

# Desarrollo y validación de un método microbiológico para la determinación de la potencia de la azitromicina

## Development and validation of a microbiological method for the determination of the potency of azithromycin

ALESSANDRA GARCÉS\*, ILIANA RIVAS\*, MIRIAM REGNAULT\* Y LUISA ROSSI\*

### Resumen

Se desarrolló y validó un método analítico para la determinación de la potencia del antibiótico azitromicina como materia prima, empleando un método microbiológico que se fundamenta en la difusión producida desde reservorios cilíndricos de acero inoxidable en placas de Petri de 20 x 100 mm, en agar antibiótico # 11 como medio de cultivo, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 como microorganismo de prueba y un rango de concentración del antibiótico en estudio comprendido entre 0,20 µg/mL y 3,35 µg/mL. El análisis de regresión lineal mostró un coeficiente de correlación promedio de  $r = 0,9910$ ; un coeficiente de determinación promedio de  $r^2 = 0,9821$ , una pendiente promedio de  $b = 6,22$  y un intercepto promedio de  $y = 14,10$ . Estos datos demuestran que el método fue lineal para el rango de concentraciones empleadas, una recuperación promedio del 99,00% y un CV (DSR = 3,07%), tolerancia de  $T = 32,00\%$ , indicando una adecuada precisión. Se demostró la selectividad del método al no obtenerse una respuesta cuantificable con el metanol a la concentración empleada en el ensayo, y la robustez del método se evaluó a pH 7, resultando insatisfactoria a este valor de pH. De acuerdo a los criterios de aceptación exigidos por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), podemos concluir que el ensayo microbiológico de cilindro en placa en las condiciones indicadas, puede ser empleado como un método confiable para cuantificar *in vitro* la actividad antimicrobiana de la azitromicina y podría ser empleado como punto de partida para el análisis de este antibiótico en formas farmacéuticas.

**Palabras claves:** azitromicina, método microbiológico, difusión en agar, validación.

### Abstract

An analytical method was developed and validated to determine the potency of the antibiotic azithromycin as a raw material, using a microbiological method based on diffusion produced from cylindrical reservoirs made of stainless steel in petri dishes of 20 x 100 mm, antibiotic medium # 11 as growth medium, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 as a test microorganism and a range of concentrations of antibiotics from 0.20 µg/mL to 3.35 µg/mL. Linear regression analysis showed an average of correlation coefficient of  $r = 0.9910$ , an average of determination coefficient of  $r^2 = 0.9821$ , an intercept of  $y = 14.10$  and an average slope of  $b = 6.22$ . This data demonstrates that the method was linear for the range of concentrations employed, an average recovery of 99.00%, and CV (DSR = 3.07%), tolerance ( $t = 32.00\%$ ), indicating suitable precision. Selectivity of the method was demonstrated, because we had not quantifiable respond to methanol at concentrations used in the assay, and robustness to pH 7 with unsatisfactory results for this pH. According to the acceptance criteria required by the Spanish Pharmaceutical Industry Association (AEFI), the microbiological test of the cylinder plate method on the terms indicated can be used to quantify azithromycin *in vitro* and could be used as a starting point for the analysis of this antibiotic in pharmaceutical forms.

**Key words:** azithromycin, microbiological method, diffusion in agar, validation.

\* Postgrado de Aseguramiento de la Calidad, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 40109 Caracas 1040A Venezuela. Telf. (58-212) 605.275; Fax:(58-212)605.2707. miriamregnault@hotmail.com; alessgarces@hotmail.com

## Introducción

La azitromicina es un antibiótico que forma parte del grupo de los macrólidos entre los cuales están: la eritromicina, la claritromicina, la roxitromicina, entre otros, llamados así por su estructura, constituida de un anillo de lactona macrocíclico formado por varios miembros, a los que se unen uno o más desoxiazúcares. La diferencia entre los miembros de este grupo se basa en el cambio de sustituyentes presentes en el anillo o en el número de átomos que forman el mismo. La eritromicina fue el primer macrólido descubierto, en el año 1952, sin embargo este antibiótico presentó una gran cantidad de efectos adversos, por esta razón los Laboratorios Pliva en Croacia propusieron el incremento en el número de miembros del anillo de lactona de 14 miembros de la eritromicina a 15 y 16, resultando un nuevo grupo de macrólidos llamado azalidas, lográndose cambios significativos en las propiedades farmacocinéticas y en el espectro de acción comparado con los antiguos macrólidos (Turcinov y Pepeljnjak, 1998). Así surge la azitromicina como consecuencia de la inserción de un grupo amino en el anillo de la eritromicina, convirtiéndola así en un compuesto semisintético cuya estructura se puede observar en la figura 1.

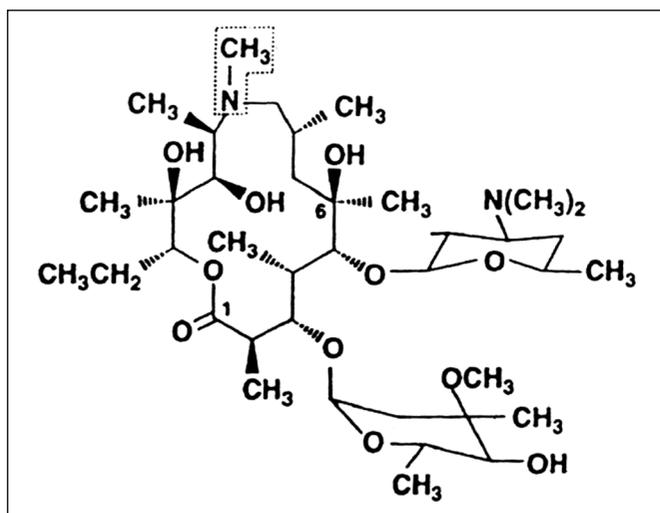


Figura 1. Estructura Química de la Azitromicina.

Los macrólidos son compuestos bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas al ligarse en forma reversible a la subunidad ribosómica 50S de microorganismos sensibles. El antibiótico no inhibe de manera directa la formación del enlace peptídico, sino que bloquea la fase de translocación del aminoacil-tRNA en la cual la cadena del péptido en crecimiento se desplaza del sitio aceptor en el ribosoma al sitio peptídico o donador (Goodman y Gilman, 1996).

La azitromicina fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) en noviembre de 1990, y se sa-

be que alcanza la mayor concentración intracelular de todos los macrólidos. Es empleada en afecciones respiratorias debido a su actividad contra el *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis*, *Mycoplasma hominis*. Es muy eficaz en las enfermedades de transmisión sexual provocadas por: *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducrey*, *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum*. Tiene buena actividad contra *Bacteroides spp* y anaerobios Gram positivos spp, las micobacterias atípicas son muy sensibles, no así *Mycobacterium tuberculosis* (González y col., 1998).

La azitromicina muestra propiedades farmacocinéticas superiores a la eritromicina, es absorbida rápidamente alcanzando altos niveles en plasma y en tejidos por períodos largos, con una vida media tisular de 2 a 4 días. Su administración consiste de una sola dosis diaria para el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual, infecciones de la piel, infecciones respiratorias, etc. por períodos significativamente más cortos de 3 a 5 días. Adicionalmente al compararla con otros miembros del grupo de los macrólidos, la azitromicina presenta menos efectos adversos y menos interacción con otras drogas (Goodman y Gilman, 1996). Es por ello que en Venezuela, la azitromicina es ampliamente prescrita por el gremio médico, además de ser uno de los antibióticos de elección para sustituir a las penicilinas en personas hipersensibles a este antibiótico.

La United States Pharmacopoeia 32 (USP 2009) y el Code of Federal Regulations (CFR 21 1997) señalan que la azitromicina se puede cuantificar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un detector electroquímico amperométrico. La European Pharmacopoeia (EP 2008) describe la identificación y cuantificación de la azitromicina por HPLC con detección espectrofotométrica ultravioleta a 210 nm al igual que la British Pharmacopoeia (BP 2009).

Diversos autores han realizado una serie de estudios que demuestran que la potencia de la azitromicina puede ser determinada microbiológicamente. Turcinov y Pepeljnjak (1998), determinaron cuáles microorganismos de un grupo de 10, mostraban la mayor sensibilidad a dicho antibiótico y bajo qué condiciones. Para ello emplearon el método de difusión en placas de agar, resultando la *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 como un microorganismo recomendable para la determinación de la potencia de este antibiótico, ya que mostró resultados de sensibilidad, precisión y exactitud aceptables. Igualmente Breier, García y Oppe (2002), realizaron la validación de un ensayo microbiológico, aplicando el método de cilindro en placa 3 x 3. Para la determinación de la azitromicina, utilizaron la *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 como microorganismo de ensayo y trabajaron con concentraciones de 0,1

a 0,4 µg/mL para cápsulas y suspensiones. Calcularon linealidad, precisión y exactitud, concluyendo que el ensayo microbiológico era satisfactorio para su cuantificación. Estos resultados demuestran que la azitromicina puede ser determinada microbiológicamente.

En Venezuela existen en la actualidad once laboratorios comercializadores de azitromicina, de ellos sólo cinco aplican métodos químicos para determinar la potencia del antibiótico, de los cuales tres emplean el método de la USP, y dos métodos propios, esto probablemente debido a la carencia de los equipos específicos para la cuantificación de este antibiótico. Por ello se han empleado métodos microbiológicos para la determinación de azitromicina, a pesar de que éstos no están referenciados en los textos oficiales antes mencionados. Cabe destacar que las condiciones utilizadas por estos laboratorios difieren entre sí y en su mayoría, son las indicadas para la eritromicina.

Por lo antes expuesto fue de nuestro interés desarrollar un método microbiológico a nivel nacional que permita unificar los criterios que permitan determinar la potencia de la azitromicina; estableciendo la metodología y las condiciones óptimas para alcanzar resultados confiables, y al mismo tiempo cumplir con las normativas existentes para la industria farmacéutica.

Hoy en día existe gran variedad de textos oficiales que hablan sobre la validación de métodos químicos y muy pocos sobre la validación de bioensayos, entre los que se encuentran los métodos microbiológicos. Sin embargo, la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI 2001) en su libro: «Validación de Métodos Analíticos», publicó la validación de métodos de análisis en microbiología, dentro de los cuales se encuentra la valoración microbiológica de antibióticos, donde se establece el significado de cada uno de los parámetros de validación, los criterios de aceptación y las herramientas estadísticas necesarias para la evaluación de los datos obtenidos para cada una de estas pruebas. Basándonos en ello, se planteó desarrollar y validar un método microbiológico que determine la potencia de la azitromicina. Esto nos permitirá ofrecer a los laboratorios farmacéuticos nacionales una metodología microbiológica validada para cuantificar el mencionado antibiótico, como alternativa a los métodos cromatográficos en el control de calidad del antibiótico y demostrar la fiabilidad de los resultados a través de la validación del mismo.

## Materiales y métodos

### ESTANDARIZACIÓN DEL MICROORGANISMO DE ENSAYO

Un cultivo puro y fresco (24 horas) de *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 en agar antibiótico N° 1 (agar de siembra Penassay, marca BBL), se resuspendió en 3 mL

de solución salina estéril con perlas de vidrio y se inoculó en una botella de Roux con agar antibiótico N° 1. Se incubó a una temperatura de  $32,5 \pm 2,5$  °C por 24 horas. Posteriormente se recogió el crecimiento microbiano con 45 mL de solución salina estéril, y se preparó una dilución 1:40 la cual proporcionó el 25% de transmitancia al leerse a una longitud de onda de 580 nm en el espectrofotómetro (Milton Roy Company (Spectronic 20D).

Medios de cultivo: Éstos fueron preparados siguiendo las instrucciones del fabricante (BBL). En el caso del agar neomicina (agar antibiótico N° 11, marca BBL) se ajustó el pH a 8,0 con una solución de NaOH 1N. Se esterilizaron en autoclave (Högner modelo VAP-5001), a 121 °C por 15 min, almacenándose a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

Preparación de patrones y muestras: Las soluciones de patrones y muestras para los ensayos preliminares se prepararon inmediatamente antes de ser utilizadas. Se prepararon soluciones madre de azitromicina de 10 µg/mL y 100 µg/mL de concentración. El antibiótico se disolvió inicialmente en 10 mL de metanol y luego se llevó a volumen con solución buffer fosfato 0,1M pH 8 y en solución buffer fosfato 0,1M pH 7 para el estudio de la robustez. Con el propósito de establecer cuál era el rango de concentración óptimo para la determinación de la potencia de la azitromicina, a partir de las soluciones madre, se prepararon las diluciones para cada uno de los rangos de concentraciones estudiados en los ensayos preliminares: ensayos 1, 2 y 3, rango de concentración comprendido desde 0,64 µg/mL hasta 1,56 µg/mL; ensayo 4 y 5 con un rango de concentración desde 0,41 µg/mL hasta 2,44 µg/mL; ensayo 6 con un rango de concentración en estudio a partir de 0,41 µg/mL hasta 7,45 µg/mL; ensayo 7 ampliación del rango a partir de 1 µg/mL hasta 32 µg/mL y un ensayo 8 con un rango comprendido desde 0,05 µg/mL hasta 12,8 µg/mL.

Preparación de las placas de Petri: Cada ensayo requirió una placa de Petri por cada concentración a ensayar. Para su preparación se añadió a cada placa 21 mL de agar neomicina fundido y se dejó solidificar en una superficie plana y nivelada por un período entre 20 y 30 minutos, para formar la capa base. Se evaluaron diferentes inóculos para determinar la mejor respuesta en cuanto a tamaño, nitidez y definición de los halos de inhibición. Los tamaños de inóculos ensayados fueron: 1,2%; 2%; 3%; 4%, 5%, 10% y 12%, para lo cual se añadieron 4,0 mL de agar neomicina inoculado al porcentaje seleccionado, a cada una de las placas que contenían la capa base, distribuyéndose uniformemente por toda la superficie para formar la capa semilla y se dejaron solidificar a temperatura

ambiente alrededor de 20 a 30 minutos. En cada una de las placas se colocaron 6 cilindros de acero inoxidable ( $6 \pm 0,1$  mm de diámetro interno y  $8 \pm 0,1$  mm de diámetro externo). El llenado se realizó en forma de concentraciones creciente (Clavell, 1991; Hewitt, 2004). Se incubaron las placas de Petri en la estufa (marca Heraus modelo B6060) a una temperatura de  $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  (CFR 21 y USP 32) por un período de 18 a 24 horas. Posteriormente se realizaron las lecturas de cada uno de los halos de inhibición obtenidos, haciendo uso del medidor de halos (Fischer Scientific).

## Validación del método

### LINEALIDAD

Ésta se determinó ensayando por triplicado el rango de concentraciones escogido ( $0,2-0,32-0,51-0,82-1,31-2,10$  y  $3,35$   $\mu\text{g/mL}$ ). Para ello se realizaron tres pesadas del patrón USP de azitromicina y de cada pesada se prepararon las diluciones de trabajo y se siguió la metodología analítica propuesta. Una vez obtenidos los resultados, se graficó el logaritmo de la concentración  $\mu\text{g/mL}$  vs. los halos de inhibición en mm y se determinó para cada uno: la ecuación de la recta, el intercepto (a), la pendiente (b), los coeficientes de correlación (r) y determinación ( $r^2$ ), la varianza residual, la normalidad de los residuales, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de linealidad.

### PRECISIÓN (REPETIBILIDAD)

Se determinó con la dilución intermedia ( $0,82$   $\mu\text{g/mL}$ ) del rango ensayado, para ello se tomaron los resultados completos de una placa, que contenían 6 réplicas para esta concentración. Con los datos obtenidos, se calcularon el coeficiente de variación (CV) o la desviación estándar relativa (% DSR) y la tolerancia, que son los criterios que miden la precisión.

### EXACTITUD

Se determinó para las concentraciones de  $0,20$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $0,82$   $\mu\text{g/mL}$  y  $3,35$   $\mu\text{g/mL}$  del mismo ensayo, las cuales corresponden a las concentraciones: baja, media y alta del rango seleccionado. Para ello sólo se tomaron 3 lecturas por cada placa de concentración a evaluar. Con los resultados obtenidos se calculó: el coeficiente de recuperación en porcentaje (R), la homogeneidad de las varianzas y la prueba de *t de Student*.

### SELECTIVIDAD

Se determinó realizando un blanco (metanol y buffer pH 8) de la solución madre para 6 réplicas y de esta manera observar si se producía una respuesta

cuantificable en ausencia del antibiótico y corroborar así la selectividad del método.

### LÍMITE DE DETECCIÓN (LD) Y CUANTIFICACIÓN (LC)

Se determinó a partir de un blanco (metanol y buffer pH 8) de la solución madre en ausencia del antibiótico para 6 réplicas. Con los datos obtenidos y la pendiente de la curva de calibración se procedió a realizar la estimación para el LD y el LC según lo indica la guía Q2B de la Internacional Conference on Harmonisation (ICH).

### ROBUSTEZ

Se determinó para el rango de concentraciones seleccionado ( $0,2-0,32-0,51-0,82-1,31-2,10-3,35$   $\mu\text{g/mL}$ ). La condición escogida para este estudio fue variar el pH del buffer fosfato empleado como diluyente. Se procedió a realizar el método propuesto empleando un buffer pH 7 para preparar las diluciones en vez del buffer pH 8 siguiendo la metodología analítica propuesta y de esta manera observar los cambios en las respuestas.

## Resultados y discusión

Se eligió la *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 ya que el CFR (1997) la indica para la determinación de eritromicina y es descrita por Turcinov y Pepeljnjak (1998) como el microorganismo que brindó los mejores resultados en cuanto a precisión y exactitud de un total de 10 microorganismos estudiados. Se utilizó la temperatura de  $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  como la óptima que permite el crecimiento de la *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 y la difusión del antibiótico. Como medio de cultivo se empleó el agar antibiótico N° 11, debido a que es un medio adecuado para el crecimiento del microorganismo a ensayar y ofrece un pH óptimo (7,8-8,0) que evita la degradación de la azitromicina, lo cual ocurre cuando se trabaja con pHs ácidos debido a la naturaleza básica de esta droga (Turcinov y Pepeljnjak, 1998). Como diluyente se utilizó buffer fosfato pH 8, de manera de favorecer la estabilidad del antibiótico y metanol para disolver la azitromicina ya que al ser éste alcohol miscible con el agua permite la difusión del antibiótico en el agar, sin inhibir la respuesta del microorganismo frente al antibiótico, esto se comprobó al ensayar un blanco, utilizando una solución madre (10 mL de metanol/ buffer pH 8 csp 100 mL) demostrándose que no hubo interferencia por parte de éste, al no obtenerse halos de inhibición.

Se ensayaron tres concentraciones del antibiótico baja, media y alta (1, 32, 128  $\mu\text{g/mL}$ ) para distintos tamaños de inóculo (2, 3, 4, 5, 10 y 12%), y de esta manera se determinó la cantidad de microorganismo a

ser empleada en el ensayo. Según la USP 32 (2009) los halos de inhibición obtenidos en un análisis de cilindro en placa, deben estar por encima de 14 mm de diámetro para considerarlos como una zona de inhibición satisfactoria. En las evaluaciones realizadas, a tamaños de inóculos muy elevados (3 a 12%), los halos de inhibición obtenidos fueron difusos. Se decidió entonces trabajar con tamaños de inóculos por debajo del 2%, con los cuales se obtuvieron halos de inhibición definidos y nítidos a concentraciones bajas, facilitando así la lectura de los mismos. Con una concentración del 1,2% del inóculo, la cual es la empleada por la mayoría de los laboratorios que aplican métodos microbiológicos para la azitromicina, los halos de inhibición obtenidos tenían diámetros mayores a 14 mm con bordes claramente definidos que facilitaron su lectura y mejoraron la precisión en el análisis.

Para determinar el rango óptimo de concentraciones a utilizar en el método propuesto, se realizó una serie de ensayos preliminares, donde se varió el rango de concentración del antibiótico y se analizaron las medidas de los halos de inhibición del microorganismo de ensayo frente a esta variación. Los datos obtenidos fueron evaluados según el capítulo <111> de la USP «Diseño y Análisis de Ensayos Biológicos» (2009), para el rechazo de observaciones que parecen fuera de lugar o aberrantes, y se graficó el diámetro de los halos de inhibición (mm) *vs.* logaritmo de la concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) tal y como se muestra en la figura 2. Al analizar este gráfico se observa que al aumentar las concentraciones del antibiótico disminuye el valor de la pendiente y por consiguiente la sensibilidad del método.

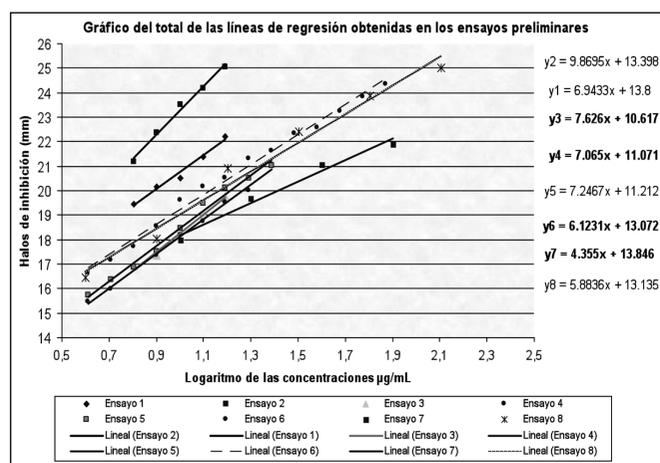


Figura 2. Gráficos de los Ensayos Preliminares.

Para escoger el rango a emplear en el método propuesto, se realizó un análisis estadístico de las pendientes obtenidas para los diferentes rangos de concentraciones ensayados. Se aplicó la prueba de Grubb indicada en la norma COVENIN 2972-2: 1997 y se calculó la desviación estándar relativa (DSR) de las pendientes

para determinar cuál rango presenta una mayor repetibilidad. De acuerdo a la prueba de Grubb no existen valores atípicos en la muestra analizada, pero se obtuvo una DSR de 20,31% (criterio de aceptación <5%), lo que indica que no hay repetibilidad en todo el rango de concentraciones estudiado que va desde 0,4 hasta 12,8  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, se observó que existe repetibilidad para los rangos de concentraciones entre 0,41 hasta 2,44  $\mu\text{g/mL}$  correspondientes a los ensayos N° 1, 3, 4 y 5, obteniéndose una DSR de 4,12%, así como para los ensayos 6 y 8 en donde también se observó repetibilidad con un valor de DSR de 3,43% pero con una menor sensibilidad (menor pendiente), ya que en éstos se llegaron a emplear concentraciones más altas como 7,45  $\mu\text{g/mL}$  y 12,8  $\mu\text{g/mL}$ .

Se concluyó entonces, que el rango para determinar la azitromicina se encuentra entre 0,4 y 2,44  $\mu\text{g/mL}$ , ya que es aquí donde se han observado los mayores valores de pendiente y repetibilidad, además de obtener en este rango de concentración la mejor definición en los halos de inhibición, facilitando su lectura y disminuyendo así los errores durante la medición. Siendo la azitromicina un macrólido, semejante a la eritromicina, esperábamos conseguir un rango de dosis parecido al utilizado para determinar su potencia 0,64-1,56  $\mu\text{g/mL}$ , (CFR 21, 1997). Adicionalmente de acuerdo a los estudios de Breier, García y Oppe (2002), la azitromicina puede ser determinada microbiológicamente a concentraciones bajas en un rango de 0,1 a 0,4  $\mu\text{g/mL}$ .

## Validación del método

### LINEALIDAD

El estudio de la linealidad implica una representación gráfica y una comprobación estadística, la cual se realizó empleando todos los datos obtenidos en cada uno de los ensayos y no los promedios. La figura 3 muestra los gráficos obtenidos para los 3 ensayos de validación, en ella se aprecian los resultados del análisis de regresión correspondiente y se observa que existe repetibilidad, ya que los valores de las pendientes presentan una DSR igual a 2,99%. Para el análisis de regresión lineal se empleó el programa Minitab® y se encontró para los 3 ensayos de validación un coeficiente de correlación y determinación >0,95 y la regresión lineal es estadísticamente significativa ya que  $p < 0,005$ .

Para poder realizar el ANOVA, inicialmente se demostró que los residuales provienen de una distribución normal, ya que se encuentran formando una línea recta en donde la prueba de Anderson-Darling revela un valor de  $p < 0,05$ . Adicionalmente se puede observar que la distribución de los residuales *vs.* los valores

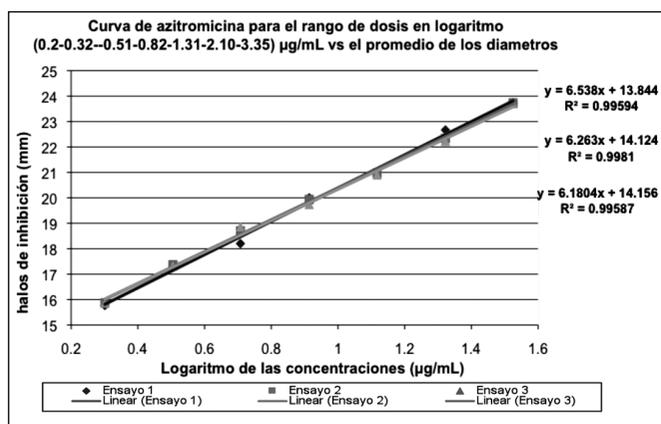


Figura 3. Ensayos de Validación.

estimados es aleatoria y no refleja ninguna tendencia, concluyendo entonces que hay homoscedasticidad indicando la validez del modelo empleado (AEFI, 2001), por lo cual se procedió a realizar el análisis de varianza para cada uno de los ensayos, resumiendo los resultados en la Tabla I.

Tabla I  
Análisis de Varianza (ANOVA)

(F)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
F1 Tabla 4,075	1823,70	2257,91	2655,45
F2 Tabla 2,492	2,490	0,8467	1,9717

Los tres ensayos cumplen con el ANOVA:  $F1_{exp} > F1_{tab}$  indicando que las pendientes son estadísticamente diferentes de cero y  $F2_{exp} < F2_{tab}$  demostrando la linealidad de los resultados obtenidos. Adicionalmente se comprobó que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante la prueba de t de Student ya que el  $t_{exp} > t_{tab(0,05)}$ , cumpliendo con la prueba de linealidad y se calcularon los intervalos de confianza a partir de la expresión  $b \pm t * Sb$ , siendo en este caso t el valor de la distribución de la t de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación  $\alpha = 0,05$ ; b el valor promedio de las pendientes y Sb la desviación estándar de la pendiente; en donde para ninguno de los 3 ensayos se encontró el cero incluido.

Una vez aplicadas todas las herramientas estadísticas para el cálculo de la linealidad, se encontró que los 3 ensayos cumplieron con los parámetros recomendados por la AEFI para determinar la linealidad de un método microbiológico, lo cual indica, que en el rango escogido 0,20 µg/mL a 3,35 µg/mL las respuestas fueron lineales.

#### PRECISIÓN

Se determinó analizando 6 réplicas en una misma placa de la dilución intermedia (0,82 µg/mL) del rango

de concentraciones estudiado, preparada a partir de la misma solución madre. Con los resultados obtenidos se calculó el coeficiente de variación (Tabla II) y la tolerancia, arrojando respectivamente 3,07% y 32,2. Los resultados obtenidos indican, que la precisión cumple con los parámetros establecidos por la AEFI, es decir, el método fue repetitivo.

Tabla II  
Precisión del Método Analítico

Halos de Inhibición (mm)	Log de la concentración µg/mL	Concentración µg/mL	Resultado %
19,8	0,9186	0,8291	101,11
19,8	0,9186	0,8291	101,11
19,6	0,8857	0,7686	93,73
19,7	0,9021	0,7982	97,34
19,8	0,9186	0,8291	101,11
19,7	0,9021	0,7982	97,34
		Promedio	98,62
		S	3,03
		CV	3,07

#### EXACTITUD

Se determinó calculando el porcentaje de recuperación de 3 réplicas para cada una de las siguientes concentraciones 0,20 µg/mL; 0,82 µg/mL y 3,35 µg/mL preparadas a partir de un patrón USP de azitromicina. Con los resultados obtenidos, se determinó el coeficiente de recuperación, la homogeneidad de las varianzas y la prueba de «t de student» (Tabla III). De acuerdo a los resultados obtenidos: el  $G_{exp} < G_{tab}$  lo que indica que las varianzas son homogéneas y la prueba de t de Student arrojó un  $t_{exp} < t_{tab}$ , lo que indica que no hay diferencia entre la recuperación media obtenida y el 100%. Estos datos nos indican que se cumplió con la exactitud para el método, es decir, se detectaron las concentraciones de los extremos sin ningún inconveniente.

Tabla III  
Exactitud del Método Analítico

Criterios de aceptación	Resultados
Coeficiente de recuperación para materias prima 80 - 120%	99%
Homogeneidad de variancias $G_{exp} < G_{3,2,0,05} = 0,8709_{tab}$	$G_{exp} = 0,3532$
t de Student: $t_{exp} < t_{tab} = 2,306$	$t_{exp} = 0,6565$

## SELECTIVIDAD

Se realizó una valoración microbiológica de 6 réplicas para un blanco de la solución madre y el promedio de las lecturas obtenidas fue de 8,47 mm. Se observó que no hubo difusión, no hubo respuesta cuantificable; demostrándose la selectividad del método, ya que sólo se obtuvo respuesta en presencia del antibiótico.

## LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se determinó a partir de las lecturas obtenidas para 6 replicas de un blanco de la solución madre (metanol/buffer fosfato pH 8) en ausencia del antibiótico. Con los resultados obtenidos, se determinó la desviación estándar de las respuestas proporcionadas por el blanco y con la pendiente de la curva de calibración se estimaron ambos parámetros, LD y LC siguiendo la metodología descrita en la guía ICH Q2B. El valor promedio de las respuestas del blanco fue de 8,47 mm y el promedio obtenido a la concentración de 0,2 µg/mL fue de 15,84 mm (menor concentración del rango lineal); lo que indica que realmente hubo un proceso de difusión a esta concentración, ya que el diámetro del halo de inhibición obtenido es muy superior al obtenido por el blanco. Matemáticamente el límite de detección se encontró a una concentración de 0,1264 µg/mL, siendo este valor menor de 0,2 µg/mL la cual es la menor concentración utilizada en la curva de calibración. El valor del límite de cuantificación se encontró que matemáticamente estaba alrededor de 0,3828 µg/mL; sin embargo, experimentalmente se encontró que a un valor de 0,2 µg/mL se contenía una respuesta cuantificable y satisfactoria según los requisitos exigidos en el capítulo <81> de la USP, el cual señala que los mismos deben estar por encima de 14 mm, demostrándose además que las mediciones efectuadas a esta concentración son exactas y precisas, razón por la cual se decidió incluirla dentro del rango de linealidad.

## ROBUSTEZ

El ensayo fue realizado empleando buffer fosfato pH 7 como diluyente en las diluciones de trabajo, para de esta manera demostrar si el método soporta cambios de pH, sin alterar sus respuestas. Tanto la pendiente como el coeficiente de determinación se mantuvieron en el valor estudiado de pH 7, siendo esto indicativo de que la linealidad del método permanece constante. Sin embargo, al comparar los halos de inhibición obtenidos a pH 7 y pH 8 respectivamente, se observaron cambios en dichas respuestas. Las respuestas obtenidas a pH 7 son significativamente menores a los halos de inhibición obtenidos a pH 8 para el mismo nivel de concentración, demostrándose así

la degradación que sufre la azitromicina a este valor de pH 7. Esto permite concluir que el pH de la solución buffer fosfato, es un factor crítico, capaz de causar variaciones en los resultados del método; en este caso los resultados se encontrarán por debajo de los valores reales, lo cual indica que el método desarrollado no es robusto a pH 7.

## Conclusiones y recomendaciones

Los resultados obtenidos en el rango ensayado, indicaron que el método cumple con los parámetros de validación recomendados por la AEFI: linealidad, exactitud, precisión, selectividad y robustez, por lo que se puede señalar que el mismo fue validado satisfactoriamente y puede ser empleado como método alternativo a los métodos oficiales, en el control de calidad de rutina para la determinación de la azitromicina bajo la forma de materia prima, según los parámetros evaluados en este estudio.

Los parámetros de límite de detección y cuantificación no son requisitos exigidos por la AEFI para los métodos microbiológicos utilizados en la determinación de potencia de antibióticos, pero fueron incluidos en este estudio y calculados según la guía ICH Q2B dándole mayor validez al rango escogido en el método propuesto.

Con el presente trabajo se logró un avance en el tema de validación de los métodos microbiológicos cuantitativos en Venezuela, específicamente en el ensayo de difusión en placas de agar aplicado al análisis de antibióticos, sirviendo de guía en el desarrollo y validación de otros métodos microbiológicos, siendo un aporte importante en esta rama de investigación.

Se recomienda emplear el método microbiológico desarrollado no sólo a materias primas, sino a formas farmacéuticas, tales como tabletas, cápsulas y polvo para suspensión. Adicionalmente es necesario realizar mejoras en el sistema de medición de los halos de inhibición, tales como acoples a sistemas computarizados en donde se amplíe la imagen y se pueda realizar una mejor lectura o cambiar el medidor de halos por modelos más actualizados, de manera de obtener hasta dos decimales en cada lectura, facilitando los cálculos y por ende mejorando los resultados estadísticos.

## Agradecimientos

Agradecemos al Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel», en especial a todo el personal del Departamento de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos, al Postgrado de Aseguramiento de la Calidad de la Facultad de Farmacia de la UCV, y a los profesores: Manuel Caetano (Escuela de Química de la Fa-

cultad de Ciencias) y Thaís Fajardo (INHRR) por su valiosa colaboración y ayuda en la realización de este trabajo.

### Referencias bibliográficas

- Antúñez S, Carro A, García A, Niubó C, Olivar M. 2001. Validación de Métodos de Análisis en Microbiología. En: Pérez J y Pujol Martí, coordinadores. Monografías de A.E.F.I. Validación de Métodos Analíticos. Gráficas GISPERT S.A, Girona, p. 190-205.
- Breier A, García C, Oppe T, Steppe M, Schapoval E. 2002. Microbiological Assay for Azithromycin in Pharmaceutical Formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 29: 957-961.
- British Pharmacopoeia. 2009. Monographs. Londres: British Pharmacopoeia Commission Market.
- Clavell L, Pedrique de Aulacio M. 1991. Análisis Microbiológico de Antibióticos. Fondo Editorial Facultad de Farmacia-UCV, Caracas, Venezuela.
- Code of Federal Regulations. Título 21. Parte 436 Test and Methods of Assay Antibiotic and Antibiotic-containing Drugs. Subparte D Microbiological Assay Methods. Washington: FDA; 1997.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. Exactitud (Veracidad y Precisión) de Métodos de Medición y Resultados. Parte 2: Método Básico para la Determinación de Repetibilidad y Reproducibilidad de un Método Estándar de Medición. Venezuela: COVENIN 2972-2: 1997.
- European Pharmacopoeia. Monographs. 5<sup>ta</sup> ed. Vol 2. France: Directorate for Quality of Medicines of the Council of Europe EDQM; 2008.
- González J, Barreto J, Rodríguez M, Pino P, Lim N. 1998. Macrólidos. En: [http://www.informed.sld.cu/revistas/act/vol8\\_1\\_98/act10198.pdf](http://www.informed.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act10198.pdf). Acceso 19 de febrero de 2004.
- Goodman & Gilman. 1996. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Vol. 2. 9<sup>na</sup> ed. Editorial McGRAW-HILL / INTERAMERICANA, México.
- Hewitt W. 2004. Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis a Rational Approach. Interpharm/CRC press LLC, Florida.
- ICH Topic Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonisation. Rockville MD: FDA 1996.
- Turcinov T, Pepeljnjak S. 1998. Azithromycin Potency Determination: Optimal Conditions for Microbiological Diffusion Method Assay. *J Pharm Biomed Anal* 17: 903-910.
- United States Pharmacopoeia. General Information and Biological Test. 29 ed. Rockville: USP; 2009.