



Universidad  
**Norbert Wiener**

Powered by **Arizona State University**

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

**Tesis**

Validación del ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario al 0,25% para limpieza de superficies, basado en la Farmacopea Americana vigente.

Lima 2023

**Para optar el Título Profesional de**  
**Químico Farmacéutico**

**Presentado por:**

**Autor:** Reyes Villalobos, Daniel Rafael

**Código ORCID:** <https://orcid.org/0009-0009-7038-1471>

**Asesor:** Dr. Collanque Pinto, Jesús Daniel

**Código ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2855-1632>

**Lima – Perú**

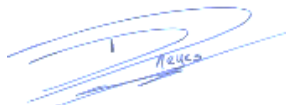
**2024**

 Universidad Norbert Wiener	<b>DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN</b>		
	<b>CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033</b>	<b>VERSIÓN: 01</b> REVISIÓN: 01	<b>FECHA: 08/11/2022</b>

Yo, Daniel Rafael Reyes Villalobos egresado de la Facultad Farmacia y Bioquímica y Escuela Académica Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo de investigación "Validación del ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario al 0,25% para limpieza de superficies, basado en la Farmacopea Americana vigente. Lima 2023." Asesorado por el docente: Collanque Pinto, Jesús Daniel DNI 09401989 ORCID 0000-0003-2855-1632 tiene un índice de similitud de 12 % con código oid:14912:342713617 verificable en el reporte de originalidad del software Turnitin.

Así mismo:

1. Se ha mencionado todas las fuentes utilizadas, identificando correctamente las citas textuales o paráfrasis provenientes de otras fuentes.
2. No he utilizado ninguna otra fuente distinta de aquella señalada en el trabajo.
3. Se autoriza que el trabajo puede ser revisado en búsqueda de plagios.
4. El porcentaje señalado es el mismo que arrojó al momento de indexar, grabar o hacer el depósito en el turnitin de la universidad y,
5. Asumimos la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión en la información aportada, por lo cual nos sometemos a lo dispuesto en las normas del reglamento vigente de la universidad.



.....  
 Autor: Daniel Rafael Reyes Villalobos

DNI: 43443829



.....  
 Asesor: Collanque Pinto, Jesús Daniel

DNI: 09401989

Lima, 09 de Octubre del 2024



Tesis

“Validación del ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario al 0,25% para limpieza de superficies, basado en la Farmacopea Americana vigente. Lima 2023.”

Línea de investigación

Salud y Bienestar

Asesor:

Dr. COLLANQUE PINTO, JESÚS DANIEL

Código ORCID: 0000-0003-2855-1632

## **DEDICATORIA**

A mi madre Elizabeth Elena por creer siempre en mí y ser mi apoyo cuando más lo necesito.

Al equipo de trabajo de Microbiología y la Dra. Rosario Chocano.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecer a Dios por disfrutar del milagro de la vida, al Dr. Jesús Daniel Collanque Pinto por su valioso tiempo en guiarme en la elaboración de este trabajo de investigación, a su vez a los Dres. Federico Martin Malpartida Quispe y Pedro Iván Sáenz por la enseñanza de calidad.

## Índice general

	Pág.
Portada	i
Título	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
Índice general	v
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	xiii
<b>CAPÍTULO I: EL PROBLEMA</b>	<b>1</b>
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Formulación del problema	3
1.2.1. Problema general	3
1.2.2. Problemas específicos	3
1.3. Objetivos de la investigación	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Justificación de la investigación	5
1.4.1 Teórica	5

1.4.2 Metodológica	5
1.4.3 Practica	5
1.5 Limitaciones de la investigación	6
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b>	7
2.1. Antecedentes de la investigación	7
2.2. Bases teóricas	13
2.3. Formulación de Hipótesis	24
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b>	25
3.1. Método de investigación	25
3.2. Enfoque de la investigación	25
3.3. Tipo de investigación	25
3.4. Diseño de la investigación	26
3.5. Población, muestra y muestreo	26
3.6. Variables y operacionalización	27
3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	28
3.7.1 Técnica	28
3.7.2 Descripción de instrumentos	42
3.7.3 Validación	43
3.7.4 Confiabilidad	43
3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos	43
3.9. Aspectos éticos	47

<b>CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b>	48
4.1. Resultados	48
4.1.1. Análisis descriptivo de los resultados	48
4.1.2. Prueba de hipótesis	69
4.1.3. Discusión de los resultados	69
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	72
5.1. Conclusiones	73
5.2. Recomendaciones	74
<b>Referencias</b>	74
<b>Anexos</b>	83
<b>Anexo 1.</b> Matriz de consistencia	83
<b>Anexo 2.</b> Instrumento de recolección de datos	84
<b>Anexo 3.</b> Certificado de validez de contenido del instrumento	89
<b>Anexo 4.</b> Confiabilidad del instrumento	98
<b>Anexo 5.</b> Aprobación del comité de ética	98
<b>Anexo 6.</b> Carta de aprobación de la institución para recolección de datos	99
<b>Anexo 7.</b> Testimonios Fotográficos	100
<b>Anexo 8.</b> Informe de asesor de Turnitin	102
<b>Anexo 9.</b> Materiales y equipos de ensayo	103
<b>Anexo 10.</b> Flujograma del Proceso de Validación	105

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Preparación y uso Microorganismos de Prueba	18
<b>Tabla 2:</b> Agentes Neutralizantes comunes/ Métodos para Sustancias de Interferencia	21
<b>Tabla 3:</b> Propiedades Indicadoras de Promoción de Crecimiento e Inhibitorias de los medios de cultivo	32
<b>Tabla 4:</b> Criterios de Aceptación de Prueba de Promoción de Crecimiento y Propiedades Indicadoras e inhibitorias de los medios de cultivo	45
<b>Tabla 5:</b> Criterios de aceptación de la Prueba de Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos Específicos	46
<b>Tabla 6:</b> Procesamiento de Parámetros Estadísticos	47
<b>Tabla 7.</b> Estandarización de cepas de prueba	48
<b>Tabla 8.</b> Suspensión de trabajo	49
<b>Tabla 9.</b> Recuperación de microorganismos en medios de cultivo	50
<b>Tabla 10.</b> Propiedades Indicadoras de Promoción de crecimiento e Inhibición de los medios de cultivo	51
<b>Tabla 11.</b> Recuperación de Microorganismos en presencia del producto /Ensayo 1	52
<b>Tabla 12.</b> Recuperación de Microorganismos en presencia del producto/ Ensayo 2	53
<b>Tabla 13.</b> Recuperación de Microorganismos en presencia del producto/ Ensayo 3	54
<b>Tabla 14.</b> Recuperación de microorganismos específicos	55
<b>Tabla 15.</b> Recuperación de microorganismos específicos en medios selectivos <i>/Pseudomonas aeruginosa</i>	55

<b>Tabla 16.</b> Recuperación de microorganismos específicos en medios selectivos/ <i>Staphylococcus aureus</i>	56
<b>Tabla 17.</b> Comparación de la Eficacia neutralizante en el grupo de Prueba A ( $10^{-1}$ ) en referencia al grupo Control (B)	57
<b>Tabla 18.</b> Comparación de la Eficacia neutralizante en el grupo de Prueba A ( $10^{-2}$ ) en referencia al grupo Control (B)	58
<b>Tabla 19.</b> Comparación de la Toxicidad del Neutralizante en el Grupo Control (B) en referencia al grupo Viabilidad (C)	59
<b>Tabla 20.</b> Prueba de equivalencia de dos muestras: Grupo de prueba (A) Dilución $10^{-1}$ / Grupo Control (B)	60
<b>Tabla 21.</b> Prueba de equivalencia de dos muestras: Grupo de prueba (A) Dilución $10^{-2}$ /Grupo Control (B)	61
<b>Tabla 22.</b> Prueba de equivalencia de dos muestras: Grupo Control (B)/ Grupo Viabilidad (C)	62
<b>Tabla 23.</b> Resultados de Coeficiente de Variación en los Grupos de tratamiento	63
<b>Tabla 24.</b> Comparación entre el grupo de Prueba (A) Dilución $10^{-2}$ / Grupo Control (B)	64
<b>Tabla 25.</b> Límite de Detección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65
<b>Tabla 26.</b> Límite de Detección de <i>Staphylococcus aureus</i>	66
<b>Tabla 27.</b> Estadística de muestras emparejadas en grupo de tratamiento	67

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Esquema de estandarización de cepas de Prueba	30
<b>Figura 2.</b> Esquema de Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos Específicos	38
<b>Figura 3.</b> Esquema del Límite de Detección	40
<b>Figura 4.</b> Esquema de Validación del Método de Neutralización	42

## Resumen

La presente investigación tuvo como **Objetivo:** Validar la Técnica analítica de Recuento Microbiano, mediante la dilución - neutralización del Amonio Cuaternario al 0,25 %, utilizando como **Método** de vertido en placa para la recuperación de microorganismos de prueba, para el desarrollo de los parámetros estadísticos se utilizó los Softwares SPSS y Minitab. Los **Resultados** obtuvieron recuentos menores a 100 UFC para las Cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus Subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, la prueba de Aptitud recuperó todos los microorganismos de prueba en la dilución  $10^{-2}$  y presentó crecimiento e identificación de microorganismos específicos. La Validación del método de neutralización evidenció eficacia adecuada del neutralizante en la dilución  $10^{-2}$  y a su vez se demuestra la ausencia de toxicidad del neutralizante. La Exactitud de los porcentajes de recuperación se encuentran dentro del intervalo de confianza del 90%, la Precisión del ensayo se encuentra  $< 15$  % del coeficiente de variación, a su vez se demuestra que los neutralizantes utilizados son específicos para inhibir las propiedades antimicrobianas del Amonio Cuaternario. El Límite de detección recuperó *Pseudomonas aeruginosa*  $> 11$  UFC y *Staphylococcus aureus*  $> 17$  UFC la robustez demuestra que no existe variabilidad significativa en los recuentos, en distintos tiempos de incubación **Concluyendo** que el método de dilución – Neutralización con Lecitina de soya 0,5% y Polisorbato 80 4%, permitió la recuperación de los microorganismos de prueba en la dilución  $10^{-2}$ .

**Palabras clave.** Validación, Dilución - Neutralización, Recuento Microbiano.

### **Abstract**

The objective of this research was: To validate the analytical technique of Microbial Counting, through the dilution - neutralization off Quaternary Ammonium at 0.25%, using the method of pouring onto a plate for the recovery of test microorganisms, for the development of the parameters. SPSS and Minitab software were used for statistics. The Results obtained counts less than 100 CFU for the Strains *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus Subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, the Aptitude test recovered all the test microorganisms in the  $10^{-2}$  dilution and presented growth and identification of specific microorganisms. The Validation of the neutralization method showed adequate efficacy of the neutralizer at the  $10^{-2}$  dilution and in turn demonstrated the absence of toxicity of the neutralizer. The accuracy of the recovery percentages is within the 90% confidence interval, the Precision of the test is  $< 15\%$  of the coefficient of variation, in turn it is demonstrated that the neutralizers used are specific to inhibit the antimicrobial properties of Ammonium. Quaternary. The Detection Limit recovered *Pseudomonas aeruginosa*  $> 11$  CFU and *Staphylococcus aureus*  $> 17$  CFU. The Robustness demonstrates that there is no significant variability in the counts, at different incubation times. Concluding that the dilution method – Neutralization with 0.5% soy Lecithin and Polysorbate 80 4% allowed the recovery of the test microorganisms in the  $10^{-2}$  dilution.

**Keywords.** Validation, Dilution - Neutralization, Microbial Count.

## INTRODUCCION

La validación de métodos microbiológicos es de gran importancia, ya que asegura que la técnica analítica a implementar para el análisis microbiológico de dispositivos médicos a base de solución de Amonio Cuaternario al 0,25 % garantice que la calidad microbiológica que presente el producto se encuentre dentro de los límites establecidos por el laboratorio y a su vez cumpla con los lineamientos de las entidades regulatorias.

En el capítulo I se plantean y formula el problema general y específicos, y se exponen el objetivo general y específicos, a su vez se plantea la justificación teórica, metodológica y práctica. En el capítulo II se presentan los antecedentes nacionales e internacionales de validación microbiológica, y el contenido de las teorías de la investigación. En el capítulo III muestra el tipo, el enfoque, y el diseño de esta investigación; se presenta la matriz con las variables y operacionalización, a su vez se plantea la técnica e instrumentos de recolección de datos, los aspectos éticos donde se protege la confidencialidad del producto y su formulación. En el capítulo IV, se exponen los resultados y la discusión a partir del desarrollo de los objetivos específicos. En el capítulo V se presentan las conclusiones y recomendaciones con respecto a esta investigación.

## **CAPÍTULO I: EL PROBLEMA**

### **1.1. Planteamiento del problema**

Desde la década de los años 50 del siglo pasado, se reportó la aparición de las primeras cepas bacterianas capaces de adquirir resistencia a biocidas, demostrando la capacidad de los microorganismos de realizar mutaciones para resistir a estos compuestos (1); ocasionando que reduzca su acción para el cual fue elaborado y por lo tanto estos microorganismos puedan generar infecciones (2).

La presencia de Amonio Cuaternario para limpieza de superficies presenta actividad bactericida para la recuperación de microorganismos de prueba. La Farmacopea Americana (USP NF 2023) menciona los neutralizantes para inhibir esta acción, pero no la concentración a utilizar, el cual un neutralizante en estudio requiere ser validado, para demostrar la eficacia del método de recuperación de la carga microbiana que podría presentar el producto (3).

El ensayo microbiológico de Dispositivos Médicos no se encuentra descritos en las Farmacopeas u otras referencias reconocidas, por lo cual se deben establecer parámetros de validación y los resultados deben evaluarse con métodos estadísticos apropiados, basados y descritos en las Farmacopeas (4).

En la “Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios” (Ley N° 29459) establece las pautas para la elaboración, en el cual la inspección de plantas de fabricación de laboratorios es asumida por la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID) para el cumplimiento de su certificación, mediante las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) (5), a su vez siguiendo los lineamientos de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) (6).

Actualmente la validación de métodos microbiológicos para Dispositivos Médicos no se encuentra normados por DIGEMID y el Centro Nacional de Control de Calidad (CNCC); el cual cada laboratorio valida e implementa la metodología de los productos que requieran ser validados. La norma de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) menciona que los métodos analíticos deben ser validados para su uso previsto, verificando inicialmente si el producto terminado que se analiza por primera vez presenta interferencias a partir de los excipientes o el principio activo (7).

El laboratorio elabora soluciones de Amonio Cuaternario al 0,25%, por la acción bactericida que presenta, es necesario que se implemente un esquema de neutralización para la recuperación de microorganismos de prueba, y se determine los parámetros de validación teniendo como referencia la Farmacopea Americana, en el cual presentan pautas para el desarrollo de los parámetros de validación mediante la interpretación de los datos, criterios de aceptación y el desarrollo de métodos estadísticos (8).

Productos con potencial antibacteriano no son exentos de contaminación microbiológica, en ocasiones se han reportado casos de detección de microorganismos fuera

de sus especificaciones, lo cual la entidad reguladora DIGEMID tiene la facultad de alertar, retirar y posteriormente ordenar su destrucción (9).

Es necesario determinar y validar un método de neutralización para la solución de Amonio Cuaternario al 0,25% para lograr recuperar los microorganismos que podrían encontrarse en las muestras. La importancia de desarrollar este ensayo es garantizar la calidad de este Dispositivo Médico (10).

## **1.2. Formulación del problema**

### **1.2.1. Problema General**

¿Será posible validar el ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario al 0,25 % para limpieza de superficies, basado en la Farmacopea Americana Vigente. Lima 2023?

### **1.2.2. Problemas Específicos**

- a.- ¿Cómo se estandariza las cepas de referencia basado en la Farmacopea Americana?
- b.- ¿Cómo se verifica la prueba de Promoción de Crecimiento de los Medios de Cultivo basado en la Farmacopea Americana?
- c.- ¿Cómo se realiza el procedimiento de Aptitud del Método en presencia del producto basado en la Farmacopea Americana?
- d.- ¿Cuál será la Validación del método de neutralización más adecuado para neutralizar las propiedades antimicrobianas basado en la Farmacopea Americana?

e.- ¿Cuáles son los Parámetros de Validación del ensayo microbiológico basado en la Farmacopea Americana?

### **1.3. Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Determinar la validez del ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario al 0,25% para limpieza de superficies, basado en la Farmacopea Americana Vigente. Lima 2023.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- a.- Estandarizar las cepas de referencia basado en la Farmacopea Americana.
- b.- Realizar la prueba de Promoción de Crecimiento de los Medios de Cultivo basados en la Farmacopea Americana.
- c.- Determinar la Aptitud del Método en presencia del producto basado en la Farmacopea Americana.
- d.- Determinar la Validación del Método de Neutralización más adecuado para neutralizar las propiedades antimicrobianas basado en la Farmacopea Americana.
- e.- Determinar los Parámetros de Validación del ensayo microbiológico basado en la Farmacopea Americana.

## **1.4. Justificación de la investigación**

### **1.4.1. Teórica**

Implementar una metodología para la validación teniendo como referencia la Farmacopea Americana, ya que actualmente no existe normativa para la validación del ensayo microbiológico de Dispositivos Médicos.

La Validación del ensayo microbiológico sirve para demostrar que el método de análisis a emplear para el recuento Total de Microorganismos Aerobios Mesófilos (RTMA), Recuento total de Hongos y Levaduras (RTHL) y Microorganismos Específicos sean de confiabilidad, evitando obtener falsos resultados negativos o falsos resultados positivos.

### **1.4.2. Metodológica**

Esta investigación servirá de referencia para la elaboración de protocolos de Validación en futuras investigaciones que se realizarán a Dispositivos Médicos no invasivos, que presenten Amonio Cuaternario en su composición.

### **1.4.3. Práctica**

La presente investigación tiene como finalidad dar validez e implementar la técnica analítica del Recuento total de Microorganismos Aerobios Mesófilos, Recuento Total de Hongos y Levaduras y la recuperación de Microorganismos Específicos, para dar confiabilidad al ensayo microbiológico del Dispositivo Médico.

### **1.5. Limitaciones de la investigación**

Se realizó una búsqueda exhaustiva de información, encontrándose escasas investigaciones de validación relacionados a la Validación de Amonio Cuaternario. Para resolver esta investigación se utilizó como material de referencia validaciones de productos farmacéuticos y la Farmacopea Americana NF 2023.

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Antecedentes de la investigación**

#### **ANTECEDENTES INTERNACIONALES**

Araujo et al. (11). En el año 2011. En este artículo tuvo como objetivo realizar la validación de la neutralización del conservante y del método para el conteo microbiano. De acuerdo con la USP 30 y el informe técnico número 33 de la Asociación de Medicamentos Parenterales (PDA). Se utilizaron microorganismos ATCC Gram positivos y Gram negativos, Levaduras la mayoría y medios de cultivo Agar Trypticase de Soya y Agar Sabouraud Dextrosa. El método utilizado mediante neutralización con 0,4% Polisorbato 80 y 0,5% de Lecitina de Soja. Obteniendo resultados de recuperación en el grupo de prueba entre 90,95% y 99,72% para la suspensión oral de Mebendazol de 20 mg/mL. La no toxicidad de los neutralizadores fue confirmada por la recuperación en el grupo peptona en un porcentaje de 93,53% y 103,82%. En la distribución homogénea se obtiene un 95% de confianza en la precisión, mientras que la prueba t de Student no reveló diferencias entre las pruebas y peptona. La linealidad del método en relación proporcional en UFC en los 3 grupos de análisis y sus volúmenes tomados (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 y 1,2 ml) los valores de coeficiente de

correlación ( $R^2$ ) oscilaron entre 0,9694 y 0,9932 para la suspensión de Mebendazol, estos valores cumplen lo establecido por la USP 30 que determina ( $R^2 > 0,95$ ). No se encontró correlación estadísticamente significativa de los cocientes lineales para los tres grupos de análisis ( $p \leq 0,05$ ). La robustez mediante el cambio de temperatura, concentración de Polisorbato de sodio 80 y medios de cultivo, los resultados de recuento microbiano no fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos en condiciones definidas. Concluyéndose que el método de recuento microbiano validado demostró ser exacto, preciso, sólido y lineal, y puede utilizarse de forma segura en operaciones rutinarias.

Arias et al. (12). En el año 2013 tuvieron como Objetivo: la validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado con parabenos, según la Farmacopea Americana edición 34, 2011. Utilizando como Método cuantitativo para recuento de microorganismos Mesófilos Aerobios, Hongos y Levaduras. Obteniendo resultados de exactitud con una recuperación superiores al 70 % tanto en presencia y ausencia de la muestra. Se obtuvo resultados de Precisión con Coeficientes de Variación menores a 35 % para todos los microorganismos de acuerdo con las especificaciones de la USP. La Precisión Intermedia entre analistas demostró Coeficientes de Variación máximos de 12,2 %. La evaluación de la Robustez tuvo una diferencia 12 UFC para microorganismos Mesófilos, entre distintos medios de cultivo y tiempos de incubación. En el parámetro de linealidad se obtienen regresiones lineales cercanos al valor teórico. Para el Límite Detección se demostró la recuperación de microorganismos Mesófilos en la dilución  $10^{-7}$  en referencia al inóculo inicial después de incubarse por 24 horas, para luego determinar

la Especificidad con la presencia de los microorganismos. Concluyendo que la metodología mediante la neutralización con Polisorbato tiene la capacidad de brindar resultados confiables para la calidad microbiológica del producto.

García et al. (13). En el año 2017 en su investigación, tuvieron como objetivo validar el esquema de neutralización por medio del aumento en el volumen de diluyente e incorporando un agente neutralizante, para eliminar la actividad antimicrobiana según la Aptitud del Método Farmacopeico (USP 39), usando como Método de vertido en placa, utilizando protocolo de validación con procedimientos basados en la Farmacopea oficial. Se analizaron los datos obtenidos con parámetros establecidos. Obteniendo resultados, el cual logró encontrar un esquema de neutralización adecuado para el Recuento Total de Hongos y Levaduras, realizando una dilución  $10^{-1}$  para las Cepas *Aspergillus Brasiliensis* ATCC 16404 y *Candida albicans* ATCC 10231, neutralizando con Lecitina al 0,7 % las matrices de Amoxicilina cápsulas y Trimetoprim Sulfametoxazol suspensión. Los resultados de recuperación para Amoxicilina capsulas tuvo un porcentaje de recuperación para la cepa *Candida albicans* de 100,63 % y para *Aspergillus Brasiliensis* obtuvo 106,47%. Los resultados de recuperación para Trimetoprim Sulfametoxazol tuvo un porcentaje de recuperación de *Candida albicans* de 101,58 % y para *Aspergillus Brasiliensis* obtuvo un porcentaje de recuperación de 99,57 %. el cual ambos medicamentos cumplen con el porcentaje de Recuperación >70 %. Con respecto a la matriz de Azitromicina usando el mismo esquema de neutralización no hubo crecimiento de bacterias, hongos y Levaduras. Se demostró la eficacia del neutralizante al demostrar recuperación similar en los grupos A y B

en los productos Amoxicilina y Trimetoprim Sulfametoxazol, a su vez se demostró que el neutralizante no es tóxico por que se obtuvo recuperación similar en los grupos B y C. Concluyendo que el método de neutralización solo es eficaz para permitir la recuperación de *Aspergillus brasiliensis* y *Candida albicans* en los ensayos de Amoxicilina y Trimetoprim en los 3 grupos de prueba.

Gordon et al. (14). En el año 2017 Este artículo tuvo como Objetivo demostrar que Milliflex® Quantum produjo resultados no inferiores al método tradicional de carga biológica. Fue validado de acuerdo con la USP 1223, la Farmacopea Europea 5.1.6 y el Informe Técnico No. 33 de la Asociación de Medicamentos Parenterales y comprendió los parámetros de validación de Robustez, Solidez, Repetibilidad, Especificidad, Límite de detección y cuantificación, Exactitud, Precisión, Linealidad, Rango y equivalencia en operación rutinaria. Se utilizaron el Método filtración por membrana y recuento en placa. Los resultados se evaluaron estadísticamente según el criterio de aceptación Farmacopeica de 70 % de recuperación en comparación con el método tradicional. Los cálculos de potencia de las pruebas post hoc verificaron la idoneidad del tamaño de muestra utilizado para detectar tal diferencia. Además, las pruebas de equivalencia verificaron la no inferioridad del método rápido respecto al método tradicional. Concluyendo: Que se valida con éxito la rápida biocarga basada en Milliflex® Quantum, como método alternativo a la prueba tradicional de carga biológica.

## ANTECEDENTES NACIONALES

Sueros (15). En el año 2013 en su investigación tuvo como objetivo validar un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel intralaboratorial, basado en la Farmacopea Americana versión 34. Empleando el método de dilución neutralización, el cual los resultados demostraron la detección de los microorganismos de prueba en los tres grupos de tratamiento, mayor al 70 %. El Límite de Detección cuantificó 5 ufc/mL como la mínima cantidad que puede ser detectada. Los resultados de Precisión de cada analista como entre ellos obtuvieron una desviación estándar relativa menor a 0,02. El parámetro de Robustez usando distintos medios de cultivo y tiempo de incubación obtuvieron un coeficiente de variación de máximo 15%, El parámetro de Linealidad demostró coeficientes de correlación mayores de 0,95 en todas las cepas de prueba y en grupos de tratamiento. Concluyéndose que el método de neutralización permitió la recuperación y cuantificación de los microorganismos que puedan estar presente en la muestra.

Morales (16). En el año 2018 tuvo como objetivo validar el examen microbiológico del Bicarbonato de Sodio y Sulfadiazina de Plata según USP vigente, mediante el Método: filtración por membrana y vertido en placa, los resultados de validación de Sulfadiazina en los 3 lotes demostró tener una Exactitud dentro del factor de 2 en comparativa al control; en la Precisión demostró que en el grupo de prueba y grupo control, no presenta variabilidad significativa en los recuentos de acuerdo al valor de la prueba “t” de Student, para el Parámetro robustez en referencia a los tiempos de incubación existe similitud en los recuentos

para ambos grupos, la detección de microorganismos se observó crecimiento de *Staphylococcus aureus* a las 24 horas y para los microorganismos *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, crecieron a las 48 horas; a su vez demostrando total crecimiento a las 72 horas de incubación. La Validación del Bicarbonato de sodio en los 3 lotes, la Exactitud evidenció recuperación dentro del factor 2 en comparativa al grupo control, la precisión obtuvo un valor “t” > 0,05 observando que no hay variaciones en los recuentos, en el parámetro de Robustez se demuestra que el Bicarbonato de Calcio no afecta el crecimiento de los microorganismos, detectándose la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 en 24 horas, 48 horas y 72 horas de incubación. En conclusión, ambos métodos permiten el crecimiento de los microorganismos en los tiempos establecidos en la validación.

Simbron et al. (17). En el año 2020 en su investigación tuvieron objetivo Validar la Aptitud del Método Microbiológico de Recuento y Microorganismos Específicos para Sulfametoxazol + Trimetoprima en Tableta Recubierta. Utilizando el método de inoculación directa y filtración por membrana, en referencia a los lineamientos de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 42). Obteniendo resultados dentro del factor de 2 en los tres lotes de prueba, demostrando una mejor precisión para el método de inoculación directa en el caldo neutralizante, en comparación al método de filtración por membrana obtuvo una recuperación limitada y no ser de confiabilidad. Concluyéndose que el método de inoculación directa es el adecuado para el recuento y detección de microorganismos específicos.

## **2.2 Bases teóricas**

### **Dispositivo Médico**

Son instrumentos, aparato, máquina, programas informáticos, equipo entre otros. Utilizado solo o en combinación para el uso en pacientes para diagnosticar, prevenir, monitorear, tratar, dar soporte de alguna estructura anatómica, en la desinfección de superficies, esterilización de material médico y en investigación en la medicina (18).

### **Clasificación de Dispositivos Médicos**

Los dispositivos de clase I o bajo riesgo, presentan escasa posibilidad de producir daño la salud, los de clase II o moderado riesgo están sujetas a controles generales para demostrar su seguridad, los de clase III o de alto riesgo están sujetos a un estricto control para demostrar su seguridad y los de clase IV o críticos en materia de riesgo, están destinados para dar soporte vital en pacientes enfermos (19).

### **Control de Calidad de los Dispositivos Médicos**

Es un aspecto fundamental para garantizar su seguridad y eficacia. Se lleva a cabo a lo largo de todo el proceso de fabricación, desde la etapa de manufactura hasta la obtención del producto final. Este control se realiza de acuerdo con las normas y estándares de calidad establecidos a nivel nacional e internacional, al momento de la emisión del registro sanitario correspondiente. Los establecimientos públicos como privados tienen la responsabilidad de garantizar la calidad de los Dispositivos Médicos (20).

### **Amonio Cuaternario**

Es un compuesto cuya estructura básica es el catión Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), son solubles en agua y alcohol, actúan de manera eficiente en medio alcalino, tiene atributos tensoactivos y su eficacia disminuye con la presencia de material orgánico. Presenta acción desinfectante a partir de concentraciones de 0,25%. Se utilizan en soluciones acuosas o mezclados con detergentes para potenciar su acción, generalmente asociados a aminas terciarias en su composición (21).

### **Mecanismo de acción**

Actúan incrementando la permeabilidad de la membrana. Su acción bactericida actúa sobre las enzimas productoras de energía, desnaturalizando las proteínas celulares esenciales y afectando la membrana celular con la consecuente pérdida de los componentes citoplasmáticos (22).

### **Espectro de acción**

Presenta actividad desinfectante sobre bacterias vegetativas, hongos y virus. Dentro de su espectro de acción presenta excelente eficacia sobre las bacterias grampositivas. No presentan acción esporicida, tuberculocida, y algunos virus pequeños (21). Tiene baja eficacia sobre las bacterias Gram negativas, como las *Pseudomonas aeruginosa* que crean resistencia determinado por plásmidos (23).

### **Colección de cultivo Tipo Americano (ATCC)**

Fundada en 1925 para servir como centro de distribución de cultivos de microorganismos, dedicada a la preservación, autenticación y distribución de diversos materiales biológicos.

Actualmente es la colección de cultivos más grande del mundo, con colecciones en seis áreas: Bacteriología, Cultivo Celular, Biología Molecular, Micología, Protistología y Virología. Por lo cual cada laboratorio en su especialidad lo use para sus fines convenientes (24).

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Es un patógeno oportunista que se encuentra y persiste en el medio ambiente. Esta bacteria tiene forma bacilar, perteneciente al grupo de los bacilos Gram negativos. Presenta flagelo polar que le confiere la motilidad, pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, utilizando el Nitrógeno o Arginina como terminal de aceptación de Protones. Crece de manera eficaz en el agua y en el suelo viviendo con mínimos requerimientos nutricionales. Puede crecer entre 20° C - 43° C, se diferencia de otras especies de *Pseudomonas* por crecer a altas temperaturas. Pertenecen al grupo de no fermentadores de Lactosa, con la capacidad de utilizar al Acetato y Amoniaco, para obteniendo energía de la oxidación de azúcares (25).

### ***Staphylococcus aureus***

Es un microorganismo que en la observación microscópica se observan agrupados en racimos, la coloración de sus colonias tiene un pigmento de color dorado. Se clasifica como un coco Gram positivo,  $\beta$  hemolítico, Catalasa y Coagulasa positivo. Este microorganismo es parte de la flora normal de la piel de los seres humanos (26).

### ***Bacillus subtilis***

Presenta crecimiento aerobio, según su coloración son Bacilos Gram positivos de tamaño variable (0,5 a 10  $\mu\text{m}$ ), crecen en pH neutro, son mesófilas (temperatura entre 30° C y 45° C), tienen la capacidad de producir endosporas con lo que confiere un mecanismo de resistencia a diversos tipos de ambientes (27).

### ***Candida albicans***

Las especies del género *Candida* son microorganismos que se encuentran como parte de la flora normal de piel y mucosa; en el individuo inmunocompetente se comportan como patógenos oportunistas (28), presentan forma ovoide, son unicelulares, de reproducción asexual (Fisión binaria o gemación), son pequeñas (4 - 6 $\mu\text{m}$ ), de pared delgada. Mediante la coloración Gram se tiñen de color azul oscuro. La morfología de la colonia es lisa, de color cremoso y brillante. En la identificación preliminar se observa el tubo germinal luego de 90 minutos de incubación (29).

### ***Aspergillus brasiliensis***

Se encuentra distribuido en la naturaleza, sus esporas se diseminan fácilmente al ambiente, crecen a temperaturas entre 6° C - 55° C y a poca humedad. Se desarrollan sobre una amplia variedad de substratos gracias a que secreta enzimas que los degradan en compuestos nutritivos útiles; son de importancia a nivel industrial como productoras de enzimas (30). Las principales características macroscópicas de las colonias: como el diámetro, textura de las colonias, pigmento difusible del anverso y reverso de las colonias en el medio de cultivo y a nivel microscópico se observan esclerocios y formas de conidióforo, entre otros (31).

## **ESTANDARIZACION DE CEPAS**

La finalidad de esta metodología es la obtención de una suspensión de microorganismos, el cual se obtendrá un inóculo de no mayor a 100 UFC mediante la técnica de espectrofotometría, después de un cultivo de no más de cinco pasajes de las Cepas ATCC según la tabla 1; cuya duración de uso será de 2 horas desde la estandarización o 24 horas si es que se conservan a temperatura de 2° C a 8° C, estas suspensiones se usarán para la verificación de las pruebas de Promoción de Crecimiento, Prueba de Aptitud del Método de Recuento, Límite de Detección y Validación del Método de Neutralización (32).

## **PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO**

Todos los medios de cultivo preparados deben someterse a la prueba de Promoción de Crecimiento, donde se verificará que estén aptos antes de ser usados, demostrando que estos cumplen con las exigencias nutricionales que permitan el desarrollo de los microorganismos. Cada medio sólido o líquido debe ser inoculado con una cantidad no mayor de 100 UFC a partir de un inóculo estandarizado (33). Para medios de cultivo sólidos, no deben diferir de un factor mayor de 2 con respecto al inóculo estandarizado y los medios de cultivo líquidos serán considerados adecuados si se observa la presencia de turbidez (34).

**Tabla 1.** Preparación y uso de Microorganismos de Prueba

Microorganismo	Preparación de cepas de Prueba	Promoción del crecimiento		Aptitud del Método de Recuento en Presencia del Producto	
		Recuento Total de Microorganismos Aerobios	Recuento Total de Hongos Filamentosos y Levaduras	Recuento Total de Microorganismos Aerobios	Recuento Total de Hongos Filamentosos y Levaduras
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Agar Digerido de Caseína y Soja o Caldo Digerido de Caseína y Soja 30°-35° 18-24 horas.	Agar Digerido de Caseína y Soja y Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC 30°-35° ≤ 3 días		Agar Digerido de Caseína y Soja / NMP Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC 30° - 35° ≤ 3 días	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Agar Digerido de Caseína y Soja o Caldo Digerido de Caseína y Soja 30°-35° 18-24 horas.	Agar Digerido de Caseína y Soja y Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC 30°-35° ≤ 3 días		Agar Digerido de Caseína y Soja / NMP Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC 30° - 35° ≤ 3 días	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Agar Digerido de Caseína y Soja o Caldo Digerido de Caseína y Soja 30°-35° 18-24 horas.	Agar Digerido de Caseína y Soja y Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC 30°-35° ≤ 3 días		Agar Digerido de Caseína y Soja / NMP Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC 30° - 35° ≤ 3 días	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Agar Sabouraud Dextrosa o Caldo Sabouraud Dextrosa 20°- 25° 2 - 3 días	Agar Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC 30°-35° ≤ 5 días	Agar Sabouraud Dextrosa ≤ 100 UFC 20°- 25° ≤ 5 días	Agar Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC 30° - 35° ≤ 5 días NMP: no aplica	Agar Sabouraud Dextrosa ≤ 100 UFC 20° - 25° ≤ 5 días
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Agar Sabouraud Dextrosa o Agar Sabouraud Papa Dextrosa 20°- 25° 5 – 7 días o hasta alcanzar una buena esporulación	Agar Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC 30°-35° ≤ 5 días	Agar Sabouraud Dextrosa ≤ 100 UFC 20°- 25° ≤ 5 días	Agar Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC 30° - 35° ≤ 5 días NMP: no aplica	Agar Sabouraud Dextrosa ≤ 100 UFC 20° - 25° ≤ 5 días

**Fuente:** Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP NF 2023) Capitulo 61 (32).

## APTITUD DEL METODO

Determina que el método de neutralización sea el idóneo para inhibir las sustancias de interferencia en un producto (Tabla 2), demostrando a través de la recuperación de los microorganismos de prueba (Tabla 1), en el cual no deben de diferir de un factor mayor de 2 en referencia al diluyente sin producto (32).

La Aptitud del método de Recuento puede demostrarse mediante tres pruebas independientes. Solo se requiere los parámetros de Validación de Exactitud y Precisión para métodos cuantitativos y cualitativos la Recuperación de Microorganismos Específicos (35; 36).

### **¿Por qué realizarlo?**

Porque se encuentra estipulado en las Normativas Nacionales e Internacionales, como en el caso de la Farmacopea Americana (USP) y es de exigencia el cumplimiento por las entidades de control regulatorio (DIGEMID), para asegurar que el método empleado en los análisis microbiológicos de productos terminados y materia prima, sean seguros y confiables (33).

### **¿Cuándo realizarlo?**

Se ejecuta cuando nunca se realizó, cuando se modifica la formulación del producto validado o cuando se modifica las condiciones experimentales del método, a su vez aplica cuando la entidad regulatoria lo exige, y en casos de que cambien las especificaciones del producto (37).

## **INOCULACIÓN Y DILUCIÓN**

Agregar a la muestra preparada y a un control una suspensión de inóculo no mayor a 100 UFC. El volumen de la suspensión a inocular no debe exceder del 1% con respecto al volumen del producto diluido. Para evidenciar una recuperación microbiana aceptable, de preferencia usar la dilución de la muestra más baja para la prueba; de no ser posible la recuperación de microorganismos, debido a la presencia del antimicrobiano o la baja solubilidad, deben desarrollarse otros protocolos adecuados (32).

Si mediante la inoculación y dilución, hay inhibición del crecimiento, se debe modificar el procedimiento, aumentando el volumen del diluyente, incorporando agentes neutralizantes en este, cambiando la metodología mediante filtración por membrana o combinando todas las medidas anteriormente descritas (33).

### **Neutralización / Eliminación de la Actividad Antimicrobiana**

**Agentes neutralizantes:** Se usan para neutralizar productos que contengan sustancias de interferencia (ver tabla 2). Se pueden añadir un diluyente o al medio de cultivo durante la preparación, para luego esterilizarse; debe demostrar su efectividad neutralizante y la ausencia de toxicidad para los microorganismos de prueba, con referencia con un blanco con neutralizador sin el producto (Grupo Control) (32).

Para neutralizar las propiedades antimicrobianas de compuestos de Amonio Cuaternario, se puede utilizar detergentes no iónicos como el Polisorbato (Tween 80) al 3 % en combinación con Lecitina de soya al 0.3 %. El uso de estos neutralizantes puede causar que los microorganismos sean sensibles a cambios de pH, temperatura y concentraciones del Biocida (38).

**TABLA 2.** Agentes Neutralizantes Comunes/Métodos para sustancias de Interferencia

<b>Sustancia de Interferencia</b>	<b>Agentes Neutralizantes Potenciales/Método</b>
Glutaraldehído, mercuriales	Sulfito ácido de Sodio (Bisulfito de Sodio)
Fenólicos, Alcohol, Aldehídos, Sorbato	Dilución
Aldehídos	Glicina
Compuestos de Amonio Cuaternario (CAC), Parahidroxibenzoatos (parabenos), bis-biguanidas	Lecitina
CAC, Yodo, Parabenos	Polisorbato
Mercuriales	Tioglicolato
Mercuriales, halógenos, aldehídos	Tiosulfato
EDTA (Edetato)	Iones de Mg o Ca

**Fuente:** Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP NF 2023) Capítulo 61 (32).

### **Recuperación de Microorganismos en Presencia del Producto**

**Filtración por membrana:** La inoculación de estos microorganismos de prueba (< 100 UFC) se realizan en el último lavado, para evaluar que no haya presencia residual de antimicrobianos en la membrana. A su vez se debe considerar que el filtro de membrana puede inhibir el crecimiento de los microorganismos, lo cual se debe realizar controles positivos mediante el método de recuento en placa (32).

**Método de Recuento en placa:** Esta técnica es utilizada para pruebas cuantitativas, en el cual se incorpora la muestra en placas triplicadas para obtener una media aritmética de los recuentos; se utilizan dos métodos de siembra: Vertido en placa y método de extensión por superficie (33).

**Método del Número Mas Probable (NMP)** Esta metodología no es confiable para el recuento de hongos filamentosos y reservado para el recuento total de aerobios mesófilos en los cuales no haya otra metodología disponible (39).

### **VALIDACIÓN DEL ENSAYO MICROBIOLÓGICO**

Se utiliza para demostrar con evidencia objetiva que el método puede detectar o cuantificar microorganismos en distintos grupos de prueba, posterior a una prueba de idoneidad o Aptitud del método (40). La validación se realiza, cuando el método utilizado no está normalizado, cuando la técnica analítica es propia del laboratorio, cuando no pertenece a la normativa nacional, cuando se modifica el método estandarizado y por último cuando se debe demostrar la equivalencia comparable con otro método (41).

### **VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE NEUTRALIZACIÓN**

Para garantizar la eficacia y la ausencia de toxicidad del neutralizante utilizado en el esquema de neutralización, se lleva a cabo un estudio de validación, el cual busca recuperar los microorganismos viables inoculados (menos de 100 UFC).

#### **Criterios de Validación:**

Se debe demostrar eficacia adecuada del Neutralizante, cuando existe recuperación similar de microorganismos en el Grupo de Prueba (Producto + Diluyente + Neutralizante+ Inóculo) con respecto al Grupo Control (Diluyente + Neutralizante + Inóculo), a su vez se debe demostrar la ausencia de toxicidad del Neutralizante, cuando existe recuperación similar entre el Grupo Control y el Grupo Viabilidad (Diluyente + inóculo) (42).

## **PARAMETROS DE VALIDACIÓN**

**EXACTITUD:** Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos en referencia al valor verdadero (43).

**PRECISIÓN** Es el grado de similitud entre los resultados de ensayos independientes realizadas a una muestra, se denota como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de análisis. Puede ser una medida del grado de reproducibilidad (diferentes laboratorios, equipos, días y analista) o de repetibilidad (un solo analista en periodos corto de tiempo) del procedimiento analítico (44). En microbiología la variabilidad del método es más amplia, el cual se considera la desviación estándar relativa en un intervalo del 15% al 35 % (35).

**ESPECIFICIDAD** Es la capacidad del método para detectar o medir un analito, dentro de la muestra y sin interferencia de componentes (45).

**LÍMITE DE DETECCIÓN:** Es la capacidad que tiene el método para recuperar la cantidad más baja de microorganismos en una muestra establecida (46).

**ROBUSTEZ:** Capacidad del método para no ser inalterado a modificaciones, es representativo de un indicador de su fiabilidad durante uso normal (40).

## **2.3 Formulación de hipótesis**

### **2.3.1 Hipótesis General**

- **Hipótesis nula**

Ho: No existe validez del ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario al 0,25% para limpieza de superficies, basado en la Farmacopea Americana Vigente.

- **Hipótesis alterna**

Ha: Existe validez del ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario al 0,25% para limpieza de superficies, basado en la Farmacopea Americana Vigente.

## **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA**

### **3.1 Método de la investigación**

El Método Hipotético – Deductivo, se caracteriza por partir de hipótesis iniciales, que a través de etapas deductivas tiene la finalidad de llegar a la realidad comprobando o refutando las hipótesis mediante la experiencia (47).

### **3.2 Enfoque de la investigación**

El enfoque Cuantitativo, son Eventos de la realidad que se quieren investigar, se verifican, se cuantifican y pueden darse o no a conocer o se utilizan de alguna manera (48).

### **3.3. Tipo de investigación**

La investigación es Aplicativa, es entendida como la utilización de los conocimientos en la práctica, para aplicarlos en provecho de los grupos que participan en esos procesos y en

la sociedad en general, además del bagaje de nuevos conocimientos que enriquecen la disciplina (49).

### **3.4. Diseño de la investigación**

El diseño experimental, se caracteriza por una asignación aleatoria probabilística de los participantes en el grupo experimental y control (50).

### **3.5. Población, muestra y muestreo**

**Población:** 9 Litros con solución de Amonio Cuaternario al 0,25 %.

**Criterios de inclusión:** Solución de Amonio Cuaternario al 0,25 % de 1 litro.

**Criterios de exclusión:** Solución de Amonio Cuaternario al 0,25 % en presentaciones de 4 Litros.

**Muestra:** 200 mL de solución de Amonio Cuaternario al 0,25 %.

**Muestreo:** No probabilístico - Por conveniencia.

### 3.6. Variables y operacionalización

#### Variable 1: Validación

**Definición Operacional:** Proceso mediante el cual se demuestra que las características de desempeño del método son aptas para las aplicaciones analíticas previstas en comparación a los estándares de referencia.

Dimensión	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Escala de medición	Escala valorativa (Niveles o rangos)
Estandarización de cepas	Metodología por el cual se busca obtener una suspensión con un inóculo de concentración conocida	El criterio se basará en la USP NF 2023	Recuento de UFC	Razón	Cumple: < 100 UFC No cumple: > 100 UFC
Promoción de crecimiento	Prueba que verifica que los medios de cultivo se encuentren aptos para recuperar microorganismos.	La verificación se basará en la USP NF 2023	Recuento de UFC Crecimiento	Razón Nominal	Cumple: No difiere Factor mayor de 2 Cumple: Presencia de crecimiento No cumple: difiere Factor mayor de 2 No cumple: ausencia de crecimiento
Aptitud del Método	Determina que el método de neutralización sea el idóneo para inhibir las sustancias de interferencia en un producto, demostrando a través de la recuperación de los microorganismos de prueba.	La determinación se basará en la USP NF 2023	Recuento de UFC Crecimiento	Razón Nominal	Cumple: No difiere Factor mayor de 2 Cumple: Presencia de Crecimiento de Microorganismos específicos No cumple: Factor mayor de 2 No cumple: Ausencia de crecimiento de Microorganismos específicos
Efectividad del Neutralizante	Método empleado en el cual la Neutralización es eficaz para inhibir las propiedades antimicrobianas del producto.	El criterio se basará en la USP NF 2023	Recuento de UFC	Razón	Cumple: $\mu$ Grupo Prueba (A) = $\mu$ Grupo control (B) No cumple: $\mu$ Grupo Prueba (A) $\neq$ $\mu$ Grupo control (B)
Toxicidad del Neutralizante	Método empleado en el cual se permite la recuperación de microorganismos Viables	El criterio se basará en la USP NF 2023	Recuento de UFC	Razón	Cumple: $\mu$ Grupo Control (B) = $\mu$ Grupo Viabilidad (C) No cumple: $\mu$ Grupo Control (B) $\neq$ $\mu$ Grupo Viabilidad (C)
Exactitud	Proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos en referencia al valor verdadero.	La Determinación se basará en la USP NF 2023	Recuento de UFC	Razón	Cumple: Factor 2 se encuentra dentro de los límites del Intervalo de confianza al 90%. No cumple: Factor no se encuentra dentro de los límites del intervalo de confianza al 90%
Precisión	Es el grado de similitud entre los resultados de ensayos independientes realizadas a una muestra.	La Determinación se basará en la USP NF 2023	Recuento de UFC	Razón	Cumple: Coeficiente de variación < 15% No Cumple: Coeficiente de variación > 15 %
Especificidad	Es la capacidad del método para detectar o medir un analito, dentro de la muestra y sin interferencia de sus componentes.	La Determinación se basará en la USP NF 2023	Recuento de UFC	Razón	Cumple: $\mu$ Grupo prueba = $\mu$ Grupo control No cumple: $\mu$ Grupo prueba $\neq$ $\mu$ Grupo control
Límite de Detección	Es la capacidad que tiene el método para recuperar la cantidad más baja de microorganismo en una muestra.	La Determinación se basará en la USP NF 2023	Crecimiento	Nominal	Cumple: Existe crecimiento > 90 % No cumple: crecimiento < 90 %
Robustez	Es la capacidad del método para no ser inalterado a modificaciones, es representativo de un indicador de su fiabilidad durante su uso normal.	La Determinación se basará en la USP NF 2023	Recuento de UFC	Razón	Cumple: Conteo promedio de UFC de RTMA de 3 días = Conteo promedio de UFC de RTMA a los 5 días Conteo promedio de UFC de RTHL de 5 días = Conteo promedio de UFC de RTHL a los 7 días No Cumple: Conteo promedio de UFC de RTMA de 3 días $\neq$ Conteo promedio de UFC de RTMA a los 5 días Conteo promedio de UFC de RTHL de 5 días $\neq$ Conteo promedio de UFC de RTHL a los 7 días

### 3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

#### 3.7.1. Técnica

Para el ensayo de validación de este Dispositivo Médico, la técnica de referencia se basó en el capítulo 61 y 62 de la Farmacopea Americana NF 2023; los resultados obtenidos se transfirieron al programa estadístico SPSS Statistics 27 y Minitab 21 para desarrollar los parámetros de validación, basado en el capítulo 1223 y Capitulo 1227 de la mencionada obra oficial.

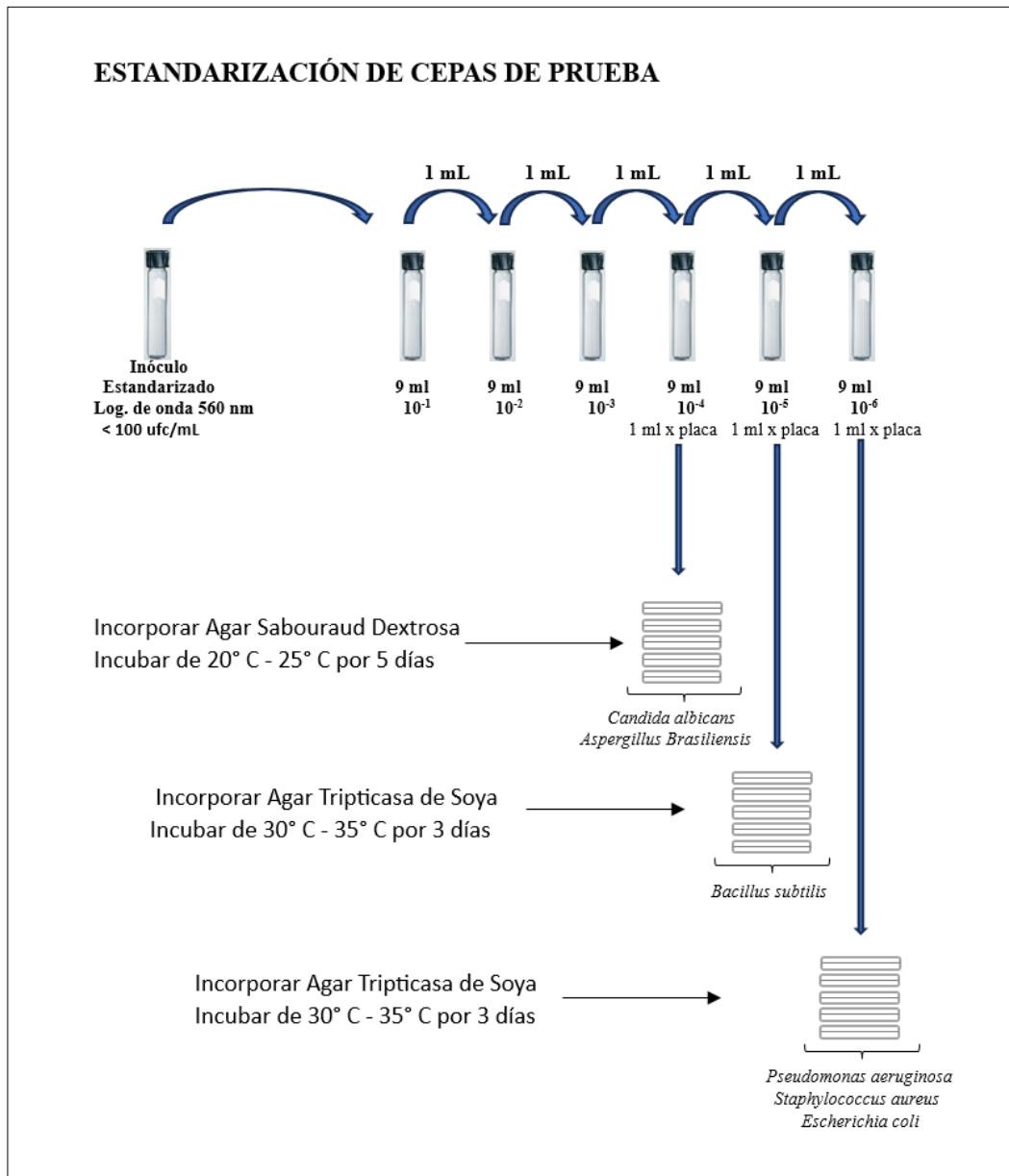
#### 3.7.1.1 PROCEDIMIENTO

##### 3.7.1.1.1 Estandarización de cepas

- A partir de un Cultivo de cada microorganismo y con un asa de siembra se inoculó en un tubo con 10 mL de medio de Caldo Tripticasa de Soya, las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* 8739 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 durante 24 horas entre 30° C - 35 °C y para el cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231 se inoculó con un asa de siembra a un tubo con 10 mL de Caldo Sabouraud y se incubó durante 48 - 72 horas entre 20° C - 25° C. El cultivo de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 se suspendió con 10 ml de Buffer Peptona con 0,05% de Polisorbato 80 hasta completar los 50 ml en un frasco con tapa rosca estéril.
- Se transfirieron 0,1 mL de cada suspensión obtenida a 9,9 ml de buffer Peptona, solo para el caso de *Aspergillus brasiliensis* se transfirió aproximadamente 0,5 ml de la suspensión recolectada a 9,5 ml de Buffer Peptona con 0,05% de Polisorbato 80.

- La suspensión de cada microorganismo (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*) se midió al espectrofotómetro con una longitud de onda de 560 nm y a una absorbancia entre 0,050 a 0,075 y para el caso de *Aspergillus brasiliensis* en una absorbancia aproximada de 0,27 para obtener un recuento menor de 100 ufc/ml.
- Se realizó diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  para las cepas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6633 y *Escherichia coli* ATCC 8739; para *Bacillus subtilis* ATCC 6633 hasta la dilución  $10^{-5}$ ; para los microorganismos *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 se realizaron las diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$ .
- Se agregó de la última dilución de cada microorganismo 1ml a una placa Petri (se realizó en 5 placas repetidas) y se incorporó Agar Tripticasa de Soya para las cepas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*) se homogenizó e incubó entre 30° C - 35° C por 72 horas. Para los microorganismos *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* se incorporó Agar Sabouraud Dextrosa y se incubó de 20° C - 25° C por 5 días, y se determinó las diluciones con menos de 100 UFC/mL. Figura 1.
- Se registró el recuento en la ficha de recolección de datos de estandarización de cepas.

**Figura 1.** Esquema de Estandarización de Cepas de Prueba



**Fuente:** Elaboración propia

### 3.7.1.1.2 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

- Se prepararon los medios de cultivo Agar Digerido de Caseína y Soja, Agar Sabouraud Dextrosa, Caldo Digerido de Caseína y Soja y Caldo Sabouraud Dextrosa como indica el fabricante.
- Para medios de cultivo solidos se agregó de 15 - 20 mL de Agar estéril a placas Petri a una temperatura aproximada de 45° C - 50° C y se dejó solidificar; para el caso de medios de cultivo líquidos estériles se preparó alícuotas 9,9 mL en tubos estériles.
- Se inoculó a los medios sólidos y líquidos, un inóculo de microorganismos (no más de 100 UFC) los cuales están indicados en la Tabla 1. Estas suspensiones de cepas de prueba se deben usar dentro de las 2 horas o 24 horas si se almacena a una temperatura de 2° C a 8° C.
- Con una espátula de Drigasly distribuyó el Inóculo en toda la superficie del medio y se incubó las placas de 30° C - 35° C por 72 horas para Microorganismos Aerobios Mesófilos y para Hongos y Levaduras se incubó de 20° C - 25° C durante 5 días.
- Se registró la recuperación de los microorganismos en el Formato de Registro de la Prueba de Promoción e Inhibición de Crecimiento de Medios de Cultivo.

### Propiedades Indicadoras de Promoción del crecimiento e Inhibitorias de los Medios de Cultivo

- Se prepararon los medios de cultivo Agar Manitol Salado y Agar Cetrimide como indica el fabricante. Se agregó de 15 - 20 mL de Agar estéril a placas Petri a una temperatura aproximada de 45° C - 50° C y se dejó solidificar.
- Se seleccionó e incubó los microorganismos de prueba (no más de 100 UFC) correspondientes a los medios indicados en la Tabla 3. con la ayuda de una espátula de Drigasly se distribuyó e Inoculó en toda la superficie del medio. Se incubó las placas invertidas de 30° C a 35° C durante 72 horas y a 20° C - 25° C durante 5 días para Levaduras.
- Se registró la recuperación de los microorganismos en el Formato de Registro de la Prueba de Promoción e Inhibición de Crecimiento de Medios de Cultivo.

**Tabla 3. Propiedades Indicadoras de Promoción del crecimiento e Inhibitorias de los medios de cultivo**

Prueba / Medio	Propiedad	Cepas de Prueba
<b><u>Prueba de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></u></b>	Promoción de crecimiento	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Agar Cetrimide	Inhibitoria	<i>Escherichia coli</i>
<b><u>Prueba de <i>Staphylococcus aureus</i></u></b>	Promoción de crecimiento	<i>Staphylococcus aureus</i>
Agar Manitol Salado	Inhibitoria	<i>Escherichia coli</i>
<b><u>Prueba de <i>Candida albicans</i></u></b>		
Caldo Sabouraud Dextrosa	Promoción de crecimiento	<i>Candida albicans</i>
Agar Sabouraud Dextrosa	Promoción del crecimiento + Indicadora	<i>Candida albicans</i>

**Fuente:** Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP NF 2023) Capítulo 62 (36).

### 3.7.1.1.3 APTITUD DEL MÉTODO

#### A. PREPARACIÓN DE GRUPOS DE PRUEBA

##### A.1 PREPARACIÓN DEL GRUPO DE PRUEBA (A)

- Se realizó una dilución 1/10 y 1/100 en caldo Tripticasa Soya Lecitina (0,5%) Polisorbato 80 (4%), tomando 10 mL de muestra a evaluar. Se Homogenizó y se distribuyó con una pipeta estéril 9,9 mL de las diluciones realizadas del Caldo Tripticasa Soya Lecitina (0,5%) Polisorbato 80 (4%) a tubos estériles (ver Figura 2). Se rotuló cada tubo correspondiente con el nombre de los microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*.

##### A.2 PREPARACIÓN DEL GRUPO CONTROL (B)

- A partir del medio cultivo estéril Caldo Tripticasa Soya Lecitina (0,5%) Polisorbato 80 (4%). Se distribuyó con una pipeta estéril, 9,9 mL a tubos estériles (Figura 2). Se rotuló cada tubo correspondiente con el nombre de los microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*.

##### A.3 INOCULACIÓN

- Se adicionó 0,1 mL de la suspensión de trabajo que contenga menos de 100 UFC de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* al tubo rotulado con el nombre de cada Microorganismo y se homogenizó.

#### **A.4 CONTROL NEGATIVO**

- Se realizó el control del medio de Cultivo Caldo Tripticasa Soya Lecitina (0.5%) Polisorbato 80 (4%) y se incubó de 30° C a 35° C por 24 a 72 horas.
- Adicionalmente se realizó el control negativo del Agar Tripticasa de Soya, incorporando 15 a 20 mL del medio de cultivo enfriado a 45°C aproximadamente. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó de 30° C a 35° C por 24 a 72 horas. Asu vez se realizó el control negativo del Agar Sabouraud Dextrosa incorporando 15 a 20 mL del medio de cultivo enfriado a 45° C aproximadamente. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó de 20° C a 25° C por 3 a 5 días.

### **B. RECUPERACIÓN DE MICROORGANISMOS (Método de Recuento en Placa)**

#### **B.1 RECUESTO TOTAL DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS (RTMA)**

- Se pipeteó 1 mL del tubo rotulado como *Pseudomonas aeruginosa* a placas Petri estériles (por triplicado), se realizó la misma acción para los *microorganismos Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, *finalmente a cada placa* se incorporó 15 a 20 mL de Agar Tripticasa de Soya enfriado a 45° C aproximadamente. Se realizó movimientos rotatorios y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Se incubó todas las placas a la temperatura de 30°C a 35°C por 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se contó el número de colonias por placa y se obtuvo el promedio y expresó el resultado en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL).

- Los resultados se registraron en el formato de Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos específicos.

## **B.2 RECUESTO TOTAL DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS (RTHL)**

- Se pipeteó 1mL del tubo rotulado como *Candida albicans* a placas Petri estériles (por duplicado), se realizó la misma acción para el microorganismo *Aspergillus brasiliensis*, finalmente a cada placa se incorporó 15 a 20 mL de Agar Sabouraud Dextrosa enfriado a 45° C aproximadamente. Se realizó movimientos rotatorios, dejar solidificar a temperatura ambiente. Se incubó todas las placas a la temperatura de 20° C a 25° C por 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación se contó el número de colonias por placa y se obtuvo el promedio y expresó el resultado en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL).
- Los resultados se registraron en el formato de Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos específicos.

## **C. MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS**

### **C.1 PREPARACIÓN DEL GRUPO DE PRUEBA (A)**

- Se realizó una dilución 1/10 en caldo Tripticasa Soya Lecitina (0,5%) Polisorbato 80 (4%) tomando 10 mL de muestra y se homogenizó. De la dilución realizada se transfirió 10 mL a otro envase que contenga 90 mL de caldo Tripticasa Soya Lecitina (0,5%) Polisorbato 80 (4%) y se homogenizó.

- Se distribuyó con una pipeta estéril 9,9 mL del envase de la segunda dilución a dos tubos estériles y se Rotuló como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

## **C.2 PREPARACIÓN DEL GRUPO CONTROL (B)**

- A partir del medio de cultivo Caldo Tripticasa Soya Lecitina (0,5%) Polisorbato 80 (4%). Se distribuyo con una pipeta estéril 9,9 mL a dos tubos estériles y se rotuló como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

## **C.3 INOCULACION**

- Se adicionó 0,1 mL de la suspensión de trabajo que contiene menos de 100 UFC de *Pseudomonas aeruginosa* al tubo rotulado con el nombre del microorganismo y se incubó de 30° C a 35° C por 18 a 24 horas.
- Se adicionó 0,1 mL de la suspensión de trabajo que contiene menos de 100 UFC de *Staphylococcus aureus* al tubo rotulado con el nombre del microorganismo y se incubó de 30° C a 35° C por 18 a 24 horas.

## **C.4 CONTROL NEGATIVO**

- Se realizó los controles negativos para el medio de cultivo: Caldo Tripticasa Soya Lecitina (0,5%) Polisorbato 80 (4%) y se incubó los tubos de 30° C - 35° C por 18 a 24 horas. Finalizado el periodo de incubación se observó la ausencia de turbidez de cada uno de los tubos.

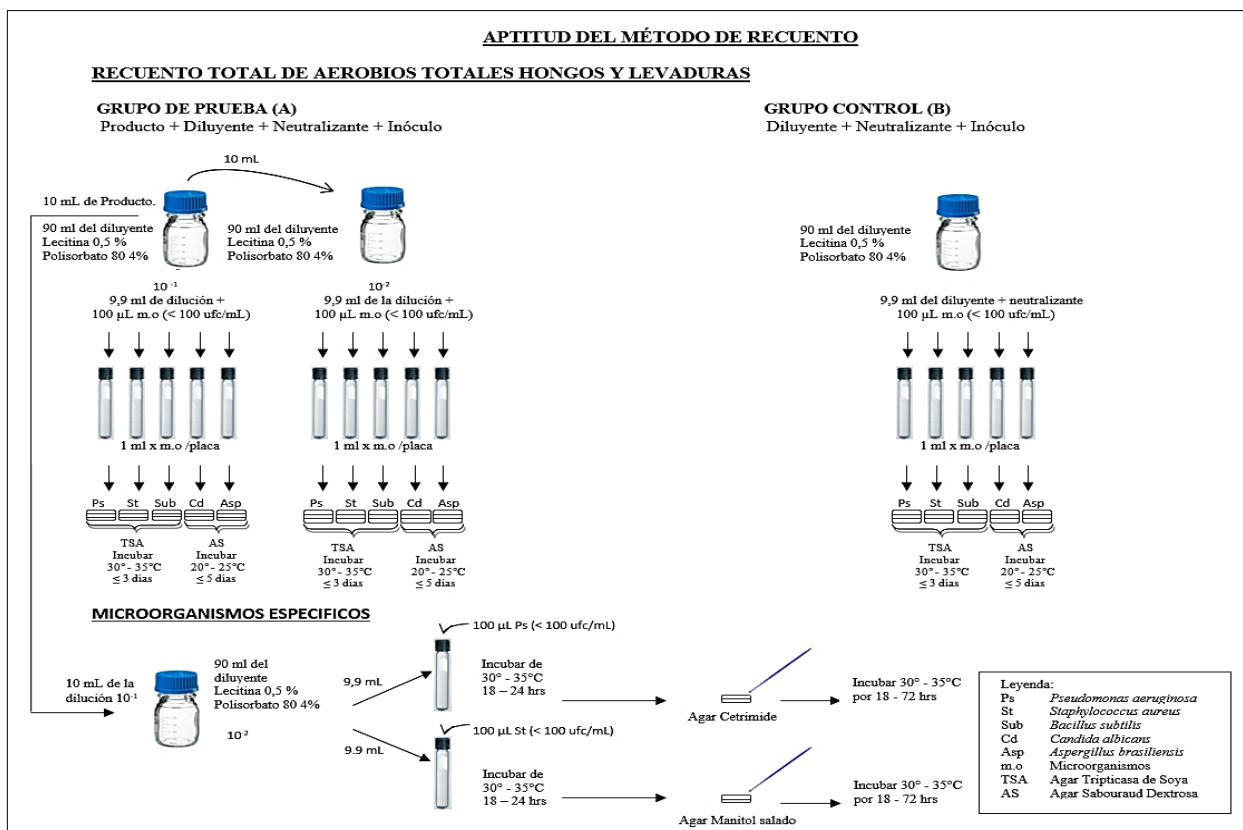
**C.5 SELECCIÓN Y SUBCULTIVO:****C.5.1 MICROORGANISMO: *Pseudomonas aeruginosa***

- Mediante un asa de siembra subcultivo por estría y agotamiento del tubo de Prueba, el tubo del Grupo control y el control negativo a una placa conteniendo Agar Cetrimide y se incubó a una temperatura de 30° C - 35° C por 18 a 72 horas.

**C.5.2 MICROORGANISMO: *Staphylococcus aureus***

- Mediante un asa de siembra subcultivo por estría y agotamiento del tubo de Prueba, el tubo del Grupo control y el control negativo a una placa conteniendo Agar Manitol salado y se incubó a una temperatura de 30° C - 35° C por 18 a 72 horas.

**FIGURA 2.** Esquema de Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos Específicos



**Fuente:** Elaboración propia

### 3.7.1.1.4 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN

#### A. PREPARACIÓN DEL GRUPO DE PRUEBA (A)

- Se realizó una dilución 1/10 en caldo Tripticasa Soya Lecitina (0,5%) Polisorbato 80 (4%) tomando 20 mL de muestra y luego se homogenizó. De la dilución realizada se transfirió 20 mL a otro envase que contuvo 180 mL de caldo Tripticasa Soya Lecitina (0,5%) Polisorbato 80 (4%) y se homogenizó.
- Se distribuyó con una pipeta estéril, 9,9 mL del envase de la segunda dilución a 20 tubos estériles y se rotularon como *Staphylococcus aureus*.

- Se Distribuyó con una pipeta estéril, 9,9 mL del envase de la segunda dilución a 20 tubos estériles y se rotularon como *Pseudomonas aeruginosa*.

## **B. PREPARACIÓN DEL GRUPO CONTROL (B)**

- Previamente se incorporó 20 ml de Buffer Peptona al medio de cultivo Caldo Tripticasa Soya Lecitina (0,5%) Polisorbato 80 (4%) y se homogenizó.
- Se distribuyó con una pipeta estéril 9,9 a 20 tubos estériles y se rotularon como *Staphylococcus aureus*.
- Se distribuyó con una pipeta estéril 9,9 mL a 20 tubos estériles y se rotularon como *Pseudomonas aeruginosa*.

## **C. INOCULACIÓN**

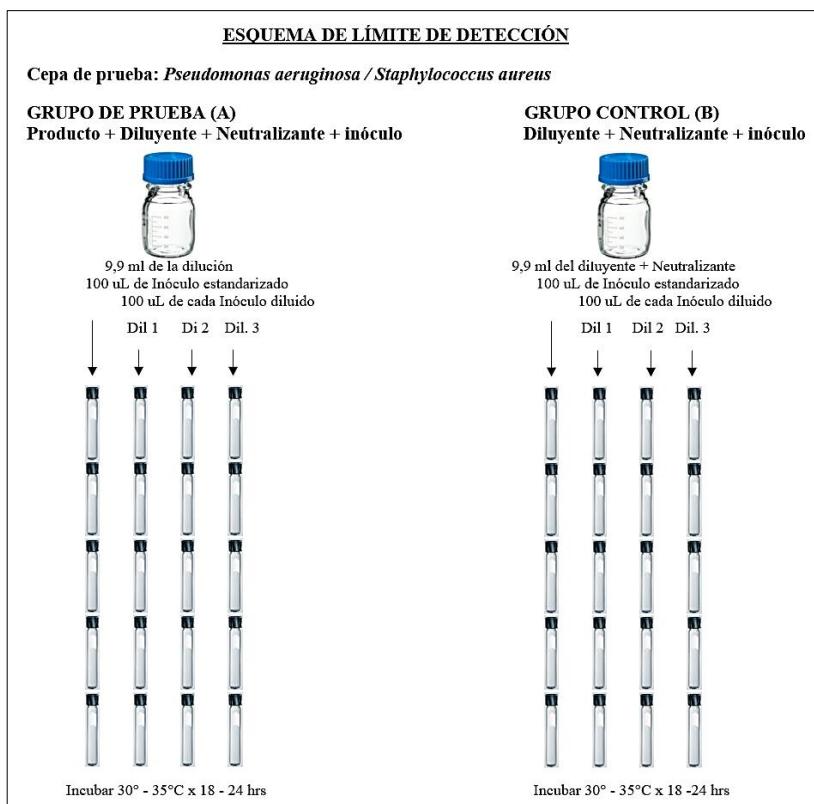
### **C.1 Inoculación de *Pseudomonas aeruginosa*:**

- Se realizó 3 diluciones sucesivas al medio a partir de la suspensión del Inóculo estandarizado. (Figura 3.)
- Se adicionó 0,1 mL de la suspensión de trabajo que contiene menos de 100 UFC de *Pseudomonas aeruginosa* a 5 tubos rotulados con el nombre del microorganismo.
- Se adicionó 0,1 mL de la dilución 1 (Dil 1) a 5 tubos rotulados con la dilución respectiva
- Se adicionó 0,1 mL de la dilución 2 (Dil 2) a 5 tubos rotulados con la dilución respectiva
- Se adicionó 0,1 mL de la dilución 3 (Dil 3) a 5 tubos rotulados con la dilución respectiva
- Se incubaron todos los tubos de 30° C - 35° C por 18 a 24 horas.

### C.2 inoculación de *Staphylococcus aureus*

- Se realizó 3 diluciones sucesivas al medio a partir de la suspensión del Inóculo estandarizado. (Figura 3.)
- Se adicionó 0,1 mL de la dilución de trabajo  $10^{-4}$  de *Staphylococcus aureus* a 5 tubos rotulados con el nombre del microorganismo.
- Se adicionó 0,1 mL de la dilución 1 (Dil 1) a 5 tubos rotulados con la dilución respectiva
- Se adicionó 0,1 mL de la dilución 2 (Dil 2) a 5 tubos rotulados con la dilución respectiva
- Se adicionó 0,1 mL de la dilución 3 (Dil 3) a 5 tubos rotulados con la dilución respectiva
- Se incubó todos los tubos de  $30^{\circ}\text{C}$  -  $35^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas.

**Figura 3.** Esquema del Límite de Detección



**Fuente:** Elaboración propia

### 3.7.1.1.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE NEUTRALIZACIÓN

Para la Validación del método de neutralización, al Grupo de Prueba (A) y al Grupo Control (B) se adicionó el Grupo Viabilidad (C) para determinar la ausencia de la Toxicidad del neutralizante, en el cual se realizaron 3 ensayos independientes en tres lotes del producto.

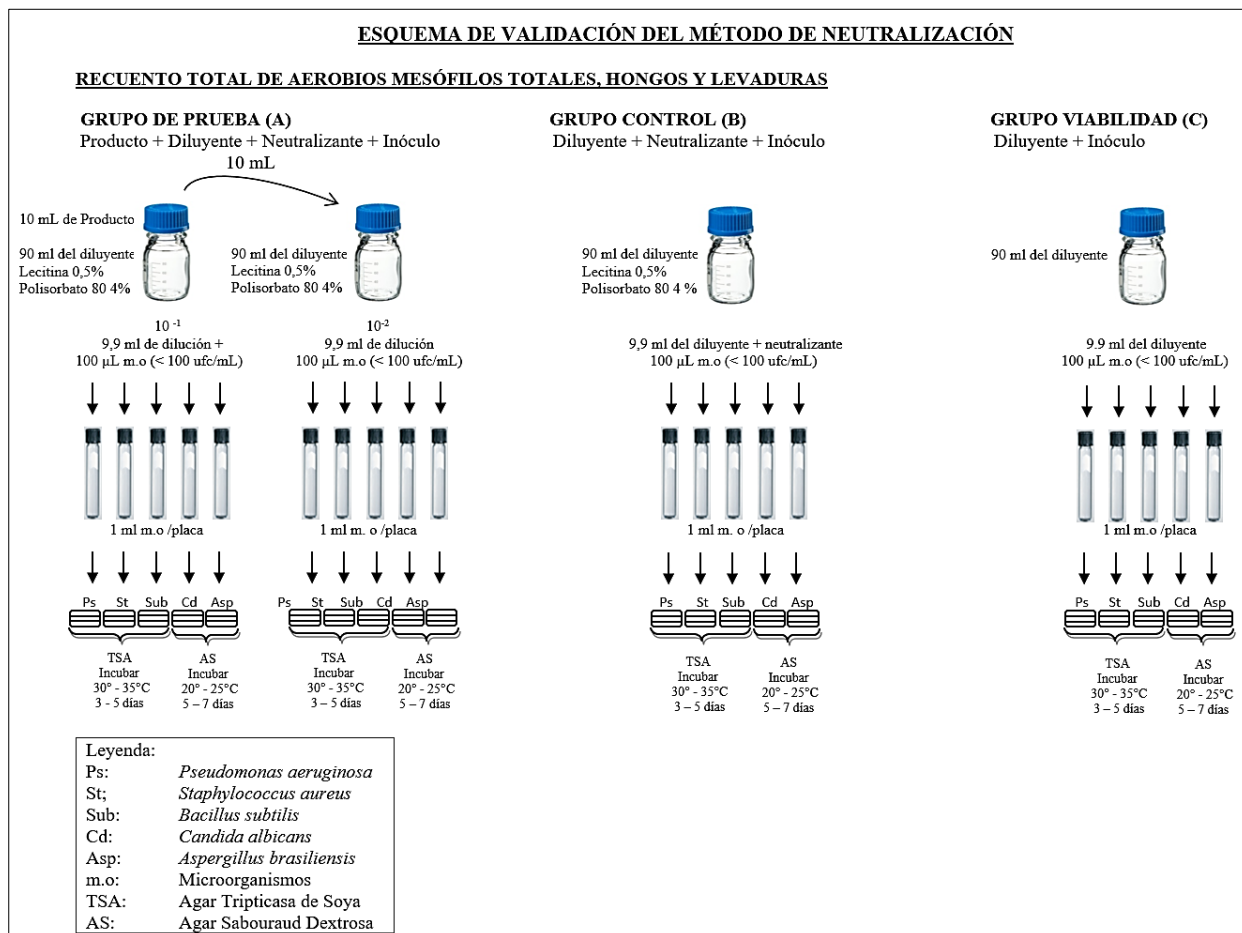
#### A. PREPARACIÓN DEL GRUPO VIABILIDAD (C)

- A partir del medio de cultivo Caldo Tripticasa Soya sin presencia de neutralizantes, se realizó lo siguiente:
- Se distribuyó con una pipeta estéril, 9,9 mL a tubos estériles (Figura 4). Se rotuló cada tubo correspondiente con el nombre de los microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*.

#### B. INOCULACIÓN.

- Se adicionó 0,1 mL de la suspensión de trabajo que contuvo menos de 100 UFC de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* al tubo rotulado con el nombre de cada Microorganismo y homogenizar.
- Para la recuperación de los microorganismos para este grupo, se siguió el procedimiento a partir del Ítem 3.7.1.1.3 B
- Para el desarrollo del parámetro de robustez se incubó dos días adicionales para cada grupo de microorganismos.

**Figura 4.** Esquema de Validación del Método de Neutralización



**Fuente:** Elaboración Propia

### 3.7.2. Descripción de instrumentos

Se registró los datos en los siguientes formatos:

- Ficha de Recolección de Datos de Estandarización de Cepas de Prueba.
- Formato de registro de la prueba de Promoción e Inhibición de Crecimiento de Medios de Cultivo.

- Formato de registro de la Prueba de la Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos Específicos.
- Formato de Límite de Detección
- Formato de Validación de Método de Neutralización en Grupos de Tratamiento.

### **3.7.3 Validación**

La validación de los instrumentos se realizó por el juicio de 3 expertos.

### **3.7.4. Confiabilidad**

No aplica por ser una ficha de recolección de datos.

## **3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos**

Los resultados de recuento de UFC y turbidez de los medios de cultivo se registraron a los instrumentos respectivos:

- Ficha de Recolección de Datos de Estandarización de Cepas de Prueba.
- Formato de registro de la prueba de Promoción e Inhibición de Crecimiento de Medios de Cultivo.
- Formato de registro de la Prueba de la Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos Específicos.
- Formato de Límite de Detección
- Formato de Validación de Método de Neutralización en Grupos de Tratamiento.

#### ❖ **Estandarización de Cepas**

Para el logro de este objetivo se desarrolló el procedimiento a partir del Ítem 3.7.1.1.1, se promedió las 5 repeticiones (recuento en placa), el cual obtuvo un promedio de UFC de la suspensión estandarizada.

**Criterio de aceptación:** El recuento de los microorganismos de Prueba debe corresponder a una Inóculo estandarizado menor de 100 UFC/ mL.

#### ❖ **Prueba de Promoción de Crecimiento y Propiedades Indicadoras e Inhibitorias de los medios de cultivo**

Para verificar la conformidad del medio de cultivo preparado, se realizará el procedimiento de la prueba de Promoción a partir del ítem 3.7.1.1.2. Los resultados se registraron en el Formato de registro de Prueba de Promoción e Inhibición de crecimiento de medios de cultivo, el cual cumplió los siguientes criterios de aceptación del medio de cultivo.

**Tabla 4.** Criterios de aceptación de Prueba de Promoción de Crecimiento y Propiedades Indicadoras e Inhibitorias de los medios de cultivo.

Prueba			Criterio de aceptación
Promoción en medios de cultivo sólido			Factor no mayor de 2
Promoción en medios de cultivo líquido			Turbidez
Propiedades Inhibitorias	Medio de cultivo	Cepas de prueba	Ausencia de Crecimiento
	Agar Cetrimide	<i>Escherichia coli</i>	
	Agar Manitol Salado	<i>Escherichia coli</i>	
Propiedades Indicadoras	Medio de cultivo	Cepas de prueba	Presencia de crecimiento (Turbidez)
	Agar Cetrimide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Agar Manitol Salado	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Agar Sabouraud Dextrosa	<i>Candida albicans</i>	

**Fuente:** Elaboración Propia

#### ❖ Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos Específicos

Para el cálculo de la interpretación de los resultados, previamente se realizó el procedimiento de Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos específicos del Ítem

3.7.1.1.3

**Tabla 5.** Criterios de aceptación de la Prueba de Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos Específicos

Prueba			Criterio de aceptación
<b>Aptitud del Método de Recuento</b>			Grupo de Prueba con respecto al Grupo Control no difiere en un Factor mayor de 2 ( 50% - 200 %).
<b>Prueba de Microorganismos Específicos</b>	<b>Grupo de Estudio</b>	<b>Microorganismo</b>	Crecimiento (Turbidez)
	<b>Grupo de Prueba (A):</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<b>Grupo Control (B):</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<b>Control Negativo:</b>	No aplica	Ausencia de Crecimiento
<b>Selección y Subcultivo</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Medio Selectivo</b>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar Cetrimide	Colonias verdosas
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Manitol Salado	Colonias amarillas

**Fuente:** Propia

#### ❖ **Determinación del Límite de Detección**

Para determinar del criterio de aceptación, se realizó el procedimiento del Límite de Detección para Microorganismos específicos del Ítem 3.7.1.1.4

**Interpretación:** Turbidez en las 5 réplicas simultaneas de cada dilución que permita el crecimiento, lo cual establecerá el límite mínimo de recuperación de microorganismos en los Grupos de ensayo no menor del 90 % (46).

## PROCESAMIENTO DE PARAMETROS ESTADISTICOS

Luego los resultados se trasladaron en la plataforma estadística SPSS Versión 27 y Minitab para el desarrollo de los parámetros de Validación.

**Tabla 6.** Procesamiento de Parámetros Estadísticos

PRUEBA Y PARAMETROS	CALCULO ESTADISTICO
Estandarización de cepas	No aplica
Promoción de Crecimiento	No aplica
Aptitud del Método de Recuento	No aplica
Efectividad del Neutralizante	Prueba t para comparación de dos medias independientes a nivel de significancia de 5 % Bilateral: $\mu$ Grupo Prueba = $\mu$ Grupo Control
Toxicidad del Neutralizante	Prueba t para comparación de dos medias independientes a nivel de significancia de 5 % Bilateral: $\mu$ Grupo Control = $\mu$ Grupo Viabilidad
Exactitud	Cumple: Factor 2 se encuentra dentro de los límites del Intervalo de confianza al 90%.
Precisión (Repetibilidad)	C.V. menor al 15 %
Especificidad	$\mu$ Grupo prueba = $\mu$ Grupo Control
Límite de detección	No aplica
Robustez	Prueba t para comparación de dos medias emparejadas a nivel de significancia de 5 % Bilateral: $\mu$ Grupo Prueba = $\mu$ Grupo Control $\mu$ Grupo Control = $\mu$ Grupo Viabilidad

**Fuente:** Elaboración Propia

### 3.9. Aspectos éticos

Se trabajó con equipos calibrados, calificados y materiales que forman parte del Laboratorio. No existen problemas éticos ni morales. La información de la formulación y lotes del producto para esta investigación se mantiene en reserva de acuerdo con las políticas de confidencialidad de la empresa.

## CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.1. Resultados

#### 4.1.1. Análisis descriptivos de resultados

De acuerdo con el Objetivo específico 1: ESTANDARIZACION DE CEPAS

**Tabla 7. Estandarización de cepas de prueba**

ESTANDARIZACIÓN DE CEPAS MICROBIOLÓGICAS																		
Diluciones	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Candida albicans</i>			<i>Aspergillus brasiliensis</i>		
	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Fecha 12-01-24	9 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	86	7 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	65	9 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	85	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	60	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	82	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	53
	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	81	7 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	70	9 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	86	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	62	9 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	85	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	48
	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	84	7 x 10 <sup>2</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	67	9 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	87	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	60	9 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	87	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	50
	9 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	85	7 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	69	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	84	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	58	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	80	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	52
	8 x 10 <sup>2</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	82	7 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	66	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	83	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	61	9 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	85	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	51
Promedio UFC/mL	9 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	84	7 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	67	9 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	85	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	60	9 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	84	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	51
Absorbancia	0,060			0,075			0,065			0,050			0,050			0,250		
Fecha 19-01-24	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	83	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	64	No aplica			6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	64	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	83	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	52
	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	84	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	62				6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	60	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	82	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	49
	9 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	85	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	63				6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	63	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	80	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	47
	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	82	7 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	65				6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	64	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	84	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	48
	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	82	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	61				6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	63	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	81	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	50
Promedio UFC/mL	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	83	6 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	63	No aplica			6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	63	8 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	81	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	49
Absorbancia	0,059			0,074						0,050			0,051			0,251		

<b>Fecha</b> 24-01-24	8 x 10 <sup>3</sup> 8 x 10 <sup>2</sup> 83	6 x 10 <sup>3</sup> 6 x 10 <sup>2</sup> 60	No aplica	7 x 10 <sup>3</sup> 7 x 10 <sup>2</sup> 66	9 x 10 <sup>3</sup> 9 x 10 <sup>2</sup> 85	5 x 10 <sup>3</sup> 5 x 10 <sup>2</sup> 54
	8 x 10 <sup>3</sup> 8 x 10 <sup>2</sup> 84	6 x 10 <sup>3</sup> 6 x 10 <sup>2</sup> 64		6 x 10 <sup>3</sup> 6 x 10 <sup>2</sup> 62	9 x 10 <sup>3</sup> 9 x 10 <sup>2</sup> 86	6 x 10 <sup>3</sup> 6 x 10 <sup>2</sup> 56
	9 x 10 <sup>3</sup> 9 x 10 <sup>2</sup> 85	7 x 10 <sup>3</sup> 7 x 10 <sup>2</sup> 65		7 x 10 <sup>3</sup> 7 x 10 <sup>2</sup> 65	8 x 10 <sup>3</sup> 8 x 10 <sup>2</sup> 83	6 x 10 <sup>3</sup> 6 x 10 <sup>2</sup> 57
	8 x 10 <sup>3</sup> 8 x 10 <sup>2</sup> 82	6 x 10 <sup>3</sup> 6 x 10 <sup>2</sup> 62		7 x 10 <sup>3</sup> 7 x 10 <sup>2</sup> 67	8 x 10 <sup>3</sup> 8 x 10 <sup>2</sup> 82	5 x 10 <sup>3</sup> 5 x 10 <sup>2</sup> 53
	8 x 10 <sup>3</sup> 8 x 10 <sup>2</sup> 82	7 x 10 <sup>3</sup> 7 x 10 <sup>2</sup> 66		7 x 10 <sup>3</sup> 7 x 10 <sup>2</sup> 65	9 x 10 <sup>3</sup> 9 x 10 <sup>2</sup> 86	6 x 10 <sup>3</sup> 6 x 10 <sup>2</sup> 55
<b>Promedio</b> <b>UFC/mL</b>	8 x 10 <sup>3</sup> 8 x 10 <sup>2</sup> 83	6 x 10 <sup>3</sup> 6 x 10 <sup>2</sup> 63	No aplica	7 x 10 <sup>3</sup> 7 x 10 <sup>2</sup> 65	9 x 10 <sup>3</sup> 9 x 10 <sup>2</sup> 84	6 x 10 <sup>3</sup> 6 x 10 <sup>2</sup> 55
<b>Absorbancia</b>	0,060	0,075		0,050	0,051	0,249

**Interpretación:** Se observa que el recuento de microorganismos en la mayor dilución presentó un recuento menor a 100 unidades formadoras de colonias.

**Tabla 8. Suspensión de trabajo**

Prueba	Promoción de crecimiento						Aptitud del Método/ Validación				
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>
Microorganismo	PS	ST	EC	Bs	Cd	Asp	PS	ST	BS	Ca	Asp
<b>Fecha:12-01-24</b>	9.x 10 <sup>2</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>	No aplica				
	8 x 10 <sup>2</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>					
	8 x 10 <sup>2</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>					
	9 x 10 <sup>2</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>					
	8 x 10 <sup>2</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>					
<b>Promedio</b> <b>UFC/mL</b>	9 x 10 <sup>2</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	9 x 10 <sup>2</sup>	6 x 10 <sup>2</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>					
<b>Fecha: 19-01-24</b>	No aplica						8 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>
	No aplica						8 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>
	No aplica						9 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>
	No aplica						8 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>
	No aplica						8 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>
<b>Promedio</b> <b>UFC/mL</b>							8 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>
<b>Fecha: 24-01-24</b>	No aplica						8 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>
	No aplica						8 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>
	No aplica						9 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>
	No aplica						8 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>
	No aplica						8 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>
<b>Promedio</b> <b>UFC/mL</b>							8 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>3</sup>	9 x 10 <sup>3</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>

(Ps) *Pseudomonas aeruginosa* (St) *Staphylococcus aureus* (Ec) *Escherichia coli* (Bs) *Bacillus subtilis* (Cd) *Candida albicans* (Asp) *Aspergillus brasiliensis*

**Interpretación:** Se seleccionó las diluciones que presentaron un recuento referencial menor a 100 UFC/mL con respecto a la dilución estandarizada.

De acuerdo con el Objetivo específico 2: **PROMOCIÓN E INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO**

**Tabla 9. Recuperación de microorganismos en medios de cultivo**

Medio de cultivo		CEPAS DE PRUEBA					Control negativo
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	
Fecha: 12-01-24							
Agar Tripticasa de soya	Recuento de inóculo Estandarizado	84 UFC	67 UFC	60 UFC	84 UFC	51 UFC	-
	Promoción de crecimiento	82 UFC	58 UFC	56 UFC	95,2 UFC	48 UFC	
	Resultados (50 % - 200 %)	98 %	87 %	93,3%	97,4%	95 %	
Agar Sabouraud Dextrosa	Recuento de inóculo Estandarizado	N/A	N/A	N/A	84 UFC	51 UFC	-
	Promoción de crecimiento	N/A	N/A	N/A	82 UFC	47 UFC	
	Resultados (50 % - 200 %)	-	-	-	98%	92%	
Caldo Tripticasa de soya + Neutralizantes	Recuento de inóculo Estandarizado	84 UFC	67 UFC	60 UFC	84 UFC	51 UFC	-
	Promoción de crecimiento	+	+	+	+	+	
	Resultados (50 % - 200 %)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
Caldo Tripticasa de soya	Recuento de inóculo Estandarizado	84 UFC	67 UFC	60 UFC	84 UFC	51 UFC	
	Promoción de crecimiento	+	+	+	+	+	
	Resultados (50 % - 200 %)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
Buffer Peptona	Recuento de inóculo Estandarizado	84 UFC	67 UFC	60 UFC	84 UFC	51 UFC	
	Promoción de crecimiento	+	+	+	+	+	
	Resultados (50 % - 200 %)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	

Medios líquidos: (+) Presencia de Crecimiento

(-) Ausencia de Crecimiento

(/) No aplica

**Interpretación:** Se observan que los medios de cultivo preparados permitieron el crecimiento de los microorganismos inoculados, el cual los resultados se encontraron dentro porcentaje de recuperación del 50% - 200 % (Factor 2) y para medios líquidos presentaron crecimiento o turbidez.

**Tabla 10. Propiedades Indicadoras de Promoción de crecimiento e Inhibición de los medios de cultivo.**

Medios de Cultivo		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Control negativo
<b>Fecha: 12-01-24</b>					
<b>Agar Manitol salado</b>	<b>Recuento de inóculo Estandarizado</b>	85 UFC	67 UFC	85 UFC	-
	<b>Promoción de crecimiento</b>	N/A	65 UFC	N/A	
	<b>Resultados (50 % - 200 %)</b>	N/A	97 %	N/A	
	<b>Prueba Inhibitoria</b>	N/A	N/A	-	
<b>Agar Cetrimide</b>	<b>Recuento de inóculo Estandarizado</b>	85 UFC	67 UFC	85 UFC	-
	<b>Promoción de crecimiento</b>	80 UFC	N/A	N/A	
	<b>Resultados (50 % - 200 %)</b>	106,3 %	N/A	N/A	
	<b>Prueba Inhibitoria</b>	N/A	N/A	-	

Medios líquidos: (+) Presencia de Crecimiento (-) Ausencia de Crecimiento (/) No aplica

**Interpretación:** Se observa que la recuperación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* se encontraron dentro del Factor no mayor de 2 para medios selectivos y presentaron inhibición del microorganismo *Escherichia coli* en ambos medios de cultivo.

## De acuerdo con el Objetivo específico 3: APTITUD DEL METODO EN PRESENCIA DEL PRODUCTO

Tabla 11. Recuperación de Microorganismos en presencia del producto / Ensayo 1

Nro.de ensayo: 1	CEPAS ATCC	A			B				A/B	Control Negativo	% Recuperación (50% - 200%)	
		Grupo de Prueba (UFC/mL)				Grupo Control (UFC/mL)						Factor
		Muestra + Diluyente + Neutralizante + Inóculo				Diluyente + Neutralizante + Inóculo				Caldo Tripticasa de Soya Lecitina (0,5 %) Polisorbato 80 (4%)		
		Recuento de UFC/mL			Promedio de UFC/mL	Recuento de UFC/mL			Promedio de UFC /mL			
Placa 1	Placa 2	Placa 3		Placa 1	Placa 2	Placa 3						
Amonio cuaternario  Lote 1 Dilución 10 <sup>-1</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	88	89	81	86,00	85	86	84	85	1,01	-	101%
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	00	00	00	0,0	65	58	62	61,7	0,00	-	0%
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	00	00	00	0,0	57	66	63	62	0,00	-	0%
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	88	80	85	84,3	87	84	86	85,7	0,98	-	98%
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	53	52	48	51	57	51	54	54	0,94	-	94%
Amonio cuaternario  Lote 1 Dilución 10 <sup>-2</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	81	83	83	82,3	85	86	84	85	0,97	-	97%
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	62	64	60	62	65	58	62	61,7	1,01	-	101%
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	58	56	58	57,3	57	66	63	62	0,92	-	92%
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	82	84	79	81,7	87	84	86	85,7	0,95	-	95%
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	56	51	48	51,7	57	51	54	54	0,96	-	96%

**Interpretación:** La recuperación de microorganismos del primer ensayo independiente en la dilución  $10^{-1}$  para los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* no cumplieron con el factor mayor de 2 (50% - 200%). Sin embargo, en la dilución  $10^{-2}$  todos los microorganismos presentaron recuperación dentro del factor de 2 (50% - 200%).

Tabla 12. Recuperación de microorganismos en presencia del producto/ Ensayo 2

Nro. de ensayo: 2	CEPAS ATCC	A Grupo de Prueba (UFC/mL)				B Grupo Control (UFC/mL)				A/B	Control Negativo  Caldo Tripticasa de Soya Lecitina (0,5 %) Polisorbato 80 (4%)	% Recuperación (50% - 200%)
		Muestra + Diluyente Neutralizante + Inóculo				Diluyente + Neutralizante + Inóculo				Factor		
		Recuento de UFC/mL			Promedio de UFC/mL	Recuento de UFC/mL			Promedio de UFC/mL			
		Placa 1	Placa 2	Placa 3		Placa 1	Placa 2	Placa 3				
Amonio cuaternario  Lote 1 Dilución 10 <sup>-1</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	83	80	85	82,7	89	86	90	88,3	0,94	-	93,6%
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	00	00	00	0,0	61	65	62	62,7	0,00	-	0,0%
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	00	00	00	0,0	61	59	64	61,3	0,00	-	0,0%
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	88	85	82	85	87	83	88	86	0,99	-	98,8%
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	56	57	51	54,7	57	49	50	52	1,05	-	105,1%
Amonio cuaternario  Lote 1 Dilución 10 <sup>-2</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	85	88	80	84,3	89	86	90	88,3	0,95	-	95,5%
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	65	59	63	62,3	61	65	62	62,7	0,99	-	99,5%
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	58	59	62	59,7	61	59	64	61,3	0,97	-	97,3%
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	81	83	82	82	87	83	88	86	0,95	-	95,3%
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	52	49	57	52,7	57	49	50	52	1,01	-	101,3%

**Interpretación:** La recuperación de microorganismos del segundo ensayo independiente en la dilución 10<sup>-1</sup> para los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* no cumplieron con el factor mayor de 2 (50% - 200%). Sin embargo, en la dilución 10<sup>-2</sup> todos los microorganismos presentaron recuperación dentro del factor de 2 (50% - 200%).

Tabla 13. Recuperación de microorganismos en presencia del producto/ Ensayo 3

Nro. de ensayo: 3	CEPAS ATCC	A				B				A/B	Control Negativo	% Recuperación (50%-200%)
		Grupo de Prueba (UFC/mL)				Grupo Control (UFC/mL)				Factor	Caldo Tripticasa de Soya Lecitina (0,5 %) Polisorbato 80 (4%)	
		Muestra + Diluyente Neutralizante + Inóculo				Diluyente + Neutralizante + Inóculo						
		Recuento de UFC/mL			Promedio de UFC/mL	Recuento de UFC/mL			Promedio de UFC /mL			
Placa 1	Placa 2	Placa 3		Placa 1	Placa 2	Placa 3						
Amonio cuaternario Lote 1 Dilución 10 <sup>-1</sup> Ensayo 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	90	87	81	86	82	83	80	81,7	1,05	-	105,3%
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	00	00	00	0,0	60	63	64	62,3	0,00	-	0,0%
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	00	00	00	0,0	57	65	59	60,3	0,00	-	0,0%
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	88	82	79	83	79	83	79	80,3	1,03	-	103,3%
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	54	57	50	53,7	49	48	53	50	1,07	-	107,3%
Amonio cuaternario Lote 1 Dilución 10 <sup>-2</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	89	82	83	84,7	82	83	80	81,7	1,04	-	103,7%
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	62	61	64	62,3	60	63	64	62,3	1,00	-	100%
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	59	58	60	59	57	65	59	60,3	0,98	-	97,8%
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	81	88	82	83,7	79	83	79	80,3	1,04	-	104,1%
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	49	50	57	52	49	48	53	50	1,04	-	104%

**Interpretación:** La recuperación de microorganismos del tercer ensayo independiente en la dilución  $10^{-1}$  para los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* no cumplieron con el factor mayor de 2 (50% - 200%). Sin embargo, en la dilución  $10^{-2}$  todos los microorganismos presentaron recuperación dentro del factor de 2 (50% - 200%).

**Tabla 14. Recuperación de microorganismos específicos**

Dilución 10 <sup>-2</sup> DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS				
Nro. De ensayo	CEPAS ATCC	A	B	Control Negativo
		Grupo de Prueba (UFC/mL) Muestra + Diluyente + Neutralizante + Inóculo	Grupo Control (UFC/mL) Diluyente + Neutralizante + Inóculo	Caldo Tripticasa de Soya Lecitina (0,5 %) Polisorbato 80 (4%)
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+	+	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	+	-
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+	+	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	+	-
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+	+	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	+	-

(+) Presencia de crecimiento

(-) Ausencia de crecimiento

**Interpretación:** Se observó presencia de crecimiento de los microorganismos específicos *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en la dilución 10<sup>-2</sup> en cada ensayo independiente.

**Tabla 15. Recuperación de microorganismos específicos en medios selectivos /*Pseudomonas aeruginosa***

Dilución 10 <sup>-2</sup> SELECCIÓN Y SUBCULTIVO					
FECHA	Número de ensayo	CEPAS ATCC	A	B	Control Negativo
			Grupo de Prueba Agar Cetrimide Incubación: 30° C a 35° C por 18 - 72 h	Grupo Control	Caldo Tripticasa de Soya Lecitina (0,05 %) Polisorbato 80 (2%)
19/01/2024	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+	+	-
	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+	+	-
	3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+	+	-

(+) Presencia de crecimiento

(-) Ausencia de crecimiento

**Interpretación:** Se observó recuperación del microorganismo *Pseudomonas aeruginosa* en agar Cetrimide en el grupo de Prueba (Dilución 10<sup>-2</sup>) y el grupo Control.

**Tabla 16. Recuperación de microorganismos específicos en medios selectivos/  
*Staphylococcus aureus***

Dilución 10 <sup>-2</sup> SELECCIÓN Y SUBCULTIVO					
FECHA	Número de ensayo	CEPAS ATCC	A	B	Control Negativo
			Grupo de Prueba	Grupo Control	Caldo Tripticasa de Soya Lecitina (0,05 %) Polisorbato 80 (2%)
Agar Manitol Salado Incubación: 30° C a 35° C por 18 - 72 h					
19/01/2024	1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	+	-
	2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	+	-
	3	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	+	-

**Interpretación:** Se observó recuperación del microorganismo *Staphylococcus aureus* en agar Manitol salado en el grupo de Prueba (Dilución 10<sup>-2</sup>) y el grupo Control.

## De acuerdo con el Objetivo específico 4: VALIDACIÓN DEL METODO DE NEUTRALIZACIÓN

### Eficacia del Neutralizante

**Tabla 17. Comparación de la Eficacia neutralizante en el grupo de Prueba A ( $10^{-1}$ ) en referencia al grupo Control (B)**

Estadísticas de grupo		Homogeneidad de varianzas						
		Prueba de Normalidad	Prueba de Levene	Prueba T			Conclusión de la prueba	
MICROORGANISMO (UFC)	Grupo	Media	Desviación estándar	p-valor	p-valor	Diferencia de medias		p-valor
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prueba (A) $10^{-1}$	85,04	0,84	0,193	0,641	0,296	0,464	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)	85,33	0,83	0,148				
<i>Staphylococcus aureus</i>	Prueba (A) $10^{-1}$	0,00	0,00	–	0,000	-59,000	0,000	Grupo de Prueba $\neq$ Grupo Control
	Control (B)	59,00	3,08	0,158				
<i>Bacillus subtilis</i>	Prueba (A) $10^{-1}$	0,00	0,00	–	0,003	-61,000	0,000	Grupo de Prueba $\neq$ Grupo Control
	Control (B)	61,15	0,78	0,742				
<i>Candida albicans</i>	Prueba (A) $10^{-1}$	82,67	1,62	0,571	0,762	-0,519	0,473	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)	83,19	1,36	0,799				
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Prueba (A) $10^{-1}$	51,67	0,91	0,175	1,00	-0,333	0,426	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)	52,00	0,82	0,605				

**Interpretación:** Para comparar los promedios, los dos grupos debían tener una distribución normal (para esto se realizó la Prueba de Shapiro Wilk) observándose un p-valor mayor 0,05 seguidamente se determinó la Homogeneidad de Varianzas mediante la prueba T, el cual mostro tener un p-valor mayor a 0,05 lo cual llevo para concluir que los promedios son iguales, de esa manera se demostró la eficacia adecuada del neutralizante.

## Eficacia del Neutralizante

**Tabla 18. Comparación de la Eficacia neutralizante en el grupo de Prueba A ( $10^{-2}$ ) en referencia al grupo Control (B)**

MICROORGANISMO (UFC)	Estadísticas de grupo		Desviación estándar	Prueba de Normalidad p-valor	Prueba de Levene p-valor	Homogeneidad de varianzas		
	Grupo	Media				Diferencia de medias	Prueba T p-valor	Conclusión de la prueba
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prueba (A) $10^{-2}$	85,82	1,43	0,855	0,110	0,481	0,395	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)	85,33	0,83	0,148				
<i>Staphylococcus aureus</i>	Prueba (A) $10^{-2}$	58,00	1,20	0,158	0,002	-1,000	0,385	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)	59,00	3,08	0,321				
<i>Bacillus subtilis</i>	Prueba (A) $10^{-2}$	60,48	0,56	0,256	0,371	-0,667	0,054	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)	61,15	0,78	0,742				
<i>Candida albicans</i>	Prueba (A) $10^{-2}$	83,70	2,31	0,474	0,366	0,519	0,570	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Grupo Control (B)	83,19	1,36	0,799				
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Prueba (A) $10^{-2}$	51,85	1,00	0,570	0,595	-0,148	0,735	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)	52,00	0,82	0,605				

**Interpretación:** Para comparar los promedios, los dos grupos debían tener una distribución normal (para esto se realizó la Prueba de Shapiro Wilk) observándose un p-valor mayor 0,05 seguidamente se determinó la Homogeneidad de Varianzas mediante la prueba T, el cual mostro tener un p-valor mayor a 0,05 lo cual llevo para concluir que los promedios son iguales, de esa manera se demostró la eficacia adecuada del neutralizante.

## Toxicidad del Neutralizante

**Tabla 19. Comparación de la toxicidad del Neutralizante en el Grupo Control (B) en referencia al grupo Viabilidad (C)**

MICROORGANISMO (UFC)	Estadísticas de grupo		Desviación estándar	Prueba de Normalidad p-valor	Prueba de Levene p-valor	Homogeneidad de varianzas		
	Grupo	Media				Diferencia de medias	Prueba T p-valor	Conclusión de la prueba
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Control (B)	85,33	0,83	0,148	0,460	-0,074	0,826	Grupo de Control = Grupo Viabilidad
	Viabilidad (C)	85,41	0,55	0,259				
<i>Staphylococcus aureus</i>	Control (B)	59,00	3,08	0,321	0,003	-0,259	0,821	Grupo de Control = Grupo Viabilidad
	Viabilidad (C)	59,26	1,32	0,152				
<i>Bacillus subtilis</i>	Control (B)	61,15	0,78	0,742	0,283	-0,333	0,451	Grupo de Control = Grupo Viabilidad
	Viabilidad (C)	61,48	1,03	0,318				
<i>Candida albicans</i>	Control (B)	83,19	1,36	0,799	0,553	-0,556	0,363	Grupo de Control = Grupo Viabilidad
	Viabilidad (C)	83,74	1,15	0,279				
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Control (B)	52,00	0,82	0,605	0,543	0,111	0,827	Grupo de Control = Grupo Viabilidad
	Viabilidad (C)	51,89	1,26	0,188				

**Interpretación:** Para comparar los promedios, los dos grupos debían tener una distribución normal (para esto se realizó la Prueba de Shapiro Wilk) observándose un p-valor mayor 0,05 seguidamente se determinó la Homogeneidad de Varianzas mediante la prueba T, el cual mostro tener un p-valor mayor a 0,05 lo cual llevo para concluir que los promedios son iguales, de esa manera se demostró la ausencia de toxicidad del neutralizante.

## De acuerdo con el Objetivo específico 5: PARAMETROS DE VALIDACIÓN

### EXACTITUD

**Tabla 20. Prueba de equivalencia de dos muestras: Grupo de prueba (A) Dilución 10<sup>-1</sup>/ Grupo Control (B)**

Hipótesis nula: Relación $\leq 0,5$ o Relación $\geq 2$ Hipótesis alterna: $0,5 < \text{Relación} < 2$ Nivel de significancia: 0,05										
MICROORGANISMO (UFC)	Grupo	Media	Desviación estándar	Porcentaje de recuperación (50 - 200 %)	Relación	Intervalo de Confianza de 90%	Grados de libertad	Valor T	Valor P	Conclusión de la prueba
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	85,04	0,84	99,7	0,997	(0,988; 1,005)	15	135,47	0,000	Se puede afirmar equivalencia
	Control (B)	85,33	0,83					-135,62	0,000	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	0,00	0,00	0,0	-	-	-	-	-	No se puede afirmar equivalencia
	Control (B)	59,00	3,08					-	-	
<i>Bacillus subtilis</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	0,00	0,00	0,0	-	-	-	-	-	No se puede afirmar equivalencia
	Control (B)	61,15	0,78					-	-	
<i>Candida albicans</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	82,67	1,62	99,4	0,994	(0,979; 1,009)	15	70,008	0,000	Se puede afirmar equivalencia
	Control (B)	83,19	1,36					-79,470	0,000	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	51,67	0,91	99,4	0,994	(0,980; 1,007)	15	77,000	0,000	Se puede afirmar equivalencia
	Control (B)	52,00	0,82					-83,920	0,000	

**Interpretación:** La prueba de hipótesis de dos colas, evaluó el porcentaje de recuperación entre grupos, la relación de las medias debía encontrarse entre 0,5 a 2; lo cual llevó a concluir y afirmar equivalencia con un intervalo de confianza del 90%.

**Tabla 21. Prueba de equivalencia de dos muestras: Grupo de prueba (A) Dilución 10<sup>-2</sup>/ Grupo Control (B)**

Hipótesis nula: Relación $\leq 0,5$ o Relación $\geq 2$ Hipótesis alterna: $0,5 < \text{Relación} < 2$ Nivel de significancia: 0,05										
MICROORGANISMO (UFC)	Grupo	Media	Desviación estándar	Porcentaje de recuperación (50 - 200 %)	Relación	Intervalo de Confianza de 90%	Grados de libertad	Valor T	Valor P	Conclusión de la prueba
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	85,81	1,43	100,6	1,000	(0,991; 1,010)	14	105,89	0,000	Se puede afirmar equivalencia
	Control (B)	85,33	0,83					14	-126,87	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	58,00	1,20	98,3	0,983	(0,951; 1,017)	10	43,749	0,000	Se puede afirmar equivalencia
	Control (B)	59,00	3,08					10	-28,660	
<i>Bacillus subtilis</i>	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	60,48	0,56	98,9	0,989	(0,980; 0,998)	14	131,97	0,000	Se puede afirmar equivalencia
	Control (B)	61,15	0,78					14	-111,51	
<i>Candida albicans</i>	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	83,70	2,31	100,6	1,006	(0,987; 1,026)	12	52,435	0,000	Se puede afirmar equivalencia
	Control (B)	83,19	1,36					12	-69,614	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	51,85	1,00	99,7	0,997	(0,983; 1,012)	15	71,708	0,000	Se puede afirmar equivalencia
	Grupo Control (B)	52,00	0,82					15	-81,666	

**Interpretación:** La prueba de hipótesis de dos colas, evaluó el porcentaje de recuperación entre grupos, la relación de las medias debía encontrarse entre 0,5 a 2; lo cual llevó a concluir y afirmar equivalencia con un intervalo de confianza del 90%.

**Tabla 22. Prueba de equivalencia de dos muestras: Grupo Control (B) / Grupo Viabilidad (C)**

Hipótesis nula: Relación $\leq 0,5$ o Relación $\geq 2$ Hipótesis alterna: $0,5 < \text{Relación} < 2$ Nivel de significancia: 0,05																																																																				
MICROORGANISMO (UFC)	Grupo	Media	Desviación estándar	Porcentaje de recuperación (50 - 200 %)	Relación	Intervalo de Confianza de 90%	Grados de libertad	Valor T	Valor P	Conclusión de la prueba																																																										
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Control (B)	85,33	0,83	99,9	0,999	(0,992;1,006)	13	145,81	0,000	Se puede afirmar equivalencia																																																										
	Viabilidad (C)	85,41	0,55					-186,44	0,000		<i>Staphylococcus aureus</i>	Control (B)	59,00	3,08	99,6	0,996	(0,967;1,030)	10	27,953	0,000	Se puede afirmar equivalencia	Viabilidad (C)	59,26	1,32	-43,990	0,000	<i>Bacillus subtilis</i>	Control (B)	61,15	0,78	99,5	0,995	(0,982; 1,007)	14	97,306	0,000	Se puede afirmar equivalencia	Viabilidad (C)	61,48	1,03	-84,217	0,000	<i>Candida albicans</i>	Control (B)	83,19	1,36	99,3	0,993	(0,981;1,006)	15	84,174	0,000	Se puede afirmar equivalencia	Viabilidad (C)	83,74	1,15	-94,608	0,000	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Control (B)	52,00	0,82	100,2	1,002	(0,985; 1,019)	13	75,833	0,000
<i>Staphylococcus aureus</i>	Control (B)	59,00	3,08	99,6	0,996	(0,967;1,030)	10	27,953	0,000	Se puede afirmar equivalencia																																																										
	Viabilidad (C)	59,26	1,32					-43,990	0,000		<i>Bacillus subtilis</i>	Control (B)	61,15	0,78	99,5	0,995	(0,982; 1,007)	14	97,306	0,000	Se puede afirmar equivalencia	Viabilidad (C)	61,48	1,03	-84,217	0,000	<i>Candida albicans</i>	Control (B)	83,19	1,36	99,3	0,993	(0,981;1,006)	15	84,174	0,000	Se puede afirmar equivalencia	Viabilidad (C)	83,74	1,15	-94,608	0,000	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Control (B)	52,00	0,82	100,2	1,002	(0,985; 1,019)	13	75,833	0,000	Se puede afirmar equivalencia	Viabilidad (C)	51,89	1,26	-58,710	0,000										
<i>Bacillus subtilis</i>	Control (B)	61,15	0,78	99,5	0,995	(0,982; 1,007)	14	97,306	0,000	Se puede afirmar equivalencia																																																										
	Viabilidad (C)	61,48	1,03					-84,217	0,000		<i>Candida albicans</i>	Control (B)	83,19	1,36	99,3	0,993	(0,981;1,006)	15	84,174	0,000	Se puede afirmar equivalencia	Viabilidad (C)	83,74	1,15	-94,608	0,000	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Control (B)	52,00	0,82	100,2	1,002	(0,985; 1,019)	13	75,833	0,000	Se puede afirmar equivalencia	Viabilidad (C)	51,89	1,26	-58,710	0,000																										
<i>Candida albicans</i>	Control (B)	83,19	1,36	99,3	0,993	(0,981;1,006)	15	84,174	0,000	Se puede afirmar equivalencia																																																										
	Viabilidad (C)	83,74	1,15					-94,608	0,000		<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Control (B)	52,00	0,82	100,2	1,002	(0,985; 1,019)	13	75,833	0,000	Se puede afirmar equivalencia	Viabilidad (C)	51,89	1,26	-58,710	0,000																																										
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Control (B)	52,00	0,82	100,2	1,002	(0,985; 1,019)	13	75,833	0,000	Se puede afirmar equivalencia																																																										
	Viabilidad (C)	51,89	1,26					-58,710	0,000																																																											

**Interpretación:** La prueba de hipótesis de dos colas, evaluó el porcentaje de recuperación entre grupos, la relación de las medias debía encontrarse entre 0,5 a 2; lo cual llevó a concluir y afirmar equivalencia con un intervalo de confianza del 90%.

## PRECISIÓN

**Tabla 23. Resultados de Coeficiente de Variación en los grupos de tratamiento.**

MICROORGANISMO (UFC)	Grupo	Número de casos	Media	Desviación estándar	Coeficiente de variación (< 15%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	9	85,04	0,84	0,99
	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	9	85,81	1,43	1,66
	Control (B)	9	85,33	0,83	0,98
	Viabilidad (C)	9	85,41	0,55	0,64
<i>Staphylococcus aureus</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	9	0,00	0,00	N/A
	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	9	58,00	1,20	2,07
	Control (B)	9	59,00	3,08	5,22
	Viabilidad (C)	9	59,26	1,32	2,23
<i>Bacillus subtilis</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	9	0,00	0,00	N/A
	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	9	60,48	0,56	0,92
	Control (B)	9	61,15	0,78	1,28
	Viabilidad (C)	9	61,48	1,03	1,67
<i>Candida albicans</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	9	82,67	1,62	1,97
	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	9	83,70	2,31	2,76
	Control (B)	9	83,19	1,36	1,63
	Viabilidad (C)	9	83,74	1,15	1,38
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	9	51,67	0,91	1,77
	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	9	51,85	1,00	1,93
	Control (B)	9	52,00	0,82	1,57
	Viabilidad (C)	9	51,89	1,26	2,43

N/A no aplica los recuentos son contantes =0

**Interpretación:** La mayor variación entre los recuentos se encontró en el Grupo Control para *Staphylococcus aureus* (5,22 %), cumpliendo la especificación del coeficiente de variación < 15%.

## ESPECIFICIDAD

**Tabla 24. Comparación entre grupo de Prueba (A) Dilución 10<sup>-2</sup>/ Grupo Control (B)**

MICROORGANISMO (UFC)	Grupo	p-valor	Conclusión
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	0,395	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	0,385	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)		
<i>Bacillus subtilis</i>	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	0,054	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)		
<i>Candida albicans</i>	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	0,570	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)		
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	0,735	Grupo de Prueba = Grupo Control
	Control (B)		

**Interpretación:** Para comparar los promedios, los dos grupos debían tener una distribución normal (para esto se realizó la Prueba de Shapiro Wilk) observándose un p-valor mayor 0,05 seguidamente se determinó la Homogeneidad de Varianzas mediante la prueba T, el cual mostro tener un p-valor mayor a 0,05 lo cual llevo para concluir que los promedios son iguales, de esa manera se demostró que el método de dilución neutralización fue el adecuado.

## LÍMITE DE DETECCIÓN

**Tabla 25. Límite de Detección de *Pseudomonas aeruginosa***

<b>Producto:</b> Amonio Cuaternario al 0,25%									
<b>Lote:</b> 01									
<b>Dilución:</b> 10 <sup>-2</sup>									
<b>Número de ensayo:</b> 1									
<b>Microorganismo:</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
<b>Recuento de Inóculo Estandarizado:</b>									
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN</b>									
<b>A</b>					<b>B</b>				
<b>Grupo de Prueba (UFC/mL)</b>					<b>Grupo Control (UFC/mL)</b>				
Muestra + Diluyente + Neutralizante + Inóculo					Diluyente + Neutralizante + Inóculo				
N° de Repeticiones	Número de UFC/mL					Número de UFC/mL			
	Inóculo	Dil 1	Dil 2	Dil 3		Inóculo	Dil 1	Dil 2	Dil 3
	84	42	21	11		84	42	21	11
1 <sup>era</sup> Repetición	+	+	+	+		+	+	+	+
2 <sup>da</sup> Repetición	+	+	+	+		+	+	+	+
3 <sup>era</sup> Repetición	+	+	+	+		+	+	+	+
4 <sup>ta</sup> Repetición	+	+	+	+		+	+	+	+
5 <sup>ta</sup> Repetición	+	+	+	+		+	+	+	+
<b>Resultado de Límite de Detección (&gt; 90%)</b>	>11 UFC					>11 UFC			

(+ ) Presencia de crecimiento

(-) Ausencia de crecimiento

**Interpretación:** Se evaluó la turbidez en las 5 réplicas simultaneas de cada dilución que permitió el crecimiento, lo cual estableció el límite mínimo de recuperación de microorganismos en los Grupos de ensayo no menor del 90 %

**Tabla 26. Límite de Detección de *Staphylococcus aureus***

<b>Producto:</b> Amonio Cuaternario al 0,25%								
<b>Lote:</b> 01								
<b>Dilución:</b> 10 <sup>-2</sup>								
<b>Número de ensayo:</b> 1								
<b>Microorganismo:</b> <i>Staphylococcus aureus</i>								
<b>Recuento de Inóculo Estandarizado:</b>								
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN</b>								
<b>A</b>					<b>B</b>			
<b>Grupo de Prueba (UFC/mL)</b>					<b>Grupo Control (UFC/mL)</b>			
Muestra + Diluyente + Neutralizante + Inóculo					Diluyente + Neutralizante + Inóculo			
Número de UFC/mL					Número de UFC/mL			
N° de Repeticiones	Inóculo	Dil 1	Dil 2	Dil 3	Inóculo	Dil 1	Dil 2	Dil 3
	67	34	17	8	67	34	17	8
1 <sup>era</sup> Repetición	+	+	+	+	+	+	+	+
2 <sup>da</sup> Repetición	+	+	+	-	+	+	+	+
3 <sup>era</sup> Repetición	+	+	+	+	+	+	+	+
4 <sup>ta</sup> Repetición	+	+	+	+	+	+	+	+
5 <sup>ta</sup> Repetición	+	+	+	-	+	+	+	+
<b>Resultado de Límite de Detección (&gt; 90%)</b>	>17 UFC				8 UFC			

(+ ) Presencia de crecimiento

(-) Ausencia de crecimiento

**Interpretación:** Se evaluó la turbidez en las 5 réplicas simultaneas de cada dilución que permitió el crecimiento, lo cual estableció el límite mínimo de recuperación de microorganismos en los Grupos de ensayo no menor del 90 %.

## ROBUSTEZ

Tabla 27. Estadística de muestras emparejadas en grupos de tratamiento

Estadísticas de muestras emparejadas									
Microorganismo	Grupo	UFC	Media	Número de casos	Desviación estándar	Diferencias de medias	Sig. (bilateral)	Conclusión	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	Par 1	FECHA 1	85,04	9	0,84	-0.111	0,081	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	85,15	9	0,84			
	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	Par 1	FECHA 1	85,81	9	1,43	-0.037	0,347	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	85,85	9	1,43			
	Control (B)	Par 1	FECHA 1	85,33	9	0,83	-0.074	0,169	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	85,41	9	0,91			
	Viabilidad (C)	Par 1	FECHA 1	85,41	9	0,55	-0.074	0,169	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	85,48	9	0,58			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	Par 1	FECHA 1	0,00	9	0,00	N/A	-	N/A
			FECHA 2	0,00	9	0,00			
	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	Par 1	FECHA 1	58,00	9	1,20	-0.074	0,169	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	58,07	9	1,18			
	Control (B)	Par 1	FECHA 1	59,00	9	3,08	-0.111	0,081	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	59,11	9	3,19			
	Viabilidad (C)	Par 1	FECHA 1	59,26	9	1,32	-0.111	0,081	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	59,37	9	1,35			
<i>Bacillus subtilis</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	Par 1	FECHA 1	0,00	9	0,00	-0.111	0,081	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	0,11	9	0,17			
	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	Par 1	FECHA 1	60,48	9	0,56	-0.037	0,347	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	60,52	9	0,58			
	Control (B)	Par 1	FECHA 1	61,15	9	0,78	-0.111	0,081	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	61,26	9	0,83			
	Viabilidad (C)	Par 1	FECHA 1	61,48	9	1,03	N/A	-	N/A

			FECHA 2	61,48	9	1,03			
<i>Candida albicans</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	Par 1	FECHA 1	82,67	9	1,62	-0.111	0,195	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	82,78	9	1,54			
	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	Par 1	FECHA 1	83,70	9	2,31	N/A	-	N/A
			FECHA 2	83,70	9	2,31			
	Control (B)	Par 1	FECHA 1	83,19	9	1,36	-0.074	0,169	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	83,26	9	1,30			
	Viabilidad (C)	Par 1	FECHA 1	83,74	9	1,15	-0.037	0,347	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	83,78	9	1,11			
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Prueba (A) 10 <sup>-1</sup>	Par 1	FECHA 1	51,67	9	0,91	-0.074	0,169	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	51,74	9	0,89			
	Prueba (A) 10 <sup>-2</sup>	Par 1	FECHA 1	51,85	9	1,00	-0.111	0,195	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	51,96	9	0,99			
	Control (B)	Par 1	FECHA 1	52,00	9	0,82	-0.111	0,195	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	52,11	9	0,87			
	Viabilidad (C)	Par 1	FECHA 1	51,89	9	1,26	-0.111	0,195	Promedios significativamente iguales
			FECHA 2	52,00	9	1,26			
N/A: No aplica. Los recuentos son constantes = 0									

**Interpretación:** Se observó que el promedio de los recuentos de los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* en un tiempo de incubación de 3 días (Fecha 1) en comparación a 5 días (Fecha 2) y los microorganismos *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* en un tiempo de incubación de 5 días (Fecha 1) en comparación a 7 días (Fecha 2) de incubación, no presentaron diferencias significativas en los recuentos, ya que se observó que el p-valor es mayor a 0,05 con un intervalo de 95% de confianza, el cual llevó a concluir que los promedios son significativamente iguales.

#### **4.1.2 Prueba de hipótesis**

Se demostró el cumplimiento de la estandarización de cepas, Promoción de crecimiento, Aptitud del Método, Validación del método de neutralización y los Parámetros de validación: Exactitud, Precisión, Especificidad, Límite de detección y Robustez, se encontraron dentro de las especificaciones establecidas, por el cual se da validez al método, rechazando la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alterna.

#### **4.1.3 Discusión de resultados**

La estandarización de cepas microbianas obtuvo resultados reproducibles menores a 100 UFC en todos los microorganismos de prueba, estos resultados son comparados con las especificaciones de la Farmacopea Americana NF 2023, el cual es usado de referencia para productos Farmacéuticos, donde indica que para la estandarización del inóculo no debe ser mayor de 100 UFC.

La Promoción de crecimiento permitió la recuperación de los microorganismos que no deben diferir un factor mayor de 2, el cual demuestra que los medios de cultivo se encontraban aptos para su uso en los ensayos de Aptitud y Validación microbiológica del dispositivo médico evaluado. El cual es comparable con la Farmacopea Americana NF 2023 para la evaluación de medios de cultivo utilizado en el análisis de productos Farmacéuticos, el cual especifica que la recuperación de microorganismos no debe diferir en factor mayor de 2 con respecto a un inóculo estandarizado.

La Aptitud del Método de recuento mediante la dilución y neutralización con Lecitina de Soya 0,5% y Polisorbato 80 4% en la dilución  $10^{-1}$  no neutralizo completamente al Amonio Cuaternario, el cual no se observó la recuperación de los microorganismos de prueba: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, pero en la dilución  $10^{-2}$  se logra neutralizar completamente al Amonio Cuaternario, permitiendo la recuperación de todos los microorganismos de prueba, en un porcentaje de recuperación que no difiere en un factor mayor de 2, en el estudio de Araujo et al (11) utilizó como método de neutralización, el uso de Lecitina de Soja 0,5% y 0,4 % de Polisorbato 80, obteniendo una recuperación de microorganismos dentro del factor 2. Asu vez Arias et al. (12) utilizando como neutralizante al polisorbato, presentando recuperación de microorganismos mayores al 70%.

La validación del método de neutralización presenta igualdad de promedios en todos los microorganismos y entre los grupos de Prueba (A) de la dilución  $10^{-2}$  en referencia al grupo control (B), observándose un p- valor mayor al 0,05 por el cual se demostró eficacia adecuada del neutralizante, a su vez también se demostró la ausencia de toxicidad del neutralizante al presentar igualdad en los recuentos del grupo Control (B) en referencia al grupo Viabilidad (C) , en la investigación de García y paredes (13) presentaron eficacia del neutralizante al obtener recuperación similar entre los grupos (A) y (B) y ausencia de toxicidad al comparar el grupo de (B) y (C).

En cuanto a la determinación de los Parámetros de la Validación: La exactitud de los porcentajes de recuperación demostró que los resultados de la relación de los promedios se

encontraron dentro del intervalo de confianza (0,5 a 2), el cual cumplieron cuando hay recuperación de microorganismos; a su vez para la Precisión entre los recuentos se observó que el máximo coeficiente de variación encontrado fue de 5,22 %. El parámetro del Límite de detección en la dilución  $10^{-2}$  para el microorganismo *Pseudomonas aeruginosa* recupero 11 UFC y para *Staphylococcus aureus* 17 UFC; el parámetro de Especificidad, estadísticamente demostró la recuperación de los microorganismos en una dilución  $10^{-2}$  en presencia del producto y neutralizante, finalmente se demostró la robustez del método al no haber diferencias significativas de los recuentos en las diferentes tiempos de incubación; en comparación con los hallazgos de Morales (16) obtuvieron resultados de Exactitud dentro del factor de 2 en comparación al control; en la Precisión demostró que en el grupo de prueba y grupo control, no presenta variabilidad significativa en los recuentos de acuerdo al valor de la prueba “t” de Student, para el Parámetro robustez en referencia a los tiempos de incubación existe similitud en los recuentos para ambos grupos, a su vez Sueros (15) en el año 2013 en su investigación obtuvo resultados de límite de detección 5 ufc/mL como la mínima cantidad detectada. Los resultados de Precisión de cada analista como entre ellos obtuvieron una desviación estándar relativa menor a 0,02. El parámetro de Robustez usando distintos medios de cultivo y tiempo de incubación se obtiene un coeficiente de variación de máximo 15%.

## CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

En esta investigación se concluyó:

**Primera:** En cuanto a los inóculos estandarizados cumplen con la especificación de la Farmacopea Americana en cuanto al número de unidades formadoras de colonias.

**Segunda:** La Promoción de Crecimiento de medios de cultivos demostró que estuvieron aptos para los análisis de Aptitud del Método de Recuento y Validación del ensayo microbiológico.

**Tercera:** La Prueba de Aptitud del Método de Recuento demostró la recuperación satisfactoria de los microorganismos en una dilución específica, a su vez permitió detectar e identificar los microorganismos específicos.

**Cuarta:** La Validación del Método de Neutralización con el uso de neutralizantes, resultó ser eficaz y no tóxico para los Microorganismos de prueba.

**Quinta:** Los Parámetros de validación: Exactitud, Precisión, Especificidad, Límite de detección y Robustez cumplieron de acuerdo con las especificaciones establecidas.

## 5.2 Recomendaciones

- Se recomienda que el analista que realice la validación sea la más calificada para realizar este ensayo.
- Este método puede adecuarse para otras investigaciones de Validación Microbiológica a dispositivos Médicos derivados de Amonio Cuaternario.
- De tener distintas concentraciones de Productos de Amonio Cuaternario, trabajar con el que presenta la concentración más alta de Amonio Cuaternario, para no modificar el neutralizante.

## REFERENCIAS

1. Chacón L, Rojas J. Resistencia a desinfectantes y su relación con la resistencia a los antibióticos. Scielo.sa.cr. [Internet]. 2020; 62(1):7-12. [Consultado el 10 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43463222002>
2. Gholizadeh A, Lotfipour F, Hallaj S. Quality control of Non Sterile Drug Product According to United States' Pharmacopeia Instruction. Iran J. Med Microbiol. [Internet]. 2019; 13(5):321-45. [Consultado el 10 de agosto de 2023] Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/fdd3/d08d8f8613bbce370e3a37b33b00c63e6423.pdf>
3. Katerji A, Trefi S, Bitar Y, Ibrahim A. Evaluation of new formulations for neutralizing antimicrobial preservatives in pharmaceutical preparations. Heliyon [Internet]. 2023;9(3):14555. [Consultado el 10 de agosto de 2023] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844023017620>
4. Buenas Prácticas de la OMS para laboratorios de Microbiología Farmacéutica (Red PARF Documento Técnico N° 11) [Internet]. Paho.org. Washington, DC: OPS, 2012. [Consultado el 10 de agosto de 2023] Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/buenas-practicas-oms-para-laboratorios-microbiologia-farmaceutica-red-parf-documento>
5. Dongo V. Ley N°29459 Ley de los Productos farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios. Rev. Perú Med Exp. Salud Publica [Internet]. 2009; 26(4):517-29. [Consultado el 11 de agosto de 2023] Disponible en: [http://www.cielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-463420090000400014](http://www.cielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-463420090000400014)

6. Decreto supremo que aprueba el Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Calidad de Productos Farmacéuticos. Decreto Supremo N° 017-2018-SA. Publicado en el Diario Oficial el Peruano, 20 de julio del 2018.
7. Decreto Supremo que modifica el Reglamento para el registro, control y vigilancia sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios y aprueba el Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. Decreto Supremo N° 021-2018-SA. Publicado en el Diario Oficial el Peruano, 20 de Agosto del 2018.
8. Canil A, Guffanti M, Verón L, Zaccardo R, Bitonte L, Mariani G. Métodos Microbiológicos Alternativos: Revisión del Proceso de validación para la implementación en la Industria Farmacéutica. Ciencia Reguladora [Internet]. 2020; 26–31. [Consultado el 21 de Agosto de 2023]. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1102038>
9. Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas. [Internet] Lima 18 de Setiembre del 2019; Disponible en: [https://www.digemid.minsa.gob.pe/Archivos/Alertas/2019/ALERTA\\_38-19.pdf](https://www.digemid.minsa.gob.pe/Archivos/Alertas/2019/ALERTA_38-19.pdf)
10. Ramos J, Cañaverl A, Camacho H. Gestión de la calidad de los dispositivos médicos. Guía de implementación ISO 13485. Signos, Investigación en Sistemas de Gestión, [Internet] 2021; 13 (2) [Consultado el 23 de Agosto de 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.15332/24631140.6663>
11. Araújo de Assis P, Borja de Andrade S, Carvalho de Oliveira C, Meneses de Araújo P, Grangeiro S, Vierira S. Development and validation of a microbial counting method for

- Mebendazole oral suspensión. *Braz J Pharm Sci.* [Internet] 2011; 47(3):555 – 63. [Consultado el 23 de Agosto de 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000300013>
12. Arias P, Diana L, Ortiz D, González A. Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado, elaborado en una industria farmacéutica. *Revista Cubana de Farmacia* [Internet] 2013; 47(2): p 178-184. [Consultado el 23 de Agosto de 2023]. Disponible en: <http://www.scielo.sld.cu/pdf/far/v47n2/far05213.pdf>
13. García A, Paredes E. Validación del esquema de neutralización para Recuento Total de Bacterias y Recuento Total de Hongos y Levaduras en matrices de medicamentos Amoxicilina cápsulas, Azitromicina tabletas y Trimetoprim Sulfametoxazol suspensión [Tesis en licenciatura en Química y Farmacia]. San salvador, El Salvador: Universidad Salvadoreña “Alberto Masferrer”; 2017. Disponible en: <https://usam.siabcloud.com/backendsiab/viewer/viewer.php?idobra=10975&urlindex=0>
14. Gordon O, Goverde M, Staerk A, Roesti D, Staerka A, Roestia D. Milliflex Quantum Validation for Bioburden Testing of Pharmaceuticals. *PDA J Pharm Sci Techno.* [Internet]. 2017; 71(3):206–24 [Consultado el 23 de Agosto de 2023]. Disponible en: <http://journal.pda.org/content/71/3/206.abstract>
15. Sueros G. Validación de un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel intralaboratorial. [Tesis de licenciatura Biólogo]. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013. Disponible en: [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/3430/Sueros\\_rg.pdf](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/3430/Sueros_rg.pdf)

16. Morales M. Validación del Examen Microbiológico del Bicarbonato de Sodio y Sulfadiazina de plata según USP vigente. [Tesis de licenciatura en Biología]. Lima: Universidad Ricardo Palma; 2018. Disponible en: [https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14138/1697/Morales\\_m.pdf?sequence=1](https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14138/1697/Morales_m.pdf?sequence=1)
17. Simbron M, Ysuhualas E. Validación de Aptitud del método microbiológico de recuento y microorganismos específicos para sulfametoxazol + trimetoprima en tableta recubierta. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Norbert Wiener; 2020. Disponible en: [https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/3931/T061\\_45807710\\_46818914\\_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/3931/T061_45807710_46818914_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
18. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. ABC de dispositivos médicos. [Internet].2013 [Consultado el 25 de Setiembre de 2023]. Disponible en: [https://www.invima.gov.co/sites/default/files/dispositivos-medicos/2023-10/abc\\_dispositivos-medicos.pdf](https://www.invima.gov.co/sites/default/files/dispositivos-medicos/2023-10/abc_dispositivos-medicos.pdf)
19. Decreto Supremo que aprueba el Reglamento que establece las Reglas de Clasificación y los Principios Esenciales de Seguridad y Desempeño de los Dispositivos Médicos. Decreto Supremo N° 003-2020-SA. Publicado en el diario oficial El Peruano, 06 de febrero de 2020.
20. Ley de los productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios. Ley N° 29459. Congreso de la Republica; 25 de Noviembre de 2009.

21. Diomedi A, Chacón E, Delpiano L, Hervé B, Jemenao M, Medel M, et al. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. Rev. Chil. Infectol. [Internet]. 2017 Abr; 34(2): 156-174. [Consultado el 25 de setiembre de 2023] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000200010>
22. Gaviola S, Lombardo G, Malinovsky V, Ferreiros L, Sapoznik M, Contreras A, et.al. Desinfectantes y Antisépticos [Internet]. Ministerio de Trabajo, Empleo y Seguridad Social. [Consultado el 26 de setiembre de 2023]. Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/guia\\_desinfectantes\\_y\\_antisepticos\\_septiembre\\_2021\\_0.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/guia_desinfectantes_y_antisepticos_septiembre_2021_0.pdf)
23. Ramos Y, Guillermina A. Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes de bacterias aisladas de ambientes naturales. Rev. Soc. Ven. Microbiol. [Internet]. 2011 Dic; 31(2): 130-137. [Consultado el 28 de setiembre de 2023]. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562011000200009](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000200009)
24. Kenneth I, Bond E, Manning F. Resource Sharing in Biomedical Research [Internet]. Washington, D.C.1996. División of Health Sciences Policy. [consultado el 28 de setiembre de 2023]. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK209078/pdf/Bookshelf\\_NBK209078.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK209078/pdf/Bookshelf_NBK209078.pdf)
25. Paz V, Mangwani S, Martínez A, Álvarez D, Solano S, Vázquez R. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Rev. Chil. Infectol. [Internet]. 2019; 36(2): 180-189. [Consultado el 29 de setiembre de 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>

26. Pasachova J, Ramírez S, Muñoz L. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. Nova [Internet]. 2019; 27K 32: 25-38. [Consultado el 29 de setiembre de 2023]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S179424702019000200025&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S179424702019000200025&lng=en)
27. Villarreal M, Villa E, Cira L, Estrada M, Parra Fannie I, Santos S. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Rev. Mex. Fito patol [Internet]. 2018; 36 (1): 95-130. [Consultado el 29 de setiembre de 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
28. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. Horiz. Med. [Internet]. 2018; 18 (1): 75-85. [Consultado el 30 de setiembre de 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n1.11>
29. Organización Panamericana de la Salud. Microbiología: lo Esencial y lo Práctico. Guatemala: PAHO; 2005. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51601>
30. Salazar C, León A. Características Morfológicas Microscópicas de especies de *Aspergillus* asociadas a infecciones en humanos. Hech Microb. [Internet]. 2014;3(2):93-6. [Consultado el 01 de Octubre de 2023]. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/18741>
31. Arrúa A, Moreno E, Yolanda M, Moreno J, Ernesto M, Flores A. *Aspergillus* Aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. Rev. Mex. Cienc. Agríc [Internet]. 2012. vol.3, n.5, pp.1047-1052. [Consultado el 01 de octubre de 2023]. Disponible en:

[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S20070934201200050001](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S20070934201200050001)

6

32. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Capítulos Generales (61) Examen Microbiológico de productos No Estériles: Pruebas de Recuento Microbiano. USP-NF 2023. Rockville; Maryland; 2023. p. 1 - 7.
33. Cerra H, Fernández M, Horak C, Lagomarsino M, Torno G, Zarankin E. Manual de Microbiología Aplicada a la Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos, 2013. p. 514.
34. Sánchez D. Evaluación del Tiempo de Vigencia del Agar P para *Pseudomonas* (PSP) y del Agar F para *Pseudomonas* (PSF) Almacenados en Frascos. [Trabajo de suficiencia profesional]. Perú. Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2022. Disponible en: [https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/11236/Evaluacion\\_SanchezMu%c3%b1oz\\_Diego.pdf](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/11236/Evaluacion_SanchezMu%c3%b1oz_Diego.pdf)
35. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Capítulos Generales (1223) Validación de Métodos Microbiológicos Alternativos USP-NF 2023. Rockville; Maryland; 2023. p. 1-14.
36. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Capítulos Generales (62) Examen Microbiológico de Productos No estériles: Pruebas de Microorganismos Específicos. USP-NF 2023. Rockville; Maryland; 2023. p. 1-10.
37. Guía para realizar la Aptitud de Métodos Microbiológicos. [Internet]. Instituto de Salud Pública de Chile. 2019 [consultado el 06 de octubre del 2023]. Disponible en: <https://www.ispch.cl/sites/default/files/Res.%20aptitud.pdf>

38. Hernández A. Aportaciones del estudio de la actividad antimicrobiana de los desinfectantes y antisépticos. [Tesis Doctoral en Biología]. España: Universidad Autónoma de Barcelona; 2006. Disponible en: <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2006/tdx-0601107-162233/ahr1de1.pdf>
39. Sandle T. Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control. Cambridge, Woodhead Publishing; 2016. 295 p.
40. Guía para la validación de métodos Microbiológicos. [Internet] Organismo Argentino de Acreditación; 2013. [Consultado el 07 de Octubre de 2023]. Disponible en: <https://docplayer.es/15400162-Guia-para-la-validacion-de-metodos-microbiologicos.html>
41. Morillas P, et al. Guía Eurachem: La Adecuación al uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de laboratorio para la Validación de métodos y temas relacionados [Internet] . Eurolab España. 1ª ed. 2016. [Consultado el 07 de Octubre de 2023]. Disponible en: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_ES.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf)
42. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Capítulos Generales (1227). Validación de Recuperación Microbiana en Artículos Farmacopeicos. USP-NF 2023. Rockville; Maryland; 2023. p. 1 – 6.
43. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Capítulos Generales (1227). Validación de Procedimiento Farmacopeicos. USP-NF-2023. Rockville; Maryland; 2023. p. 1-6.
44. Aguirre L, Pérez J, Pujol M. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos en la industria. Sección catalana, Madrid,1998. p. 331.
45. Ortega M, Rodríguez C, Zhurbenko R. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Rev. Cubana Hig. Epidemiol [Internet]. 2013; 51(1): 111-121. [Consultado el 08 de Octubre de 2023] Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S156130032013000100011&lng=e](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156130032013000100011&lng=e)  
s.

46. Guía para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo en aguas. [Internet]. Asociación Española de Abastecimiento de Agua y Saneamiento. 2022. [Consultado el 08 de Octubre de 2023]. Disponible en: [https://www.aeas.es/images/Doc\\_Manu\\_Guia/Parte\\_II\\_-\\_Gua\\_Apdo\\_7\\_2\\_13102022.pdf](https://www.aeas.es/images/Doc_Manu_Guia/Parte_II_-_Gua_Apdo_7_2_13102022.pdf)
47. López P. Metodología de la Investigación Social Cuantitativa. [Internet]. Bellaterra. Cerdanyola del Vallès. Universidad Autónoma de Barcelona. 2020; [Consultado el 09 de Octubre de 2023]. Disponible en: [https://ddd.uab.cat/pub/caplli/2020/232105/metinvsoccua\\_cap1-1a2020.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/caplli/2020/232105/metinvsoccua_cap1-1a2020.pdf)
48. Cadena P, et al. Métodos cuantitativos, métodos cualitativos o su combinación en la investigación: un acercamiento en las ciencias sociales. Rev. Mex de Cienc Agric [Internet]. 2017; 8(7):1603–17. [Consultado el 09 de Octubre de 2023]. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S200709342017000701603](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200709342017000701603)
49. Vargas Z, La Investigación Aplicada: Una forma de conocer las realidades con evidencia científica. revista Educación [Internet]. 2009; 33 (1):155-165. [Consultado el 09 de Octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44015082010>
50. Ramos C. Editorial: Diseños de investigación experimental. Ciencia América [Internet]. 2021; 10(1):1–7. [Consultado el 09 de Octubre de 2023]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7890336>

## Anexo 1: Matriz de consistencia

### VALIDACIÓN DEL ENSAYO MICROBIOLÓGICO DE UNA SOLUCIÓN DE AMONIO CUATERNARIO AL 0,25% PARA LIMPIEZA DE SUPERFICIES, BASADO EN LA FARMACOPEA AMERICANA VIGENTE. LIMA 2023”

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Diseño Metodológico
Problema general	Objetivo general	Hipótesis General		
¿Será posible validar el ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario al 0,25 % para limpieza de superficies, basado en la Farmacopea Americana vigente. ¿Lima 2023?	Determinar la validez del ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario al 0,25% para limpieza de superficies, basado en la Farmacopea Americana vigente. Lima 2023	Ho: No existe validez del ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario al 0,25% para limpieza de superficies, basado en la Farmacopea Americana Vigente. Ha: Existe validez del ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario al 0,25% para limpieza de superficies, basado en la Farmacopea Americana Vigente.	Validación	<b>Método:</b> Hipotético - Deductivo <b>Enfoque:</b> Cuantitativo <b>Tipo:</b> Aplicativo <b>Diseño:</b> Experimental <b>Corte:</b> Transversal <b>Nivel o alcance:</b> Explicativo
Problemas específicos	Objetivos específicos	Hipótesis Especificas		
¿Cómo se estandariza las cepas de referencia basado en la Farmacopea Americana?	Estandarizar las cepas de referencia basado en la Farmacopea Americana	No aplica		
¿Cómo se verifica la prueba de Promoción de crecimiento de los medios de cultivo basado en la Farmacopea Americana?	Realizar la prueba de Promoción de Crecimiento de los medios de cultivo basados en la Farmacopea Americana.	No aplica		
¿Cómo se realiza el procedimiento de Aptitud del Método en presencia del producto basado la Farmacopea Americana?	Determinar la Aptitud del método en presencia del producto basado la Farmacopea Americana	No aplica		
¿Cuál será la Validación del método de neutralización más adecuado para neutralizar las propiedades antimicrobianas basado en la Farmacopea Americana?	Determinar la Validación del método de Neutralización más adecuado para neutralizar las propiedades antimicrobianas basado en la Farmacopea Americana.	No aplica		
¿Cuáles son los Parámetros de Validación del ensayo microbiológico basado en la Farmacopea Americana?	Determinar los Parámetros de Validación del ensayo Microbiológico basado en la Farmacopea Americana	No aplica		

**Anexo 2: Instrumento de recolección de datos**

**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS  
DE ESTANDARIZACIÓN DE CEPAS DE PRUEBA**

FECHA DE ESTANDARIZACIÓN: .....

DILUYENTE: .....

EQUIPO UTILIZADO: .....

RECuento EN PLACA						
CEPA DE PRUEBA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
ABSORBANCIA						
DILUCIONES	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>
TEMPERATURA / TIEMPO DE INCUBACIÓN	30° C - 35° C 72 horas			20° C - 25° C 5 días		
1 <sup>ra</sup> PLACA						
2 <sup>da</sup> PLACA						
3 <sup>ra</sup> PLACA						
4 <sup>ta</sup> PLACA						
5 <sup>ta</sup> PLACA						
PROMEDIO UFC/mL						

Observaciones:

---



---



---

## FORMATO DE REGISTRO DE PRUEBA DE PROMOCIÓN E INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO

FECHA DE ANÁLISIS: ..... FECHA DE PREPARACIÓN: .....  
 FECHA DE LECTURA: ..... MARCA DE MEDIO DE CULTIVO: .....  
 MEDIO DE CULTIVO: .....

### I. PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO ( )

CEPAS DE PRUEBA					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
RECuento DE INÓCULO ESTANDARIZADO					
PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO RECuento UFC/mL					
CONTROL NEGATIVO					
RESULTADO (%) 50 - 200%					

Medios líquidos: (+) Presencia de Crecimiento (-) Ausencia de Crecimiento (/) No aplica

### II. PROPIEDADES INDICADORAS DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO E INHIBITORIAS DE LOS MEDIOS ( )

CEPAS DE PRUEBA				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
RECuento DE INÓCULO ESTANDARIZADO				
PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO RECuento UFC/mL				
PRUEBA INHIBITORIA				
CONTROL NEGATIVO				
RESULTADO (%) 50 - 200 %				

Medios líquidos: (+) Presencia de Crecimiento (-) Ausencia de Crecimiento (/) No aplica

Observaciones:

---



---



---

## FORMATO DE REGISTRO DE LA PRUEBA DE LA APTITUD DEL MÉTODO DE RECuento Y MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS

Producto /N° Lote
Fecha:
Dilución:
Número de ensayo:

APTITUD DEL MÉTODO DE RECuento Y MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS											
RECUPERACIÓN DE MICROORGANISMOS EN PRESENCIA DEL PRODUCTO											
CEPAS ATCC	A				B				A/B	Control Negativo	% Recuperación
	Grupo de Prueba (UFC/mL)				Grupo Control (UFC/mL)				Factor		
	Muestra + Diluyente + Neutralizante + Inóculo				Diluyente +Neutralizante + Inóculo						
	Recuento de UFC/mL			Promedi o de UFC/mL	Recuento de UFC/mL			Promedio de UFC /mL			
Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1		Placa 2	Placa 3					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027										Caldo Trypticasa de Soya Lecitina (0,5 %) Polisorbato 80 (4%)	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538											
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633											
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231											
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404											
Dilución 10 <sup>-2</sup> DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS											
	A				B				Control Negativo		
CEPAS ATCC	Grupo de Prueba (UFC/mL)				Grupo Control (UFC/mL)				Caldo Trypticasa de Soya Lecitina (0,5 %) Polisorbato 80 (4%)		
	Muestra + Diluyente Neutralizante + Inóculo				Diluyente + Neutralizante + Inóculo						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027											
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538											

(+) Presencia de crecimiento

(-) Ausencia de crecimiento

Observaciones:

---



---



---

## FORMATO DE VALIDACIÓN DE MÉTODO DE NEUTRALIZACIÓN EN GRUPOS DE TRATAMIENTO

Producto:
Fecha:
Dilución:
Tiempo de incubación:

<b>COMPARACION DE GRUPOS DE TRATAMIENTO</b>														
<b>Microorganismo:</b>														
<b>Número de Repeticiones</b>	<b>A</b>			<b>B</b>				<b>C</b>			<b>Control Negativo</b>			
	<b>Grupo de Prueba (UFC/mL)</b>			<b>Grupo Control (UFC/mL)</b>				<b>Grupo Viabilidad (UFC/mL)</b>						
	Muestra + Diluyente + Neutralizante + Inóculo			Diluyente + Neutralizante + Inóculo				Diluyente + Inóculo			Caldo Trypticase de Soya Lecitina (0,5 %) Polisorbato 80 (4%)			
	<b>Recuento de UFC/mL</b>			<b>Recuento de UFC/mL</b>				<b>Recuento de UFC/mL</b>			<b>Promedio de UFC/mL</b>			
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Promedio de UFC/mL	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Promedio de UFC/mL	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Promedio de UFC/mL		
1 <sup>er</sup> Ensayo N° de lote:														
2 <sup>do</sup> Ensayo N° de lote:														
3 <sup>er</sup> Ensayo N° de lote:														
4 <sup>to</sup> Ensayo N° de lote:														
5 <sup>to</sup> Ensayo N° de lote:														
6 <sup>to</sup> Ensayo N° de lote:														
7 <sup>mo</sup> Ensayo N° de lote:														
8 <sup>vo</sup> Ensayo N° de lote:														
9 <sup>no</sup> Ensayo N° de lote:														
<b>PROMEDIO</b>														

(-) Ausencia de crecimiento

Observaciones:

---



---



---

## FORMATO DE REGISTRO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN

Producto /N° Lote:
Fecha:
Dilución:
Número de ensayo:

<b>LÍMITE DE DETECCIÓN</b>								
<b>Microorganismo:</b>								
<b>Recuento de Inóculo Estandarizado:</b>								
	<b>A</b>				<b>B</b>			
	<b>Grupo de Prueba (UFC/mL)</b>				<b>Grupo Control (UFC/mL)</b>			
	Muestra + Diluyente + Neutralizante + Inóculo				Peptona + Diluyente + Neutralizante + Inóculo			
N° de Repeticiones	Número de UFC/mL				Número de UFC/mL			
	Inóculo	Dil 1	Dil2	Dil 3	Inóculo	Dil 1	Dil 2	Dil 3
1 <sup>ra</sup> Repetición								
2 <sup>da</sup> Repetición								
3 <sup>ra</sup> Repetición								
4 <sup>ta</sup> Repetición								
5 <sup>ta</sup> Repetición								
<b>Resultado de Límite de Detección (&gt; 90%)</b>								

(+) Presencia de crecimiento

(-) Ausencia de crecimiento

Observaciones:

---



---



---

### Anexo 3: Certificado de Validez del contenido del instrumento

**CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DE LOS INSTRUMENTOS**

**TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: "VALIDACIÓN DEL ENSAYO MICROBIOLÓGICO DE UNA SOLUCIÓN DE AMONIO CUATERNARIO AL 0,25% PARA LIMPIEZA DE SUPERFICIES, BASADO EN LA FARMACOPEA AMERICANA VIGENTE, LIMA 2023"**

N.º	DIMENSIONES / ítems	Pertinencia <sup>1</sup>		Relevancia <sup>2</sup>		Claridad <sup>3</sup>		Sugerencias
		Si	No	Si	No	Si	No	
	<b>VARIABLE 1: Validación</b>							
	<b>DIMENSIÓN 1: Estandarización de Cepas</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
1	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 2: Promoción de crecimiento</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
2	Recuento de UFC / Crecimiento	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 3: Aptitud del Método</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
3	Recuento de UFC /Crecimiento	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 4: Efectividad del Neutralizante</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
4	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 5: Toxicidad del Neutralizante</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
5	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 6: Exactitud</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
6	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 7: Precisión</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
7	Recuento de UFC	✓		✓		✓		

<b>DIMENSION 8: Especificidad</b>		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
<b>8</b>	Recuento de UFPC	✓		✓		✓		✓	
<b>DIMENSION 9: Limite de detección</b>		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
<b>9</b>	Crecimiento	✓		✓		✓		✓	
<b>DIMENSION 10: Robustez</b>		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
<b>10</b>	Recuento de UFPC	✓		✓		✓		✓	

Observaciones (precisar si hay suficiencia): Si hay suficiencia

Opinión de aplicabilidad:   Aplicable [ x ]   Aplicable después de corregir [ ]   No aplicable [ ]

Apellidos y nombres del juez validador. Dr: **PARREÑO TIPIAN, JUAN MANUEL**

DNI: 10326579

Especialidad del validador: **Dr. Juan Manuel Parreño Tiplan**

<sup>1</sup>Pertinencia: El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

<sup>2</sup>Relevancia: El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

<sup>3</sup>Ciudadad: Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

Nota: Suficiencia, se dice suficiencia cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión

12 de noviembre del 2023.



Firma del Experto Informante

**CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DE LOS INSTRUMENTOS**

**TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: "VALIDACIÓN DEL ENSAYO MICROBIOLÓGICO DE UNA SOLUCIÓN DE AMONIO CUATERNARIO AL 0,25% PARA LIMPIEZA DE SUPERFICIES, BASADO EN LA FARMACÓPEA AMERICANA VIGENTE, LIMA 2023"**

N.º	DIMENSIONES / ítems	Pertinencia <sup>1</sup>		Relevancia <sup>2</sup>		Claridad <sup>3</sup>		Sugerencias
		Si	No	Si	No	Si	No	
	<b>VARIABLE 1: Validación</b>							
	<b>DIMENSIÓN 1: Estandarización de Cepas</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
1	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 2: Promoción de crecimiento</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
2	Recuento de UFC / Crecimiento	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 3: Aptitud del Método</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
3	Recuento de UFC / Crecimiento	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 4: Efectividad del Neutralizante</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
4	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 5: Toxicidad del Neutralizante</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
5	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 6: Exactitud</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
6	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 7: Precisión</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
7	Recuento de UFC	✓		✓		✓		

<b>DIMENSION 8: Especificidad</b>		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
<b>8</b>	Recuento de UFC	✓		✓		✓		✓	
<b>DIMENSION 9: Limite de detección</b>		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
<b>9</b>	Crecimiento	✓		✓		✓		✓	
<b>DIMENSION 10: Robustez</b>		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
<b>10</b>	Recuento de UFC	✓		✓		✓		✓	

Observaciones (precisar si hay suficiencia): SI HAY SUFICIENCIA

Opinión de aplicabilidad:   Aplicable [ X ]           Aplicable después de corregir [   ]           No aplicable [   ]

Apellidos y nombres del juez validador. Dr/ Mg: **CARLOS A. CANO PEREZ**

DNI: **06062363**

Especialidad del validador: **DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUIMICA**

<sup>1</sup>Pertinencia: El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

<sup>2</sup>Relevancia: El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

<sup>3</sup>Claridad: Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

Nota: Suficiencia, se dice suficiencia cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión

**14 de Noviembre del 2023**

*Carlos A Cano P*

Firma del Experto Informante

**CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DE LOS INSTRUMENTOS**

**TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: "VALIDACIÓN DEL ENSAYO MICROBIOLÓGICO DE UNA SOLUCIÓN DE AMONIO CUATERNARIO AL 0,25% PARA LIMPIEZA DE SUPERFICIES, BASADO EN LA FARMACÓPEA AMERICANA VIGENTE, LIMA 2023"**

N.º	DIMENSIONES / ítems	Pertinencia <sup>1</sup>		Relevancia <sup>2</sup>		Claridad <sup>3</sup>		Sugerencias
		Si	No	Si	No	Si	No	
	<b>VARIABLE 1: Validación</b>							
	<b>DIMENSIÓN 1: Estandarización de Cepas</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
1	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 2: Promoción de crecimiento</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
2	Recuento de UFC / Crecimiento	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 3: Aptitud del Método</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
3	Recuento de UFC / Crecimiento	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 4: Efectividad del Neutralizante</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
4	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 5: Toxicidad del Neutralizante</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
5	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 6: Exactitud</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
6	Recuento de UFC	✓		✓		✓		
	<b>DIMENSIÓN 7: Precisión</b>	Si	No	Si	No	Si	No	
7	Recuento de UFC	✓		✓		✓		

<b>DIMENSION 8: Especificidad</b>		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
<b>8</b>	Recuento de UFC	✓		✓		✓		✓	
<b>DIMENSION 9: Limite de detección</b>		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
<b>9</b>	Crecimiento	✓		✓		✓		✓	
<b>DIMENSION 10: Robustez</b>		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
<b>10</b>	Recuento de UFC	✓		✓		✓		✓	

Observaciones (precisar si hay suficiencia): Ninguna

Opinión de aplicabilidad:   Aplicable [ X ]   Aplicable después de corregir [ ]   No aplicable [ ]

Apellidos y nombres del juez validador. Mg: Lauro Socrates Pinedo Panduro

DNI: 43112184

Especialidad del validador: Industria Farmacéutica.

<sup>1</sup>Pertinencia: El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

<sup>2</sup>Relevancia: El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

<sup>3</sup>Claridad: Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

Nota: Suficiencia, se dice suficiencia cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión

14 de Noviembre de 2023




-----  
C.F. LAURO PINEDO, Mg

COFP N° 15133

-----  
Firma del Experto Informante

**Anexo 4: Confiabilidad del instrumento**

No aplica

**Anexo 5: Aprobación del Comité de ética**

**Universidad  
Norbert Wiener**

**RESOLUCIÓN N° 175-2024-DFFB/UPNW**

Lima, 10 de enero de 2024

**VISTO:**

El Acta N° 184 donde la Unidad Revisora de Asuntos Éticos de la FFYB aprueba la no necesidad de ser evaluado el proyecto por el Comité de Ética de la Universidad que presenta el/la tesista: REYES VILLALOBOS, DANIEL RAFAEL, egresado (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

**CONSIDERANDO:**


Que es necesario proseguir con la ejecución del proyecto de tesis, presentado a la facultad de farmacia y bioquímica.

En uso de sus atribuciones, el decano de la facultad de farmacia y bioquímica;

**RESUELVE:**

**ARTÍCULO ÚNICO:** Aprobar el proyecto de tesis titulado: "VALIDACIÓN DEL ENSAYO MICROBIOLÓGICO DE UNA SOLUCIÓN DE AMONIO CUATERNARIO AL 0,25% PARA LIMPIEZA DE SUPERFICIES, BASADO EN LA FARMACOPEA AMERICANA VIGENTE. LIMA 2023" presentado por el/la tesista: REYES VILLALOBOS, DANIEL RAFAEL, autorizándose su ejecución.

Regístrese, comuníquese y archívese.

  
**Dr. Manuel Jesús Mayorga Espichan**  
Decano de la Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Universidad Privada Norbert Wiener

uwienner.edu.pe    info@uwienner.edu.pe / 706 5655 - 706 5100    Av. Arequipa  
3111, Lima Sur y Universidad  
Norbert Wiener

**Anexo 6: Carta de aprobación de la institución para la recolección de datos**

Lima 10 de enero 2024

Laboratorio Roker Perú S.A

Asunto: Respuesta a Solicitud de autorización para realizar pruebas de Validación del ensayo microbiológico de una solución de Amonio Cuaternario.

Yo, Cesar Chuquillanqui Bernaola Director Técnico de Laboratorio Roker Perú, con número de colegiatura C.Q.F.P:15890, autorizo que se realicen las pruebas solicitadas para el desarrollo de tesis de título: "VALIDACIÓN DEL ENSAYO MICROBIOLÓGICO DE UNA SOLUCIÓN DE AMONIO CUATERNARIO AL 0,25% PARA LIMPIEZA DE SUPERFICIES, BASADO EN LA FARMACOPEA AMERICANA VIGENTE. LIMA 2023", en el cual se utilizará las instalaciones, equipos y materiales durante los procesos de las distintas etapas de investigación.

Así mismo dicha investigación se ejecutará en el mes de enero del presente año y culminará dependiendo de los resultados obtenidos.

Por lo tanto, me comprometo que cumplan con las Buenas Practicas de Laboratorio e investigación y con el cronograma de supervisión de la ejecución según corresponda.

Atentamente

Firma y Sello  ROKER PERU S.A.

  
D.F. Cesar Luis Chuquillanqui Bernaola  
DIRECTOR TÉCNICO  
C.O.F.P. 15890

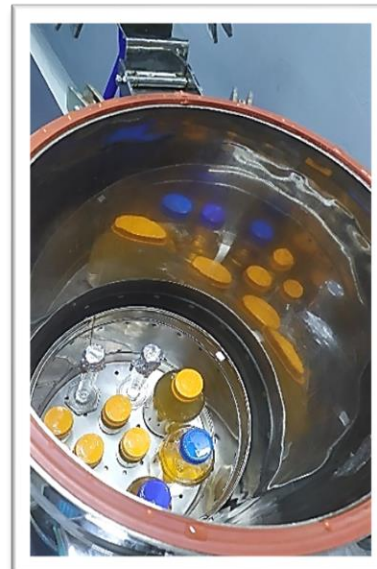
**ROKER PERÚ S.A.**  
Calle La Milla N° 220, Urb. La Milla  
San Martín de Porres, Lima - Perú  
Central: +51(1) 719 0707 / 715 0190  
Ventas: +51(1) 713 4466  
Cel.: +51) 997 508 549 / 994 604 274  
E-mail: info@roker.com.pe Web: www.roker.com.pe



## Anexo 7: Testimonios fotográficos



**Imagen 1.** Preparación de medios de cultivo



**Imagen 2.** Esterilización en autoclave



**Imagen 4.** Estandarización de cepas ATCC



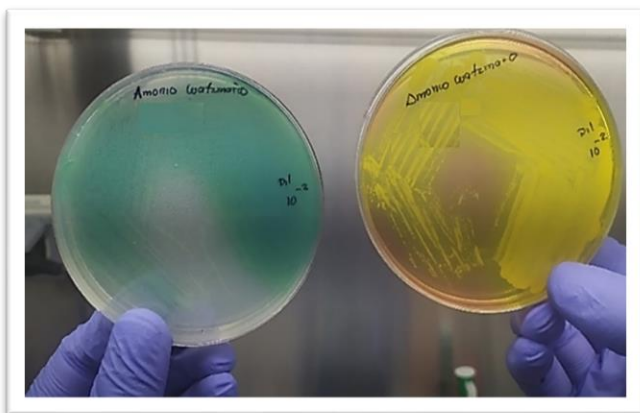
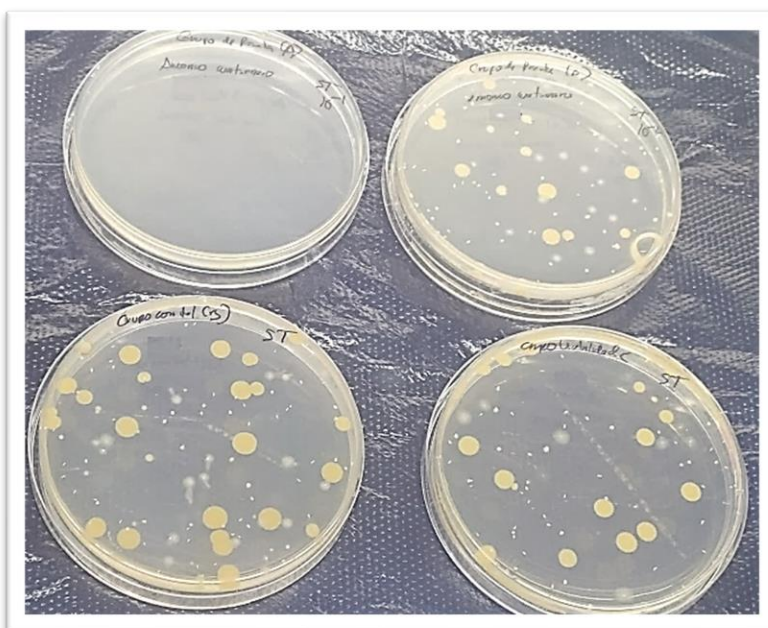
**Imagen 3.** Dilución y preparación de un ensayo independiente de los Grupos A, B y C.



**Imagen 5.** Recuento de unidad formadoras de colonias (UFC)

**Imagen 6.** Recuperación de Microorganismos:

*Staphylococcus aureus* a partir de la dilución  $10^{-2}$  en el Grupo de Prueba (A)



**Imagen 7.** Recuperación de Microorganismos específicos en la dilución  $10^{-2}$  de las cepas:

- Izquierda: Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en Agar Cetrimide
- Derecha: Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol Salado

## Anexo 8: Informe del asesor de Turnitin

Reporte de similitud	
NOMBRE DEL TRABAJO <b>TESIS.docx</b>	AUTOR <b>Daniel Reyes Villalobos</b>
RECUENTO DE PALABRAS <b>15809 Words</b>	RECUENTO DE CARACTERES <b>79958 Characters</b>
RECUENTO DE PÁGINAS <b>75 Pages</b>	TAMAÑO DEL ARCHIVO <b>2.4MB</b>
FECHA DE ENTREGA <b>Mar 28, 2024 10:32 PM GMT-5</b>	FECHA DEL INFORME <b>Mar 28, 2024 10:33 PM GMT-5</b>
<p>● <b>12% de similitud general</b></p> <p>El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 11% Base de datos de Internet</li> <li>• Base de datos de Crossref</li> <li>• 6% Base de datos de trabajos entregados</li> <li>• 1% Base de datos de publicaciones</li> <li>• Base de datos de contenido publicado de Crossref</li> </ul> <p>● <b>Excluir del Reporte de Similitud</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Material bibliográfico</li> <li>• Coincidencia baja (menos de 10 palabras)</li> </ul>	

## **Anexo 9: Materiales y equipos de Ensayo**

### **MATERIALES Y CRISTALERIA**

- Micropipetas automáticas de rango de medición de 5 a 200 ul y de 100 a 1000 ul
- Pipetas de 1 mL, 5mL y 10 mL descartable estériles
- Placas de Petri descartable estériles
- Tips estériles
- Asa de siembra descartable estéril
- Espátula de Drigaslky
- Cubetas de Cuarzo
- Probeta graduada de 100 mL
- Frasco de vidrio de tapa rosca de 100, 200 y500 mL
- Tubos de ensayo con tapa rosca estériles

### **MEDIOS DE CULTIVO**

- Caldo Tripticasa de Soya
- Caldo Sabouraud
- Buffer Peptona
- Agar Tripticasa de soya
- Agar Sabouraud Dextrosa
- Agar Cetrimide
- Agar Manitol Salado

**REACTIVOS**

- Lecitina de soya
- Polisorbato 80 (Tween 80)
- Glicerol

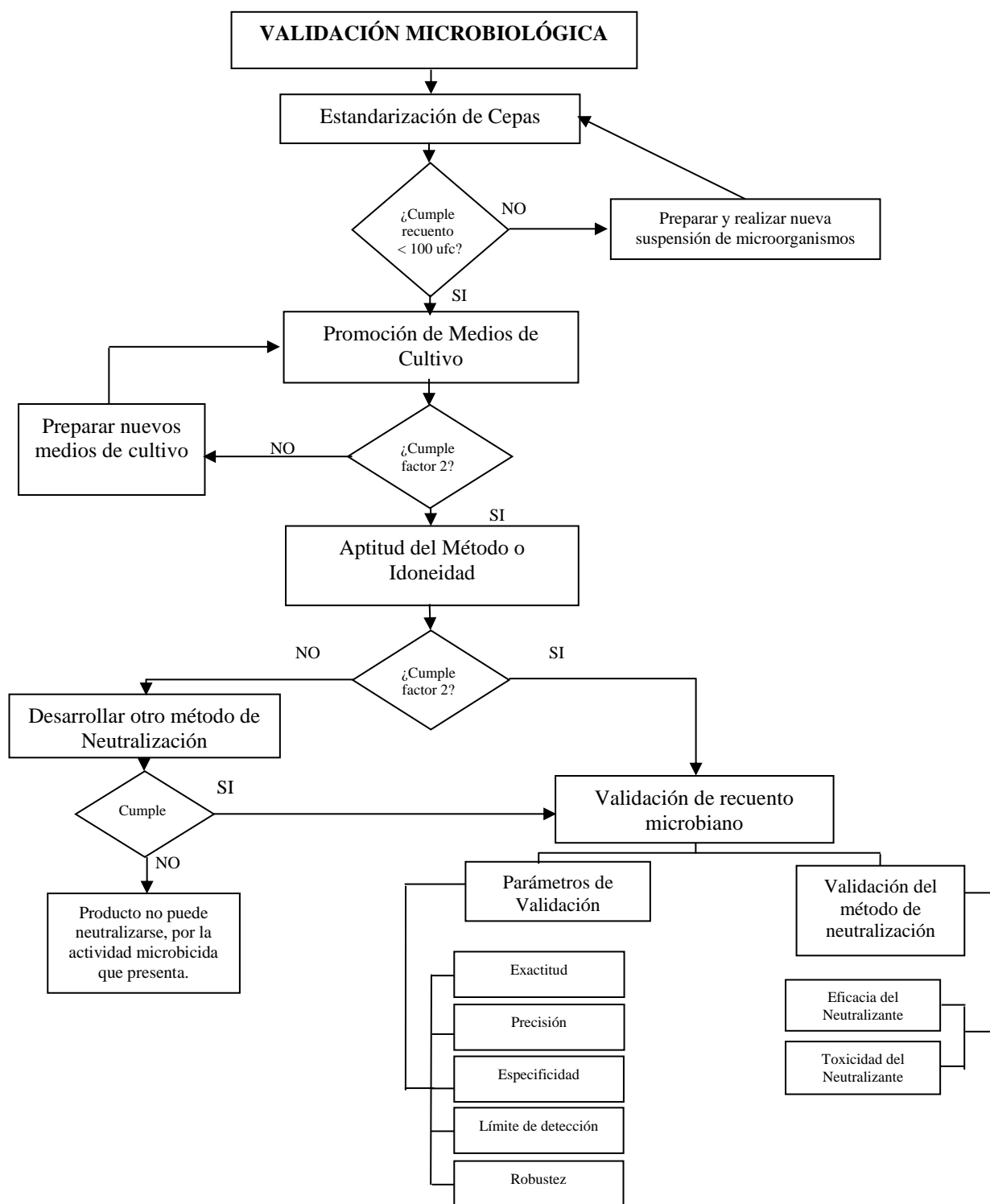
**EQUIPOS**

- Cabina de Flujo laminar y cabina de Bioseguridad
- Vortex
- Espectrofotómetro UV Visible
- Baño María
- Balanza de Precisión
- Autoclave de esterilización
- Incubadora de 20° C - 25° C y 30° C - 35° C

**CEPAS ATCC**

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

### Anexo 10: Flujograma del Proceso de Validación



Fuente: Elaboración Propia

## ● 12% de similitud general

Principales fuentes encontradas en las siguientes bases de datos:

- 11% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 6% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

### FUENTES PRINCIPALES

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	<b>qdoc.tips</b> Internet	2%
2	<b>repositorio.uwiener.edu.pe</b> Internet	2%
3	<b>argentina.gob.ar</b> Internet	<1%
4	<b>aam.org.ar</b> Internet	<1%
5	<b>hdl.handle.net</b> Internet	<1%
6	<b>cybertesis.unmsm.edu.pe</b> Internet	<1%
7	<b>repositorio.unamba.edu.pe</b> Internet	<1%
8	<b>coursehero.com</b> Internet	<1%