coli* ATCC 11229, los resultados obtenidos de cada una de las porciones muestran un sesgo menor al 0.3 para cada uno de los microorganismos, por lo tanto, se cumple con el criterio de aceptación como indica el parámetro de sesgo para la muestra de clorhexidina 4%.

El Manual de Buenas Prácticas de Manufactura para Productos Químicos, Farmacéuticos y Biológicos para Animales, (2020), indica que se debe llevar a cabo la validación de procedimientos ya que al adaptarse un método se debe tomar medidas para demostrar que es adecuado y que posee las condiciones reguladas oficialmente y la calidad exigida con el fin de asegurar que al emplearlo se pueden seguir obteniendo resultados deseados. Considerando también la Norma Oficial Mexicana, NOM-012-SAG/ZOO-2020, Especificaciones para la regulación de productos para uso o consumo animal, (2020), menciona que cada producto terminado que se pretenda comercializar en México, debe analizarse en el laboratorio de control de calidad, conforme a lo establecido al artículo 171 del Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal, 2012, (las personas físicas o morales que fabriquen productos para uso o consumo animal

deberán contar con un laboratorio de control de calidad interno, el cual deberá estar autorizado o aprobado por la Secretaría y en el caso de no contar con él, deberán de contratar a un laboratorio autorizado o aprobado), además la norma menciona que se debe garantizar la calidad del producto presentando el documento de análisis o de control de calidad efectuando técnicas analíticas internacionalmente reconocidas o los métodos analíticos descritos preferentemente en la última edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) y/o suplementos; si el método analítico no está descrito en esta, se podrán utilizar farmacopeas de otros países o regiones del mundo, o en su métodos internacionales validados.

En este trabajo de investigación se empleó el MGA 0100, Valoración Microbiológica de Antibióticos de la FEUM, 13ª edición, pág. 280-283, (2021), el cual demostró ser confiable puesto al seguir la metodología se obtuvo una potencia antimicrobiana del 95.83% del producto farmacéutico inyectable veterinario con Gentamicina teniendo un rango de aceptación del 80 a 125 %, así mismo, se seleccionaron los lineamientos y criterios de evaluación del desempeño del método de prueba guiándonos en el CCAYAC-P-062, determinando la repetibilidad, reproducibilidad, sesgo y recuperación, se realizó la validación de cada uno de los parámetros señalados presentando resultados dentro de los límites establecidos para cada uno de ellos, consiguiendo niveles altos de veracidad en los análisis, lo que a su vez se traduce en la confiabilidad de los resultados.

## CONCLUSIÓN

El método demostró una capacidad precisa y específica para el principio activo de la Gentamicina, considerando la presentación farmacéutica del producto.

La potencia obtenida para el producto farmacéutico inyectable veterinario con Gentamicina fue de 95.83%, el cual es aceptable y confiable. Lo que nos muestra que el producto farmacéutico inyectable inhibe el crecimiento del microorganismo de prueba, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

El método microbiológico Cilindro Placa para la valoración de potencia antimicrobiana de Gentamicina, cumple con los parámetros de validación recomendados por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 13ª edición, (2021), pues la evaluación estadística en base a el CCAYAC-P-062, Guía para la Evaluación del Desempeño de Métodos de Prueba Microbiológicos para análisis de alimentos, (2012) con los resultados de repetibilidad, reproducibilidad, recuperación, sesgo demostró que el método analítico es confiable y adecuado para su aplicación en el control de calidad de

productos farmacéuticos inyectables que contienen Gentamicina.

Mediante la implementación de este método validado, se garantiza la fiabilidad de los resultados.

#### CONFLICTO DE INTERESES:

Los autores declaran la ausencia de potenciales conflictos de interés.

#### BIBLIOGRAFÍA

Bar R. 2019. Charting and Evaluation of Real-Time Continuous Monitoring Water Bioburden. *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, 73(5), 496–509. Doi: <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2018.009837>.

Barrios-Villa, E. 2024. "Bacterias multidrogaresistentes ¿la pandemia que viene?" *RD-ICUAP* 10(28): 9-21. Doi: <https://doi.org/10.32399/icuap.rdic.2448-5829.2024.10.28.1233>.

Criterios de Validación de Métodos Microbiológicos de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC-P-062). 2012.

Cunha, E.K.A., & Estrela, M.A.A. 2021. Método Espectrofotométrico para dosificación de Amoxicilina en Suspensiones Orales. *RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinaria - ISSN 2675-6218*, 2 (11), e211951. <https://doi.org/10.47820/recima21.v2i11.951>.

de la Fuente-Nunez, C., Cesaro, A., Hancock, R. E. W. 2023. Antibiotic failure: Beyond antimicrobial resistance. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 71, 101012. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2023.101012>

Diaz Muñoz, G. A., & Salazar Duque, D. A. 2021. La calidad como herramienta estratégica para la gestión empresarial. *Podium*, (39), 19-36. doi:10.31095/podium.2021.39.2.

Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera “DGIAAP” y el Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes “CNRPyC”. 2022. Criterios para el funcionamiento, aplicación e interpretación de los resultados y los métodos analíticos para la identificación y/o cuantificación de residuos de plaguicidas.

Doxandabarat, X. D., Paes-Rodríguez, J. D., Albarellos, G. A. 2020. Prueba in vitro de potencia de cefovecin luego de su conservación a distintas temperaturas. *In Vet*, 22(1), 1.

Duijkeren, E., Schink, A., Roberts, M. C., Wang, Y., Schwarz, S. 2018. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbiol Spectr* 6(1): ARBA-0019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA0019-2017>.

Farmacopeia Brasileira. 2019. volume 1. 6.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Gligo, N., Peres, W., Plottier, C. 2023. Industria farmacéutica y sistemas de salud en la Argentina, el Brasil, Chile, México y el Uruguay: estructura, desempeño y políticas (No. 68655).

Naciones Unidas Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL).

Hutchings, M. I., Truman, A. W., Wilkinson, B. 2019. Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>

Inostroza-Ruiz L., et al. 2023. "Globalización e industria farmacéutica: la dimensión ética del cuidado de la salud." *Encuentros. Revista de Ciencias Humanas, Teoría Social y Pensamiento Crítico* 17: 26-38.

International Organization for Standardization (ISO) and International Electrotechnical Commission (IEC). 2017. ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

Juárez López, C. J., & Ramos Ramírez, W. A. 2023. Propuesta de protocolo de validación para comprobar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% en Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).

Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., Connolly, L. E. 2016. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 6(6):a027029. Doi: 10.1101/cshperspect.a027029. PMID: 27252397; PMCID: PMC4888811.

Li, X., Cai, M., Wang, L., Niu, F., Yang, D., Zhang, G. 2019. Evaluation survey of microbial disinfection methods in UV-LED water treatment systems. *The Science of the total environment*, 659, 1415–1427. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.344>.

Loor, A. 2022. Determinación de límites de confianza en valoración microbiológica de gentamicina de dos formas farmacéuticas bajo la venta de medicamento genérico o de marca utilizando el método cilíndrico placa. Tesis maestría. Escuela Superior Politécnica. ESPO. FCNM. del Litoral. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/56484>.

- Mahmoudi, A., Tertiş, M., Simon, L. M., Van Schepdael, A., De Francia, S., Junie, L. M., Săndulescu, R. 2020. Correlated quantification using microbiological and electrochemical assays for roxithromycin determination in biological and pharmaceutical samples. *Talanta*, 211, 120703. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120703>.
- 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.
- Manual de Buenas Prácticas de Manufactura para Productos Químicos, Farmacéuticos y Biológicos para Animales. 2020.
- MGA 0100, Valoración Microbiológica de Antibióticos de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 13a edición. 2021.
- Mimenza-Alvarado A. J., et al. 2023. "Investigación clínica e industria farmacéutica." *Gaceta médica de México* 159(2): 91-92.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-012-SAG/ZOO-2020, Especificaciones para la regulación de productos para uso o consumo animal. 2020.
- Ploog, J. T., Herrera, F. R., & Izaguirre, L. R. 2009. Evaluación de la Eficacia y la Tolerancia de una Suspensión Inyectable de larga acción sobre la base de Amoxicilina y Gentamicina (Amoxigentín)\* en el tratamiento de infecciones respiratorias en Ovinos de la Sierra Central.
- Pop Lara, A. K., & Cardona Morales, C. F. 2024. Validación de métodos de potencia antibiótica en disco-placa para Neomicina Sulfato y Gentamicina Sulfato en productos semisólidos (Doctoral dissertation).
- Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2012.
- Samayoa Ordoñez, A. D., & Hernández De León, S. D. 2024. Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente (Doctoral dissertation).
- Santillán-Doherty, P., & Pérez-Padilla, R. 2023. On clinical research and the pharmaceutical industry. Sobre la investigación clínica y la industria farmacéutica. *Gaceta medica de Mexico*, 159(4), 354–355. <https://doi.org/10.24875/GMM.M23000790>.
- Tejada Rodríguez, E. J., & Arreguín, A. 2024. Construcción y validación de cuestionarios para evaluar el riesgo de los antibióticos veterinarios en el consumo de huevo e impacto en la seguridad alimentaria. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 15(1), 149-175.
- United States Pharmacopeia. 2022. "Sulfato de Gentamicina, Inyección", 43 NF 38., p. 49759.
- Wang, C.H., Hsieh, Y. H., Powers, Z. M., Kao, C. Y. 2020. Defeating Antibiotic-Resistant Bacteria: Exploring Alternative Therapies for a Post-Antibiotic Era. *Int J Mol Sci.*; 21(3):1061. doi: 10.3390/ijms21031061. PMID: 32033477; PMCID: PMC7037027.