

Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina

Validation of the analytical method to quantify the bacitracine

Carolina Velandia-Castellanos^I; Peña-Páez Viviana^{II}; Arias-Palacios Janeth^{III}

^IMicrobióloga Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). Bogotá, Colombia.

^{II}Microbióloga Industrial. Coordinadora Laboratorio Microbiología. Vicar Farmacéutica S.A. Bogotá, Colombia.

^{III}Bacterióloga. Máster en Ciencias. Grupo de Biotecnología Industrial y Ambiental. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Se desarrolló y validó un método analítico para la determinación cuantitativa de bacitracina zinc al 15 % y bacitracina metilen disalicilato al 11 %, por el método de cilindro en placa (difusión en agar), con el fin de ser usado en el control de calidad de las materias primas y productos farmacéuticos. Se evaluaron los parámetros de especificidad, selectividad, linealidad del sistema, y del método, exactitud, límite de cuantificación y precisión. Mediante el diseño experimental y la evaluación estadística de los resultados, se demostró que el método analítico es específico, selectivo, lineal, preciso ($CV < 5\%$) y exacto ($\text{sesgo} < 3\%$, $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$ y $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$) en el intervalo de las concentraciones estudiadas. El límite de cuantificación y de detección fue de 0,02 y 0,005 UI/mL respectivamente. Las características de desempeño analítico cumplen con los requisitos para la aplicación analítica propuesta.

Palabras clave: Bacitracina, control de calidad, difusión en agar, industria farmacéutica, validación microbiológica.

ABSTRACT

An analytical method was developed and validated for quantitative determination of 15 % zinc bacitracine and 11 % disalicylate methylene-bacitracine by the plate-cylinder method (agar diffusion) to be used in quality control of raw products and pharmaceutical products. Specificity, selectivity, system and method linearity, accuracy, quantification and precision parameters were assessed. By the experimental design and the statistic evaluation of results, it was demonstrated that the analytical method is specific, selective, linear, precise ($CV < 5 \%$) and exact ($\text{bias} < 3 \%$, $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}} < t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$) during the study concentrations. The quantification and detection limit was of 0.02 and 0.005 UI/mL, respectively. The analytical performance characteristics fulfill the requirement for the proposal analytical implementation.

Key words: Bacitracin, quality control, agar-diffusion, pharmaceutical industry, microbiological validation.

INTRODUCCION

Se define como método analítico a la adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado. La validación de un método analítico es un procedimiento para establecer por medio de pruebas documentadas, mediante estudios sistemáticos y demostrativos de laboratorio, que el método analítico tiene las características de desempeño (exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad) adecuadas para cumplir con los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.¹ Un método analítico validado permite el conocimiento de las características de funcionamiento, proporciona un alto grado de confianza al aplicarlo, siendo lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto a intervalos definidos.²

La valoración microbiológica de antibióticos por difusión en agar (cilindro placa)¹ es un método analítico que permite bajo las condiciones adecuadas, demostrar la actividad (potencia) de los antibióticos mediante la comparación de la actividad de un producto (problema) y la de una muestra estándar de referencia (patrón), que se difunden en la capa de agar solidificada, inhibiendo el crecimiento de un microorganismo testigo visualizado en una zona de inhibición.³

El producto de prueba, la bacitracina, está compuesta de uno o más polipéptidos antimicrobianos, que inhiben la formación de la pared celular, producido por ciertas cepas de *Bacillus licheniformis* y *B. subtilis* var. Tracy. Según la Farmacopea Europea 2002, la potencia no es inferior a 60 UI/mg, calculándola con respecto a la sustancia seca y según la USP 30 tiene una potencia no inferior a 40 UI/mg.

La bacitracina de zinc es el antibiótico más comúnmente utilizado en afecciones digestivas, por ser activa frente a bacterias grampositivas. Actúa también sobre la cinética de absorción de nutrientes en pollos, pavos, cerdos, conejos, entre otros;⁴ se emplea además como promotor de crecimiento y en el control de infecciones entéricas y superficiales.⁴

La bacitracina metilen disalicilato se ha administrado a pollos de engorde, pavos en crecimiento y en cerdos, sin presentar efectos adversos. En pollos de engorde se usa para la prevención y control de la enteritis necrótica causada por *Clostridium*

perfringens. En pavos se utiliza para el control de la enteritis contagiosa (cresta azul, fiebre del lodo) y en cerdos se administra para el tratamiento de la disentería porcina asociada a *Treponema hyodysenteriae*.⁵

El presente trabajo tiene como objetivo describir el proceso de validación microbiológica del método analítico para la cuantificación de bacitracina, efectuado en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica.

METODOS

La planificación y ejecución de las valoraciones microbiológicas de los antibióticos muestra y la validación de la técnica de cuantificación de bacitracina se realizaron según lo establecido en la USP 30, con respecto a las especificaciones para bacitracina descritos en la técnica de valoraciones microbiológicas de antibióticos³ y en las especificaciones descritas para la realización de la validación de los procedimientos farmacopeicos.²

Para el desarrollo del estudio se empleó el estándar de referencia USP de bacitracina, de lote N1E200 y potencia de 75,1 UI/mg, obtenido de la US Pharmacopeial Convention, Inc. La primera muestra que se utilizó en el análisis fue bacitracina zinc al 15 % como principio activo, de lote 20071102-6 y potencia asignada de 6,06 U/g en base seca y la segunda muestra empleada en el análisis fue bacitracina metileno disalicilato al 11 % como principio activo, de lote LO70701 y potencia asignada de 4,49 U/g en base seca.

Preparación y estandarización de la suspensión del microorganismo de ensayo

Cultivo bacteriano: la cepa de *Micrococcus luteus* liofilizada se obtuvo de las colecciones estandarizadas de la American Type Culture Collection (ATCC 10240). Se reconstituyó el vial liofilizado y a partir de este cultivo de origen se sembró por agotamiento en placas con agar tripticasa soya (TSA) para su recuperación, incubándose por 24 h a 35 ± 2 °C. Se realizaron subcultivos en placas con TSA a partir del cultivo primario para mantener la viabilidad del microorganismo durante la validación.

Preparación de suspensión madre del microorganismo: se preparó una suspensión en 10 mL de solución salina al 0,9 % de *M. luteus*, hasta obtener una turbidez igual al patrón de McFarland al 25 % de transmitancia.

Preparación de placas de valoración

Se prepararon placas de valoración utilizando cajas de petri de 90 x 15 mm a las que se les adicionó 20 mL de medio antibiótico No. 1, el cual se dejó solidificar durante 40 min para formar una capa de agar base lisa. Posteriormente se agregaron 6 mL de inóculo como capa de siembra sobre la superficie de la capa de agar base y se dejó solidificar durante 1 h. Pasado el tiempo se hicieron 6 perforaciones equidistantes entre ellas en cada una de las placas. Estas se rotularon de tal forma que 3 pozos fueran para la concentración del estándar de referencia o patrón (serie de concentración 1,0 UI/mL) y los 3 restantes se rotularon como muestra. Una vez sembradas las placas se incubaron por 18 h a 35 ± 2 °C, para después con la ayuda de un calibrador realizar la lectura del diámetro de las zonas de inhibición.

Validación del método de cuantificación del principio activo

Todos los parámetros y características del desempeño analítico de la validación se evaluaron de manera independiente para cada muestra (bacitracina zinc y bacitracina metileno disalicilato).

Especificidad: se prepararon diluciones de las muestras y del patrón hasta obtener una concentración de 1,0 UI/mL; posteriormente se sembraron 100 µL de estas, el placebo y el diluyente en cajas de valoración por triplicado.

Linealidad del sistema y linealidad del método: se preparó una curva de calibración en un intervalo de concentración desde 0,05 hasta 2,5 UI/mL, que incluyó 10 niveles de concentraciones diferentes (0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 UI/mL) del estándar de bacitracina más el placebo de cada muestra para la linealidad del método y del estándar de referencia USP bacitracina para la linealidad del sistema. El análisis se realizó por triplicado en cada concentración.

Los datos obtenidos de la prueba se analizaron estadísticamente determinando las siguientes especificaciones: ecuación de la recta de regresión, representación gráfica de la recta de regresión, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y análisis de variancia.

Selectividad: para verificar la selectividad del método analítico se prepararon muestras al 100 % del patrón y de las muestras, con el fin de detectar posibles interferencias generadas por metabolitos de degradación, por lo cual se sometieron a las siguientes condiciones:

Acidez: 5 mL de HCl 1 N en baño termostático por 1 h a 90 °C, pasado el tiempo la solución se neutralizó con NaOH 1 N.

Basicidad: 5 L de NaOH 1 N en baño termostático por 1 h a 90 °C, la solución se neutralizó con HCl 1 N.

Fotólisis por UV: luz solar por 8 días.

Termólisis: en baño termostático a 90 °C por 1 h.

Una vez realizado el tratamiento de cada una de las muestras en cada una de las condiciones de estrés, estas se llevaron a una concentración de 1,0 UI/mL utilizando solución amortiguadora No. 1, al 1 % y pH 6, para determinarles el porcentaje de degradación. Se prepararon 3 réplicas independientes para el patrón y las muestras.

Precisión del método: la precisión del método se evaluó por medio de la repetitividad y la reproducibilidad. En el caso de la repetitividad, el estudio se realizó por triplicado para cada muestra a una concentración de 1,0 UI/mL. La valoración al igual que las diluciones se prepararon y analizaron por un mismo analista, en el mismo día. Y en el caso de la reproducibilidad, el estudio se realizó por triplicado para cada muestra a una concentración de 1,0 UI/mL. La valoración y las diluciones, se prepararon por 2 analistas, en 2 días diferentes.

Se analizaron estadísticamente los resultados determinando las siguientes especificaciones: media, desviación estándar, coeficiente de variación, intervalo de confianza y los límites de confianza de la media.

Precisión del sistema: el estudio se realizó con 10 réplicas, a una concentración de 1,0 UI/mL del patrón. La valoración y las diluciones, se prepararon y analizaron por un mismo analista, en el mismo día. Se realizó el mismo análisis estadístico de la precisión del método.

Exactitud: para establecer la exactitud del método analítico, se prepararon soluciones de cada muestra más placebo a concentraciones de 80, 100 y 120 %; para cada nivel de concentración se prepararon 3 réplicas independientes. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente determinando las siguientes especificaciones: porcentaje de recuperación, homogeneidad de variancias (prueba de Cochran), determinación del sesgo y prueba de la t de Student.

Límite de detección: se prepararon diluciones del patrón en un intervalo de concentraciones de 0,005; 0,01; 0,015 y 0,025 UI/mL. Cada concentración se realizó por triplicado para su valoración. La concentración en la cual no se observó halo de inhibición, correspondió al límite de detección.

Límite de cuantificación: se preparó una dilución que representó 3 ± 4 veces el límite de detección. Se estableció como concentración de trabajo 0,02 UI/mL, preparando 6 replicas independientes a esta concentración para ser valoradas. Con los datos obtenidos se estableció el límite mínimo del analito que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables.

RESULTADOS

Validación del método de cuantificación del principio activo

Especificidad: en el ensayo de especificidad se observó que el procedimiento no resulta afectado por la presencia del diluyente o excipientes, ya que las placas de valoración sembradas con placebo y diluyente no presentaron formación de halo al cuantificar el principio activo.⁶

Linealidad del sistema y linealidad del método: la curva de calibración realizada para cada una de las muestras de bacitracina y del patrón, ejecutada entre el logaritmo de la concentración en la variable dependiente (Y) y el diámetro del halo (mm) en la variable independiente (X), resultaron ser lineales en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 0,05 y 2,55 UI/mL (tabla 1).

Tabla 1. Resultados del estudio de linealidad del sistema y la linealidad del método para cada una de las bacitracinas

Determinación	Linealidad del sistema	Linealidad método bacitracina zinc	Linealidad método bacitracina metilen disalicilato
Coefficiente de correlación (r)	0,996	0,997	0,98
Coefficiente de determinación (r ²)	0,993	0,995	0,96
Ecuación de la recta	y = 0,127843x - 3,13256	Y = 0,168504x - 4,19447	Y = 0,187593 - 4,52561

Selectividad: a partir de los datos que se muestran en las tablas 2 y 3 se observó un alto porcentaje de degradación al someter las muestras a condiciones ácidas y básicas. Los porcentajes de degradación fueron menores al exponer las muestras a condiciones de estrés de radiación con luz solar y altas temperaturas, pero aun así presentaron degradación significativa.

Tabla 2. Resultados del estudio de la selectividad del método para bacitracina zinc

Condiciones ácidas	Muestra	% de degradación	Temperatura 90 °C	Muestra	% de degradación
M1	Estándar	99,9	M1	Estándar	22,1
M2	Muestra	100	M2	Muestra	75,5
M3	Pacebo	-	M3	Pacebo	-
Condiciones básicas	Muestra	% de degradación	Temperatura 90 °C	Muestra	% de degradación
MI	Estándar	99,9	M1	Estándar	18,4
M2	Muestra	100	M2	Muestra	82,6
M3	Placebo	-	M3	Pacebo	-

(-) No se detectó halo de inhibición.

Tabla 3. Resultados del estudio de la selectividad del método para bacitracina metilen disalicilato

Condiciones ácidas	Muestra	% de degradación	Temperatura 90 °C	Muestra	% de degradación
M1	Estándar	99,9	M1	Estándar	22,1
M2	Muestra	100	M2	Muestra	73
M3	Pacebo	-	M3	Pacebo	-
Condiciones básicas	Muestra	% de degradación	Radiación ultravioleta	Muestra	% de degradación
MI	Estándar	99,9	M1	Estándar	18,4
M2	Muestra	100	M2	Muestra	76,6
M3	Placebo	-	M3	Pacebo	-

(-) No se detectó halo de inhibición.

Precisión del método y precisión del sistema: en las tablas 4 y 5 se exponen los resultados correspondientes al estudio de la precisión del método. El porcentaje promedio de recuperación de todo el sistema fue de 107,11 % con una desviación estándar de 1,93.

Tabla 4. Resultados del estudio de precisión de bacitracina zinc

Analista	Día 1 Repetibilidad	Día 2 Repetibilidad	Reproducibilidad
Analista 1	107,6 %	101,70 %	Xmedia 105,9 S 2,88 CV 2,72 %
	106,0 %	99,80 %	
	107,7 %	103,40 %	
	Xmedia 107,1	Xmedia 101,6	
	S 0,97	S 1,79	
	CV 0,91 %	CV 1,76 %	
Analista 2	105,1 %	109,30 %	
	108,8 %	106,50 %	
	107,1 %	107,40%	
	Xmedia 107,0	Xmedia 107,7	
	S 1,85	S 1,41	
	CV 1,73 %	CV 1,30 %	

Tabla 5. Resultados del estudio de precisión de bacitracina metilen disalicilato

Analista	Día 1 Repetibilidad	Día 2 Repetibilidad	Reproducibilidad
Analista 1	106,2 %	107,60 %	Xmedia 106,4 S 2,72 CV 2,56 %
	105,9 %	108,00 %	
	104,9 %	108,20 %	
	Xmedia 105,7	Xmedia 107,9	
	S 0,72	S 0,28	
	CV 0,68 %	CV 2,26 %	
Analista 2	106,9 %	101,80 %	
	109,3 %	101,10 %	
	109,9 %	107,50%	
	Xmedia 108,07	Xmedia 103,5	
	S 1,63	S 3,54	
	CV 1,50%	CV 3,42 %	

Exactitud: los porcentajes de recuperación para los niveles de concentración estudiados, en la concentración de 80, 100 y 120 se encontraron para bacitracina zinc, valores promedio de 100,7; 111 y 91,4 y para bacitracina disalicilato entre el 91 y el 106 %. Al aplicar la prueba de Cochran para la homogeneidad de varianzas, se obtuvo para un valor de G_{tab} de $G_{(3-2-0,05)} = 0,8709$, un valor de $G_{exp} = 0,682$ para bacitracina zinc y $G_{exp} = 0,790$ para bacitracina metilen disalicilato. Al aplicar la prueba de la t de Student se obtuvo un valor de $t_{tab} = 2,306$ para $p = 0,05/2$ y $v = 8$, un valor de $t_{exp} = 1,208$ para bacitracina metilen disalicilato y un valor $t_{exp} = 0,39$ para bacitracina zinc. En la determinación del sesgo se obtuvo un valor de $e\% = 1,24$ para bacitracina zinc y $e\% = 2,2$ para bacitracina metielen disalicilato.

Limite de detección: el límite de detección se encuentra a partir de 0,010 UI/mL, concentración en la cual se observaron halos de inhibición. Para las diferentes concentraciones 0,010 UI/mL se halló un halo de 12,46 mm, para la de 0,015 UI/mL un halo de 15,99 mm y para la de 0,025 UI/ mL 17,613. Con la primera concentración de 0,005 UI/mL no se detectó halo de inhibición.

Límite de cuantificación: los valores encontrados determinaron una media de 17,51 mm para el diámetro de los halos de inhibición, con una desviación estándar de 0,22 entre los datos.

DISCUSION

En el estudio de la linealidad del sistema y la linealidad del método, los coeficientes de correlación obtenidos fueron muy cercanos a la unidad existiendo una correlación positiva (tabla 1). El índice indica que existe una dependencia entre las 2 variables, denominada relación directa: cuando el halo tiene un mayor diámetro (mm) la concentración (UI/mL) del principio activo es mayor, existiendo una relación directamente proporcional.⁷ El criterio de aceptación para este método analítico es un coeficiente de correlación $\leq 0,95$ y por los datos obtenidos las linealidades se consideran válidas. A partir de la evaluación de las pendientes obtenidas en cada una de las rectas de regresión, se puede decir que el método con un mayor valor en su pendiente es más sensible, es decir que mayor es la respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito.¹

Los resultados del estudio de selectividad (tablas 2 y 3) determinaron que el principio activo es susceptible a la degradación cuando se somete o se encuentra expuesto a radiación UV y a temperaturas iguales o mayores que 90 °C durante un periodo. Estas condiciones resultan siendo un interferente que se debe tener en cuenta a la hora de su fabricación, almacenamiento y al realizarle los análisis de calidad (prueba de potencia). De igual forma se observó cómo la molécula al ser expuesta a condiciones ácidas y básicas presenta degradación, lo que coincide con la información obtenida en cuanto a la estabilidad de la bacitracina, determinando que esta es rápidamente inactivada en soluciones que tienen un pH mayor que 9 y menores que 4.⁸ Para la correcta cuantificación del analito de interés se requiere la ausencia de interferencias de compuestos de degradación ácidos o básicos que puedan estar presentes en la muestra, en su preparación, condiciones instrumentales y/o en el material de trabajo.

En la precisión del método (tablas 4 y 5) los coeficientes de variación para la repetitividad y para la reproducibilidad no fueron mayores que 5 %, lo cual muestra que el método cumple con los parámetros establecidos, siendo el ensayo repetitivo y reproducible por ambos analistas, y reproducible en distintos días por un mismo analista. De la misma forma el coeficiente de variación obtenido en la precisión del sistema fue menor que 5 %, encontrándose dentro del criterio de aceptación establecido.

En el estudio de la exactitud, al ser $G_{exp} < G_{tab}$ permitió verificar que las varianzas de las 3 concentraciones utilizadas son equivalentes y homogéneas, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Al aplicar la prueba de la t de Student, se comprobó que no existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 % de recuperación de acuerdo con los resultados obtenidos. Los valores obtenidos del sesgo o error determinado fueron menores que 3 %, considerado este el criterio de aceptación. A partir de los estadísticos determinados se muestra que la exactitud del método cumple con los parámetros establecidos: concentraciones extremas de problema se detectan como tales.

A partir del análisis cualitativo se determinó el límite de detección en la concentración de 0,005 UI/mL de bacitracina; en esta concentración no se detectó la formación de halo. El límite de detección se refiere a la cantidad mínima de bacitracina en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse en las condiciones experimentales indicadas.³

A partir del análisis cuantitativo se determinó el límite de cuantificación en la concentración de 0,02 UI/mL de bacitracina; en esta concentración se detectó y cuantificó la formación de halo de inhibición. La concentración mínima de bacitracina, que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables en condiciones experimentales indicadas es de 0,02 UI/mL.

En conclusión, el método tiene la capacidad de diferenciar de manera precisa y específicamente el principio activo de bacitracina zinc y bacitracina metileno disalicilato, en presencia de los demás componentes y/o sustancias químicas como lo son el diluyente utilizado y el placebo, con un límite de cuantificación de 0,02 UI/mL y de detección de 0,005 UI/mL. A su vez mediante el diseño experimental y la evaluación estadística de los resultados, se demostró que el método analítico es específico, selectivo, lineal, preciso y exacto en el intervalo de las concentraciones estudiadas. Por lo tanto, el método analítico cumple con los requisitos para la valoración microbiológica de antibióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de métodos analíticos. Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad. Barcelona: Edición Hewlett Packard; 2001
2. United States Pharmacopoeial Convention. USP 30. Validación de procedimientos farmacopeicos. 30 ed. Rockville: Mack Printing; 2007. p. 749.
3. United States Pharmacopoeia Convention. USP 30. Antibióticos. Valoraciones microbiológicas. 30 ed. Rockville: Mack Printing; 2007. p. 81-111.
4. Abecia L, Balcells J, Fondevila M, Belenguer A, Calleja L. Efecto de La terapia con antibióticos en pienso sobre la actividad fermentativa cecal en conejos. Anim Res. 2004;54:307-14.
5. Bacitracina Metileno Disalicilato Soluble grado veterinario. Animal Health Division. Alpharma Inc. Fort Lee, NJ 07024, USA. 2007. Available from: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=34881>
6. WHO. Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Report 32. WHO Technical Report Series No 823. Geneva. 1992. Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_908.pdf
7. Reyes Agüero C. Procedimiento para la validación de métodos analíticos CODIGO PR-IIT-143. Ciudad Juárez: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez; 2007.

8. McEvoy GK (ed.). American Hospital Formulary Service. Drug Information 93. Bethesda, MD: American Society of Hospital Pharmacists, Inc., 1993. p. 326.

Recibido: 30 de noviembre de 2010.

Aprobado: 9 de enero de 2011.

Carolina Velandia-Castellanos. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). Carrera 7^a # 43-82. Edificio (51) Carlos Ortiz, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: jdcarias@javeriana.edu.co