

En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, el día **LUNES 4 DE SEPTIEMBRE de 2023** se expone en cartelera digital el **tema** para la prueba de oposición del Concurso para proveer 6 ayudantes de segunda DP área QMA, Departamento de Química Orgánica (**Res. CD Nº 1623/23**)

Las/os postulantes deberán exponer **a partir del LUNES 11 DE SEPTIEMBRE de 2023 en pizarrón (con marcador), eligiendo entre los siguientes temas** (durante 10 minutos, más 10 minutos adicionales de preguntas):

- **Determinación de hidroximetil furfural (HMF) en miel (Química de Alimentos/Bromatología)**
- **Determinación de *Escherichia coli* en aguas (Microbiología de Alimentos)**

CRONOGRAMA DE EXPOSICIÓN - LUNES 11/9/23, MARTES 12/9/23			
HORARIO (estar 10 min. antes de su turno)	POSTULANTE		
<b>LUNES 11/9/23</b>			
10:00	1	AGRANATTI, Carola	42076716
10:20	2	ALONSO SUAREZ, Julia	40677544
10:40	3	ANSEDES, María Victoria	39342746
11:00	4	BARBIERI OLIVERI, Lucas	42833218
11:20	5	BODMER, Inés	42039488
11:40	6	CANCINO, Camila Dara	40383372
12:00	7	DE LOS SANTOS, Paula	42673806
12:20	8	Ayelén GONZÁLEZ, Germán	41107897
12:40	9	Ezequiel GRECCO, Macarena	42225529
13:00	10	GUACHALLA RICALDEZ, Diana	42497813
14:00	11	MACHAIN, Lucas Gabriel	40869711
14:20	12	MACIEL PACCINI, Juan	41353026
14:40	13	Ignacio NORRES, Martina	43876383
15:00	14	GUAITA, Sol	41586511
15:20	15	BAYER, Clara	40078939
15:40	16	RAITER, Julieta	42659125
<b>MARTES 12/9/23</b>			
10:00	17	ROJAS CAMPIÓN, Ignacio Ezequiel	41893417
10:20	18	ROSET, Violeta	41396524
10:40	19	SAAD, Ezequiel	42148492
11:00	20	VAL, Matias	41352224

### IMPORTANTE

Las exposiciones son PRESENCIALES en el AULA SEMINARIO del Departamento de Química Orgánica, excepto quienes hayan enviado constancia de su estadía a más de 500 km (\*) o situación evaluada por el Jurado previamente.

El postulante que realice su prueba de oposición virtual, deberá proveerse de una pizarra de escritura manual, de forma tal que en el zoom pueda simular su prueba en un pizarrón de aula con marcador. La exposición será de forma oral y sincrónica a través de la plataforma Zoom. Se requerirá tener la cámara y micrófono encendidos durante toda la presentación y preguntas según el siguiente procedimiento:

1. El postulante deberá unirse con los siguientes datos:

DATOS DE ACCESO	DATOS DE ACCESO ALTERNATIVO
<a href="https://exactas-uba.zoom.us/my/qo.aula02">https://exactas-uba.zoom.us/my/qo.aula02</a> ID reunión qo.aula02 Password: exactas20	<a href="https://exactas-uba.zoom.us/my/qo.aula02">https://exactas-uba.zoom.us/my/qo.aula02</a> ID de reunión: 7055974618 Código de acceso: exactas20

2. Deberán nombrarse con APELLIDO, Nombre/s.  
Una vez que el jurado lo incorpore a la sala exhibir su DNI y luego comenzar su exposición. Una vez finalizada la prueba/preguntas deberá salir de la sala.
- En caso de necesitar justificadamente un cambio de franja horaria, deberá comunicarlo a los Jurados (**antes del 7/9/23**) vía e-mail: [concursos.si@qo.fcen.uba.ar](mailto:concursos.si@qo.fcen.uba.ar) con el comprobante que lo certifique.
  - En caso de NO PRESENTARSE a la prueba de oposición deberá informar **antes del 7/9/23**, vía e-mail a [concursos.si@qo.fcen.uba.ar](mailto:concursos.si@qo.fcen.uba.ar) su renuncia.



Dr. Nicolás O. Amiano  
JURADO TITULAR



Dra. Graciela E. Leiva  
JURADO TITULAR



Dra. Gabriela L. Gallardo  
JURADO TITULAR

# **Química de Alimentos**

**TRABAJOS PRÁCTICOS  
LABORATORIO**

**LICENCIATURA EN CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Segundo Cuatrimestre  
2023**

## CONTENIDO

<b>PROGRAMA ANALÍTICO</b> .....	2
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	5
<b>RÉGIMEN DE APROBACIÓN DE LA MATERIA</b> .....	7
<b>INTERROGATORIOS INICIALES</b> .....	8
<b>REGLAS BÁSICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD EN LABORATORIOS</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	16
<b>DETERMINACIÓN DE MACROCOMPONENTES</b> .....	17
MODELO DE INFORME.....	18
HUMEDAD Y SÓLIDOS TOTALES .....	19
CENIZAS.....	22
NITRÓGENO TOTAL Y PROTEÍNA BRUTA .....	23
GRASA .....	25
FIBRA DIETARIA.....	29
AZÚCARES.....	31
<b>PROPIEDADES FUNCIONALES DEL ALMIDÓN</b> .....	34
<b>PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS</b> .....	36
<b>ALTERACIONES Y ADULTERACIONES</b> .....	38
ALTERACIONES DE LÍPIDOS .....	38
<i>Índice de ácidos grasos libres</i> .....	38
<i>Índice de peróxido</i> .....	39
ALTERACIÓN Y ADULTERACIÓN EN MIEL.....	41
<i>Hidroximetilfurfural (HMF)</i> .....	41
<i>Determinación de presencia de dextrinas</i> .....	43
<i>Actividad Diastásica</i> .....	43
<i>Acidez Libre</i> .....	45

# **PROGRAMA ANALÍTICO**

**Carga horaria:** 120 horas

**Horas semanales:** teóricas 3 horas

prácticas 5 horas

## **Contenidos**

### **Unidad 1:**

#### **Agua**

La molécula de agua. Estructura y asociaciones intermoleculares. Interacciones agua-soluto. Migración de agua en los alimentos. Presión de vapor relativa, movilidad molecular y estabilidad de alimentos.

### **Unidad 2:**

#### **Sistemas alimentarios**

Dispersiones. Angulo de contacto, fenómenos de superficie, surfactantes. Interacciones coloidales: aplicación de los conceptos de doble capa eléctrica y atracciones de van der Waals. Dispersiones líquidas y fenómenos de agregación. Geles. Emulsiones. Espumas. Formación y estabilidad de las distintas dispersiones.

### **Unidad 3:**

#### **Hidratos de carbono**

Reacciones de azúcares, dextrinas y polisacáridos de importancia en los alimentos: caramelización, reacción de Maillard, hidrólisis ácida y enzimática. Gelatinización, retrogradación y dextrinización de almidones, almidones modificados. Sustancias pécticas. Gomas. Aplicaciones en alimentos. Fibra dietaria y digestibilidad de carbohidratos. Propiedades físicas y funcionales de azúcares y polisacáridos.

## **Unidad 4:**

### **Lípidos**

Clasificación. Ácidos grasos esenciales. Propiedades físicas y funcionales. Cristalización y consistencia. Polimorfismo. Rol de los lípidos en la percepción del flavor. Alteraciones. Antioxidantes. Modificaciones durante la cocción y fritura de los alimentos.

## **Unidad 5:**

### **Proteínas**

Estabilidad conformacional y adaptabilidad. Termodinámica de la desnaturalización. Propiedades funcionales. Cambios físicos, químicos y nutricionales inducidos por el procesado. Modificaciones químicas y enzimáticas. Aislados y concentrados proteicos.

## **Unidad 6:**

### **Enzimas**

Clasificación de enzimas significativas en alimentos. Rol de los enzimas endógenos en la calidad de los alimentos. Efectos beneficiosos y perjudiciales. Pardeo enzimático. Utilización de preparados enzimáticos.

## **Unidad 7:**

### **Vitaminas y minerales**

Características generales. Vitaminas hidrosolubles y liposolubles. Causas de la variación / pérdida de vitaminas. Minerales: distribución en los alimentos. Variaciones por tratamientos tecnológicos. Biodisponibilidad.

## **Unidad 8:**

### **Propiedades organolépticas**

Pigmentos naturales: ejemplos y ocurrencia, características, solubilidad, estabilidad. Color: definición, medición objetiva. Definición de gusto, aroma y "flavor". Flavores naturales y generados por reacciones químicas. Concepto de textura, factores que influyen en la percepción. Alimentos con estructura celular y dispersiones. Atributos de textura vinculados con la estructura química de los componentes.

## **Unidad 9:**

### **Aditivos alimentarios**

Definición. Requisitos para su utilización en alimentos: inocuidad, justificación de su uso, aceptación por la legislación vigente. Niveles probablemente seguros para el ser humano: ingesta diaria admisible. Clasificación general y usos. Aditivos de conservación: antimicrobianos y antioxidantes. Aditivos mejoradores de las propiedades sensoriales: aromatizantes y modificadores del flavor, edulcorantes, colorantes, emulsionantes, antiaglomerantes, espesantes y gelificantes. Auxiliares tecnológicos de fabricación.

## **Unidad 10:**

### **Métodos analíticos de uso general en Bromatología.**

Necesidad de normalización de las técnicas. Preparación y toma de muestra. Determinaciones físicas. Fundamento de los métodos para determinar hidratos de carbono, sustancias nitrogenadas, minerales, vitaminas y lípidos. Criterios de selección de métodos, causas de error e interferencia. Expresión de los resultados y su interpretación.

## **Unidad 11:**

### **Alteraciones físicas, químicas y biológicas de materias primas y productos alimenticios**

Cambios físicos, químicos y biológicos. Ejemplos y discusión de cada uno. Factores que influyen en las alteraciones. Alteraciones consecutivas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Association of Official Analytical Chemists, **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 16th ed., 1995.
- Belitz, H.D. y Grosch, W., **Química de los alimentos**, 2ª ed., Acribia, Zaragoza, 2012.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L. y Lorient, D., **Proteínas alimentarias: Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas.**, Acribia, Zaragoza, 1989.
- Coultate, T.P., **Manual de química y bioquímica de los alimentos**, Acribia, Zaragoza, 1998.
- Damodaran, S. y Paraf, A., **Food proteins and their applications**. Marcel Dekker, New York, 1997.
- Egan, H., Kirk, R.S. y Sawyer, R., **Análisis químico de los alimentos de Pearson**, Ed. Continental, México, 1987.
- Eliasson, A.C., **Carbohydrates in foods**, Marcel Dekker, New York, 1996.
- Fennema, O., **Food Chemistry**, 3<sup>rd</sup>. ed., CRC Press, New York., 2017.
- Fennema, O., **Química de los alimentos**, Acribia, Zaragoza, 2012.
- Gómez, R.G., , Malec L.S. Vigo M.S. y Buera M. P. **Fundamentos de Métodos para el Análisis de Alimentos**, Ed. CCC Educando, Buenos Aires, 2001.
- Gunstone, F., **Fatty acid and lipid chemistry**, Chapman & Hall, London, 1996.
- Hart, F.L. y Fisher, H.J., **Análisis moderno de los alimentos**, 2ª reimpresión, Acribia, Zaragoza, 1991.
- Leach, H.W., MacCowan, L.D., Schoch, T.J., Structure of starch granule. **Cereal Chem.** 36:534-544, 1959.
- Pearson, D., **Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos**, 2ª reimpresión, Acribia, Zaragoza, 1986.
- Pilosof, A.M.R. y Bartolomai, G.B., **Caracterización Funcional y Estructural de proteínas**, Eudeba, Argentina, 2000.
- Pomeranz, Y y Meloan, C.E., **Food Analysis: Theory and Practice**, 3<sup>rd</sup> ed., Chapman & Hall, New York., 1994.
- Potter, N.W. y Hotchkiss, J.H., **Ciencia de los alimentos**, Acribia, Zaragoza, 1998.
- Sanderson, G.R.. Polysaccharides in food. **Food Technology**. Julio 1981, pag.50.
- Sathe, S.K. y Salunke, D.K. Isolation, partial characterization and modification of Great Nother Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starch. **Journal of Food Science**. 46:617-621, 1981.

- Schwartzberg, H.G. & Hartel, R.W., **Physical chemistry of foods**, Marcel Dekker, New York, 1992.
- Willard, H.H., Merrit, L.L. y Dean, J.A., **Métodos instrumentales de análisis**, Compañía Editorial Continental, 1985.
- Wilson, L.A.; Birmingham, V.A.; Moon, D.P. y Snyder, H.E. Isolation and characterization of starch from mature soybeans. **Cereal Chem.** 55(5):661-670,1978.
- Wong, D.W.S., **Química de los alimentos: mecanismos y teoría**, Acribia, Zaragoza, 1995.
- Pomeranz, Y., **Functional Properties of Food Components**, Academic Press, Inc. , Orlando, 1985.

#### **Páginas web de interés**

- Código Alimentario Argentino actualizado. <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>
- Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca. <http://www.minagri.gob.ar/site/index.php>
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasa.gov.ar/indexhtml.php>
- Instituto Nacional de Tecnología Argopecuaria. <http://inta.gob.ar/>
- Food and Drug Adminsitration. <http://www.fda.gov/Food/default.htm>
- Joint Expert Committe on Food Additives. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/search.html?lang=es>
- Organización de la Naciones Unidas para La Alimentación y La Agricultura. [http://www.fao.org/index\\_es.htm](http://www.fao.org/index_es.htm)
- Unión Europea, legislación sobre alimentos. [http://ec.europa.eu/food/food/foodlaw/index\\_es.htm](http://ec.europa.eu/food/food/foodlaw/index_es.htm)
- Normas internacionales sobre alimentos. <http://www.codexalimentarius.org/codex-home/es/>

## **RÉGIMEN DE APROBACIÓN DE LA MATERIA**

- La cursada de los trabajos prácticos incluye problemas y explicaciones de métodos de análisis y trabajos de laboratorio. Requieren la asistencia obligatoria.
- Se permitirá un máximo de 2 (dos) ausentes a las clases prácticas durante todo el cuatrimestre. La asistencia se tomará a los 15 minutos del horario del inicio del turno; en caso de llegar más tarde el alumno podrá asistir a la clase, pero será considerado como ausente.
- La cursada se aprobará con 2 exámenes parciales. Los mismos se aprueban con un mínimo de 6 (seis) puntos cada uno. Si el estudiante no alcanzara el puntaje mínimo para aprobar o si hubiese estado ausente, podrá recuperar el o los parciales en cuestión. Cada parcial práctico podrá ser recuperado solo una vez.

### **FINAL**

Se deberá rendir un final teórico, con carácter obligatorio. Es condición para rendir el final, tener aprobados los trabajos prácticos.

### **NOTA:**

La nota final de la materia tendrá en cuenta el desempeño global del alumno durante los trabajos prácticos.

## INTERROGATORIOS INICIALES

En los interrogatorios iniciales se deberán conocer los siguientes temas:

- **Preparación y toma de muestra.**
- **Determinación de componentes en los alimentos:**
  - Humedad y sólidos totales
  - Cenizas
  - Nitrógeno y proteína bruta
  - Grasa
  - Fibra dietaria
  - Azúcares

Fundamentos de todos los métodos analíticos incluidos en la guía de Trabajos Prácticos. Expresión de los resultados. Criterios de selección de métodos. Necesidad de normalización de las técnicas. Ejercicios de aplicación.

- **Alteraciones de lípidos:** Concepto de rancidez hidrolítica y oxidativa. Fundamentos de los métodos de medición de índices de acidez y de peróxido. Ejercicios de aplicación.

- **Propiedades funcionales del almidón:** Estructura química y tipos de almidón. Gelatinización. Definición de gel. Gelificación. Retrogradación. Concepto de propiedad funcional. Ejercicios de aplicación.

- **Productos azucarados:** Miel. Características generales. Composición. Métodos de valoración químicos de hidratos de carbono (Munson y Walker, iodometría) y físicos (polarimetría y refractometría). Fundamento de las técnicas incluidas en la guía de T.P. Normas de higiene y seguridad a tener en cuenta durante la práctica. Legislación argentina.

- **Capacidad emulsionante de proteínas.** Concepto de propiedad funcional. Definición de emulsión. Acción de las proteínas como emulsionantes. Fundamento del método de medición de la capacidad emulsionante. Ejercicios de aplicación.

## REGLAS BÁSICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD EN LABORATORIOS

Las prácticas que se realizan en los laboratorios presentan riesgos propios de cada actividad. Las reglas básicas aquí indicadas son un conjunto de normas destinadas a proteger la salud de los alumnos y a evitar accidentes y contaminaciones tanto dentro del ámbito de trabajo, como hacia el exterior.

Es un elemento clave en la seguridad la información que permita reconocer y minimizar o evitar los riesgos presentes en el laboratorio. Será fundamental respetar la metodología de cada técnica, y trabajar con cuidado y en forma ordenada.

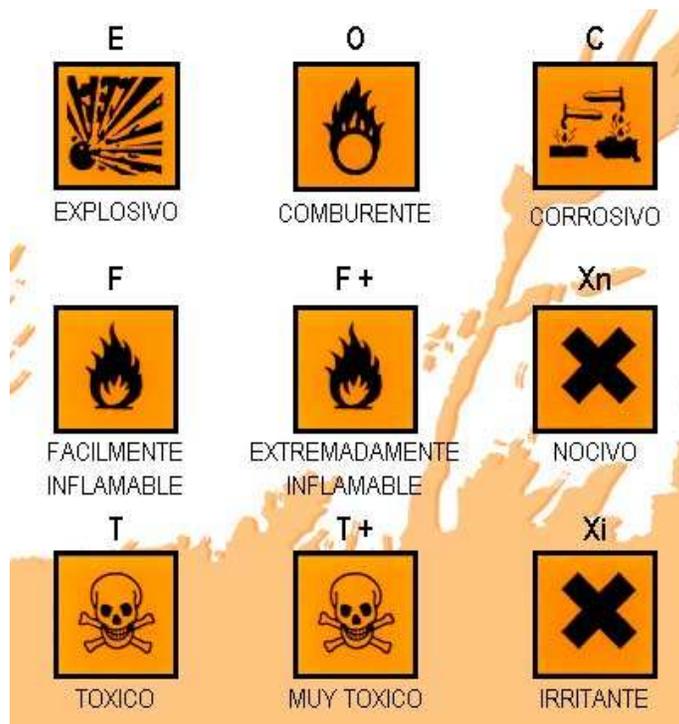
### **MEDIDAS GENERALES**

1. Se deberá conocer la ubicación de los elementos de seguridad en el lugar de trabajo, tales como: matafuegos, salidas de emergencia, mantas ignífugas, lavaojos, gabinete para contener derrames, accionamiento de alarmas, etc.
2. No se debe comer, beber, fumar o maquillarse en el laboratorio.
3. No se debe guardar alimentos en heladeras que contengan drogas o preparados.
4. Se debe utilizar vestimenta apropiada para realizar trabajos de laboratorio, guardapolvo abrochado (preferentemente de algodón y de mangas largas) y zapatos cerrados. Evitar el uso de accesorios colgantes (aros, pulseras, collares, etc.) y cabello recogido.
5. Las mesadas de trabajo, deben estar despejadas, sin libros, ni abrigos ni objetos personales. Es imprescindible mantener el orden y la limpieza. Cada persona es responsable directa de la zona que le ha sido asignada y de todos los lugares comunes.
6. Las manos deben lavarse cuidadosamente después de cualquier manipulación de laboratorio y antes de retirarse del mismo.
7. Se deben utilizar guantes apropiados para evitar el contacto con sustancias química o material biológico. Toda persona cuyos guantes se encuentren contaminados no deberá tocar objetos, ni superficies, tales como: teléfono, lapiceras, manijas de cajones o puertas, cuadernos, etc.
8. No se permite correr en los laboratorios.
9. No se deben bloquear las rutas de escape o pasillos con bancos, sillas, equipos, máquinas u otros elementos que entorpezcan la correcta circulación.
10. De aviso inmediato al docente responsable si encuentra instalaciones eléctricas y de gas precarias o provisorias.
11. No utilice equipos (Ej. Rotavap, columnas de destilación, sonicadores, hornos etc.) sin haber recibido entrenamiento previo y sin supervisión durante su uso.
12. Toda herida o abrasión, aún los pequeños cortes que puedan producirse durante el trabajo práctico deben ser informados al Docente. Los laboratorios cuentan con un botiquín de primeros auxilios con los elementos indispensables para atender casos de emergencia.
13. Respete las señales de advertencia. (ej.: riesgo eléctrico, alta temperatura, radiaciones, etc.)
14. Todo residuo generado debe colocarse en los recipientes destinados para tal fin según las indicaciones del docente (ver Pautas para Gestión de Residuos)



## LABORATORIOS DE QUÍMICA

1. No se permite pipetear con la boca.
2. Siempre que sea necesario proteger los ojos y la cara de salpicaduras o impactos se utilizarán anteojos de seguridad, viseras o pantallas faciales u otros dispositivos de protección. Cuando se manipulen productos químicos que emitan vapores o puedan provocar proyecciones, se evitará el uso de lentes de contacto.
3. No utilice el contenido de un recipiente que no esté identificado. Los envases que contengan agentes químicos deben adecuadamente etiquetados con la denominación del compuesto y el tipo de riesgo (Ej.: corrosivo, tóxico, inflamable, oxidante, radiactivo, explosivo o nocivo).



4. Cuando sea necesario manipular grandes cantidades de materiales inflamables (más de 5 litros) deberá tenerse a mano un extintor apropiado para ese material en cuestión.
5. Al almacenar sustancias químicas se debe considerar las incompatibilidades que dan lugar a reacciones peligrosas. Consultar con el Docente.
6. No almacenar en estantes sobre mesadas sustancias corrosivas y en caso de ácidos o álcalis concentrados (mayor de 2N) deben ser mantenidos en bandejas de material adecuado.
7. Las prácticas que produzcan gases, vapores, humos o partículas, y que puedan ser riesgosas por inhalación deben llevarse a cabo bajo campana.

8. Se debe verificar la ausencia de vapores inflamables antes de encender una fuente de ignición.
9. No se debe trabajar con materiales inflamables o solventes sobre llamas directa o cerca de las mismas. Para calentamiento, sólo se utilizarán resistencias eléctricas o planchas calefactoras blindadas. Se prestará especial atención al punto de inflamación y de autoignición del producto.
10. Está prohibido descartar líquidos inflamables o tóxicos o corrosivos por los desagües de las piletas, sanitarios o recipientes comunes para residuos. Se deben seguir las pautas para la gestión de residuos.
11. Los cilindros de gases comprimidos y licuados deben estar en posición vertical sujetos con correas o cadenas a la pared en sitios de poca circulación, de ser posible fuera del lugar de trabajo, protegidos de la humedad y fuentes de calor.
12. El material de vidrio roto no se depositará con los residuos comunes. Será conveniente envolverlo en papel y ubicarlo en cajas resistentes,
13. Todo recipiente que hubiera contenido agentes químicos puede ser descartado junto a los residuos comunes vaciado totalmente, enjuagado apropiadamente y sin etiquetas.
14. Está terminantemente prohibido hacer experimentos no autorizados por el Docente. No substituya nunca, un producto químico por otro en una práctica.

#### LABORATORIOS DE BIOLOGIA

1. Leer Reglas Básicas para Laboratorios de Química.
2. Se deben utilizar mascarillas descartables cuando exista riesgo de producción de aerosoles (mezcla de partículas en medio líquido) o polvos, durante operaciones de pesada de sustancias tóxicas o biopatógenas, apertura de recipientes con cultivos después de agitación, etc.
3. Está prohibido descartar material biológico por los desagües de las piletas, sanitarios o recipientes comunes para residuos. En cada caso se deberán seguir los procedimientos establecidos para la gestión de residuos.
4. La superficie de trabajo se deberá descontaminar una vez terminadas las tareas o luego de cada derrame de material viable, utilizando productos probadamente efectivos contra los agentes con que se trabaja.
5. El derrame o caída de muestras contaminadas, diluciones y medios sembrados o inoculados será informada al docente de inmediato. Se procederá a tratar el área afectada con la solución desinfectante que corresponda, la cual se dejará actuar y se recogerá con papel absorbente que será luego descartado con los residuos patogénicos.
6. En caso de rotura del recipiente de vidrio que contiene microorganismos, proceder de igual forma, pero no tocar los residuos antes que el desinfectante haya actuado.
7. Cuando proceda a la limpieza de una superficie con alcohol, verifique que no haya mecheros encendidos.
8. Consulte con el Docente si el material biológico debe ser descontaminado previo a su descarte en recipiente de residuos patogénicos (bolsa roja).

#### PAUTAS PARA LA GESTIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS Y PATOGÉNICOS

**Peligrosos** (ácidos, álcalis, oxidantes, corrosivos, guantes, trapos, etc.):

Los residuos líquidos se deberán acumular en Bidones provistos por el Servicio de Higiene y Seguridad. Mantenerlos tapado. No mezclar sin consultar al Docente.

Los residuos sólidos se deberán acumular en bolsas negras dentro de cajas provistas por el Servicio de Higiene y Seguridad. No tirar residuos domésticos.

**Patogénicos** (tips, guantes, cajas de petri, etc.):

Los residuos biológicos (sangre, tejidos animales o humanos y todo el material que haya estado en contacto con ellos) se deberán acumular en bolsas rojas dentro de cestos con tapa provistos por el Servicio de Higiene y Seguridad. Quedan exceptuados los elementos cortopunzantes (agujas, hojas de bisturís), que se recogerán en contenedores especiales.

### **ANTE CUALQUIER DUDA CONSULTE CON EL DOCENTE**

*La seguridad la disfrutamos todos. Actuemos responsablemente*

### PAUTAS DE ACTUACIÓN EN CASO DE EMERGENCIAS

En caso de accidente, avisar inmediatamente al Docente.

#### EMERGENCIAS MÉDICAS

Si ocurre una emergencia tal como cortes o abrasiones, quemaduras o ingestión accidental de algún producto químico, tóxico o peligroso, se deberá proceder en la siguiente forma:

1. A los accidentados se les proveerá los primeros auxilios
2. Se da aviso al Departamento de Seguridad y Control (Int. 58311 Emergencias)
3. El Docente responsable del turno o una autoridad del Departamento, deberá completar el Formulario de Incidentes y enviarlo al Servicio de Higiene y Seguridad para su conocimiento y evaluación.

#### CENTROS PARA REQUERIR AYUDA MEDICA

S.A.M.E. Teléfono 107  
Hospital Pirovano  
Av. Monroe 3555 Tel. 4542-5552 / 9279

#### INTOXICACIONES:

Hospital de Niños. Dr. R. Gutiérrez  
Sánchez de Bustamante 1399. Capital Federal. Tel: 4962-6666.  
Hospital de Niños. Dr. P. de Elizalde  
Av. Montes de Oca 40 Tel. 4307-7491 Toxicología 4300-2115

#### QUEMADURAS:

Hospital de Quemados  
P.Goyena 369 Tel. 4923-4082 / 3022

#### OFTALMOLOGÍA

Hospital Santa Lucía  
San Juan 2021 Tel. 4941-7077  
Hospital Dr. P. Lagleyze  
Av. Juan B. Justo 4151 Tel. 4581-0645 / 2792

### 1. Quemaduras.

Las pequeñas quemaduras producidas por material caliente, baños, placas o mantas calefactoras, etc., se tratarán lavando la zona afectada con agua fría durante 10-15 minutos. Las quemaduras más graves requieren atención médica inmediata. No utilices cremas y pomadas grasas en las quemaduras graves.

### 2. Cortes.

Los cortes se tienen que lavar bien, con abundante agua corriente, durante 10 minutos como mínimo. Si son pequeños y dejan de sangrar en poco tiempo, lávalos con agua y jabón y tápalos con una venda o apósito adecuados. Si son grandes y no paran de sangrar, requiere asistencia médica inmediata.

### 3. Derrame de productos químicos sobre la piel.

Los productos químicos que se hayan vertido sobre la piel han de ser lavados inmediatamente con agua corriente abundante, como mínimo durante 15 minutos. Es necesario sacarle toda la ropa contaminada a la persona afectada lo antes posible. El lavado es muy importante para reducir la gravedad y la extensión de la herida. Requiere asistencia médica.

### 4. Actuación en caso de producirse corrosiones en la piel.

Por ácidos. Sacar o cortar lo más rápidamente posible la ropa. Lavar con agua corriente abundante la zona afectada. Neutralizar la acidez con bicarbonato sódico durante 15-20 minutos. Esperar la asistencia médica.

Por álcalis. Lavar la zona afectada con agua corriente abundante y luego con una solución saturada de ácido bórico. Secar y esperar la asistencia médica.

### 5. Fuego en el cuerpo.

Si se te incendia la ropa, pide ayuda. El afectado no correrá, tiene que tirarse en el suelo y rodar sobre sí mismo para apagar las llamas. Es tu responsabilidad ayudar a alguien que se esté quemando. Cubrirlo con una manta anti fuego, conducirlo hasta la ducha de seguridad, si está cerca. No utilices nunca un extintor sobre una persona. Una vez apagado el fuego, mantener a la persona tendida, hasta que llegue la asistencia médica.

### 6. Actuación en caso de producirse corrosiones en los ojos.

En este caso el tiempo es esencial (menos de 10 segundos). Cuanto antes se lave el ojo, menos grave será el daño producido. Lavar los dos ojos con agua corriente abundante durante 15 minutos como mínimo en una ducha de ojos, o con solución fisiológica. Es necesario mantener los ojos abiertos con la ayuda de los dedos para facilitar el lavado debajo de los párpados. Es necesario recibir asistencia médica, por pequeña que parezca la lesión.

### 7. Actuación en caso de ingestión de productos químicos.

Antes de cualquier actuación concreta pide asistencia médica. Si el paciente está inconsciente, ponerlo en posición inclinada, con la cabeza de lado. Si está consciente, mantenerlo apoyado. No dejarlo sólo. No provocar el vómito si el producto ingerido es corrosivo.

### 8. Actuación en caso de inhalación de productos químicos.

Identificar el vapor tóxico. Si se trata de un gas, utilizar el tipo adecuado de máscara para gases durante el tiempo que dure el rescate del accidentado. No arriesgarse. Conducir

inmediatamente la persona afectada a un sitio con aire fresco. Requiere asistencia médica lo antes posible. Ante el primer síntoma de dificultad respiratoria, iniciar la respiración artificial boca a boca.

## ☞ INCENDIOS

### 1. Fuego en el laboratorio.

Mantenga la calma.

Informe al docente responsable.

Se dará aviso inmediatamente al Dpto. de Seguridad y Control (Interno 58311) informando el lugar y las características del siniestro

### 2. Fuegos pequeños

Si el fuego es pequeño y localizado, y sabe utilizar un extintor, trate de apagarlo utilizando un extintor adecuado, arena, o cubriendo el fuego con un recipiente de tamaño adecuado que lo ahogue.

Retirar los productos químicos inflamables que estén cerca del fuego.

No utilices nunca agua para extinguir un fuego provocado por la inflamación de un solvente.

### 3. Fuegos grandes

Si el fuego es de consideración, no se arriesgue y manteniendo la calma ponga en marcha el plan de evacuación. Apague los equipos eléctricos y cierre las llaves de gas y ventanas.

Acate las indicaciones de los brigadistas.

Evacue la zona por la ruta asignada.

No corra, camine rápido, cerrando a su paso la mayor cantidad de puertas. No utilice ascensores. Descienda siempre que sea posible.

No lleve consigo objetos, pueden entorpecer su salida.

Si pudo salir por ninguna causa vuelva a entrar. Deje que los equipos especializados se encarguen.

## ☞ DERRAME MAYORES DE PRODUCTOS QUÍMICOS

- Avise al Departamento de Seguridad y Control (int. 58311 Emergencias)
- Atender a cualquier persona que pueda haber sido afectada.
- Notificar a las personas que se encuentren en las áreas cercanas acerca del derrame. Buscar los elementos en el Gabinete para contener derrames.
- Coloque la cinta de demarcación para advertir el peligro.
- Evacuar a toda persona no esencial del área del derrame.
- Si el derrame es de material inflamable, apagar las fuentes de ignición, y las fuentes de calor.
- Evite respirar los vapores del material derramado, si es necesario utilizar una máscara respiratoria con filtros apropiados al tipo de derrame.
- Ventilar la zona.
- Utilizar los elementos de protección personal tales como equipos de ropa resistente a ácidos, bases y solventes orgánicos y guantes.
- Confinar o contener el derrame, evitando que se extienda. Para ello extender los cordones en el contorno del derrame.

- Luego absorber con los paños sobre el derrame.
- Deje actuar y luego recoger con pala y colocar el residuo en la bolsa roja (patogénicos) o negra (peligrosos) y ciérrela.
- Si el derrame es de algún elemento muy volátil deje dentro de la campana hasta que lo retire para su disposición.
- Disponer la bolsa con los residuos (consultar al Servicio de Higiene y Seguridad, int. 58174)
- Lave el área del derrame con agua y jabón. Seque bien.
- Cuidadosamente retire y limpie todos los elementos que puedan haber sido salpicados por el derrame.
- Lave los guantes, la máscara y ropa.

Fecha: .....

Declaro haber leído las REGLAS BÁSICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD EN LABORATORIOS DE QUÍMICA Y BIOLOGÍA – PROCEDIMIENTOS ANTE EMERGENCIAS que aparecen en la guía de Trabajos Prácticos de la Materia .....

Turno de Laboratorio: .....

Firma:.....

Aclaración:.....

L.U. N°: .....

## INTRODUCCIÓN

Los trabajos prácticos comprenden la realización de algunos métodos de uso general para la determinación del contenido de los componentes básicos de los alimentos: agua, minerales, proteína, lípidos, hidratos de carbono y fibra.

Con la finalidad de poder determinar alteraciones y adulteraciones que pueden sufrir los alimentos, se incluyen dos prácticas en la que se determinan índices de alteración en lípidos y de alteración y adulteración en miel.

Es importante estudiar además las características fisicoquímicas de los componentes de los alimentos. Con este fin se presentan dos prácticas que abarcan el estudio de algunas propiedades funcionales de almidón y proteínas.

El número de análisis que es necesario efectuar en cada determinación para lograr resultados confiables depende de la muestra que se somete al análisis y de la precisión del método aplicado.

La muestra debe ser representativa del alimento analizado. Dado que en general los alimentos son heterogéneos, es difícil obtener una sola muestra absolutamente representativa para el análisis de laboratorio. La muestra de laboratorio debe ser tan homogénea como sea posible. El método de homogeneización dependerá del tipo de alimento que se está analizando. Por lo tanto, es de fundamental importancia la toma de muestra, el manipuleo, la preparación y la forma de conservación a fin de evitar alteraciones, antes de someterla al análisis.

La elección del método de análisis depende de su finalidad; a veces interesa más la rapidez en obtener un resultado que la exactitud.

## DETERMINACIÓN DE MACROCOMPONENTES

### Métodos de análisis de macrocomponentes que se emplearán en el laboratorio:

1. Grasas: Soxhlet, Rose-Gottlieb
2. Proteínas: Kjeldahl
3. Hidratos de Carbono: Azúcares por métodos enzimáticos  
Fibra insoluble en detergente neutro
4. Agua / Humedad: por secado en estufa.
5. Cenizas

### Esquema de trabajo:

	<u>Leche en polvo</u>	<u>Dulce de Leche</u>	<u>Galletitas integrales</u>	<u>Miel</u>
<u>Grasas (Soxhlet)</u>	-	-	x	-
<u>Grasas (Rose-Gottlieb modificado)</u>	x	x	-	-
<u>Proteínas</u>	x	x	-	-
<u>Fibra</u>	-	-	Alimento entregado por la cátedra	-
<u>Agua / humedad</u>	x	x	x	x
<u>Cenizas</u>	-	-	x	-
<u>Azúcares</u>	-	-	-	x

## MODELO DE INFORME

Informe N°...

Nombre y apellido:.....

### 1.- MUESTRA ANALIZADA

Identificación (marca, lote):.....

Características:.....

#### Determinaciones realizadas:

a) Nombre de la determinación (Referencia de la metodología)

Resultado obtenido

b) Nombre de la determinación (Referencia de la metodología)

Resultado obtenido

#### Conclusiones

a) Código Alimentario Argentino

Registrar las especificaciones de esta norma respecto de determinaciones físicoquímicas para este tipo de alimento (o el más parecido). Comparar con los resultados obtenidos.

b) Rotulado

Copiar los valores dados en el rotulado nutricional y comparar con los resultados obtenidos.

### 2.- DATOS DE LABORATORIO

#### Determinaciones realizadas:

a) Nombre de la determinación (Referencia de la metodología)

Resultado obtenido

Datos de laboratorio (masa de muestra, pesadas, diluciones, etc.)

b) Nombre de la determinación (Referencia de la metodología)

Resultado obtenido

Datos de laboratorio (masa de muestra, pesadas, diluciones, etc.)

### 3.- OBSERVACIONES

En este apartado puede volcar las observaciones que considere oportunas. Por ejemplo, explicar por qué tuvo que repetir alguna determinación, interpretar algún resultado anómalo.

## HUMEDAD Y SÓLIDOS TOTALES

La determinación de humedad es una de las más importantes y ampliamente usada en el control y procesamiento de alimentos. Influye en la estructura, apariencia y gusto de los productos, determina su susceptibilidad al deterioro (físico, químico o microbiológico) y permite detectar adulteraciones.

A veces, es difícil la determinación exacta del contenido total de agua. En la práctica es adecuado el método que proporcione una buena repetibilidad con resultados comparables, siempre que ese mismo procedimiento se siga estrictamente en cada ocasión y el alimento no contenga sustancias que puedan interferir en el método.

### **Determinación del contenido de agua**

Los métodos habitualmente usados implican la deshidratación de la muestra hasta peso constante o en forma estandarizada a determinadas temperaturas y presiones. Otros métodos se basan en la destilación directa o azeotrópica con un solvente inmiscible.

### **Método indirecto por secado en estufa a 100°C (CAA; 13.21, 1989)**

Pesar suficiente cantidad de muestra en un recipiente adecuado <sup>(1)</sup>, previamente secado en estufa a 100°C durante media hora, enfriado en desecador y tarado.

Colocar en estufa durante 2 - 3 horas a 98 - 100°C. Enfriar luego en desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente (25 - 30 minutos). Para llevar hasta peso constante, se vuelve a colocar en la estufa por intervalos de una hora.

Expresar el peso perdido por la muestra como % de humedad (o agua).

### **Notas:**

En algunos casos de muestras con elevado contenido de agua, puede añadirse arena calcinada, para conseguir una mayor superficie de secado, de manera que quede una capa delgada en el fondo del cristalizador, y tarar el conjunto. En el caso de muestras sólidas o semisólidas se aconseja colocar una varilla corta para poder mezclar bien la muestra con la arena.

(1) *Galletitas Integrales*: pesar en un pesafiltro con tapa exactamente 3-3,5 g de muestra.

## **Método indirecto de secado en estufa de vacío.**

Los productos con elevado contenido en azúcares, deben secarse en estufa de vacío a temperaturas que no excedan los 70°C, ya que a esta temperatura algunos azúcares como la fructosa, se deshidratan.

Pesar suficiente cantidad de muestra en un recipiente adecuado <sup>(2)</sup> previamente secado en estufa a 100°C durante media hora, enfriado en desecador y tarado.

Introducir en estufa de vacío, según la temperatura correspondiente de acuerdo al alimento, y secar hasta llevar a peso constante. Al retirar de la estufa, enfriar en desecador y pesar rápidamente. Expresar el peso perdido de la muestra como % de humedad.

## **Determinación de sólidos por refractometría. (A.O.A.C., 969.38 B, 1990).**

### **Procedimiento:**

1. Encender el instrumento (refractómetro AR200, Reichert) presionando la tecla “CAL”.
2. Colocar agua destilada y presionar “CAL”.
3. Una vez finalizada la calibración el equipo presenta el mensaje “Set point cal successful”.
4. Colocar una pequeña cantidad de muestra <sup>(3)</sup> en el refractómetro, permitir que se estabilice la temperatura durante un minuto y presionar la tecla “READ”. Realizar la medición utilizando el modo “nd-TC” que entrega los resultados como índice de refracción compensado por temperatura (20°C). Hacer 2 o 3 lecturas y promediarlas.
5. Calcular el % de agua a partir de la siguiente tabla (A.O.A.C., 940.39, 1990):

(2) *Leche en polvo: pesar en un pesafiltro con tapa exactamente 3-4 g de muestra.*

*Dulce de Leche: colocar una varilla de vidrio corta y arena calcinada en un cristizador de diámetro no menor de 5 cm. Pesar en el cristizador tarado exactamente 2-3 g de muestra. Mezclar bien la muestra con la arena.*

(3) *La determinación se realizará sobre una muestra de miel. Si la misma presenta cristalización de azúcares (granulación) debe homogeneizarse previamente introduciendo el envase en un baño de agua a una temperatura no mayor de 60°C. Agitar hasta disolución de los cristales, enfriar y tomar la porción para el análisis. Si no se observa granulación basta agitar con una varilla.*

Table 969.38 Relationship Between Refractive Index and Water Contents of Honey<sup>a</sup>

Water Content, %	Refractive Index			Water Content, %	Refractive Index		
	20° C <sup>b</sup>	60° F <sup>b</sup>	40° C		20° C <sup>c</sup>	60° F <sup>c</sup>	40° C
13.0	1.5044	1.5053	1.4998	19.0	1.4890	1.4900	1.4845
13.2	1.5038	1.5048	1.4993	19.2	1.4885	1.4895	1.4840
13.4	1.5033	1.5043	1.4988	19.4	1.4880	1.4890	1.4835
13.6	1.5028	1.5038	1.4983	19.6	1.4875	1.4885	1.4829
13.8	1.5023	1.5033	1.4978	19.8	1.4870	1.4880	1.4824
14.0	1.5018	1.5027	1.4973	20.0	1.4865	1.4875	1.4819
14.2	1.5012	1.5022	1.4968	20.2	1.4860	1.4870	1.4814
14.4	1.5007	1.5017	1.4962	20.4	1.4855	1.4865	1.4809
14.6	1.5002	1.5012	1.4957	20.6	1.4850	1.4860	1.4804
14.8	1.4997	1.5007	1.4952	20.8	1.4845	1.4855	1.4799
15.0	1.4992	1.5002	1.4947	21.0	1.4840	1.4850	1.4794
15.2	1.4987	1.4997	1.4942	21.2	1.4835	1.4845	1.4788
15.4	1.4982	1.4992	1.4937	21.4	1.4830	1.4840	1.4783
15.6	1.4976	1.4986	1.4932	21.6	1.4825	1.4835	1.4778
15.8	1.4971	1.4981	1.4927	21.8	1.4820	1.4830	1.4773
16.0	1.4966	1.4976	1.4922	22.0	1.4815	1.4825	1.4768
16.2	1.4961	1.4971	1.4916	22.2	1.4810		
16.4	1.4956	1.4966	1.4911	22.4	1.4805		
16.6	1.4951	1.4961	1.4905	22.6	1.4800		
16.8	1.4946	1.4956	1.4901	22.8	1.4795		
17.0	1.4940	1.4951	1.4896	23.0	1.4790		
17.2	1.4935	1.4946	1.4891	23.2	1.4785		
17.4	1.4930	1.4940	1.4885	23.4	1.4780		
17.6	1.4925	1.4935	1.4881	23.6	1.4775		
17.8	1.4920	1.4930	1.4876	23.8	1.4770		
18.0	1.4915	1.4925	1.4870	24.0	1.4765		
18.2	1.4910	1.4920	1.4865	24.2	1.4760		
18.4	1.4905	1.4915	1.4860	24.4	1.4755		
18.6	1.4900	1.4910	1.4855	24.6	1.4750		
18.8	1.4895	1.4905	1.4850	24.8	1.4745		
				25.0	1.4740		

<sup>a</sup> Values for 20°C and 60°F are Wadmore's calculations (See World 36, 197(1955)). 40°C values are calculated from Auerbach and Bontee equation (Z. Nahr. Genussm. 22, 353-358(1924)). Values >22.0% were extended by AOAC/WHO Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (1980).

<sup>b</sup> If refractive index is measured at temperature above (below) 20°C, add (subtract) 0.00023°C above (below) 20°C before using table.

<sup>c</sup> If refractive index is measured at temperature above (below) 60°F, add (subtract) 0.00019°F above (below) 60°F before using table.

## CENIZAS

Se consideran como tal el residuo inorgánico que queda después de incinerar la materia orgánica, generalmente a 500-550°C. Su composición rara vez corresponde a la de las materias minerales del producto debido a pérdidas por volatilización, descomposición e interacción entre constituyentes.

El valor principal de la determinación de cenizas es que supone un método sencillo para determinar la calidad de ciertos alimentos, determinar su pureza y detectar adulterantes inorgánicos.

### **Determinación de cenizas totales – Método directo (A.O.A.C., 923.03, 1990).**

Pesar la cantidad de alimento adecuada <sup>(4)</sup> en una cápsula de porcelana de unos 6 cm de diámetro, previamente tarada <sup>(5)</sup>. Incinerar con mechero sobre tela de amianto hasta carbonización y luego en mufla a 500°-550°C hasta obtener cenizas gris claro o cuando se llega a peso constante. Enfriar en desecador y pesar tan pronto alcance la temperatura ambiente (aproximadamente 45 minutos).

El resultado se expresa en % de muestra.

#### **Notas:**

1. Esta determinación debe realizarse por duplicado.
2. Si las cenizas quedan con trazas de carbón, humedecerlas con un poco de agua, romper las partículas de carbón con una varilla de punta chata, enjuagarla y evaporar cuidadosamente a sequedad sobre un triángulo colocado sobre la tela metálica, antes de volver a calcinar. Repetir el tratamiento tantas veces como sea necesario.
3. Los productos que contienen mucha agua se secan primero sobre una plancha eléctrica caliente, a baño María o en un baño de arena.
4. Cuando se determinan cenizas en harina de trigo (para su tipificación), se calcina a  $900^{\circ} \pm 20^{\circ}\text{C}$ . Como en este producto la concentración de cloruros es baja, las pérdidas por volatilización no son significativas.

(4) *Galletitas Integrales*: 3-5 g

(5) *Calcinar la cápsula vacía en mufla a 500° - 550°C, enfriada en desecador y pesar hasta constancia de peso.*

## NITRÓGENO TOTAL Y PROTEÍNA BRUTA

En los análisis de rutina se suele determinar el contenido de nitrógeno total y expresar el conjunto de sustancias nitrogenadas como "porcentaje de nitrógeno total" o como "porcentaje de proteínas". La estimación del contenido de proteínas de los alimentos a partir de la determinación del contenido de nitrógeno total no siempre es correcta. Pero en general, el contenido de compuestos nitrogenados no proteicos es pequeño comparado al de proteínas en la mayoría de los alimentos.

En el análisis de alimentos el método de Kjeldahl es el que ha alcanzado la mayor importancia. Desde la primera publicación por Kjeldahl el método para determinar nitrógeno orgánico ha sufrido muchos cambios.

### **Método de Kjeldahl-Arnold-Gunning (A.O.A.C., 928.08, 1990).**

#### **Reactivos:**

- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a.
- CuSO<sub>4</sub> p.a. (puede usarse CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado
- Solución concentrada de NaOH (40 o 45 %)
- Solución saturada de ácido bórico
- Solución HCl 0,1 N valorado
- Indicador Combinado: 0,016% de rojo de metilo y 0,083% de verde de bromocresol em alcohol

#### Etapa de digestión

Pesar la cantidad de muestra adecuada (de acuerdo al contenido estimado de nitrógeno)<sup>(6)</sup> en un pequeño trozo de papel satinado. Envolverla y dejarla caer en un tubo de digestión de Kjeldahl. Agregar 6 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,3 g de CuSO<sub>4</sub> (aprox. 0,8 g de CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O) y 12 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Seguir las instrucciones del equipo para la digestión de la muestra, utilizando las siguientes condiciones:

1° paso: 125°C – 15 minutos

2° paso: 300°C – 15 minutos

3° Paso 400°C – 90 minutos

(6) *Leche en polvo*: 0,3 g; *Dulce de Leche*: 1 g

### Etapa de destilación

Colocar 50 ml de solución saturada de ácido bórico en un Erlenmeyer de 500 ml y agregar unas gotitas de indicador combinado (aprox. 0,15 ml).

Realizar la destilación de acuerdo a las indicaciones del equipo.

### Etapa de titulación

El destilado se titula con HCl 0,1 N valorado.

Expresar el resultado como % proteína según las siguientes expresiones:

$$\% N = \frac{(V.N.f) \text{ ácido} \cdot Peq_N \cdot 100}{1000 \cdot m_M}$$

y

$$\% \text{ proteína} = \% N \cdot f_P$$

Donde:        V: volumen  
                  N: normalidad  
                  f: factor de corrección  
                   $Peq_N$ : Peso equivalente de nitrógeno  
                   $f_P$ : factor de conversión de nitrógeno a proteína  
                   $m_M$ : masa de muestra (g)

Factores para la conversión de N a proteína:

- Carne: 6,25 (es el más empleado si se desconoce la procedencia de la proteína)
- Leche: 6,38
- Gelatina: 5,55
- Trigo y vegetales en general: 5,70
- Arroz: 5,85
- Huevos: 6,68

## GRASA

La grasa se determina normalmente o bien por extracción directa con un solvente, o luego de un tratamiento previo para separar lípidos emulsionados o combinados con otros componentes del alimento.

La grasa libre se puede determinar por extracción del material seco y reducido a polvo con un solvente orgánico, generalmente éter etílico, hexano o cloruro de metileno en un aparato de extracción continua. En la práctica se utilizará el tipo Soxhlet en el que se realiza una extracción intermitente con un exceso de solvente recientemente condensado.

En aquellos alimentos en los que los lípidos formen emulsiones muy estables, el contenido graso se determinará por el método de Gerber o el de Rose-Gottlieb.

### **Método directo por extracción con solvente orgánico (grasa bruta) (AOAC, 960.39, 1990)**

Reactivos:

- Cloruro de metileno
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro

Pesar una cantidad adecuada de muestra en un cristizador y secarla, preferiblemente en una estufa de vacío a 70°C (o utilizar el residuo de la determinación del contenido de agua si se realizó por el método de secado en estufa). Pesar exactamente una cantidad adecuada de la muestra deshidratada <sup>(7)</sup> en un cartucho de celulosa. Cubrir con un poco de algodón y colocar en el cuerpo del extractor Soxhlet.

En el balón de extracción colocar 2 o 3 piedras pómez chicas y cargar el cuerpo del extractor una vez y media con éter etílico anhidro (ver esquema adjunto). Extraer durante 4 h como mínimo, calentando con una intensidad tal que se logre una velocidad de condensación de 5 ó 6 gotas por segundo.

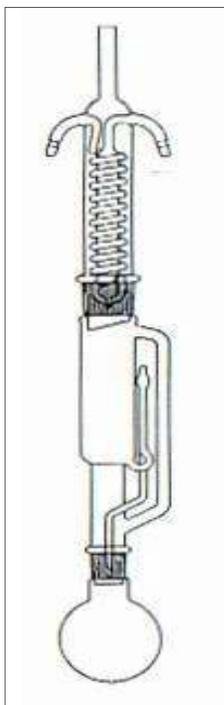
Una vez finalizada la extracción destilar la mayor parte del solvente a baño María, recuperándolo. Pasar luego el extracto a un Erlenmeyer chico tarado, con la ayuda de un poco de solvente. Evaporar a baño María y secar a 100°C durante 30 min. Enfriar y pesar.

(7) *Galletitas Integrales*: 2 g. NO SERÁ NECESARIO SECAR ESTA MUESTRA (consultar con los docentes)

El resultado se expresa como % en la muestra.

**Nota:**

En el caso de alimentos de difícil trasvasamiento cuantitativo, es conveniente secar la muestra en un cristallizador forrado con papel de aluminio. Una vez secada la muestra, se la encierra en el papel de aluminio y se trasvasa el paquete así obtenido al cartucho de celulosa. Es conveniente perforar el papel de aluminio con una varilla de manera tal que iniciada la extracción, haya en el cartucho de celulosa una circulación y drenaje continuo del solvente.



Extractor Soxhlet

**Método de Rose-Gottlieb (A.O.A.C., 989.05, 1990)**

La determinación de materia grasa se realizará en base a una **modificación del método de Rose Gottlieb** utilizado en leche. Por razones de organización en el laboratorio de TP esta

determinación deberá realizarse A PRIMERA HORA (su realización exige una decantación de 24 h pero se disminuirá ese tiempo a 4 horas).

En la práctica se va a pesar la muestra <sup>(8)</sup> en un papel satinado previamente tarado (lo más pequeño posible). Encerrarla parcialmente en el papel para que tome contacto con los reactivos, e introducirla hasta el fondo de una probeta de 50 ml con tapa. Agregar 5 ml de agua y agitar hasta que la muestra se disuelva (si es necesario, calentar en baño María a 60°C).

Enfriar y adicionar 1 ml de NH<sub>4</sub>OH cc, agitar y agregar 5 ml de etanol. Agitar y agregar con pipeta aforada 10 ml de éter etílico. Agitar 30 segundos y agregar, también con pipeta aforada, 10 ml de éter de petróleo Volver a agitar y leer bien el volumen total de la mezcla. Dejar reposar 4 horas en la heladera (hay que evitar la evaporación de solventes; si esto ocurriera se notará una disminución en el volumen leído). Con pipeta aforada tomar 10 ml de la fase superior etérea y evaporarlos en un pequeño cristizador tarado. Deja enfriar en desecador, pesar y expresar % de grasas teniendo en cuenta la alícuota que se pipeteó.

### **Reactivos**

- NH<sub>4</sub>OH concentrado
- Etanol
- Éter etílico
- Éter de petróleo

El método original es el que se detalla a continuación:

Pesar una cantidad adecuada de muestra en el Mojonnier previamente tarado. En el caso de muestras sólidas o semisólidas diluir con agua a 10 ml aproximadamente para disolver la muestra. Si es necesario, calentar en baño María a 60°C.

Enfriar, adicionar 1,5 ml de NH<sub>4</sub>OH y agitar. Adicionar 3 gotas de fenolftaleína para facilitar la visualización de la interfase entre el éter y el agua durante la extracción. Adicionar 10 ml de etanol, tapar y agitar durante 15 segundos.

Para la primera extracción agregar 25 ml de éter etílico, tapar el recipiente y agitar vigorosamente durante 1 minuto destapando para liberar la presión si fuera necesario. Agregar

(8) *Dulce de Leche: 1 g*  
*Leche en polvo: 0,5 g*

25 ml de éter de petróleo, tapar y repetir la agitación 1 minuto. Centrifugar a 600 rpm. Trasvasar la solución etérea, cuidando de no volcar parte de la fase acuosa, a un Erlenmeyer esmerilado de 250 ml previamente pesado.

Para la segunda extracción adicionar 5 ml de etanol, tapar y agitar 15 segundos. Agregar 15 ml de éter etílico y agitar 1 minuto. Agregar 15 ml de éter de petróleo y agitar 1 minuto nuevamente. Centrifugar a 600 rpm y volcar la solución etérea al Erlenmeyer junto con el primer extracto.

Repetir una tercera extracción omitiendo el agregado de etanol. Evaporar el solvente en evaporador rotatorio. Colocar luego en estufa a 100°C durante 30 minutos. Dejar enfriar en desecador y pesar.



Tubo de extracción Mojonnier

## FIBRA DIETARIA

### Introducción:

La fibra dietaria se define como el conjunto de todos los polisacáridos no digeribles por las enzimas digestivas humanas y la lignina. La mayor parte de los componentes de la fibra dietaria de los alimentos están en o asociados a la pared celular vegetal. A ellos se suman otras sustancias, componentes naturales o agregados, de los alimentos. Los principales componentes de la fibra son celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina.

La diversidad de estos componentes dificulta la valoración de la “fibra dietaria fisiológica”, a la que se intenta acercarse por diferentes vías. Sin embargo para el rotulado de alimentos se requiere de métodos rápidos y confiables para la determinación cuantitativa de la fibra total.

### Método de Fibra Insoluble en Detergente Neutro (NDF) (A.O.A.C., 50(1): 50-55 (1967))

Reactivos:

- Antiespumante
- Sulfito de sodio anhidro
- Solución de detergente neutro (dodecil sulfato de sodio, ácido etilendiamitetraacético (EDTA), trietilenglicol, buffer de pH 6,9-7,1)
- Acetona
- $\alpha$ -amilasa estable al calor
- Agua destilada en ebullición

Pesar exactamente 0,5-1,0 g de muestra perfectamente molida y transferirla a un Erlenmeyer de 250 ml esmerilado. Agregar en el siguiente orden, 100 ml de solución de detergente neutro, 0,2 ml de amilasa, 10 gotas de antiespumante y 0,5 g de sulfito de sodio. Conectar al condensador y calentar de manera tal que entre en ebullición en 5-10 min.. Cuando la solución entró en ebullición, reducir el calentamiento para evitar la formación de espuma. Hervir exactamente 60 min. (contar el tiempo a partir del momento en que comenzó la ebullición), agitando periódicamente para suspender los sólidos adheridos a las paredes.

Filtrar inmediatamente a través de un crisol de vidrio de poro grueso previamente tarado, aplicando vacío en forma suave. Lavar el Erlenmeyer con un mínimo de agua caliente (80-90°C), volcar en el crisol y succionar hasta casi sequedad. Repetir el lavado con agua caliente dos veces más. Luego lavar dos veces con acetona (aproximadamente 5 ml por vez) y succionar hasta sequedad. Secar el crisol en estufa a 100°C durante 8 horas o toda la noche.

Calcinar durante 3 horas a 500-550°C, enfriar en desecador y pesar. La diferencia de peso obtenida se refiere a porcentaje de muestra y se consigna como fibra insoluble en detergente neutro.

**Notas:**

1. No se realizará en la práctica el agregado de amilasa debido a que la cátedra no dispone de esta enzima termo-resistente.
2. Debido a inconvenientes de orden práctico, en el laboratorio no se realizará la etapa de calcinación. El resultado se informará como el peso obtenido, referido a 100, luego del secado a 100°C.
3. Para reutilizarlos, los crisoles se deben dejar en solución sulfonítrica (1:1), preferentemente durante 1 noche; luego enjuagar abundantemente con agua destilada y, posteriormente, secar a 100°C.

## AZÚCARES

Los **azúcares** son nutrientes proveedores de energía y junto a otros hidratos de carbono superiores constituyen, en general, más del 50 % de la dieta humana. Los principales son: *sacarosa* (obtenida por ej. de caña de azúcar o remolacha azucarera); *glucosa* (proveniente de hidrólisis de almidones, principalmente de maíz); y otros como fructosa, lactosa, maltosa, etc.

Aunque los azúcares pueden determinarse por métodos químicos (métodos de reducción del cobre –A.O.A.C., 920.183, 1990, iodometría de aldosas), estos en su mayoría carecen de especificidad y no pueden distinguir la glucosa de otros monosacáridos. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detector de índice de refracción, es un método de elección para el análisis cuali y cuantitativo de hidratos de carbono.

Existen además métodos enzimáticos, sensibles y específicos, para cuantificar azúcares. Se encuentran disponibles comercialmente una serie de paquetes de reactivos especialmente preparados en composición y concentración adecuadas para ser empleados en el análisis de determinados componentes de alimentos. Estos conjuntos de reactivos (o "kits") son ampliamente empleados en el área de análisis clínicos y de aguas, y se introdujeron con éxito en los laboratorios de análisis de alimentos.

### **Determinación de glucosa en una muestra de miel**

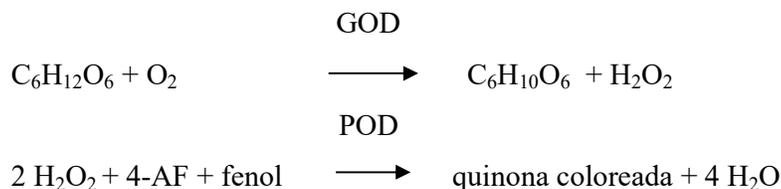
**Toma de muestra.** (A.O.A.C., 969.38 B, 1990).

Las mieles que presentan cristalización de azúcares (granulación) deben homogeneizarse introduciendo el envase en un baño de agua a una temperatura no mayor de 60°C. Agitar hasta disolución de los cristales, enfriar y tomar la porción para el análisis. Si no se observa granulación basta agitar con una varilla.

### **Método de la glucosa oxidasa-peroxidasa (Trinder, 1972)**

La determinación de la glucosa se realizará mediante un método enzimático colorimétrico.

**Fundamento:** se basa en la oxidación de glucosa a ácido glucónico por acción de la enzima glucosa oxidasa (GOD) (E.C.1.1.3.4)<sup>1</sup> con formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El peróxido de hidrógeno formado, en presencia de la enzima peroxidasa (POD) (EC .11.1.7)<sup>1</sup>, produce una oxidación en la que se une el fenol con la 4-aminofenazona (4-AF) para dar una quinonaimina coloreada. La intensidad del color, medido por la absorbancia, es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.



**Materiales:**

- 1 matraz de 100 ml
- 1 vaso de 50 ml.
- 1 embudo, papel de filtro.
- Tubos de ensayo corto
- Micropipeta automática (50 µl)
- Espectrofotómetro UV-visible con cubetas de 1 cm de paso de luz.

**Reactivos:**

- agua destilada
- solución de Carrez I: disolver 15 g de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O en agua y llevar a 100 ml.
- solución de Carrez II disolver 30 g de Zn(CH<sub>3</sub>.COO)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y llevar a 100 ml
- Kit enzimático para medición de glucosa

**Preparación de la muestra:** Pesar y diluir convenientemente la muestra tal para que la concentración de glucosa sea alrededor de 100 - 200 mg %, (considere que la muestra contiene aproximadamente 30 %). Pesar a la décima de mg y trasvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml mediante lavados con agua destilada. Disolver mezclando y sin calentar. Añadir 0,05 ml de la solución de Carrez I (con pipeta automática) y mezclar, luego

---

<sup>1</sup>Las enzimas se nombran según un código de cuatro números (EC.a.b.c.d) que hacen referencia al tipo de reacción que catalizan, al grupo catalítico y al sustrato sobre el que actúan  
*Área Química y Microbiología de Alimentos – Departamento Química Orgánica*  
*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad de Buenos Aires* 32

agregar 0,05 ml de solución de Carrez II, mezclar bien y llevar a volumen (pueden agregarse unas gotas de etanol para prevenir la formación de espuma). Filtrar a través de papel de filtro, desechando los primeros 10 ml. Mantener la solución filtrada a 20°C. Si la solución está perfectamente límpida, no filtrar. En caso de duda, consultar a un docente.

**Procedimiento:**

1. Colocar 50 µl de muestra en un tubo de ensayo
2. Agregar 5 ml del reactivo de trabajo preparado.
3. Incubar en baño de agua a 37°C durante 10 minutos.
4. Realizar el mismo procedimiento con una solución standard de glucosa 0,1% y un blanco con agua.
5. Medir la absorbancia de las muestras a 505 nm en cubetas de vidrio o plástico.

**Cálculos:**

$$\% \text{ glucosa} = \frac{\text{Abs muestra} \times \text{Conc. Standard (g/100 ml)}}{\text{Abs standard} \times \text{Conc. Muestra (g/100 ml)}} \times 100$$

Rango del método: 50-500 mg/dl.

## PROPIEDADES FUNCIONALES DEL ALMIDÓN

### **Introducción:**

El almidón es el hidrocoloide más ampliamente usado en la tecnología de alimentos. Esto es debido a su gran versatilidad funcional, ya sea en sus formas natural o modificada, y además por su costo relativamente bajo.

Los cambios de viscosidad que ocurren cuando el almidón se calienta en medio acuoso, así como la capacidad de gelificar y la estabilidad de las pastas y geles formados son de fundamental importancia en tecnología de alimentos.

Como resultado de su estructura y composición particulares, cada almidón tiene un comportamiento distinto en cuanto a la viscosidad de sus pastas, al tipo de gel formado y a su tendencia a la gelificación y a la retrogradación. De esta manera, eligiendo el almidón correcto se pueden controlar las características de un producto.

**Finalidad del análisis:** Observar las propiedades funcionales de almidones de distintas fuentes, analizando las diferencias.

### **Determinación de la temperatura inicial de gelatinización.**

Suspender en un erlenmeyer o vaso de ppdo de 50 mL, 3 g de almidón en 30 mL de agua destilada. Agregar un buzo y calentar en plancha calefactora agitando constantemente. Tomar la temperatura cada 10 segundos utilizando un termómetro digital tipo pinche (\*). La temperatura aumentará de forma continua hasta el punto en que los gránulos de almidón alcancen la temperatura de gelatinización, momento en que se mantendrá constante (cambio de fase).

(\*) con cuidado de no golpear la punta de la sonda, que es donde se encuentra el sensor

### **Determinación de la concentración aproximada necesaria para gelificar.**

Preparar 40 ml de solución al 10 % de almidón en agua destilada. A partir de esta solución preparar soluciones de concentración 8, 6, 4 y 2 % de almidón.

Transferir 10 ml de solución 10 % a un tubo de ensayos grande y colocar en un baño de agua a ebullición. Agitar con varilla constantemente hasta ebullición. Continuar el calentamiento con agitación durante 5 minutos. Enfriar en baño de agua fría.

Repetir este procedimiento para las restantes diluciones.  
Informar la concentración mínima necesaria para gelificar.

### **Tendencia a la retrogradación**

En un tubo de centrífuga, suspender 4 g de almidón en 40 ml de agua destilada. Colocar el tubo con la suspensión en baño de agua en ebullición. Agitar constantemente hasta ebullición para evitar la formación de grumos. Continuar el calentamiento con agitación por 5 minutos. Enfriar en agua fría y observar las características del gel formado (por ejemplo transparente, opaco, gomoso, elástico, etc.).

La tendencia a la retrogradación se estima a partir del volumen de agua separado luego de su almacenamiento a 4°C durante un tiempo estipulado. Colocar a 4°C durante 24 h como mínimo. Centrifugar durante 20 minutos y luego extraer por succión (usar pipeta Pasteur) el agua separada. Informar el volumen de líquido separado.

Informar las características del gel formado y el volumen desplazado por retrogradación para cada almidón estudiado.

Confeccionar una tabla, tal como se muestra a continuación, para presentar los datos correspondientes a tres almidones diferentes. Comparar sus propiedades y comentar las posibilidades de emplear uno u otro para diferentes tipos de productos alimenticios.

Tipo de almidón	Características del gel	Tendencia a retrogradar

## PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS

Las propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos están relacionadas con sus características estructurales y físico-químicas.

Las propiedades funcionales permiten contribuir a las características de los alimentos cuando se encuentran en ellos o son agregadas en los mismos. Estas pueden clasificarse en tres grandes grupos: propiedades de hidratación dependiente de las interacciones proteína-agua, propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína y propiedades superficiales. El primer grupo incluye propiedades tales como la adsorción y absorción de agua, retención de agua, dispersibilidad y solubilidad. El segundo grupo de propiedades interviene en fenómenos tales como la precipitación, gelificación y formación de otras estructuras diferentes como, por ejemplo, la formación de masa. El tercer grupo se refiere a las propiedades de emulsificación y formación de espumas.

### GELIFICACION

Materiales

Gelatina

Agua destilada

HCl 2N

NaOH 2N

Tubos tipo Falcon de 15 mL de capacidad

Baño 100 °C

pHmetro

#### **Concentración mínima para gelificar**

En tubos de centrifuga tipo Falcon de 15 mL de capacidad se disponen 5 mL de soluciones de gelatina en agua destilada (0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10% m/v). Los tubos se calientan en baño de agua a 100 °C durante 1 hora, y entonces se colocan en la heladera durante 90 minutos. La menor concentración de proteína necesaria para gelificar es la del tubo en el cual la muestra no cae o se desliza.

### **Efecto del pH:**

Prepara 15 mL de una solución de gelatina al 10% m/v en agua destilada. Dividir en tres alícuotas y ajustar cada una a un pH diferente, 4,0 7,0 y 11,0, empleando HCl o NaOH 2N. Colocar en tubos de centrifuga tipo Falcon de 15 mL y realizar el tratamiento del ítem anterior. Observar si hubo formación de gel, si hay líquido liberado, etc. Registrar las siguientes características: color, opacidad y textura. Sobre la base de los resultados obtenidos, relacionar las características de los geles con la condición de pH utilizado.

## ALTERACIONES Y ADULTERACIONES

### ALTERACIONES DE LÍPIDOS

#### **Índice de ácidos grasos libres (IUPAC, II.D.1, modificado)**

Los aceites y grasas, debido a la acción de las lipasas, contienen ácidos grasos libres en mayor o menor cantidad según sean las condiciones de manufactura y tiempo de almacenamiento del producto. El Código Alimentario Argentino menciona el máximo valor de acidez libre permitido en aceites comestibles (Art. 525).

Se expresa en mg de KOH requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres presentes en 1 g de grasa.

#### **Reactivos:**

- Sol. de etanol: éter etílico (1:1 v/v) neutralizada = 60 ml.
- NaOH 0,05 N valorado.
- Sol. de fenolftaleína al 1 %

Pesar exactamente 1-2 g de muestra en un Erlenmeyer tarado de 125 ml, y disolverla en 60 ml de la mezcla de solventes previamente neutralizada a la fenolftaleína con NaOH diluido. Agitar y titular con NaOH 0,05 N valorado, utilizando una pipeta de 2 o 5 ml graduadas al 0,1 ml (No introducir la pipeta mojada en el frasco del NaOH 0,05 N, sino sacar 10 ml en un vasito y pipetear de allí).

Calcular e informar la acidez libre en mg de KOH por g de aceite y en g de ácido oleico por 100 g de aceite, que es otra forma común de expresarla. (PM ácido oleico = 282,4).

#### Nota:

Punto final: que la coloración rosa del indicador permanezca 15-30 s.

### Cálculo de resultados:

$$IA \text{ (mg KOH / 1 g grasa)} = (V \times N \times f)_{\text{NaOH}} M_{\text{KOH}} / m_M$$

$$IA \text{ (g ácido oleico / 100 g aceite)} = (V \times N \times f)_{\text{NaOH}} M_{\text{ACIDO OLEICO}} \times 100 / (1000 \times m_M)$$

Donde: IA: índice de acidez  $V_{\text{NaOH}}$ : ml de NaOH gastados en la titulación

$N_{\text{NaOH}}$ : normalidad del NaOH  $f_{\text{NaOH}}$ : factor del NaOH

$m_M$ : masa de muestra (g)

### Índice de peróxido (A.O.A.C., 965.33, 1990; A.O.C.S., Cd 8-53, 1963)

Las grasas y aceites, por acción de diversos factores físicos o biológicos (disponibilidad de oxígeno, presencia de ciertas enzimas y metales, acción de la luz, el calor y la humedad, etc.) sufren procesos de rancidez oxidativa.

Este método determina todas las sustancias que bajo las condiciones del test, oxidan al yoduro de potasio, y las expresa en términos de miliequivalentes de peróxido por 1000 g de muestra. Se asume generalmente que todas las sustancias son peróxidos u otros productos similares de la oxidación de grasa. Es aplicable a todas las grasas y aceites típicos, incluidas las margarinas. El método es altamente empírico y cualquier cambio en el procedimiento puede provocar variación de los resultados.

### Reactivos:

- Mezcla ácido acético-cloroformo (3:2)
- Solución saturada de KI (se prepara en el momento)
- Solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N (valorada).
- Solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 N (valorada).
- Solución de almidón 1 %.

Pesar  $5,00 \pm 0,05$  g de muestra en un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, con tapa esmerilada. Agregar 30 ml de la mezcla de solventes. Agitar hasta disolución total de la muestra. Agregar 0,5 ml de la solución saturada de KI, usando pipeta (preferiblemente de tipo Mohr).

Dejar la solución exactamente 1 min., con ocasional agitación, y agregar después 30 ml de agua destilada.

Titular con solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N, agregándole gradualmente y con agitación constante y vigorosa. Continuar la titulación hasta que el color amarillo haya casi desaparecido. Agregar aproximadamente 0,5 ml de solución indicadora de almidón. Continuar la titulación agitando vigorosamente el Erlenmeyer cerca del punto final, para liberar todo el  $\text{I}_2$  de la capa clorofórmica. Agregar la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gota a gota hasta desaparición del color azul. Si el gasto de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N es muy pequeño ( $< 0,5$  ml), repetir la determinación y titular con solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 N. Conducir paralelamente un blanco (el volumen gastado debe ser  $< 0,1$  ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N).

#### **Cálculo de resultados:**

$$\text{IPO (meq. de peróxido / 1000 muestra)} = (M - B) \times N \times f \times 1000 / m_M$$

Donde:

M = ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastados en la titulación de la muestra.

B = ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastados en la titulación del blanco.

N = normalidad de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

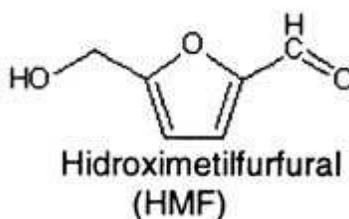
f = factor de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

$m_M$  = masa de muestra (g)

## ALTERACIÓN Y ADULTERACIÓN EN MIEL

### Hidroxiacetilfurfural (HMF)

El 5-hidroxiacetil-2-furaldehído o hidroxiacetilfurfural (HMF) es un producto generado por la deshidratación -catalizada por ácidos- de azúcares y/o por reacción de Maillard a partir de azúcares reductores.



La miel recién extraída contiene muy poca cantidad de HMF, sin embargo su contenido aumenta durante su procesamiento y posterior almacenamiento. Este producto suele ser sometido a tratamiento térmico con el fin de reducir la viscosidad y prevenir la cristalización y/o la fermentación. Con respecto al almacenamiento, si la miel se mantiene por largos períodos a temperaturas promedio entre 12 y 15°C, la formación del HMF será mínima, pero a temperaturas superiores se verá favorecida, debido principalmente al valor de acidez propio de la miel.

Por otra parte, la miel, compuesta principalmente por azúcares, ha sido tradicionalmente objeto de adulteraciones con jarabes. Éstos se obtienen de manera muy económica a partir de la hidrólisis ácida del almidón. Durante este tratamiento se forma HMF en cantidades importantes, con lo cual, la presencia de altos niveles de este compuesto en miel sugieren la posibilidad de que el alimento haya sido adulterado con este tipo de productos.

Por lo anteriormente expuesto, el contenido de HMF constituye un parámetro de genuinidad de importancia en miel. El Código Alimentario Argentino (CAA) fija una cantidad máxima permitida de HMF en miel.

## Determinación de hidroximetilfurfural por H.P.L.C.

**Principio:** El hidroximetilfurfural será determinado en una solución acuosa de miel, clara y filtrada, utilizando cromatografía líquida de alta performance en fase reversa, equipada con un detector UV-visible. Se cuantificará utilizando una curva de calibración construida a partir de las señales de estándares conocidos.

### Reactivos

- Agua bidestilada o Millipore necesaria para preparar todas las soluciones a utilizar.
- Fase móvil: agua-metanol (70:30), ambos calidad HPLC.
- Solución acuosa estándar de HMF (aproximadamente 400 mg/L).
- Solución de Carrez I: disolver 15 g de  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  en agua y llevar a 100 ml.
- Solución de Carrez II: disolver 30 g de  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  y llevar a 100 ml.

### Equipamiento

Equipo para HPLC marca Spectra System P2000, Thermo Separation Products, equipado con una válvula inyectora Reodyne provista de un loop de inyección de 10  $\mu$ l, detector UV-visible Spectra 100, Thermo Separation Products, y un integrador Data Jet Integrator, Thermo Separation Products. La columna a utilizar será Phenomenex Spherclone s u ODS (2); 250 mm x 4,6 mm id x 5  $\mu$ m. La detección se realizará a  $\lambda = 272$  nm.

### Procedimiento

#### Curva de calibración:

Preparar, a partir de la solución madre entregada por el docente, soluciones estándar de HMF de concentraciones 1, 2, 5 y 10 mg/L (consultar).

Inyectar por triplicado 20  $\mu$ l de cada una de las soluciones estándar de HMF. Las corridas se realizarán en modo isocrático, a temperatura ambiente, con un flujo de 1 ml/min. A partir de los resultados obtenidos, grafique la curva de calibración correspondiente (Área vs. concentración estándar de HMF).

**Muestra:**

Pesar exactamente 5 g de miel en un vaso de precipitados de 50 ml. Disolver la muestra en aproximadamente 25 ml de agua (bidestilada o millipore) y transferir cuantitativamente a un matraz de 50 ml. Agregar 0,5 ml de la solución de Carrez I y mezclar. Agregar 0,5 ml de solución de Carrez II, mezclar y llevar a volumen con agua (pueden agregarse unas gotas de etanol para prevenir la formación de espuma). Filtrar en papel, descartando los primeros 10 ml del filtrado. Posteriormente, filtrar a través de un filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Injectar la muestra por duplicado. A partir de las áreas obtenidas y utilizando la curva de calibración, calcule el valor, en mg/kg, del contenido de HMF del producto analizado.

**Determinación de presencia de dextrinas****Procedimiento**

Colocar aproximadamente 1 g de miel en un vaso de precipitado de 50 ml. Agregar 4 ml de agua destilada y disolver completamente la miel. Tomar 2 ml de la solución anterior, colocarlos en un tubo de ensayos y agregar 1 ml de etanol.

Observar el resultado:

- a) Líquido limpio: miel no adulterada.
- b) Líquido blanco-lechoso: miel adulterada.

**Actividad Diastásica**

Las enzimas son componentes minoritarios de la miel, pero su actividad enzimática es fundamental para la transformación del néctar en miel, ya que modifica azúcares complejos en simples, de fácil asimilación. El Código Alimentario Argentino contempla la determinación de la actividad diastásica (una de las enzimas de la miel) como una forma de valorar calidad, no por su importancia dietaria, sino por su sensibilidad al calor e inactivación por sobrecalentamiento o envejecimiento de la miel.

**Principio del método:** El sustrato de almidón tamponado, se incuba con la muestra, produciéndose la hidrólisis enzimática, que se determina por el agregado de reactivo de yodo, el cual produce coloración con el remanente del almidón no hidrolizado.

## **Materiales**

### **Buffer acetato – pH: 5.3 (1,59 M)**

Acetato de sodio – 3 H <sub>2</sub> O	87 g
Ácido acético glacial	10,5 ml
Agua destilada c.s.p.	500 ml

Disolver el acetato de sodio en 400 ml de agua, añadir el ácido acético disuelto en 50 ml de agua y completar hasta 500 ml. Ajustar a pH: 5,3 con acetato de sodio o ácido acético, según el caso.

### **Solución de cloruro de sodio 1 %**

Cloruro de sodio	1 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

### **Solución de almidón (0,05 %)**

Almidón soluble	0,050 g
Agua destilada csp	100 ml

Disolver el almidón en 80 ml de agua y llevar a ebullición 3 min, luego llevar a 100 ml. Conservar en frasco color caramelo en la heladera.

### **Solución de Iodo 0.1 N**

Ioduro de potasio	20,0 g
Iodo	12,7 g
Agua destilada csp	1000 ml

Disolver el IK en 100 ml de agua, luego agregar el I<sub>2</sub> sublimado y completar a 1,0 litro. La solución de trabajo se prepara por dilución de la solución de Iodo 0,1 N (1:10) con una solución de NaF (2 %). Conservar en frasco color caramelo en la heladera.

## **Preparación de la muestra**

Pesar 10,00 g de muestra de miel en un vaso de precipitado de 50 ml y añadir 10 ml de buffer pH: 5,3.

## **Procedimiento**

1. Colocar en una gradilla 10 tubos de ensayo y agregarle 1 ml de solución de cloruro de sodio al 1 %.
2. Agregar al primer tubo 1 ml de la muestra y mezclar.

3. Pasar luego 1 ml del primer tubo al segundo, mezclar y continuar así hasta el noveno tubo, desechando el último ml (las diluciones serán: 1/2; 1/4; 1/8; hasta 1/512).
4. El tubo décimo sirve de testigo
5. Colocar a cada tubo 1 ml de solución de almidón 0,050 % e incubar por 30 min a 37 °C.
6. Retirar, enfriar rápidamente y colocar una gota de solución de trabajo de yodo a cada tubo y agitar.

Observar la coloración.

### Expresión de los resultados

$$U.D = (\text{inversa de la dilución mayor que permanece incolora}) \times 2$$

Valor normal de miel: no menos de 32 U.D.

Cantidades menores de 32 U.D. corresponden a una miel vieja, calentada, mal procesada o adulterada. Existen mieles de bajo contenido de diastasa, por ejemplo, mieles de citrus.

Tabla de equivalencias del método de Bianchi y el I.D que corresponde al número de la escala de Gothe.

U.D. Bianchi	ID (Gothé)	
	Mínimo	Máximo
0	0,99	2,88
4	2,93	4,16
8	4,32	5,70
16	7,28	8,08
32	9,01	14,68
64	15,22	27,25
128	33,48	67,87

### Acidez Libre

La acidez libre se mide en función de los ácidos orgánicos que naturalmente contiene la miel. Los valores normales de acidez se incrementan si la miel ha fermentado y esto sucede en mieles con elevados porcentaje de humedad donde se han desarrollado mohos y levaduras. El CAA establece un valor máximo permitido.

### Reactivos

Solución de NaOH (0,05 N)

## **Determinación**

Pesar aproximadamente 10 g de muestra en un vaso de precipitados de 250 ml y agregarle 75 ml de agua destilada. Agitar y disolver completamente. Colocar el electrodo del pH metro en la solución, registrar el pH inicial y luego agregar NaOH 0,05 N con un flujo aproximado de 5 ml/min hasta alcanzar un pH de 8,50. Expresar los resultados como miliequivalentes de NaOH 0,05 N/Kg de muestra.

# *Microbiología de Alimentos*

*Área Química y Microbiología de Alimentos  
Dpto. Química Orgánica*

**2022**

**Lic. en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

# MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

## I. Microorganismos y alimentos

Importancia de los microorganismos en la alteración y conservación de los alimentos. Los microorganismos como agentes de biodeterioro y de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs). Rol de los microorganismos en la elaboración de alimentos.

## II. Principales grupos bacterianos de interés en los alimentos

Cocos Gram positivos (estreptococos y estafilococos), enterobacterias, bacilos Gram positivos formadores de endosporas, bacterias del ácido láctico, bacterias del ácido acético. Microorganismos proteolíticos y lipolíticos. Microorganismos indicadores.

## III. Ecología microbiana de los alimentos

Factores que afectan el crecimiento y supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Factores intrínsecos, extrínsecos, implícitos y de procesamiento. Los alimentos como ecosistemas. Mecanismos de adaptación de los microorganismos a diferentes factores de estrés. Homeostasis. Interacción de factores. Teoría de las barreras múltiples.

## IV. Enfermedades transmitidas por los alimentos

Agentes bacterianos de enfermedades transmitidas por los alimentos: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* (diferentes tipos), *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter* y otros patógenos menos frecuentes. El microorganismo y sus características. Aislamiento e identificación. Mecanismos de patogénesis. Características de la enfermedad. Alimentos involucrados. Incidencia. Prevención y control. Epidemiología de las enfermedades transmitidas por los alimentos.

## V. Enfermedades transmitidas por los alimentos

Agentes no bacterianos de enfermedades transmitidas por los alimentos. Hongos toxicogénicos. Parásitos. Virus. Agentes de encefalopatías espongiiformes (priones).

## VI. Deterioro microbiano de los alimentos

Microflora natural de diferentes tipos de alimentos. Fuentes de contaminación. Asociaciones microbianas características. El deterioro como consecuencia del metabolismo microbiano. Alteraciones microbianas de la leche y productos lácteos. Deterioro de carnes frescas y procesadas, aves, pescados y huevos. Alteraciones microbianas de los alimentos vegetales: frutas, hortalizas y cereales.

## VII. Control microbiológico de los alimentos

Programas de muestreo para el análisis microbiológico de los alimentos. Planes de dos clases. Planes de tres clases. Elección del plan de muestreo en función de la severidad frente a diversos riesgos microbiológicos. Concepto de categoría. Aplicación de los criterios microbiológicos para diferentes tipos de alimentos e ingredientes.

## VIII. Microbiología predictiva

Modelos matemáticos para predecir el comportamiento de los microorganismos en los alimentos. Uso de los modelos y su relación con la vida útil y la inocuidad de los alimentos. Evaluación del riesgo microbiológico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Brock, T.D. & Madigan, M.T. "Microbiología", 6ª Edición. Prentice Hall Hispanoamericana. México, 1993.
- ICMSF "Microbial Ecology of Foods". Volume 1: "Factors affecting life and death of microorganisms". Volume 2: "Food commodities". Academic Press, New York, 1980. (Edición en castellano: Editorial Acribia, 1985).
- ICMSF "Microorganisms in Foods. 1. Their significance and methods of enumeration", 2<sup>nd</sup> Ed. University of Toronto Press, 1978.
- ICMSF "Microorganisms in Foods. 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications", 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1986.
- ICMSF "Microorganisms in Foods. 5. Microbiological Specification of Food Pathogens", Blackie, London, 1996.
- ICMSF "Microorganisms in Foods. 6. Microbial Ecology of Food Commodities", 2<sup>o</sup> Ed, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.
- Adams, M.R. & Moss, M.O. "Food Microbiology". The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1995.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R. & Montville, T.J. (Eds.). "Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers". ASM Press, Washington D.C., 1997.
- Frazier, W.C. & Westhoff, D.C. "Microbiología de los Alimentos", Editorial Acribia, Zaragoza, 1993.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. "Fungi and Food Spoilage". 2<sup>nd</sup> Ed., Blackie Academic & Professional, London, 1997.
- Beuchat, L.R. (Ed.). "Food and beverages mycology". 2<sup>nd</sup> Ed., Van Nostrand Reinhold, New York, 1987.
- Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. (Eds.). "Compendium of methods for the microbiological examination of foods" 3<sup>rd</sup> Ed. APHA, 1992.
- Mossel, D.A.A. & Moreno García, B. "Microbiología de los Alimentos". Ed. Acribia, Zaragoza, 1985.
- Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. & Zucca, J. "Microbiología Alimentaria", Volumen I y II. Ed. Acribia, Zaragoza, 1994.
- Eley, R. (Ed.). "Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana". Ed. Acribia, Zaragoza, 1990.

# MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>TRABAJO PRÁCTICO N° 1</b>	<b>5</b>
<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	5
<i>SALMONELLA SPP.</i>	6
<i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	8
<b>TRABAJO PRÁCTICO N° 2</b>	<b>13</b>
<b>TRABAJO PRÁCTICO N°3</b>	<b>16</b>
<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	25
<i>ESCHERICHIA COLI O157:H7</i>	28
<b>GUÍAS DE ESTUDIO</b>	<b>31</b>
<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	<b>37</b>
<b>MUESTREO PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS</b>	37
<b>RECOLECCIÓN Y MANIPULEO DE LAS MUESTRAS</b>	41
<b>BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS TOTALES</b>	42
<b>PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA EL RECuento EN PLACA DE BACTERIAS AERÓBICAS TOTALES</b>	43
<b>NÚMERO MÁS PROBABLE</b>	48
<b>BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES A 45°C Y <i>E. COLI</i></b>	50
<b>BACTERIAS PSICOTRÓFICAS</b>	51
<b>ANEXO: ÍNDICE</b>	<b>53</b>
<b>TABLAS</b>	<b>56</b>
<b>TABLAS NMP</b>	64
<b>MÉTODOS DE TINCIÓN</b>	67
<b>SOLUCIONES Y REACTIVOS</b>	70
<b>MEDIOS DE CULTIVO</b>	72
<b>REGLAS BÁSICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD PARA ALUMNOS DE LABORATORIOS DE QUÍMICA Y BIOLOGÍA - PAUTAS DE ACTUACIÓN EN CASOS DE EMERGENCIAS</b>	118

## **TRABAJO PRÁCTICO N° 1**

### ***Staphylococcus aureus, Salmonella spp, Clostridium perfringens***

#### ***Staphylococcus aureus***

##### **Preparación de la muestra**

Se entregará a los alumnos un homogenato preparado con 10 g de leche en polvo más 90 mL de agua peptona 0,1% sobre el cual se realizará el recuento del microorganismo.

##### **Aislamiento**

Se sembrará 0,1 mL del homogenato por duplicado en placas de agar Baird-Parker y placas de Agar Manitol salado o Medio 110 para estafilococos. La siembra se efectuará en superficie. Incubar a 37°C, 48 h. Las colonias típicas se pasarán a tubos de BHI (Brain Heart Infusion) inclinado. Las colonias típicas de *S. aureus* en Baird Parker son circulares, suaves, convexas, de 2 a 3 mm de diámetro en placas poco crecidas, de grises a negras, rodeadas de un halo opaco y, frecuentemente de un halo claro más externo. Ocasionalmente se encuentran cepas no lipólicas que no presentan halos. La apariencia puede ser seca y el color menos intenso si proviene de un alimento congelado o desecado. En Agar Manitol salado, la producción de ácido a partir de la fermentación de manitol se pone de manifiesto por el viraje al amarillo del indicador de pH rojo fenol. En el Medio 110 para estafilococos la fermentación de manitol debe evidenciarse agregando unas gotas de indicador de pH sobre las colonias. En este medio, las colonias típicas de *S. aureus* son color amarillo dorado por la producción de pigmento. Además, se pone en evidencia la licuefacción de la gelatina por la reacción de Stone, inundando la placa con solución saturada de sulfato de amonio o una solución al 20 % de ácido salicílico. Después de 10 minutos aparecen zonas claras alrededor de las colonias que licuaron la gelatina.

##### **Pruebas de identificación**

De los cultivos aislados a partir del alimento se realizará:

1) Tinción de Gram.

2) Prueba de la Catalasa:

Se emulsiona un ansa de cultivo en una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 % sobre portaobjetos. La efervescencia causada por la liberación de O<sub>2</sub> indica la presencia de catalasa.

3) Prueba de la Coagulasa:

Colocar 0,5 mL de plasma citratado de conejo o humano, diluido en solución fisiológica, en un tubo de hemólisis. Agregar un ansa de cultivo o 0,5 mL de cultivo en caldo e incubar a 37°C.

La aparición de grumos o coágulos en el término de 1 a 4 horas indica que la cepa es coagulasa (+).

El coágulo formado debe ser firme y organizado (3+) o que no se cae al invertir el tubo (4+).

Paralelamente hacer un blanco sin sembrar y un testigo con cepa de estafilococo coagulasa (+).

4) Prueba de la Termoneucleasa:

Las placas de Baird-Parker en las que se observan colonias típicas se colocan en estufa de 60°C durante 2 h para inactivar las nucleasas termosensibles. Luego de la inactivación, verter en cada

placa 10 mL de TDA (agar con ADN y azul de toluidina) fundido. Incubar a 37°C durante 18 a 24 h. La hidrólisis del DNA se evidencia por la aparición de halos claros alrededor de las colonias.

### **Salmonella spp.**

#### **Enriquecimiento no selectivo**

Se incubará un homogenato realizado con 25 g de leche en polvo y 225 mL de Caldo Lactosado 16 h a 37°C.

#### **Enriquecimiento selectivo**

Se efectuará en paralelo en dos medios de cultivo. Se sembrará 1 mL del caldo de enriquecimiento no selectivo en 10 mL de Caldo Selenito Cistina y en 10 mL de Caldo Tetrionato respectivamente. Se incubará el Caldo Selenito Cistina 18 h a 37°C y el Caldo Tetrionato 18 h a 43°C.

#### **Aislamiento**

##### **Medios sólidos de aislamiento. Observación de colonias típicas.**

A partir de cada tubo del enriquecimiento selectivo sembrar por estría en:

- 1) Agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato)
- 2) Agar Bismuto-Sulfito
- 3) Agar Verde Brillante (BPLS)

Incubar las placas invertidas a 37°C durante 24 h. Observar las colonias desarrolladas.

Las colonias típicas de *Salmonella* spp. son:

Agar XLD: colonias pequeñas, color rosa con o sin centro negro.

Agar Bismuto-Sulfito: colonias con centro negro, borde claro, precipitado negro con brillo metálico alrededor (“ojo de conejo” u “ojo de pez”).

Agar Verde Brillante: colonias pequeñas, translúcidas o incoloras. El medio a su alrededor vira al rojo.

Las colonias típicas se transfieren a Agar Nutritivo inclinado y se incuban a 37°C durante 24 h.

#### **Pruebas de identificación**

A partir de cada cultivo puro realizar:

- 1) Tinción de Gram.
- 2) Prueba de oxidasa.
- 3) TSI. Sembrar por punción y en superficie. Incubar a 37°C, 24 h.
- 4) LIA. Sembrar por punción y en superficie. Incubar a 37°C, 24 h.
- 5) Caldo urea. Sembrar e incubar a 37°C, 24 h.
- 6) Prueba de la  $\beta$ -galactosidasa: a partir de un cultivo en agar inclinado, tomar una ansada bien cargada y emulsionarla en 0,2 mL de solución salina fisiológica hasta conseguir una suspensión densa. Colocar un disco de ONPG. Incubar a 37°C por 20 minutos. Observar hasta las 4 horas de incubación para dar un informe negativo. El color amarillo indica que la reacción es positiva.
- 7) Producción de Indol. Sembrar un tubo de caldo triptona. Incubar 24 h a 37°C.

##### **Investigación de Indol** – Técnica de Kovacs:

Agregar al cultivo 0,2-0,3 mL de reactivo y agitar. Esperar unos minutos.

Coloración roja en la parte superior del tubo indica formación de Indol (+).

- 8) Prueba de Voges Proskauer y de Rojo de Metilo. Sembrar un tubo de caldo Clark y Lubs (RMVP). Incubar 48 h a 37°C.

### Investigación de acetil metil carbinol – Técnica de Voges Proskauer:

Separar una alícuota del cultivo en un tubo y agregar, respetando el orden:

- 0,6 mL de  $\alpha$ -naftol al 5 % y
- 0,2 mL de KOH al 40 %

Agitar el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y oxidar la acetoína (acetil metil carbinol) y permitir el desarrollo de color. Dejar descansar por lo menos 10-15 minutos. De ser necesario agregar unos cristales de creatina.

El máximo desarrollo de color se observa luego de dos horas.

Color rosado en la superficie: producción de acetoína (+), VP (+).

Color amarillo o cobrizo: producción de acetoína (-), VP (-).

### Investigación de acidez – Prueba del Rojo de Metilo:

Agregar 5 gotas de reactivo rojo de metilo al cultivo y observar inmediatamente.

Color rojo indica acidez (+).

Características del indicador Rojo de Metilo:

pH < 4,4	rojo
4,4 < pH < 6	rango de viraje del indicador
pH > 6	amarillo

9) Prueba de citrato: Sembrar por estría un tubo de agar Citrato Simmons. Incubar 24 h a 37°C.

Resultados típicos de *Salmonella* spp.:

- 1) Bacilo corto Gram negativo sin esporas
- 2) Oxidasa (-)
- 3) TSI: superficie inclinada: rojo o sin variación/profundidad: amarillo o negro, con o sin ruptura del agar por formación de gas. La mayoría de las cepas de *Salmonella* son lactosa (-) y sacarosa (-).
- 4) LIA: superficie inclinada: violeta/profundidad: violeta o negro (negro en la mayoría de los casos). *Salmonella* es lisina descarboxilasa (+). Excepción: *Salmonella paratyphi* A: profundidad: amarillo / superficie inclinada: violeta.
- 5) Caldo Urea: medio sin cambio de color. *Salmonella* es siempre ureasa negativa.
- 6)  $\beta$ -galactosidasa: (-), sin cambio de color. (El (+) se manifiesta por la aparición de color amarillo).
- 7) Indol (-).
- 8) Voges Proskauer (-) Rojo de Metilo (+).
- 9) Citrato (+) (la mayoría de las cepas).

### Identificación serológica de *Salmonella* spp.

Toda cepa sospechosa de *Salmonella* debe identificarse bioquímicamente antes de efectuar el análisis serológico. De lo contrario aglutinaciones positivas podrán ser originadas por otros microorganismos que poseen estrecha relación antigénica (*Arizona* - *Citrobacter*).

### Sueros polivalentes somáticos de *Salmonella*

La determinación del serogrupo somático (O) es suficiente para la confirmación de un aislamiento como *Salmonella* spp. Se deben utilizar sueros polivalentes que permitan la identificación de un elevado porcentaje (>98%) de los serotipos más frecuentes de *Salmonella* spp. La serotipificación

completa es de suma utilidad para los Laboratorios de Referencia, ya que desde el punto de vista epidemiológico permite establecer la prevalencia de determinadas serovariedades en distintas zonas geográficas. También es de utilidad para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y las vías de transmisión.

Técnica:

#### Aglutinación somática:

-Preparación del antígeno: utilizar un cultivo puro en agar inclinado de 24 h de incubación a 37°C. Suspender el crecimiento de la estría con 1 mL de solución fisiológica.

-Reacción: sobre un portaobjetos depositar una gota de c/u de los sueros polivalentes somáticos. Colocar al lado de cada suero, una gota de suspensión antigénica. Correr dos controles en paralelo: una gota de la suspensión del microorganismo (control de cambio de turbidez) y una gota de solución fisiológica con el antisuero (control negativo). Mover suavemente el portaobjetos, permitiendo que las dos gotas se mezclen. No homogenizar con ansa ni con varilla, sólo con el movimiento.

-Lectura: debe ser inmediata y no después de 5 minutos. En menos de un minuto se verá el desarrollo de grumos sobre el portaobjetos. Si no se observan cambios, la aglutinación es negativa. Las reacciones tardías o dudosas no deben considerarse.

### *Clostridium perfringens*

#### Preparación de la muestra

Pesar 10 g de leche en polvo en 90 ml de agua peptona 0,1%. Sobre este homogenato se realizará el recuento del microorganismo.

#### Aislamiento

Lo realizamos de dos maneras:

- En tubo: Transferir 1 mL del homogenato a cada uno de dos tubos de agar SPS (Sulfito Polimixina Sulfadiazina) previamente deaireados y mantenidos a 45°C. La punta de la pipeta debe ingresar hasta el fondo del tubo, e ir depositando la muestra en forma espiralada hacia arriba de modo de distribuir homogéneamente el inóculo, tratando de no agitar para no reintroducir oxígeno. Inmediatamente colocar vaselina estéril, tapar el tubo y colocarlo en un recipiente con agua helada (solidifica rápidamente el agar). Incubar a 37°C, 48 h en anaerobiosis.

- En placa: Transferir 1 mL del homogenato por duplicado en placas de Petri estériles y agregar 15 mL de Agar TSC (triptona-sulfito-cicloserina) o TSN (triptona-sulfito-neomicina) o SPS (sulfito-polimixina-sulfadiazina). Una vez solidificado el agar adicionar una sobrecapa del mismo medio (aproximadamente 10 mL más). Colocar en jarra de anaerobiosis junto con un sobre comercial generador de anaerobiosis y tapparla (alternativamente se puede realizar vacío con bomba con la tapa ya colocada). Incubar a 37°C, 48 h en anaerobiosis.

La colonia típica en estos medios es de color negro.

Las colonias típicas se transfieren a Caldo tioglicolato y se incuban a 37°C, 24 h en anaerobiosis.

#### Pruebas de identificación

A partir de los cultivos aislados se realizará:

- 1) Tinción de Gram: realizar la técnica descrita en la guía de reactivos y medios de cultivo. Observar forma y tinción de las células vegetativas, forma y disposición de las esporas.
- 2) Prueba de la catalasa: se emulsiona una ansada de cultivo en una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% sobre portaobjetos. La efervescencia causada por la liberación de O<sub>2</sub> indica la presencia de catalasa.
- 3) Utilización de azúcares: sembrar 0,2 mL del cultivo en cada uno de los tubos de caldo con azúcares (salicina-rafinosa-etc.), sin burbujear. Incubar 48 h a 37°C. Agregar unas gotas de indicador. Observar acidez y/o gas.
- 4) Reducción de nitrato/movilidad: sembrar una ansada por punción en un tubo de agar semisólido de nitrato. Incubar 24 h a 37°C. Agregar unas gotas de los reactivos. Observar los resultados.
- 5) Hidrólisis de la gelatina: sembrar 0,2 mL del cultivo en el fondo de un tubo con agar gelatina-lactosa, sin burbujear. Incubar 24 h a 37°C. Enfriar en hielo y observar el resultado.
- 6) Leche: sembrar 0,2-0,5 mL del cultivo en un tubo con leche. Incubar 24 h a 37°C. Observar las reacciones que ocurren (coagulación de caseína, formación de gas, digestión, etc.).
- 7) Esporulación: sembrar 0,2 mL del cultivo en caldo Duncan-Strong al fondo y sin burbujear. Incubar 24 h a 37°C. Realizar tinción de esporas (coloración con verde de malaquita). Observar forma y disposición de las esporas.

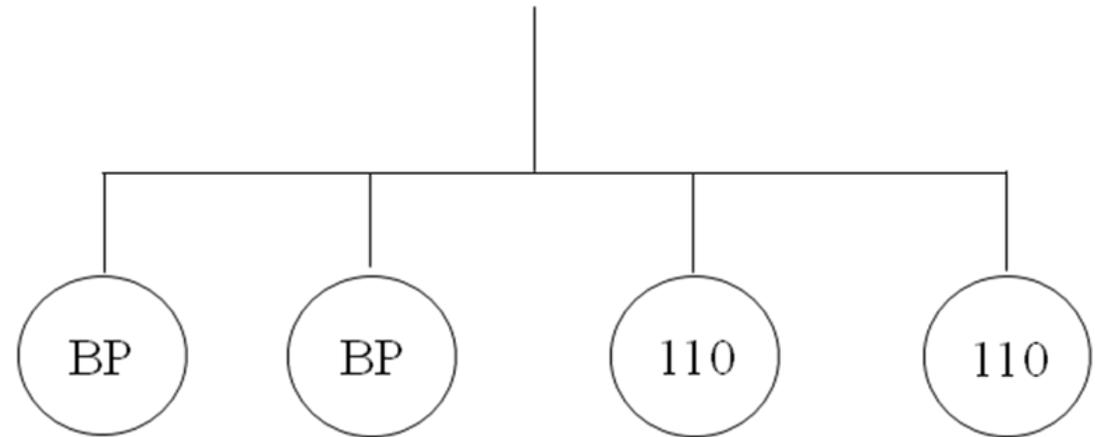
## RECuento de *Staphylococcus aureus*

### HOMOGENATO

10 g ALIMENTO + 90 mL AGUA PEPTONA 0,1%

### SIEMBRA EN SUPERFICIE

Transferir 0,1 mL del homogenato a dos placas de Petri con agar Baird Parker y a dos placas de Petri con Medio 110 para estafilococos.

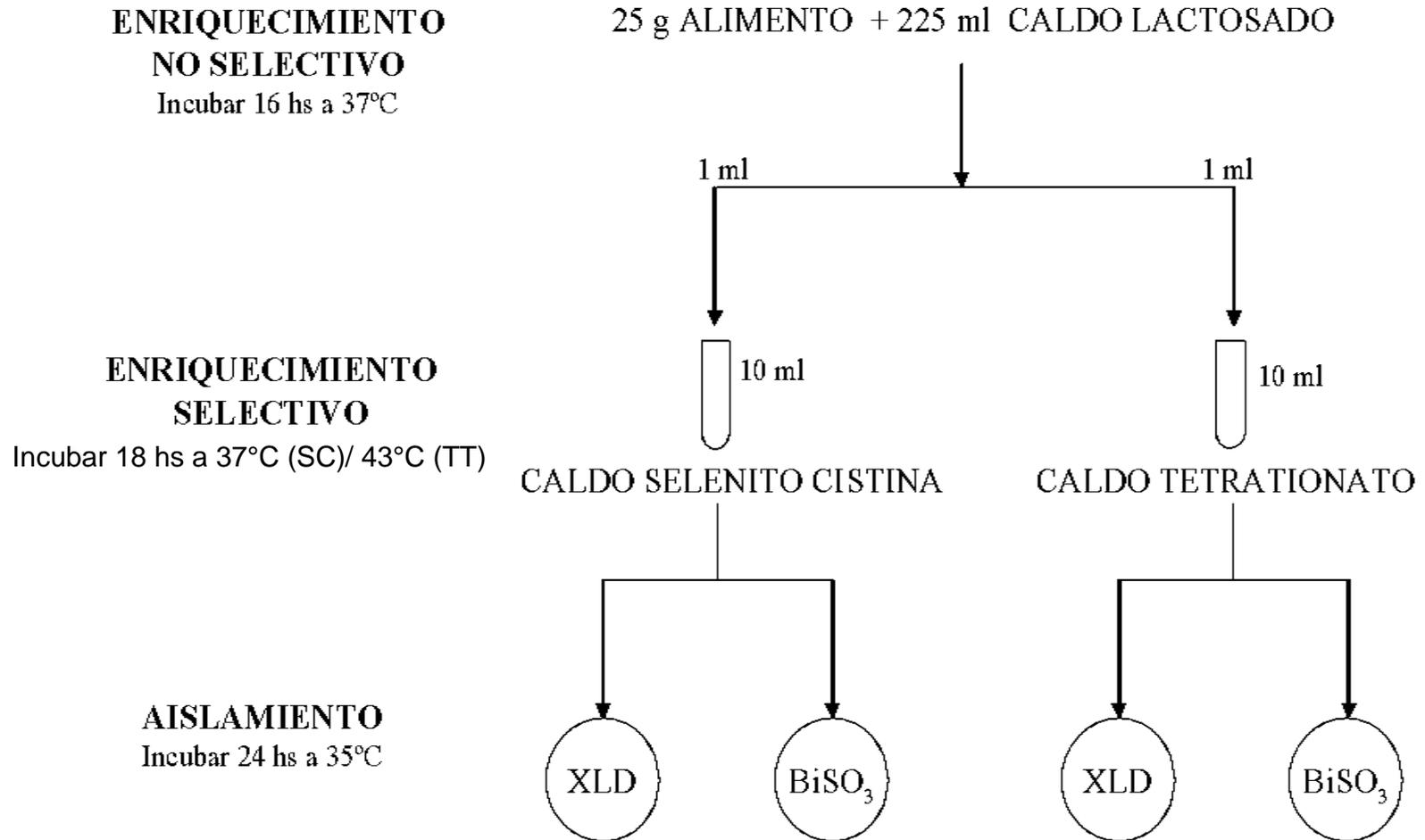


### AISLAMIENTO

Incubar 48 h a 37°C. Subcultivar las colonias típicas en caldo BHI.

### PRUEBAS BIOQUÍMICAS

# DETERMINACION DE *SALMONELLA*



PRUEBAS BIOQUIMICAS Y CONFIRMACION SEROLOGICA

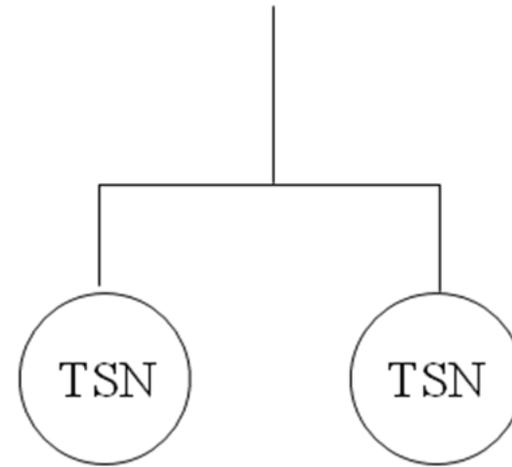
# DETERMINACIÓN DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

## HOMOGENATO

10 g ALIMENTO + 90 mL AGUA PEPTONA 0,1%

## SIEMBRA EN PROFUNDIDAD

Transferir 1 mL del homogenato a dos placas de Petri estériles. Agregar 15 mL de agar TSC, TSN o SPS. Una vez solidificado, agregar una sobrecapa de aproximadamente 10 mL más.



## AISLAMIENTO

Incubar 48 h a 37°C en anaerobiosis.

Subcultivar las colonias típicas en caldo tioglicolato. Incubar 24 a 37°C en anaerobiosis.

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS

## TRABAJO PRÁCTICO N° 2

### Análisis microbiológico de agua

#### **1. Toma de muestra y preparación de las diluciones**

Utilizar frascos estériles de capacidad adecuada para la cantidad de agua necesaria para realizar los análisis. Si se supone la presencia de cloro o cloraminas en el agua, agregar 100 mg de tiosulfato de sodio por litro de muestra en los frascos antes de su esterilización. Si pudieran hallarse presentes metales pesados proceder de igual forma empleando 572 mg de EDTA por litro de muestra. Realizar diluciones decimales sucesivas empleando como diluyente agua peptona 0,1 % (9060. St. Meth. 18th Ed. 1992).

#### **2. Metodología de análisis**

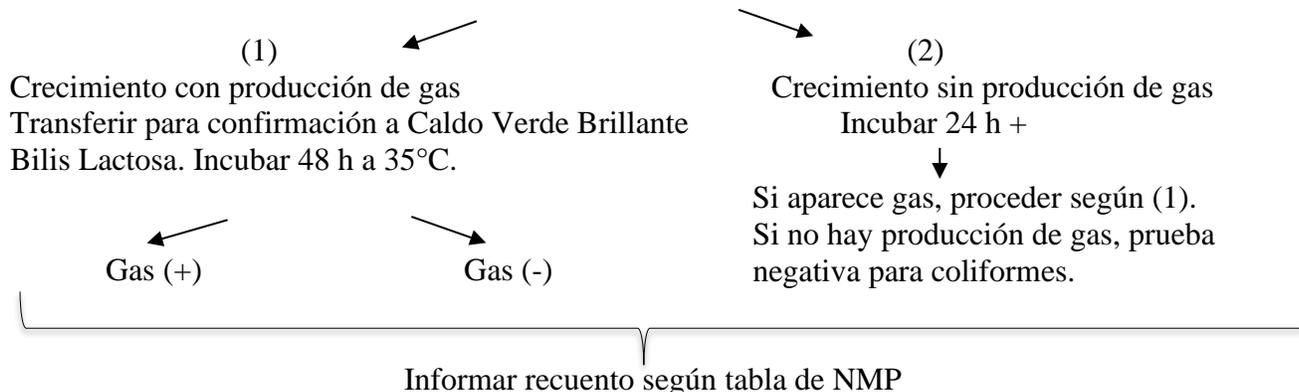
##### **a) Recuento total de bacterias aerobias mesófilas**

Sembrar en Agar para Recuento en Placa (APC). En la mayoría de las aguas potables los recuentos adecuados se logran sembrando 1 y 0,1 mL del agua tal cual y 1 y 0,1 mL de la dilución 1/100. Sembrar como mínimo dos diluciones sucesivas por duplicado. Incubar a 37°C por 24 h. Informar UFC de aerobios mesófilos/mL. (9215. St. Meth. 18th. Ed.1992).

##### **b) Recuento de coliformes totales por la técnica de fermentación en tubos múltiples (NMP)**

Esquema del método 9221. St. Meth. 18th. Ed. 1992.

Sembrar tubos de fermentación para NMP con Caldo Lauril Sulfato. Incubar por 24 h a 35°C.



##### **Ensayo presuntivo**

Se siembran series de 5 tubos de por lo menos 3 diluciones decimales sucesivas (generalmente 10, 1 y 0,1 mL) en Caldo Lauril Sulfato. Si el volumen sembrado es igual o mayor a 10 mL se utiliza el medio de concentración adecuada para no diluir los nutrientes. Se incuban 24-48 h a 35°C.

##### **Ensayo de confirmación**

Los tubos con producción de gas y/o crecimiento abundante se transfieren con ansa a tubos de fermentación de Caldo Verde Brillante Bilis Lactosa. Se incuban 48 h a 35°C.

c) **Determinación de *E. coli*** (Directiva 95/131 CEE)

-Enriquecimiento:

i) Filtrar por membrana 100 mL de agua y colocar el filtro en 25 mL de Caldo Lauril Sulfato. Incubar 4 h a 30°C y 14 h a 44°C.

-Aislamiento: A partir de los tubos que presenten producción de gas y/o crecimiento abundante, sembrar por estría en agar Endo o en agar EMB. Incubar 24 h a 37 °C. Reaislar las colonias típicas de *E. coli* en agar nutritivo.

-Confirmación: A partir del cultivo puro, realizar tinción de Gram, test de oxidasa y las pruebas de IMViC y/o set de pruebas múltiples.

Informar ausencia o presencia de *E. coli* en el volumen filtrado (100 mL).

d) **Determinación de *P. aeruginosa*** (Norma DIN 38411)

-Enriquecimiento:

Filtrar por membrana 100 mL de agua y colocar el filtro en 25 mL de Caldo Verde de Malaquita. Incubar 48 h a 37°C.

-Aislamiento: Si se observa crecimiento en el caldo de enriquecimiento, sembrar por estría en placas de Agar Cetrimida. Incubar 48 h a 42°C. Reaislar las colonias típicas de *P. aeruginosa* en agar nutritivo.

-Confirmación: A partir del cultivo puro, realizar tinción de Gram, test de oxidasa y sembrar por estría en Agar F, Agar P y Agar Acetamida. Informar ausencia o presencia de *P. aeruginosa* en el volumen filtrado (100 mL).

## **PATRÓN MICROBIOLÓGICO**

### **Requerimientos Microbiológicos del CAA**

**Art. 982** - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 68/2007 y N° 196/2007)

**Agua potable de suministro público y de uso domiciliario.** Características Microbiológicas:

Bacterias coliformes: NMP a 37 °C - 48 hs. (Caldo Mc Conkey o Lauril Sulfato), en 100 mL: igual o menor de 3.

*Escherichia coli*: ausencia en 100 mL.

*Pseudomonas aeruginosa*: ausencia en 100 mL.

En la evaluación de la potabilidad del agua ubicada en reservorios de almacenamiento domiciliario deberá incluirse entre los parámetros microbiológicos a controlar el recuento de bacterias mesófilas en agar (APC - 24 a 37°C): en el caso de que el recuento supere las 500 UFC/mL y se cumplan el resto de los parámetros indicados, sólo se deberá exigir la higienización del reservorio y un nuevo recuento. En las aguas ubicadas en los reservorios domiciliarios no es obligatoria la presencia de cloro activo.

**Art. 983** - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 68/2007 y N° 196/2007)

**Agua de bebida potabilizada envasada.** Características Microbiológicas:

Bacterias coliformes: NMP a 37 °C - 48 h (Caldo de Mc Conkey o Lauril sulfato), en 100 mL: igual o menor de 3.

*Escherichia coli*: ausencia en 100 mL.

*Pseudomonas aeruginosa*: ausencia en 100 mL.

Bacterias mesófilas (APC - 37 °C, 24 h) máx.: 500 UFC/mL. En el caso de que el recuento supere las 500 UFC/mL, y se cumplan con el resto de los parámetros indicados, sólo se deberá exigir la higienización de la planta y realizar un nuevo recuento.

## **ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA POTABLE**

### **NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL LABORATORIO:**

Fecha de informe:

### **DATOS DEL SOLICITANTE**

Nombre:

Dirección:

TE/Fax:

Correo electrónico:

### **DATOS DE LA MUESTRA**

Tipo de muestra:

Lugar de toma de muestra:

Características de la muestra\*:

Fecha de toma de muestra:

Fecha de inicio de análisis:

\*Consignar datos relevantes, por ejemplo, si es refrigerada, congelada, temperatura de recepción, si tiene signos de alteración, etc.

### **RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS**

Recuento total de bacterias aerobias mesófilas (Met., 9060 St. Meth 18th Ed. 1992):

Recuento de coliformes totales NMP (Met. 9221 St. Meth 18th Ed. 1992):

Determinación de *E. coli* en 100 mL (Directiva 95/131 CEE):

Determinación de *P. aeruginosa* en 100 mL (Norma DIN 38411):

### **CONCLUSIONES**

FIRMA Y ACLARACION DEL ANALISTA

## TRABAJO PRÁCTICO N°3

### Análisis microbiológico de quesos

#### **a) Toma de muestra (FAO, Manual para el control de calidad de los alimentos. 4. Análisis Microbiológico. 1981)**

Las muestras se toman de los recipientes originales sin abrir, o de porciones representativas de los recipientes abiertos, utilizando para ello instrumentos apropiados, como cucharas, cuchillos o espátulas esterilizadas. Las muestras se deben proteger de la contaminación, enfriar a 0-4,4°C y enviar rápidamente al laboratorio para ser examinadas. De los quesos duros y semiduros se deben tomar por lo menos cinco muestras de diferentes partes del queso, cada una de cinco gramos como mínimo.

#### **b) Preparación de la muestra y diluciones (FAO, Manual para el control de calidad de los alimentos. 4. Análisis Microbiológico. 1981)**

Pesar asépticamente 10 g de queso en un recipiente estéril con 90 mL de solución de citrato de sodio al 2 % previamente calentada (40-45°C). Dispersar completamente en el Stomacher o mezclar en vortex durante dos minutos. Esta es la dilución 1/10.

Para realizar las siguientes diluciones, transferir 1 mL de la primera dilución bien mezclada a un tubo con 9 mL citrato de sodio al 2 %. Agitar para homogeneizar. Repetir esta operación para obtener las diluciones sucesivas.

#### **c) Metodología de análisis.**

- c 1) Recuento de coliformes a 30°C
- c 2) Recuento de coliformes a 45°C
- c 3) Recuento de *E. coli*
- c 4) Recuento de mohos y levaduras
- c 5) Recuento de *Staphylococcus aureus*
- c 6) Determinación de *Salmonella* en 25 g

#### **c 1) Recuento de coliformes totales (FIL 73 A:1985)**

Puede realizarse por recuento en placa en medio sólido o en medio líquido por la técnica de número más probable (NMP).

##### **c 1.1) Recuento en placa.**

Sembrar por duplicado 1 mL de, al menos, dos diluciones sucesivas en placas de Petri vacías. Agregar aproximadamente 12 mL de Agar Bilis Rojo Violeta – lactosa (ABRV-L) fundido a 44-46°C. Mezclar. Dejar solidificar completamente y agregar entonces 4 mL más de medio fundido. Dejar enfriar e incubar las placas invertidas a 30°C por 22-26 h.

Seleccionar las diluciones que presenten entre 15 y 150 colonias. Contar las colonias rojas oscuras con diámetro de por lo menos 0,5 mm, características de bacterias coliformes.

**Confirmación:** Tomar entre 5 y 10 colonias del ABRV y transferirlas a tubos de fermentación con caldo Verde Brillante Lactosa 2 % de Sales Biliares (cada colonia a un tubo distinto). Incubar a 30°C por 22-26 h. Se consideran positivas aquellas colonias que den producción de gas.

El resultado se calcula en base al número de colonias confirmadas. Se expresa como “UFC de coliformes totales/g”.

La confirmación de las colonias es especialmente recomendable para el caso de alimentos que contengan otros azúcares distintos de lactosa.

### **c 1.2) Técnica del número más probable (NMP).**

**Prueba presuntiva:** Sembrar por triplicado 1 mL de, al menos, tres diluciones sucesivas en tubos de fermentación con caldo Verde Brillante Lactosa 2 % de Sales Biliares. Incubar a 30°C por 48 h. Se consideran positivos aquellos tubos que presenten formación de gas en la campanita de Durham.

**Confirmación:** Estriar cada tubo presuntamente positivo en agar EMB (agar eosina azul de metileno). Incubar a 30°C por 22-26 h. Se consideran colonias de coliformes las de aspecto oscuro/rojo/rosado y/o mucoso, con o sin brillo metálico.

Registrar el número de tubos positivos de cada dilución. Con la ayuda de una tabla de Número Más Probable (NMP), calcular el NMP de coliformes totales/g de muestra, teniendo en cuenta los tubos positivos confirmados y las diluciones empleadas.

### **c 2) Recuento de coliformes a 45°C (APHA, 1992)**

A partir de los tubos positivos de c.1.2 (coliformes a 30°C, por NMP), sembrar un tubo de fermentación de caldo EC. Incubar 24 h a 45°C. La producción de gas en la campanita de Durham confirma coliformes a 45°C.

Registrar el número de tubos positivos de cada dilución. Seleccionar la combinación de diluciones positivas que resulte más apropiada. Con la ayuda de una tabla de Número Más Probable (NMP), calcular el NMP de coliformes a 45°C/g de muestra, teniendo en cuenta los tubos positivos y las diluciones empleadas.

### **c 3) Recuento de *Escherichia coli* (Bacteriological Analytical Manual, 1998. Actualizado a 2001)**

Estriar una ansada de cada uno de los tubos positivos en EC en placas de EMB. Incubar 18-24 h a 35°C.

Examinar las placas para observar colonias típicas de *Escherichia coli*, con centro oscuro y planas, con o sin brillo metálico. Transferir colonias típicas a tubos de agar nutritivo inclinado e incubar 24 h a 35°C.

Sobre cada cultivo puro realizar:

- 1- Tinción de Gram.
- 2- Prueba de oxidasa.
- 3- Prueba de indol.

Sembrar un tubo de caldo triptona. Incubar 24 h a 35°C.

Investigación de indol -Técnica de Kovacs:

Agregar al cultivo de 0,2-0,3 mL de reactivo y agitar. Esperar unos minutos.

Coloración roja en la parte superior del tubo indica formación de Indol (+).

- 4- Prueba de Voges Proskauer y de Rojo de Metilo.

Sembrar un tubo de caldo Clark y Lubs (RMVP). Incubar 48 h a 35°C.

Investigación de acetil metil carbinol - Técnica de Voges-Proskauer

Separar una alícuota del cultivo en un tubo y agregar, respetando el orden:

- 0,6 mL de  $\alpha$ - naftol al 5% y

- 0,2 mL de KOH al 40%

Agitar el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y oxidar la acetoína (acetil metil carbinol) y permitir el desarrollo de color. Dejar descansar por lo menos 10-15 minutos. De ser necesario agregar unos cristales de creatina.

El máximo desarrollo de color se observa luego de dos horas.

Color rosado en la superficie: producción de acetoína (+), VP (+).

Color amarillo o cobrizo: producción de acetoína (-), VP (-).

#### Investigación de acidez - Prueba del Rojo de Metilo:

Agregar 5 gotas de reactivo rojo de metilo al cultivo y observar inmediatamente.

Color rojo indica acidez (+).

Características del indicador Rojo de Metilo:

pH < 4,4	rojo
4,4 < pH < 6	rango de viraje del indicador
pH > 6	amarillo

#### 5- Prueba de citrato.

Sembrar por estría un tubo de agar Citrato Simmons. Incubar 24 h a 37°C.

Investigación de utilización de citrato: Los microorganismos que son capaces de utilizar el citrato producen cambio de color en el medio (de verde a azul). Se considera citrato (+) el desarrollo de color azul.

#### Resultados típicos de *Escherichia coli*:

Bacilo corto Gram negativo sin esporas

Oxidasa (-) Voges Proskauer (-)

Indol (+) algunas cepas (-) Citrato (-)

Rojo de Metilo (+)

*Escherichia coli* puede presentar IMViC: ++-- (biotipo 1) o -+-- (biotipo 2), muy poco frecuente.

#### **c4) Recuento de mohos y levaduras (Bacteriological Analytical Manual, 1998. Actualizado a 2001)**

Sembrar por duplicado 0,1 mL de las diluciones 1/10 y 1/100 en superficie en placas con agar YGC o DRBC. Distribuir el inóculo con una espátula de Drigalsky cuidadosamente (tener la precaución de enfriar bien la espátula para no matar los microorganismos).

Si se trata de alimentos con actividad de agua inferior a 0.95, se recomienda emplear agar DG18.

Incubar las placas en oscuridad a 25°C durante 5 días. No invertir las placas ni apilar más de 3 placas.

Si a los 5 días no hubiera crecimiento, reincubar otras 48 h.

Seleccionar las placas de la dilución que contengan entre 10 y 150 colonias para realizar el recuento.

El límite superior para un buen recuento dependerá del tipo de crecimiento que prevalezca, mohos o levaduras, tamaño de colonias, y deberá ser decidido a discreción del analista en cada caso particular.

Notas:

1.- Eventualmente puede realizarse la siembra con el método de vertido en placa (por ejemplo, con agar YGC-extracto de levadura, glucosa y cloranfenicol). La técnica de siembra en superficie se considera más conveniente que la de vertido en placa. En este último caso, las colonias de hongos en la superficie crecen más rápido y, frecuentemente, enmascaran a las que crecen debajo de la superficie, resultando enumeraciones menos exactas. Además, los hongos son microorganismos aerobios, con lo cual su crecimiento se ve favorecido con la siembra en superficie.

2.- El agar DRBC debe ser empleado únicamente en siembra en superficie.

3.- No mover las placas durante la incubación hasta el recuento.

4.- Preferiblemente, no contar las placas antes de concluir el período de incubación, porque la manipulación de placas puede provocar crecimiento secundario por las esporas que se hubieran desprendido en el movimiento de la placa.

5.- Si se necesitara identificar las especies fúngicas, aislarlas en agar PDA (papa dextrosa) o MA (Agar Malta).

### **c 5) Recuento de *Staphylococcus aureus* (FIL 145:1990)**

Sembrar por duplicado 0,1 mL de las diluciones 1/10 y 1/100 en superficie de placas de agar Baird Parker perfectamente secas. Distribuir el inóculo con una espátula de Drigalsky cuidadosamente (tener la precaución de enfriar bien la espátula para no matar los microorganismos). Dejar secar las placas tapadas sin invertir a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. Una vez secas, incubarlas invertidas a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 h.

Tomar para enumerar placas con no más de 150 colonias.

Seleccionar un número representativo de colonias típicas y atípicas; y transferirlas a tubos de caldo infusión cerebro-corazón (BHI). Incubar a  $37^\circ\text{C}$  o  $35^\circ\text{C}$  por 20 a 24 h.

#### Identificación y confirmación

Sobre los cultivos puros de 20-24 horas, realizar:

1 - Tinción de Gram

2 - Catalasa

3 - Coagulasa (comparar con cepa patrón)

Agregar 0,1 mL del cultivo a aproximadamente 0,3 mL de plasma de conejo reconstituido en un tubo de hemólisis estéril. Incubar a  $35\text{-}37^\circ\text{C}$ . Examinar después de 4 a 6 horas. El coágulo formado debe ser firme y organizado (3+) o que no se cae al invertir el tubo (4+).

Realizar un control empleando 0,1 mL de caldo BHI estéril en lugar del cultivo. Para que el ensayo sea válido, no debe observarse ningún signo de coagulación.

4 - Termonucleasa: se realiza sobre la misma placa de Baird Parker.

*S. aureus* coagulasa positiva son cocos Gram positivos, catalasa positivo, coagulasa positivo (3 o 4+) y termonucleasa positivo.

Informar “UFC de *S. aureus* coagulasa positivo/g de muestra”, teniendo en cuenta el número de colonias confirmadas.

### **c 6) Determinación de *Salmonella* (FIL 93 A: 1985)**

#### **Preenriquecimiento en medio líquido**

Pesar asépticamente 25 g de muestra en un erlenmeyer con 225 mL de agua peptona tamponada a  $45^\circ\text{C}$ . Mezclar hasta lograr una buena dispersión. Asegurarse que la temperatura no supere los  $45^\circ\text{C}$ . Incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 16-20 h.

### **Enriquecimiento selectivo en medio líquido**

Transferir 10 mL de preenriquecimiento a 100 mL de caldo tetrionato (Müller Kauffmann). Incubar a  $43\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 h.

Transferir 10 mL del preenriquecimiento a 100 mL de caldo selenito-cistina. Incubar a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 h.

### **Aislamiento en medio sólido**

A partir de cada uno de los enriquecimientos estriar una placa de agar Verde Brillante-Rojo Fenol (agar BPLS) y una de agar Bismuto Sulfito (cuatro placas en total). Incubar las placas invertidas a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 20-24 h.

De ser necesario, seguir incubando los caldos de enriquecimiento 18-24 h más y volver a estriar en los medios de aislamiento.

Si al cabo del período de incubación el crecimiento en las placas fuera escaso, reincubar por 18-24 h adicionales a la misma temperatura.

Examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella*.

### **Identificación y confirmación**

De cada placa seleccionar cinco colonias sospechosas. Estriar en una placa de agar nutritivo para que desarrollen colonias aisladas. Incubar a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 h. Al cabo de la incubación, seleccionar colonias aisladas para proseguir con las pruebas de confirmación bioquímica y serológica.

Sobre el cultivo puro realizar:

- Tinción de Gram
- Oxidasa

Sembrar los cultivos que resulten bacilos cortos Gram negativos y oxidasa negativos en los siguientes medios.

- TSI: Sembrar por punción y en superficie. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ , 24 h.
- LIA: Sembrar por punción y en superficie. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ , 24 h.
- Caldo urea: incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ , 24 h.
- Prueba de la  $\beta$ -galactosidasa: a partir de un cultivo en agar inclinado, tomar una ansada bien cargada y emulsionarla en 0,2 mL de solución salina fisiológica hasta conseguir una suspensión densa. Colocar un disco de ONPG. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Observar hasta las 4 horas de incubación para dar un informe negativo. El color amarillo indica que la reacción es positiva.
- Caldo Clark y Lubs (RMVP): incubar 48 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Caldo triptona: incubar 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

De ser posible confirmar el resultado con un sistema de pruebas múltiples.

### **Confirmación serológica (Aglutinación somática)**

Preparación del antígeno: utilizar un cultivo de estrías de 24 h de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ . Suspender el crecimiento de la estría con solución fisiológica.

Reacción: sobre portaobjetos depositar una gota de c/u de los sueros polivalentes somáticos. Colocar al lado de cada suero, una gota de suspensión antigénica. Mover suavemente el portaobjetos, permitiendo que las dos gotas se mezclen. No homogenizar con ansa ni con varilla, sólo con el movimiento.

Lectura: debe ser inmediata y no después de 5 minutos. Las reacciones tardías o dudosas no deben considerarse.

Emplear una cepa patrón de *Salmonella* sp. para controlar los medios de cultivo y los medios empleados en las pruebas de confirmación e identificación.  
Informar ausencia o presencia de *Salmonella* sp. en 25 g.

## ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS

### NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL LABORATORIO

.....  
Fecha de informe:.....

### DATOS DE CLIENTE

Nombre:.....Dirección.....  
TE/Fax:.....Correo electrónico:.....

### DATOS DE LA MUESTRA

Tipo de muestra:.....Marca.....  
Fecha de elaboración y/o de vencimiento:.....  
Lugar de elaboración:.....N° de lote.....  
Características de la muestra\*.....  
Fecha de toma de muestra:.....Fecha de inicio de análisis:.....

\*Consignar datos relevantes, por ejemplo si es refrigerada, congelada, temperatura de recepción, si tiene signos de alteración, etc.

### RESULTADOS DE LOS ANALISIS

Recuento de coliformes a 30°C (FIL 73 A:1985): .....  
Recuento de coliformes a 45°C (APHA 1992, cap.24):.....  
Recuento de *E. coli* (BAM, 1998, act 2001):.....  
Recuento de mohos y levaduras (BAM, 1998, act 2001):.....  
Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva (FIL 145:1990): .....  
Determinación de *Salmonella* spp. en 25 g (FIL 93 A:1985):.....

### CONCLUSIONES DE LA MUESTRA

.....  
.....  
.....  
.....

### RESULTADOS DEL LOTE

Determinaciones	Muestra				
	I	II	III	IV	V
Coliformes a 30°C/g					
Coliformes a 45°C/g					
<i>S. aureus</i> /g					
<i>Salmonella</i> /25g					
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g					

Conclusión del lote  
.....  
.....

Firma y cargo del responsable

## PATRÓN MICROBIOLÓGICO DE QUESOS

Artículo 605 - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006)

Los quesos deberán cumplir los siguientes requisitos microbiológicos:

D. QUESOS CUARTIROLO, CREMOSO, CRIOLLO Y MINAS FRESCAL (46% < HUMEDAD < 55%):

<b>Microorganismos</b>	<b>Criterio de Aceptación</b>	<b>Categoría ICMSF</b>	<b>Métodos de ensayo</b>
Coliformes/g (30°C)	n=5; c=2; m=10000; M=100000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes/g (45°C)	n=5; c=2; m=1000; M=5000	5	APHA 1992, c. 24 (1)
<i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva/g	n=5; c=2; m=100; M=1000	5	FIL 145: 1990
<i>Salmonella</i> spp./25 g	n=5; c=0; m=0	10	FIL 93A: 1965
<i>Listeria monocytogenes</i> / 25 g	n=5; c=0; m=0	10	FIL 143A: 1990

## Listeria monocytogenes

### **Determinación de *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-2004)**

#### **Enriquecimiento primario**

Pesar asépticamente 25 g de muestra en un Erlenmeyer u otro recipiente aséptico. Agregar 225 mL de caldo de enriquecimiento Half Fraser. Mezclar hasta lograr una buena dispersión. Incubar a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ .

#### **Enriquecimiento secundario**

Subcultivar 0,1 mL del enriquecimiento primario en un tubo con 10 mL de caldo Fraser. Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $48 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ .

#### **Aislamiento en medio sólido**

El aislamiento se realiza a partir de ambos medios de enriquecimiento después de los correspondientes tiempos de incubación. Estriar en dos placas en paralelo: Agar Listeria según Ottaviani y Agosti (ALOA) y agar Palcam o agar Oxford. Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . Si es necesario, incubar por  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  adicionales. En ALOA, *Listeria* produce colonias azul turquesa rodeadas de un halo opaco. Las colonias típicas de *Listeria* spp. en agar Oxford están rodeadas de una zona marrón oscura o negra por hidrólisis de la esculina. En Palcam, las colonias típicas de *Listeria* spp. son de color gris verdoso con halo negro-parduzco (por hidrólisis de la esculina), sobre fondo rojo (porque no fermenta manitol).

#### **Identificación**

Transferir a agar triptona de soja con extracto de levadura (TSA-YE) un número representativo de las colonias típicas que resulten ser cepas bien aisladas y puras. A partir de este cultivo realizar:

- 1) Tinción de Gram. *Listeria* spp. son bacilos asporógenos, cortos y delgados Gram positivos.
- 2) Prueba de la catalasa. Picar una colonia y suspenderla en una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3 % en un portaobjetos. *Listeria* spp. son catalasa positiva y se observa desprendimiento de burbujas de gas (oxígeno).
- 3) Hemólisis.

Secar bien la placa de hemólisis antes de sembrar. Dibujar una grilla en la parte de abajo de la placa de forma que queden entre 20 y 25 espacios por placa. Sembrar por punción los cultivos seleccionados anteriormente, uno en cada espacio, identificándolos. Conservar los cultivos puros en agar triptona de soja con extracto de levadura.

Simultáneamente sembrar controles positivos y negativos (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*). Después de 48 h de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , examinar las placas. *L. monocytogenes* presenta zonas delgadas y débiles de aclaración ( $\beta$ -hemólisis); *L. ivanovii* generalmente forma una zona ancha y claramente delineada de  $\beta$ -hemólisis y *L. innocua* no debe formar zona de aclaración alrededor de la punción. Utilizar una luz brillante para examinar la hemólisis de los cultivos en estudio y de los controles.

- 4) Fermentación de ramnosa y de xilosa.

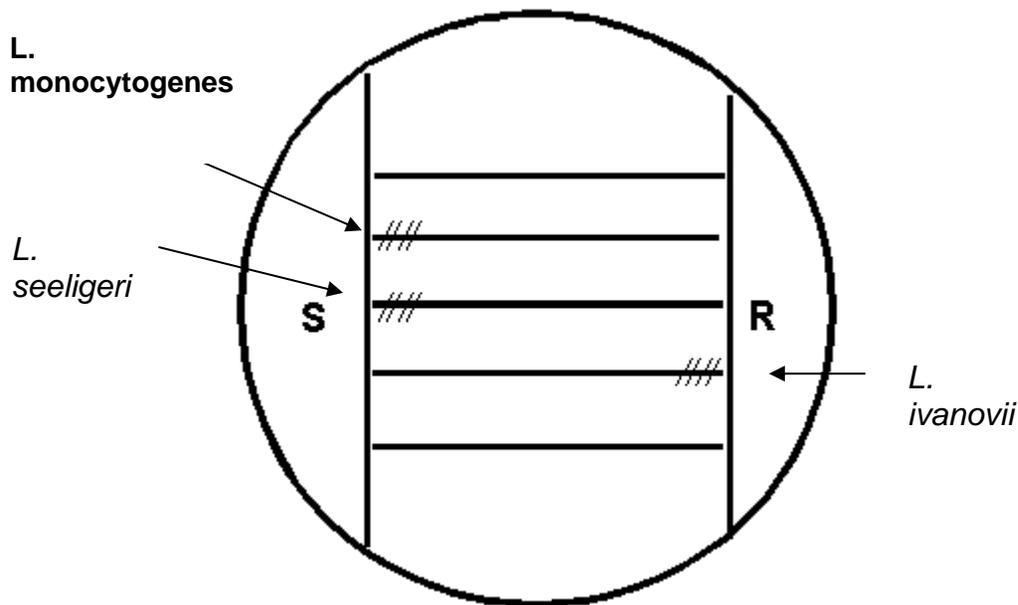
Sembrar tubos de caldo de fermentación de ramnosa y de xilosa. Incubar 24-48 h a  $37^{\circ}\text{C}$  para observar el viraje del indicador por producción de ácido. De ser necesario continuar incubando hasta 7 días.

- 5) Test de Camp

Se realiza sobre una placa de agar sangre. Se siembra en forma de fina estría un cultivo fresco de *Staphylococcus aureus* (S) y otra línea paralela de un cultivo fresco de *Rhodococcus equi* (R). Se

requiere un inóculo delgado y parejo, que se puede sembrar con un ansa recta o de rulo formando un ángulo recto con el agar. De la misma forma, se estrarán transversalmente y sin llegar a atravesar las estrías ya hechas, los cultivos en estudio y los controles de *Listeria monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* (las tres hemolíticas) y *L. innocua* (no hemolítica) (ver esquema).

Una reacción Camp positiva se observa por aumento de la hemólisis en la zona cercana a *S. aureus* o *R. equi*. De cualquier forma, la apariencia del resultado positivo depende del cultivo. Una reacción positiva con *R. equi* se ve como una zona ancha (5 a 10 mm) de hemólisis con forma de punta de flecha. Se deben tomar como negativas las reacciones que den zonas angostas (alrededor de 1 mm) de débil hemólisis en la intersección con *R. equi*. Una reacción positiva con *S. aureus* se ve como una zona pequeña y redondeada de incremento de hemólisis que se extiende solamente unos 2 mm desde la cepa de ensayo y entre la zona de débil hemólisis debida al crecimiento de la estría de *S. aureus*.



Resultados característicos de las especies hemolíticas

Especies	Camp Test		Xilosa	Ramnosa
	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>		
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+	+	-

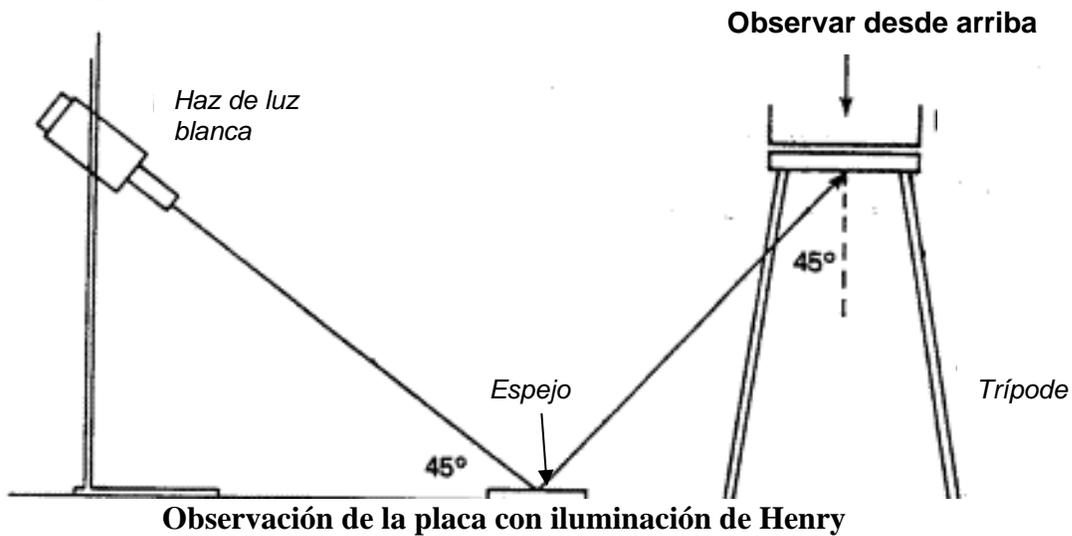
### Pruebas adicionales para *Listeria*

Se pueden realizar las siguientes pruebas complementarias: (reacción característica de *Listeria* spp.)

- Crecimiento típico en agar tripton de soja - extracto de levadura

Seleccionar cinco colonias típicas de cada placa de aislamiento y estriarlas en placas de agar tripton de soja-extracto de levadura (las placas deben ser muy finas) para obtener colonias aisladas. Incubar por 24 h a 37°C o hasta que se desarrolle un buen crecimiento.

Examinar las placas con iluminación de Henry.



Al ser examinadas con luz de Henry, las colonias de *Listeria* spp. muestran un color azul y una superficie granular.

- Movilidad a 25°C

Otra característica típica es la movilidad de los cultivos incubados a 25-30°C. Se puede observar en un preparado en fresco suspendiendo una colonia típica en solución salina al 0,85 % (bacilos delgados y cortos con débil rotación y movimiento en forma de volteo). También se comprueba la movilidad, sembrando por punción un agar movilidad (o agar SIM) e incubando hasta 5 días a 25°C. Se observa una movilidad típica en forma de paraguas.

- Hidrólisis de esulina (+)
- Utilización de glucosa: medio O/F (+)
- Fermentación de manitol (-)
- Reducción de nitrato (-)
- Rojo de Metilo-Voges Proskauer (+/+)
- Oxidasa (+)

## *Escherichia coli* O157:H7

**Determinación de *Escherichia coli* O157:H7** (adaptado de USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook. *Detection, Isolation and Identification of Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges (Revision # 9; 15-01-15). William C. Cray, Jr., Douglas O. Abbott, Frankie J. Beacorn, and Steven T. Benson

Este método se emplea para el análisis de *Escherichia coli* O157:H7 y O157:NM en productos cárnicos crudos o listos para consumir. Está basado en un enriquecimiento en un caldo selectivo, seguido por un ensayo rápido de screening, continuando con la separación inmunomagnética (IMS) en columnas paramagnéticas y el aislamiento en medios altamente selectivos.

*Escherichia coli* O157:H7/NM es un patógeno con dosis infectivas muy bajas (la ingestión de 100 células puede causar la enfermedad). Trabajar con estas cepas demanda obligatoriamente el uso de guantes y anteojos de protección. Asimismo, todas las superficies deben ser perfectamente desinfectadas antes y después del uso.

### a) **Enriquecimiento**

Pesar 25 g de la muestra en una bolsa de Stomacher. Agregar 225 mL de caldo TSB modificado con novobiocina (mTSB o mTSB+n). Homogenizar. Incubar sin agitación a 42±1°C por 15-24 h. Incluir controles: uno positivo (cepa control de *Escherichia coli* O157:H7), uno negativo (cepa de *Escherichia coli* no O157) y un medio sin sembrar.

Se registrarán todas las reacciones observadas en la muestra y en los controles.

### b) **Test de screening.**

Se emplean dispositivos comerciales de ensayos rápidos para demostrar la presencia de cepas con antígeno O157 en el caldo de enriquecimiento (a).

La norma recomienda dos metodologías de screening:

- **Sistema de PCR en tiempo real Bax<sup>®</sup> para *E. coli* O157:H7.**
- **Sistema inmunocromatográfico RapidCheck<sup>®</sup>.**

Las muestras negativas se informan “ausencia de *Escherichia coli* O157:H7/NM en 25 gramos” y se descartan.

Las muestras positivas se consideran potenciales positivos. Se procede al aislamiento e identificación a partir del caldo de enriquecimiento (a).

### c) **Aislamiento**

Previo al aislamiento, se realiza una separación inmunomagnética (IMS). De esta forma se incrementa notablemente la sensibilidad del método, comparado a la forma tradicional de siembra directa en medios de aislamiento. Para tal fin se emplean pequeñas esferitas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-*E. coli* O157. La metodología recomienda Dynal<sup>®</sup> # 710.04 anti-*E. coli* O157 (Dynal Inc., Lake Success, NY 11042). La muestra y los controles se ponen en contacto con estas esferas inmunomagnéticas y luego se hacen pasar por una columna de separación que retiene las esferas. Posteriormente se eluyen las esferas de cada columna y se siembran en el medio selectivo.

Se procede al aislamiento en medio sólido. Los medios se basan en dos características diferenciales de la mayoría de las cepas de *E. coli* O157: no fermentan sorbitol y no tienen actividad β-D-glucuronidasa.

La metodología recomienda la utilización de Agar Rainbow modificado (mRBA) contiene novobiocina, cefixime trihidrato y telurito de potasio como agentes selectivos y dos sustratos cromogénicos como agentes diferenciales. Los sustratos cromogénicos son específicos para dos enzimas asociadas a *E. coli*:  $\beta$ -galactosidasa (azul/negro) y  $\beta$ -glucuronidasa (rojo).

Las placas se incuban a 20-24 h a  $35\pm 2^\circ\text{C}$ . Las colonias típicas de *E. coli* O157:H7 son negras o grises ( $\beta$ -galactosidasa +,  $\beta$ -glucuronidasa -). Las colonias típicas de *E. coli* no toxigénica son rosas o magenta.

Otros medios de aislamiento de *E. coli* O157:H7:

- a) Agar Mac Conkey-sorbitol (SMAC). El medio contiene sorbitol como azúcar fermentescible e inhibidores de flora no entérica. Las colonias son sorbitol negativas y aparecen pálidas, comparadas con las rosadas brillantes que son sorbitol positivas. Cuando la muestra contiene una carga alta de coliformes se puede enmascarar la presencia de *E. coli* O157:H7. Incluso, *Escherichia hermannii* y otras enterobacterias pueden presentar fenotipos similares en SMAC y, por otra parte, *Citrobacter freundii* puede aglutinar con suero O157, y, causar un falso positivo.
- b) Agar HC (agar para cepas hemorrágicas). El medio contiene sorbitol y reactivo fluorogénico MUG (4 metil, umbeliferil,  $\beta$ -D-glucurónido).
- c) Agar Mac Conkey sorbitol-BCIG. El medio contiene sorbitol y un compuesto  $\beta$ -D-glucurónido cromogénico.
- d) Agar CT Mac Conkey sorbitol. El medio es similar al a), pero contiene agentes selectivos (cefixime y telurito). Con el empleo de este medio se gana sensiblemente en selectividad, inhibiéndose notablemente la flora acompañante. La colonia típica es pálida como en a).

Se identifican las colonias características de *E. coli* O157:H7/NM y se les realiza el ensayo de aglutinación en látex para O157 según las indicaciones del proveedor del reactivo. Las muestras de las que no se obtengan colonias típicas o las que dieron negativo en el test de aglutinación en látex se informan como **“ausencia de *Escherichia coli* O157:H7/NM en 25 gramos”**.

Las muestras positivas se reaislan en Agar sangre de oveja (BSA), se incuban 16-24 h a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  y se procede a la identificación, incluyendo:

- Identificación por pruebas bioquímicas. La metodología recomienda la utilización de una galería de pruebas bioquímicas miniaturizadas VITEK<sup>®</sup>.
- Confirmación por aglutinación en látex de los antígenos O157 (somático) y H7 (flagelar). La metodología recomienda la utilización del kit RIM<sup>®</sup> *E. coli* O157:H7.
- Confirmación de la presencia de las toxinas Shiga o de los genes responsables de su biosíntesis. Para la detección de la toxina, la metodología recomienda la utilización del kit Meridian Premier<sup>®</sup> EHEC. En reemplazo de esto, se puede realizar la confirmación de los genes de toxina (*stx* y *eae*) utilizando un ensayo de PCR en tiempo real (la metodología recomienda la utilización del sistema BAX<sup>®</sup>).

Reacciones bioquímicas características de *Escherichia coli* O157:H7:

- TSI (amarillo/amarillo, H<sub>2</sub>S negativo)
- Fermentación de sorbitol (negativo)
- Fermentación de celobiosa (negativo)
- Caldo triptona (indol positivo)

- Medio RM-VP (RM: positivo; VP: negativo)
- Citrato de Simmons (negativo)
- Lisina descarboxilasa (positivo) \*
- Ornitina descarboxilasa (positivo)\*
- Medio descarboxilasa base (negativo)
- Medio movilidad (+/-)

Todos los medios se incuban a 35°C. Los medios con azúcares deben leerse a las 24 horas.

\*Los caldos descarboxilasa deben llevar un sello de vaselina. Los positivos son púrpura (medio básico por descarboxilación) y el negativo es amarillo (por acidificación por fermentación de la glucosa del medio).

Se considera confirmada la presencia de *E. coli* O157:H7 cuando hubo confirmación bioquímica, serológica y de presencia de toxinas Shiga o de uno o más genes de toxina Shiga.

## GUÍAS DE ESTUDIO

### GUÍA DE ESTUDIO I

1. ¿Cómo clasifica a los microorganismos de acuerdo con su temperatura óptima de crecimiento?
2. ¿Cuál es el pH óptimo de crecimiento para bacterias? ¿y para mohos y levaduras?
3. ¿Por qué no puede emplearse agua destilada para hacer una suspensión microbiana? ¿qué líquido emplearía?
4. ¿Qué es un medio químicamente definido y en qué casos se lo emplea?
5. ¿A qué se llama un medio de cultivo complejo? Cite tres ejemplos de medios complejos que vaya a emplear para la detección de patógenos.
6. ¿Qué características tienen los medios empleados para el cultivo de anaerobios? ¿Qué es una jarra de anaerobiosis y para qué se utiliza?
7. Defina medio de cultivo selectivo. Cite un ejemplo de medio selectivo que vaya a emplear en la práctica de patógenos.
8. Defina medio de cultivo diferencial. Cite un ejemplo de medio diferencial que vaya a emplear en la práctica de patógenos.
9. Defina medio de cultivo de enriquecimiento. Cite ejemplos de medios de enriquecimiento que vaya a emplear en la práctica de patógenos.
10. Clasificación e identificación de microorganismos. ¿Qué información brinda cada una de las siguientes pruebas?
  - a) Observación microscópica
  - b) Tinción de Gram
  - c) Pruebas bioquímicas
  - d) Serología
11. Diagrame un esquema para el aislamiento e identificación de microorganismos a partir de una muestra de alimento, mencionando las etapas necesarias en la marcha.
12. Complete el siguiente cuadro comparativo de métodos de recuento microbiano:

	Ventajas	Desventajas
Recuento en placa / siembra por vertido en placa		
Recuento en placa / siembra en superficie		
Recuento por filtración por membrana		
Recuento por técnica del número más probable		
Recuento microscópico directo		

## GUÍA DE ESTUDIO II

1. Complete la siguiente tabla:

Microorganismo	Agar de aislamiento	Agente selectivo	Agente diferencial	Colonia característica
<i>S. aureus</i>	Baird Parker			
	110			
<i>Salmonella</i>	Bismuto sulfito			
	BPLS			
	XLD			
<i>Clostridium perfringens</i>	SPS			
	TSN			

2. Complete la siguiente tabla:

Microorganismo	Pruebas de identificación	Reacción característica
<i>S. aureus</i>		
<i>Salmonella</i>		
<i>Clostridium perfringens</i>		

3. Complete el cuadro:

Microorganismo	Características del microorganismo	Enfermedad (ETA) asociada	Reservorios y transmisión	Alimentos asociados a brotes
<i>S. aureus</i>				
<i>Salmonella</i>				
<i>Clostridium perfringens</i>				
<i>Clostridium botulinum</i>				
<i>Bacillus cereus</i>				

<i>Listeria monocytogenes</i>				
<i>Escherichia coli</i> O157:H7				

4. Considerando la investigación de los microorganismos del punto 3 en un alimento, señale para cuáles considera apropiado hacer una prueba de ausencia/presencia y para cuáles un recuento. Justifique.
5. Esquematice una marcha de ausencia/presencia y una de recuento. Señale las diferencias entre ellas.
6. ¿En qué circunstancias se justifica la investigación de enterotoxina de *S. aureus* en la muestra de alimento? Justifique brevemente.
7. Esquematice una marcha para la determinación de *Clostridium perfringens* en un alimento. Cite los medios de cultivo y las reacciones características esperadas para cada uno de ellos. Justifique sus respuestas.
8. En la marcha de determinación de *Salmonella* de una muestra de leche en polvo, un analista aisló cuatro colonias características a partir de los medios sólidos. En el cuadro siguiente se adjuntan los resultados de las pruebas de identificación que ensayó sobre cada una de las cuatro cepas aisladas:

Pruebas de identificación	Colonia			
	I	II	III	IV
Tinción de Gram	Bacilo Gram -	Bacilo Gram -	Bacilo Gram -	Bacilo Gram -
Oxidasa	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa
TSI	Alcalino/ácido, SH <sub>2</sub>	Ácido/ácido	Alcalino/ácido	Alcalino/ácido, SH <sub>2</sub>
LIA	Alcalino/alcalino	Alcalino/ácido	Alcalino/alcalino	Precipitado pardo rojizo/ácido, SH <sub>2</sub>
Utilización de urea	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

- a) ¿Cuál o cuáles colonias pueden corresponder a *Salmonella*? Justifique. ¿Qué otras determinaciones Ud. tendría que realizar para asegurar este informe?
- b) ¿Considera que el analista realizó determinaciones innecesarias? En caso afirmativo, diga cuáles y por qué.
- c) ¿Qué medios sólidos de aislamiento pudo haber empleado el analista? ¿Cómo hubieran sido las colonias características en cada uno de ellos?
- d) En los medios citados en c), ¿cuál sería el aspecto de las colonias de *E. coli* y de *Proteus*?

### GUÍA DE ESTUDIO III

1. ¿Qué recomendaciones daría al administrador de un edificio si el análisis de agua hubiera dado un elevado recuento de coliformes?
2. Calcular el valor del recuento total de bacterias aerobias mesófilas para las muestras A, B y C, si al realizar el recuento de aerobios mesófilos se obtienen los siguientes resultados.

Dilución	Nº de colonias por placa		
	A	B	C
1/100	890/921	0/0	208/160
1/1000	175/197	0/0	40/48
1/10000	43/50	0/0	3/12

3. En una muestra de helados se hace NMP (series de tres tubos) de coliformes totales a 30°C, coliformes a 45°C y *E. coli*. Se observan los siguientes tubos positivos:

Determinación	1/100	1/1000	1/10000
Coliformes totales	3	3	2
Coliformes a 45°C	3	2	0
<i>E. coli</i>	1	0	0

- a) Informar los resultados de las 3 determinaciones.
- b) Indique los medios empleados en cada determinación y la reacción positiva típica.
- c) Nombre por lo menos dos géneros bacterianos que componen la flora acompañante en el medio de aislamiento de *E. coli* y que pueden distinguirse por las reacciones de identificación de este microorganismo.

4. Una fábrica compra un polvo base para postres. Evalúa la aceptabilidad según el siguiente programa de muestreo (“m” y “M” se expresan por gramo de muestra):

Análisis	Categoría	n	c	m	M
Aerobios totales	2	5	2	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>
<i>E. coli</i>	5	5	2	<3	10
<i>Clostridium perfringens</i>	8	5	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>
<i>Salmonella</i>	11	10	0	0	

- a) Indique qué método emplea en cada determinación (recuento en placa, ausencia/presencia, NMP), cuáles son las unidades para la expresión del resultado y comente sobre las situaciones en que se aplica cada uno.
- b) En la tabla siguiente figuran los datos de recuentos de aerobios mesófilos para las cinco muestras. Completar la tabla. ¿Resulta aceptable el lote para recuento total de aerobios mesófilos? Justifique.

Muestra	Recuento en las placas	UFC/g de muestra	Clase de muestra
A	1/10: MNPC; 1/100: 458/342		
B	1/10: 193/207; 1/100: 23/20		
C	1/10: 235/165; 1/100: 22/16		
D	1/10: 22/24; 1/100: 0/2		
E	1/10: 0/0; 1/100: 0/0		

c) Para determinar *E. coli*, se siembran diferentes combinaciones de diluciones para cada muestra y se obtienen los siguientes resultados. Completar la tabla. ¿Considera que el lote es aceptable para esta determinación? ¿Por qué?

Muestra	Tubos positivos para <i>E. coli</i>	Recuento de <i>E. coli</i>
A	10 mL 1/10: 3/3; 1 mL 1/10: 1/3; 1 mL 1/100: 0/3	
B	1 mL 1/100: 2/3; 1 mL 1/1000: 0/3; 0,1 mL 1/1000: 0/3	
C	1 mL 1/10: 2/3; 1 mL 1/100: 0/3; 1 mL 1/1000: 0/3	
D	1 mL 1/10: 0/3; 1 mL 1/100: 0/3; 1 mL 1/1000: 0/3	
E	1 mL 1/100: 1/3; 1 mL 1/1000: 0/3; 1 mL 1/10000: 0/3	

d) La empresa usa este polvo para fabricar postres. Mezcla el polvo con agua, lo cocina, lo enfría, lo envasa y los vende refrigerados. Sabe que el valor promedio de aerobios totales en este producto al final de su vida útil es de 100/g. ¿Qué puede comentar sobre un producto que al final de la vida útil presenta un recuento de  $10^5$ /g?

e) Identificar en el plan de muestreo para el polvo para postres cuáles son los microorganismos indicadores, y comentar sobre su significado. Identificar los microorganismos patógenos.

5. Se recibe un lote de leche en polvo y es necesario saber si resulta aceptable según la siguiente norma.

Determinación	Categoría	n	c	m (UFC/g)	M (UFC/g)
Aerobios mesófilos	2	5	2	50000	500000
Coliformes totales	5	5	2	3	100
<i>S. aureus</i>	9	10	1	10	100
<i>Salmonella</i>	15	60	0	0	-

Responder Verdadero o Falso y justificar brevemente la respuesta en todos los casos:

- Tanto para *S. aureus* como para *Salmonella* se hacen pruebas de ausencia/presencia.
- La determinación de coliformes totales se podría realizar sembrando 1 mL de la dilución 1/10 y 1 mL de la dilución 1/100 por duplicado (método de recuento en placa), siguiendo la metodología correspondiente.

c) En la determinación de *Salmonella*, las condiciones de incubación del enriquecimiento selectivo son críticas para la recuperación óptima. Debe controlarse exactamente el tiempo y la temperatura, que nunca debe exceder los 37°C.

6. Completar teniendo en cuenta los fundamentos de la determinación de *Listeria monocytogenes* y de *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos. Indicar, cuando corresponda, agentes selectivos, diferenciales, colonias características, reacciones positivas.

*Listeria monocytogenes*

Medios de aislamiento:

- Agar Palcam
- Agar Oxford
- Agar ALOA

Pruebas de identificación

- .....
- .....
- .....
- .....
- .....

*Escherichia coli* O157:H7

Medios de aislamiento

- Mc Conkey sorbitol
- Fluorocult *E. coli* O157:H7
- Agar Rainbow

Pruebas de identificación

- .....
- .....
- .....
- .....

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### MUESTREO PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

#### Finalidad de los planes de muestreo

Para que el trabajo en el laboratorio resulte eficaz es de primordial importancia recibir una muestra adecuada y en buenas condiciones.

Si las muestras no son correctamente tomadas y tratadas, o no son representativas, los resultados del análisis pueden carecer de sentido. Siempre que se vayan a hacer deducciones o a juzgar la aptitud de una partida importante de alimentos, por el resultado obtenido del análisis de una muestra reducida de los mismos, es esencial seguir un procedimiento de muestreo adecuado. La toma de muestra es especialmente importante cuando se trata de investigar en un alimento la presencia de gérmenes patógenos cuyo número puede ser escaso y su distribución irregular, o cuando el destino de una partida de alimentos, depende de que cumplan o no las normas microbiológicas legales.

Muchas veces no es posible ensayar el número de muestras necesario para demostrar la ausencia de microorganismos peligrosos en un lote comercial, con el nivel de probabilidad que se consideraría deseable. La elección de un procedimiento particular de muestreo y del criterio de decisión constituye el llamado plan de muestreo.

La severidad de los planes de muestreo está basada en los riesgos para el consumidor, que dependen fundamentalmente de los tipos de microorganismos presentes en el alimento y de su número. Así, por ejemplo, existen microorganismos que simplemente deterioran al producto, otros que indican la posibilidad de contaminación con patógenos y algunos que causan enfermedades severas. El grado de peligro se ve modificado por las condiciones a las cuales será expuesto el lote y por las condiciones de uso del alimento, que pueden disminuir, mantener inalterado o aumentar el número de células presentes originalmente en el mismo.

Existen 15 casos diferentes de acuerdo con el riesgo y a como se modifica el mismo por las condiciones de uso.

	Cómo se modifica el grado de riesgo por las condiciones de uso		
Riesgo	Disminuido	No se modifica	Incrementado
1) UTILIDAD Ningún riesgo para la salud	Caso 1	Caso 2	Caso 3
2) INDICADORES Bajo riesgo indirecto para la salud	Caso 4	Caso 5	Caso 6

3) RIESGO MODERADO PARA LA SALUD Microorganismos que no son rápidamente diseminados	Caso 7	Caso 8	Caso 9
4) RIESGO MODERADO PARA LA SALUD Microorganismos que son rápidamente diseminados	Caso 10	Caso 11	Caso 12
5) RIESGO SEVERO PARA LA SALUD	Caso 13	Caso 14	Caso 15

Ensayos de utilidad: como la contaminación general, vida útil durante el almacenamiento o deterioro, no están relacionados al peligro para la salud pero sí a la economía y a la apariencia del alimento. Estos ensayos generalmente son el recuento estándar en placa de aerobios mesófilos, microorganismos totales tolerantes al frío que predicen la vida en el almacenamiento del alimento refrigerado.

El análisis de los microorganismos indicadores, revela frecuentemente fallas relacionadas con el procesado, condiciones de higiene, contaminación posterior al procesado, temperatura inadecuada durante el embarque. Así, esporulados mesófilos en alimentos no ácidos estables al almacenamiento indican la probabilidad de un procesado deficiente, coliformes y *E. coli* indican inadecuada higiene general, coliformes a 45°C y *E. coli* indican contaminación fecal, *Staphylococcus* a menudo son indicio de contaminación a partir de piel y nariz humana.

Los principales patógenos transmitidos por los alimentos son los que causan riesgos moderados y severos para la salud. Entre los riesgos moderados es necesario distinguir entre aquellos de rápida diseminación y los de diseminación limitada. Entre los primeros están *Salmonella* spp., *Shigella* spp., que son primariamente diseminados por alimentos específicos y secundariamente por otros alimentos como resultado de la contaminación cruzada y de la contaminación ambiental y para los cuales la enfermedad resulta de un inóculo relativamente pequeño.

Entre los de diseminación limitada encontramos *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico, que causan enfermedad sólo cuando el alimento contiene un número bastante grande de células o cuando las condiciones de almacenamiento y uso permiten la producción de cantidades efectivas de toxinas (como para *Staphylococcus*).

Una vez evaluado: 1) el tipo de peligro asociado con la especie microbiana particular; 2) cómo se modifica éste por las condiciones de uso; 3) ubicación en el uso correspondiente, hay que elegir el plan de muestreo apropiado.

Los planes de muestreo pueden ser de dos tipos:

- 1) planes de dos clases
- 2) planes de tres clases

1) Los planes de dos clases son aquellos que clasifican a las muestras analizadas como aceptables o defectuosas. Estos planes están definidos por tres números:  $n$ ,  $m$ ,  $c$ .

Donde  $n$  es el número de muestras unidades que son analizadas,  $m$  es el valor que separa las muestras aceptables de las defectuosas, y  $c$  da el número máximo de muestras subestándar permitido (o sea las muestras que dan resultados insatisfactorios como ser la presencia de un microorganismo o valores por encima de  $m$ ).

$m$  puede ser igual a cero o distinta de cero. Cuando  $m$  es igual a cero indica que el microorganismo buscado estará ausente en la muestra analizada.

Así por ejemplo un plan de dos clases definido por  $n=10$ ,  $m=0$ ,  $c=2$  indicará que de cada diez muestras del lote que se examinen, sólo se permitirá que 2 o menos den resultados positivos para que el lote sea aceptado. Pero si tres o más de las muestras dan resultado positivo (presentan el microorganismo en cuestión), el lote será rechazado.

2) Los planes de muestreo de tres clases, son aquellos que clasifican a las muestras analizadas como: aceptables, marginalmente aceptables y defectuosas.

Estos planes quedan definidos por cuatro números:  $n$ ,  $m$ ,  $M$ ,  $c$ .

Donde  $n$  es el número de muestras analizadas,  $m$  es el valor que separa las muestras aceptables de las marginalmente aceptables,  $M$  es el valor que separa las marginalmente aceptables de las defectuosas y  $c$  es el número máximo de muestras para las cuales se acepta que den valores de los recuentos entre  $m$  y  $M$ .

Un plan de tres clases con  $n=10$ ,  $c=3$ ,  $m=10^3/g$ ,  $M=10^7/g$ , significa que de 10 muestras (tomadas del lote) que son analizadas, sólo tres o menos darán valores de los recuentos entre  $10^3/g$  y  $10^7/g$  y ninguna dará recuentos mayores a  $10^7/g$ , para que el lote sea aceptado. Mientras que el lote será rechazado si 4 o más de las muestras analizadas dan recuentos entre  $m$  y  $M$  y/o una muestra da valores mayores a  $M$ .

Los planes de muestreo de dos clases son más severos y se aplican a los casos de riesgos que involucran a microorganismos patógenos (*Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*) cuya presencia en el alimento es inadmisibles.

Los planes de tres clases, en cambio, son menos severos y se aplican a situaciones en las que hay riesgo de pérdida de la utilidad del alimento, al recuento de microorganismos indicadores, y a algunos microorganismos moderadamente riesgosos.

## **Definiciones**

### **Lote:**

Número de muestras producidas en un batch o en un período de tiempo específico producidas y manipuladas bajo condiciones uniformes, de manera que presenten la misma calidad. Un lote comprende unidades de producto de un único tipo, grado, clase, tamaño y composición. Puede incluir un gran número de pequeños envases, cajas, barriles, o también un producto a granel, una o más cargas de furgón o de vagón.

### **Partida:**

Una partida puede contener cierto número de lotes.

### **Muestra representativa:**

Es aquella que se considera típica de una población, es decir que sus características son tan similares como sea posible a las del lote del que precede.

Una manera de obtener una muestra representativa consiste en utilizar un muestreo al azar mediante el uso de números aleatorios. No hay garantías que la muestra elegida de esta forma tenga características idénticas a las del lote, pero sí aseguramos que la muestra fue elegida con objetividad.

Primero, se deben numerar todas las unidades de un lote. Supongamos un lote de 1000 paquetes; si las 1000 unidades del lote están distribuidas en 10 filas por cantidades iguales, se asignarían números del 1 al 100 a las unidades de la primera fila, del 101 al 200 a la segunda, y así sucesivamente. Para seleccionar los números de muestras a analizar se utilizan tablas de números aleatorios, las cuales contienen una sucesión de números correlativos al azar que deben elegirse a partir de un punto que debe ser seleccionado también de forma azarosa.

### **Elección de un programa de muestreo**

Fundamentalmente, según el tipo de alimento, los microorganismos involucrados, su número y el grado de peligro por el consumo de los mismos en base a las condiciones de uso, quedan determinadas las distintas pruebas a realizar y la rigurosidad de los planes de muestreo.

### **Pruebas a realizar:**

a) **Índice de utilidad:** la alteración debe ser considerada un riesgo para el alimento más que para el consumidor, por ello las pruebas de vida útil, es decir, pruebas para organismos indicadores de la vida comercial, tales como los recuentos de aerobios mesófilos, bacterias psicrotróficas o grupos microbianos responsables de alteraciones relevantes como lipolíticos o proteolíticos, tendrán los planes de muestreo más indulgentes.

b) **Análisis de indicadores:** las pruebas que determinan el número de microorganismos indicadores revelan cómo ha sido el procesamiento, en qué forma se realizó el almacenamiento y transporte de la partida. Así, por ejemplo, los recuentos de Enterobacteriaceae o de coliformes pueden proporcionar un indicio de la adecuación de la higiene del proceso de elaboración, *Escherichia coli* es un microorganismo indicador de contaminación fecal y de la posible presencia de patógenos entéricos, aunque no existe relación directa por lo que la interpretación tampoco es definida. Debido a estas ambigüedades, los análisis de organismos indicadores sólo son de rigurosidad mediana. Sin embargo, puesto que ensayos positivos indican la posible presencia de bacterias patógenas, se requieren programas de muestreo algo más severos que los utilizados para las pruebas de utilidad.

c) **Peligrosidad moderada y grave:** Cuando se buscan patógenos conocidos, son más apropiados planes de muestreo más rigurosos, por lo que éstos son más exigentes a medida que aumenta la gravedad del trastorno que causa el patógeno. En particular esta búsqueda se aplica cuando se sabe que un determinado patógeno se encuentra con frecuencia en un alimento y es capaz de producir enfermedad, por ejemplo, *C. perfringens* en los platos preparados a base de carne cocida, *B. cereus* en los alimentos desecados, *Salmonella* en las carnes de aves, etc. Aquellos alimentos destinados a la búsqueda de patógenos caerían dentro de los casos de 7 a 15. En la tabla 4 se describen con más detalle estos microorganismos causantes de enfermedades alimentarias.

Es prácticamente imposible analizar todos los grupos microbianos en un determinado alimento, se deben elegir los más adecuados y para esta elección se deben tener en cuenta los siguientes puntos fundamentales:

a) antecedentes de las enfermedades alimentarias transmitidas por el alimento.

b) condiciones probables de tratamiento y almacenamiento y posibilidad de alteración posterior.

c) antigüedad del lote.

Es también importante en la elección de un programa de muestreo tener en cuenta la influencia de las condiciones de manipulación a las que se someterá el alimento sobre el grado de peligrosidad para la salud (tabla 5).

La tabla 6 presenta numerosos ejemplos de las relaciones existentes entre los diferentes casos o categorías, las condiciones de manipulación y los microorganismos de interés para diversos alimentos.

## **RECOLECCIÓN Y MANIPULEO DE LAS MUESTRAS**

El esquema de muestreo debe especificar, además del procedimiento para la toma de muestra, el tamaño y el número de las muestras que se enviarán al laboratorio, el cual se determina en base a consideraciones estadísticas. El número de muestras que se han de analizar en cada caso depende de la variación normal de la contaminación microbiana en el alimento, de la homogeneidad del mismo, y de la sensibilidad de los métodos utilizados para el análisis. El grado de homogeneidad del alimento influye considerablemente en la elección del esquema de muestreo, siendo necesarias más muestras si el alimento no es homogéneo.

Cuando es posible, las muestras deben enviarse al laboratorio en el envase original, no abierto. Esto previene la posible contaminación del producto y mostrará la verdadera condición del mismo tal como es preparado y ofrecido al consumidor. Si los productos se presentan a granel o en envases de gran tamaño, de modo que no es posible su traslado al laboratorio, deberán enviarse un número determinado de muestras que se tomarán al azar de diferentes partes del envase. En estos casos las muestras se recogerán en forma aséptica, en recipientes de boca ancha y tamaño apropiado, que estarán perfectamente limpios y esterilizados, al igual que los utensilios empleados (pinzas, espátulas, bisturís, etc.). Los recipientes pueden ser de plástico, de vidrio, o metálicos, con cierres herméticos para impedir pérdidas de material.

Todas las muestras deben ser perfectamente identificadas y registradas con los datos que se consideren necesarios en cada caso. Deberán ser enviadas al laboratorio lo más rápidamente posible y tratando de mantener las condiciones originales del almacenamiento. Una vez recibidas en el laboratorio, las muestras deben ser examinadas lo más pronto posible luego de su recepción. Cuando el análisis deba posponerse, las muestras perecederas no congeladas deberán almacenarse en refrigeración entre 0 y 4°C por no más de 36 h, y las muestras congeladas a -20°C hasta el momento del análisis. La descongelación debe ser cuidadosa para evitar la destrucción de los microorganismos o favorecer su multiplicación durante el descongelado; deberán descongelarse en su recipiente original a temperaturas de refrigeración ( $\leq 4,4^{\circ}\text{C}$ ), por no más de 18 h. Las muestras de bajo contenido acuoso o de productos enlatados, que no son perecederas y han sido recolectadas y enviadas a temperatura ambiente, pueden mantenerse a temperatura ambiente o bien entre 0 y 4°C. Todo otro tipo de muestra deberá guardarse en refrigerador (entre 0 y 4°C) hasta el momento del análisis.

Antes de iniciar el análisis se debe observar la apariencia física de la muestra y del recipiente y registrar toda anomalía. Las muestras de productos deshidratados o líquidos deben ser completamente mezcladas, empleando utensilios estériles para remover porciones de las muestras (submuestras). El tamaño de éstas depende también de la homogeneidad del producto. Un tamaño corriente de muestra a analizar es 25 g, pero se puede también trabajar con cantidades menores (nunca inferiores a 10 g) o mayores (hasta 100 g).

En el caso de los alimentos no líquidos, los métodos de aislamiento y recuento de los microorganismos presentes requieren por lo general, la preparación previa de homogenatos, para

liberar en un medio fluido los microorganismos que pueden estar aprisionados en las estructuras del alimento o en superficies secas o gelatinosas. Para este fin se recomienda el empleo del Stomacher (dispositivo en base a paletas que agitan la muestra junto con el diluyente en bolsas plásticas descartables). Es importante la normalización de este procedimiento inicial de preparación del homogenato, para obtener resultados comparables y reproducibles.

En el caso de los alimentos constituidos principalmente por grasas (p. ej. manteca, mayonesa, cremas, etc.) el examen microbiológico puede realizarse sobre el producto entero o empleando la fase acuosa de los mismos (suero), que se obtiene fácilmente por fusión del alimento a 43°C en condiciones asépticas y posterior centrifugación.

Normalmente se preparan diluciones decimales de la suspensión original de la muestra. La naturaleza del diluyente utilizado también tiene importancia en la enumeración o recuento de microorganismos en el alimento. En algunos casos, p.ej. para ciertos microorganismos hay que usar otros diluyentes específicos, tales como NaCl 3 % para *Vibrio parahaemolyticus* (bacteria de origen marino que requiere altas concentraciones salinas para su desarrollo). Si se analizan alimentos grasos o con tendencia a formar grumos, se pueden emplear agentes tensioactivos tales como Tergitol aniónico 7 o Tween 80 (1 %).

En síntesis las condiciones que debe presentar el diluyente son: impedir la aglutinación de los microorganismos, no ser tóxicos, impedir la reproducción de los mismos durante el tiempo de exposición y favorecer la reparación de los microorganismos que pudieran encontrarse afectados (estresados) por las condiciones del alimento o el tratamiento a que éste ha sido sometido (deseccación, calor, etc.).

## **BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS TOTALES**

El recuento de bacterias aerobias mesófilas (RAM) se utiliza como un indicador de la población microbiana de un alimento. También se denomina recuento total en placa, recuento en placa de aerobios, recuento en placa estándar (standard plate count, SPC) o recuento de mesófilos. Si bien el método presenta ciertas limitaciones, puede utilizarse para evaluar calidad sanitaria, aceptabilidad organoléptica, aplicación de buenas prácticas de manufactura, etc. El recuento de aerobios mesófilos aporta información acerca de las materias primas, condiciones del proceso, condiciones de almacenamiento y manipulación del alimento.

Para el recuento se utiliza como medio de cultivo el agar para recuento en placa (APC o SPC), con una incubación a 32°C por 48 h, porque en estas condiciones crecen la mayoría de las bacterias aerobias contaminantes. La mayoría de los alimentos se consideran no aptos para el consumo cuando contienen un gran número de microorganismos, aún cuando se sepa que éstos no son patógenos y que no han llegado a alterar marcadamente las características organolépticas del alimento.

Existen varias razones que justifican este criterio:

1. Los recuentos altos de gérmenes indican frecuentemente materias primas contaminadas, limpieza y desinfección incorrectas, condiciones inadecuadas de tiempo-temperatura durante la producción o la conservación de los alimentos.
2. Si existen recuentos altos de microorganismos mesófilos, las condiciones también fueron favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos, si es que existían y se encuentran, por lo tanto, en gran número en el alimento.
3. Los recuentos altos indican de antemano que el producto va a alterarse muy pronto, ya que en la mayoría de los alimentos que contienen  $10^6$  a  $10^8$  mo/g la alteración ya es evidente.

Es necesario advertir, sin embargo, que el recuento de la flora viable tiene en algunos casos un valor limitado, por ejemplo:

- a) En determinados alimentos, como los producidos por fermentación o maduración (salchichas, quesos, etc.), es natural una gran multiplicación de bacterias.
- b) En los alimentos tratados por calor, los recuentos de microorganismos viables pueden dar cifras muy bajas, reflejando únicamente el grado de tratamiento térmico a que fueron sometidos. En estos casos, el examen microscópico directo nos dirá si hubo o no una contaminación intensa de la materia prima.
- c) Del mismo modo, entre los alimentos deshidratados y en los congelados, siempre se obtienen recuentos de bacterias viables más bajos. El recuento en placa no refleja la calidad bacteriológica de la materia prima, recurriéndose también al examen microscópico directo.

Es importante señalar que el método de recuento en placa es el predilecto cuando las cifras de microorganismos no son demasiado elevadas (menor de 200.000) y pierde eficacia cuando se supera este número.

#### **Fuentes de error:**

1. En el medio de cultivo no se distinguen las colonias formadas a partir de células individuales, de las formadas a partir de cúmulos de células.
2. Carencia de algunas bacterias de formar colonias, debido a la inadecuada composición del medio o desfavorable tensión de oxígeno o inadecuada temperatura de incubación.
3. Errores en la medida de la toma de muestra y en el recuento de las colonias.
4. Incompleta esterilización o recontaminación del material de vidrio, medio de cultivo o agua de dilución.
5. Presencia de sustancias inhibitoras en los diluyentes, en el material de vidrio, o en el mismo alimento.

### **PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA EL RECuento EN PLACA DE BACTERIAS AERÓBICAS TOTALES**

Los métodos de recuento de colonias proveen una estimación del número de microorganismos viables en los alimentos de acuerdo al medio empleado, al tiempo y temperatura de incubación. Las células microbianas a menudo se encuentran formando cúmulos o agrupadas en los alimentos. Si bien la agitación de las muestras y las sucesivas diluciones permiten lograr una distribución uniforme de dichos cúmulos, no logran disgregarlos en su totalidad. Consecuentemente, cada colonia que desarrolla en las placas de agar puede provenir tanto de una célula aislada como de un cúmulo, por lo tanto los recuentos obtenidos por este método no se reportarán como células viables/g o mL, sino como unidades formadoras de colonias/g o mL.

Se debe tener en cuenta que no todos los tipos de microorganismos crecerán sobre un medio simple agarizado incubado bajo determinadas condiciones, debido a requerimiento de nutrientes, tensión de O<sub>2</sub> desfavorable, temperaturas de incubación inadecuadas, presencia de células estresadas, entre otros factores. La presencia de sustancias inhibitoras presentes en el material de vidrio o en los diluyentes, o producidas por microorganismos competitivos en el agar pueden limitar el desarrollo de colonias.

Las condiciones y el medio óptimo para el método de recuento en placa pueden variar de un alimento a otro. Una vez que se seleccione el procedimiento óptimo, se pueden obtener resultados precisos y reproducibles para el análisis microbiológico de rutina del alimento.

### **Reactivos y medios:**

Para el recuento en placa de bacterias aerobias totales se deben usar medios no selectivos (agar para recuento en placa, etc.).

Generalmente se utilizan diluciones decimales para simplificar el cálculo de los resultados. Existe una gran variedad de diluyentes disponibles. Entre los más utilizados se encuentran el buffer fosfato y el agua peptona 0,1 %.

### **Consideraciones generales:**

Todas las placas, tubos y recipientes a utilizar deberán estar rotulados con el número de muestra, dilución, fecha y cualquier otra información relevante antes de preparar las diluciones.

Las muestras líquidas o semilíquidas se mezclarán invirtiendo rápidamente el recipiente 25 veces, o bien recorriendo un arco de 25 cm en 7 seg. El tiempo entre el mezclado y la toma de material a analizar no excederá los 3 minutos.

Las muestras sólidas deberán mezclarse asépticamente con una espátula o cuchara estéril a fin de obtener una muestra homogénea. Para grandes muestras de alimentos sólidos, las porciones de muestra se tomarán de distintas partes y serán mezcladas asépticamente.

Antes de abrir el envase se deberá limpiar el área exterior del recipiente con alcohol 70 % para eliminar los microorganismos que podrían contaminar la muestra.

#### **a) Alimentos líquidos:**

##### **a.1) Líquidos no viscosos:**

Las proporciones de muestra a analizar de alimentos líquidos no viscosos, se medirán volumétricamente con pipeta estéril. No introducir la pipeta más de 2,5 cm por debajo de la superficie de la muestra. La pipeta será vaciada en el diluyente en un lapso de 2 a 4 seg tocando con la punta de la pipeta el borde del tubo de dilución. No soplar la última gota ni sumergir la pipeta en el diluyente. Mezclar en Vortex.

##### **a.2) Líquidos viscosos:**

Para líquidos de viscosidad similar a la leche se debe soplar la última gota de la pipeta. Para aquellos más viscosos que la leche se pesan asépticamente 11,0 ±0,1 g en 99 mL de diluyente o 10,0±0,1 g en 90 mL o 50,0±0,1 g en 450 mL. Esto provee la dilución 1/10.

#### **b) Alimentos sólidos o semisólidos:**

Se pesan asépticamente 50,0±0,1 g de muestra y se colocan en una jarra mezcladora. Se agregan 450 mL de diluyente y se agita 2 minutos a 3.000 rpm. El tiempo de mezclado puede variar dependiendo del alimento. Dentro de los 15 minutos siguientes preparan las diluciones necesarias. Durante el mezclado debe prevenirse el exceso de calentamiento.

La homogeneización de la muestra también puede realizarse mediante el uso de un Stomacher.

#### **c) Plaqueo:**

Fundir el medio evitando temperaturas elevadas y tiempos de calentamiento prolongados. Enfriar el medio a 45°C y mantenerlo en baño a 44-46°C hasta su uso. Levantar la tapa de la placa de Petri sólo lo necesario para insertar la pipeta para introducir la muestra. Se colocan de 12 a 15 mL de agar fundido por placa.

Mezclar rotando la placa primero en una dirección y luego en la dirección contraria. Dejar solidificar el agar no más de 10 minutos. Luego de solidificar el medio invertir la placa para evitar difusión e incubar.

No deben pasar más de 20 minutos entre la preparación de las diluciones de la primera muestra y el momento de volcar el agar en la última placa de la serie.

**d) Recuento de colonias:**

Para trabajos de rutina usar un cuentacolonia equipado con iluminación, magnificador y una placa guía graduada en cm. Contar todas las colonias en las placas seleccionadas que contengan el número apropiado de colonias. Este número es una función que depende del tamaño de la colonia, el tamaño de la placa, y tamaño de las propiedades diferenciales producidas en el medio (p.e. halos de precipitación). Típicamente se obtienen resultados confiables contando entre 25 y 250 colonias por placa. Se informa el resultado del recuento con sólo dos cifras significativas.

**e) Cálculo del error:**

Los límites de confianza del 95 % pueden ser calculados de modo aproximado como  $2s = 2x^{1/2}$ , donde x es el valor promedio del recuento de colonias en las placas. Así en una placa con sólo 16 colonias, el límite de confianza del 95 % será aproximadamente el 50 % (esto es que tendríamos una confianza del 95 % de que el recuento está comprendido entre 8 y 24 colonias por placa).

**Reglas para computar el número total de microorganismos viables/g o mL de muestra**

Se deben utilizar las siguientes reglas para seleccionar las placas adecuadas para realizar el recuento y calcular el número de UFC/g o mL de alimento.

1. Una placa con 25 a 250 colonias:

Contar todas las colonias, incluyendo las muy pequeñas, a menos que se excluya por difusión (DIF) o accidente de laboratorio (AL). Teniendo en cuenta la dilución, informar el número de UFC/g o mL de alimento.

Muestra	Colonias por placa		Recuento (UFC/g o mL)
	Dilución		
	1/100	1/1000	
1	<u>234</u>	23	23.000 = 2,3.10 <sup>4</sup>
2	DIF	<u>31</u>	31.000 = 3,1.10 <sup>4</sup>
3	305	<u>42</u>	42.000 = 4,2.10 <sup>4</sup>
4	<u>243</u>	AL	24.000 = 2,4.10 <sup>4</sup>

2. Dos placas de una misma dilución con 25 a 250 colonias:

Si las dos placas de una misma dilución presentan entre 25 y 250 colonias, contarlas y promediarlas. Si sólo una de las placas de un duplicado presenta entre 25 y 250 colonias, contar ambas placas y promediarlas, a menos que una se excluya por difusión o accidente de laboratorio.

Muestra	Colonias por placa		Recuento (UFC/g o mL)
	Dilución		
	1/100	1/1000	
5	<u>175</u>	16	19.000 = 1,9.10 <sup>4</sup>
	<u>208</u>	17	
6	<u>239</u>	16	28.000 = 2,8.10 <sup>4</sup>
	<u>328</u>	19	
7	275	<u>24</u>	30.000 = 3,0.10 <sup>4</sup>
	280	<u>35</u>	

3. Diluciones consecutivas con 25 a 250 colonias:

Si las placas de diluciones decimales consecutivas presentan 25 a 250 colonias cada una, calcular el recuento por g o mL para cada dilución e informar el promedio aritmético como UFC/g o mL de alimento a menos que el recuento más elevado sea más del doble que el menor recuento. En este último caso, informar el recuento más bajo.

Muestra	Colonias por placa		Relación	Recuento (UFC/g o mL)
	Dilución			
	1/100	1/1000		
8	<u>243</u>	<u>34</u>	1,4	29.000 = 2,9.10 <sup>4</sup>
9	<u>140</u>	32	2,3	14.000 = 1,4.10 <sup>4</sup>
10	<u>228</u>	<u>28</u>	1,2	25.000 = 2,5.10 <sup>4</sup>
	<u>240</u>	<u>26</u>		
11	<u>142</u>	<u>28</u>	2,1	14.000 = 1,4.10 <sup>4</sup>
	<u>134</u>	<u>30</u>		
12	<u>224</u>	<u>28</u>	1,4	24.000 = 2,4.10 <sup>4</sup>
	<u>180</u>	DIF		

4. Ninguna placa presenta 25 a 250 colonias:

Si ninguna placa tiene entre 25 y 250 colonias y una o más placas presentan más de 250 colonias, seleccionar la dilución con la/s placa/s que contengan el valor más cercano a 250 colonias. Informar el recuento como UFC/g o mL **estimativo**.

Muestra	Colonias por placa		Recuento (UFC/g o mL)
	Dilución		
	1/100	1/1000	
13	<u>325</u>	20	33.000 est. = 3,3.10 <sup>4</sup> est.
14	<u>287</u>	23	28.000 est. = 2,8.10 <sup>4</sup> est.
	<u>263</u>	19	

5. Todas las placas presentan menos de 25 colonias:

Si las placas de todas las diluciones presentan menos de 25 colonias contar las colonias de la menor dilución, a menos que sean excluidas por difusión e informar el recuento como UFC/g o mL **estimativo**.

Muestra	Colonias por placa		Recuento (UFC/g o mL)
	Dilución		
	1/100	1/1000	
15	<u>18</u>	2	1.800 est. = $1,8 \cdot 10^3$ est.
16	<u>18</u>	2	1.700 est. = $1,7 \cdot 10^3$ est.
	<u>16</u>	0	

6. Todas las placas sin crecimiento:

Si ninguna de las placas de todas las diluciones presenta colonias y no se han detectado sustancias inhibitoras informar el recuento estimado como menor que (<) la inversa de la menor dilución. Informar el recuento como UFC/g o mL **estimativo**.

Muestra	Colonias por placa		Recuento (UFC/g o mL)
	Dilución		
	1/100	1/1000	
17	<u>0</u>	0	<100 est. = $<10^2$ est.
18	<u>0</u>	0	<100 est. = $<10^2$ est.
	<u>0</u>	0	

7. Todas las placas presentan crecimiento excesivo (más de 250 colonias):

Si el número de colonias por placa excede 250, para estimar el recuento, contar las colonias presentes en porciones de la placa representativas de la distribución de colonias para estimar el recuento. Si hay menos de 10 colonias por  $\text{cm}^2$  contar las colonias presentes en 12  $\text{cm}^2$  seleccionando 6 cuadrados consecutivos horizontalmente y 6 consecutivos perpendiculares sin repetir. Cuando hay más de 10 colonias por  $\text{cm}^2$  contar las colonias en 4 cuadrados representativos. En ambos casos, multiplicar el número promedio de colonias por  $\text{cm}^2$  por el área de la placa para determinar el número de UFC/g o mL **estimativo**.

Cuando los recuentos bacterianos en placas con crecimiento excesivo superan las 100 colonias por  $\text{cm}^2$ , se informará como mayor que (>) el área de la placa multiplicada por 100 para la mayor dilución plaqueada. Por ejemplo, para una placa de 56  $\text{cm}^2$  el recuento deberá ser 5.600 veces la inversa de la mayor dilución plaqueada informado como UFC/g o mL **estimativo**.

Muestra	Colonias por placa		Recuento (UFC/g o mL)
	Dilución		
	1/100	1/1000	
19	MNPC	<u>840</u>	840.000 est. = $8,4 \cdot 10^5$ est.
20	MNPC	<u>7150</u>	>5.600.000 est. = $>5,6 \cdot 10^6$ est.

## 8. Difusión:

Existen tres tipos diferentes de difusión. La primera consiste en una cadena de colonias, no lo suficientemente separadas, aparentemente causada por la desintegración de un cúmulo bacteriano cuando el inóculo fue dispersado en la placa. Si una o más cadenas parecieran provenir de diferentes orígenes, contar cada una como una colonia. No deben contarse “colonias individuales” en dichas cadenas.

El segundo tipo de difusión consiste en el desarrollo microbiano en una película de agua entre el agar y la placa. El tercer tipo consiste en el crecimiento de microorganismos en una película de agua situada en los bordes de la placa o sobre el agar. Si se presentan estos tipos de difusión, contar las colonias en las zonas de la placa libres de difusión, siempre y cuando la distribución de las colonias en esas áreas sea homogénea y la difusión no exceda el 50 % del área total de la placa. Calcular el recuento **estimativo** multiplicando el promedio de colonias por cm<sup>2</sup> por el área de la placa como en el punto 7. Cuando la difusión exceda el 50 % de la placa, informar como “difusión” (DIF) o “accidente de laboratorio” (AL).

## NÚMERO MÁS PROBABLE

### Principios básicos

La técnica del número más probable (NMP) se basa en la obtención de resultados positivos o negativos en una o más diluciones decimales de la muestra para estimar el número de organismos presentes en la misma. El resultado se expresa como “el número más probable de microorganismos por gramo o por mililitro o por 100 mililitros” según los casos.

El método deriva de la aplicación de la teoría de probabilidad para la determinación de microorganismos en una muestra. Los valores de la tabla de NMP son calculados presuponiendo que los microorganismos buscados están homogéneamente distribuidos en la muestra y en el homogenato. En las muestras de alimentos, las grasas y las partículas insolubles impiden la formación de un buen homogenato. Por esta razón los NMP derivados de muestras de alimentos son algo menos precisos y reproducibles que aquellos derivados de muestras de agua, donde la homogeneidad es más fácil de conseguir.

A diferencia del recuento en placa, el NMP no constituye una medida directa del recuento bacteriano y sus resultados suelen ser más variables que los del recuento en placa. Es adecuado para estimar la población de microorganismos especialmente en situaciones donde se encuentran densidades extremadamente bajas, ya que posee mayor sensibilidad que el recuento en placa.

El método del NMP está basado en la subdivisión de la muestra y por lo tanto puede ser descripto como el método de dilución hasta extinción en múltiples tubos. Cuando se realizan sucesivas diluciones seriadas de una muestra, las diluciones más altas contendrán una cantidad tan pequeña de muestra original que podrían no contener microorganismos. La información más satisfactoria se obtiene cuando todos los tubos con la mayor porción de muestra (menor dilución) muestran crecimiento y los tubos con la menor porción de muestra (mayor dilución) no muestran crecimiento. La precisión de esta técnica aumenta con el incremento del número de tubos usados por dilución (la técnica más común emplea entre 3 y 5 tubos de una misma dilución).

### Detección de tubos positivos

#### a) Turbidez:

Cuando se analizan muestras que no opacan el medio de cultivo la aparición de turbidez luego de la incubación indica crecimiento (tubo positivo). Cuando las muestras causan turbidez, deben emplearse otros métodos para determinar los tubos positivos.

**b) Productos metabólicos finales:**

1. Detección de la producción de gas: Los gases producidos por el desarrollo de microorganismos pueden atraparse en viales invertidos (campanita de Durham) colocados en el medio de crecimiento. Se evidencia una reacción positiva cuando el gas que se acumula en la punta de la campanita desplaza al menos 1/5 del líquido contenido en ella.
2. Detección de ácidos o bases: La producción de ácidos o bases se puede determinar luego de la incubación midiendo el pH en cada tubo o empleando un medio que contenga un indicador de pH.
3. Detección con métodos de reducción: Compuestos aceptores de electrones (p.e. resazurina, azul de metileno, TTC, etc.) que cambian de color luego de ser reducidos pueden ser incorporados al medio. El cambio de color indicará reacción positiva.
4. Otros: Existen medios específicos que permiten evaluar ciertas actividades metabólicas, por ejemplo, reducción de NO<sub>3</sub>, producción de indol, hidrólisis de almidón, producción de H<sub>2</sub>S, etc.

**Interpretación de datos**

Como el NMP provee una estimación del recuento de microorganismos presentes en una muestra, en las tablas utilizadas para calcularlo se presenta la concentración más probable de microorganismos en la muestra, para una dada combinación de tubos positivos teniendo en cuenta las diluciones empleadas.

Cuando se emplean más de 3 diluciones de una muestra en la determinación del NMP, se utilizan los resultados de sólo 3 diluciones consecutivas. Para seleccionar las 3 diluciones más adecuadas, se aplican las siguientes reglas:

1. Seleccione la dilución más alta (menor cantidad de muestra) en la que resulten todos los tubos positivos (5/5 o 3/3) y las dos diluciones subsiguientes (casos a y b). Si esto no es posible, ya sea porque ninguna de las diluciones presenta todos los tubos positivos, o porque no se hicieron dos diluciones subsiguientes a ésta, emplear las 3 últimas (casos c y d).
2. Si sólo una dilución presenta tubos positivos, elegir 3 diluciones sucesivas de modo que el resultado positivo corresponda a la dilución del medio (caso e).
3. Si aparecen resultados positivos en la dilución siguiente a las 3 seleccionadas, sumar el número de tubos positivos presentes en esta dilución al resultado de la dilución anterior (casos f y g).

Casos	1/10	1/100	1/1000	1/10000	Combinación de tubos +
a	5/5	<u>5/5</u>	<u>2/5</u>	<u>0/5</u>	5-2-0
b	3/3	<u>3/3</u>	<u>2/3</u>	<u>0/3</u>	3-2-0
c	4/5	<u>3/5</u>	<u>1/5</u>	<u>0/5</u>	3-1-0
d	5/5	<u>5/5</u>	<u>5/5</u>	<u>3/5</u>	5-5-3
e	<u>0/5</u>	<u>1/5</u>	<u>0/5</u>	0/5	0-1-0
f	<u>5/5</u>	<u>3/5</u>	<u>1/5</u>	1/5	5-3-2
g	<u>3/3</u>	<u>2/3</u>	<u>1/3</u>	1/3	3-2-2

## **BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES A 45°C Y *E. COLI***

Se define como coliformes a las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, Gram negativas, bacilos cortos no formadores de esporas, capaces de fermentar lactosa produciendo ácido y gas a 35°C en 24/48 h. En los productos lácteos se utiliza una temperatura de incubación de 32°C. El grupo de los coliformes se define en base a reacciones bioquímicas y no a relaciones genéticas, por lo que el término “coliforme” no tiene validez taxonómica.

Este grupo incluye la mayoría de las cepas de *E. coli* y otros microorganismos que no son predominantemente de origen fecal, como *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*.

*Escherichia coli* es un germen cuyo hábitat natural es el tracto intestinal del hombre y de otros animales de sangre caliente. Su presencia en los alimentos se interpreta generalmente como contaminación directa o indirecta de origen fecal. Por ello *E. coli* es el indicador clásico de la presencia simultánea de bacterias patógenas entéricas tales como *Salmonella typhi*, otras salmonellas, shigelas, vibrios, y virus entéricos. Muchos de estos microorganismos patógenos son difíciles y costosos de determinar y por eso se hace preciso confiar en los organismos indicadores. Sin embargo, la presencia de *E. coli* en un alimento no indica que existan necesariamente gérmenes patógenos, sino simplemente advierte el riesgo de que pudieran estar presentes.

Con excepción de *E. coli*, los coliformes persisten en el suelo o sobre la superficie (por ejemplo frutas, granos y otros productos de campo) mucho más tiempo que el propio *E. coli*. Por lo tanto, los coliformes no indican necesariamente contaminación fecal en el sentido de implicar un contacto inmediato con heces o con una superficie contaminada con heces. La principal aplicación del recuento de coliformes es para la evaluación de la calidad microbiológica de un alimento y las condiciones higiénicas durante el procesado. Cuando el alimento ha sido conservado o almacenado a temperaturas no adecuadas o durante un tiempo excesivo el número de coliformes suele ser elevado. Usualmente es imposible determinar si un dado número de coliformes es debido a una gran contaminación inicial o al crecimiento posterior a una leve contaminación inicial. No sucede lo mismo con las determinaciones cuantitativas en el agua, debido a que este medio no es adecuado para la multiplicación, por lo tanto el número de coliformes determinado estaría directamente relacionado con el grado de contaminación inicial.

Los coliformes termotolerantes o coliformes a 45°C se definen como aquellos coliformes capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a 44,5-45,5°C en 48 h. El término “coliformes termotolerantes”, al igual que coliformes, carece de validez taxonómica. En este grupo se incluyen *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, entre otros microorganismos. La determinación de este grupo fue desarrollada como un método rápido y reproducible para detectar la presencia de *E. coli* sin la necesidad de tener que utilizar las pruebas confirmadoras para esta especie cuya realización requiere tiempo. Esto se debe a que los coliformes termotolerantes incluyen un porcentaje elevado de cepas de *E. coli*.

En los alimentos, *E. coli* es por lo general, el indicador preferido para significar una contaminación de origen fecal relativamente reciente y en consecuencia de la proliferación de gérmenes patógenos con él asociados, si estaban presentes. Con el fin de poner de manifiesto en los alimentos la presencia de *E. coli* cuali o cuantitativamente, se desarrollaron varios métodos que se basan en lo siguiente:

1. Determinación de gérmenes coliformes, incluyendo *E. coli*, en un caldo de enriquecimiento de coliformes.
2. Si el ensayo anterior da lugar a la posibilidad de contaminación fecal, los coliformes se someten a otros ensayos para determinar si entre ellos está presente *E. coli*. Es por esto que ha surgido el concepto de “coliformes termotolerantes” o coliformes a 45°C. Para realizar este ensayo

el inóculo se extrae de un caldo de enriquecimiento de coliformes. Tales cultivos microbianos tienen por lo general un alto porcentaje de *E. coli* tipos I y II y por lo tanto son indicativos en el alimento de una contaminación de origen fecal.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que, en ciertos alimentos procesados, en los cuales un gran número de *E. coli* ha sido eliminado durante el procesamiento, pueden persistir algunas especies de *Salmonella*, por ej. *Salmonella typhi* puede permanecer viable en quesos durante meses; *Salmonella paratyphi* ha sido aislada de huevos congelados después de varios años de conservación. Otras cepas de *Salmonella* han sido encontradas en alimentos desecados en los que se han eliminado gran número de *E. coli* en el proceso de desecación. Es importante tener en cuenta que en estos alimentos citados, *E. coli* estaría prácticamente ausente y sería erróneo, por lo tanto, utilizarlo como indicador de la presencia o ausencia de bacterias entéricas patógenas.

Es por esto, que cada vez se utiliza más la determinación en alimentos procesados de la familia Enterobacteriaceae, es decir, que se incluye los microorganismos lactosa (+) y lactosa (-). Estos recuentos se utilizan generalmente como un indicador de la calidad higiénica más que de la contaminación fecal.

### **Conclusiones Generales**

En alimentos procesados, la presencia de un número considerable de *Enterobacteriaceae* o bacterias coliformes indica:

- Inadecuado procesamiento y/o recontaminación post procesamiento, frecuentemente a partir de alimentos muy contaminados, equipos sucios o manipuleo no higiénico.
- Que las condiciones fueron también favorables para la multiplicación de un amplio rango de organismos patógenos y toxicogénicos.

### **BACTERIAS PSICROTRÓFICAS**

El término “psicrotróficos” se aplica a aquellos microorganismos que son capaces de crecer relativamente rápido a temperaturas de refrigeración, pero poseen una temperatura óptima de crecimiento mayor, en el rango de la temperatura óptima para mesófilos.

Especies de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, y otras bacterias Gram negativas, como también *Geotrichum*, *Botrytis*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhodotorula*, entre los mohos y levaduras, desarrollan en alimentos refrigerados.

La presencia de bacterias psicrotróficas es importante también en productos congelados tales como pollos y pavos que son descongelados para ser comercializados como alimentos refrigerados. Algunas especies microbianas pueden crecer lentamente a temperaturas tan bajas como -5 a -12°C, causando deterioro en alimentos almacenados por largos períodos a esas temperaturas.

Cuando las bacterias psicrotróficas están presentes en gran número en alimentos, pueden causar la aparición de sabores y aromas atípicos como también defectos físicos debido a la acción de enzimas lipolíticas y proteolíticas.

### **Métodos generales**

- Las bacterias psicrotróficas son usualmente enumeradas en medios no selectivos como el agar para recuento (SPC) con una incubación de las placas a temperaturas de refrigeración, tal como 7°C por 10 días cuando el recuento se realiza por el método de vertido en placa. Otras combinaciones de tiempo y temperatura utilizadas son: 7-8 días a 7°C para recuento en placa en superficie, y una combinación de 16 h a 17°C seguida de 3 días a 7°C.

- Otras condiciones de incubación para esta determinación utilizan tiempos más cortos y temperaturas más elevadas, como 25 h a 21°C para leche y crema, 45 h a 18°C para leche, y 24 h a 25°C para carnes.
- La prueba de Moseley es un ensayo que se realiza también con el fin de reconocer la presencia y cantidad de psicrotóxicos. Previamente se determina la presencia de bacterias que desarrollan a 32°C durante 48 h en el medio SPC, luego se sigue incubando a 7°C durante 5-7 días más realizándose un nuevo recuento. Un incremento grande entre ambos recuentos es indicativo de posibles problemas cuando el alimento es almacenado durante períodos prolongados a bajas temperaturas.
- Dado que por lo general las bacterias psicrotóxicas son Gram negativas un recuento orientativo en forma rápida se realiza en agar con cristal violeta y cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), incubando 48 h a 30°C. El cristal violeta inhibe las bacterias Gram positivas. Se cuentan como bacterias psicrotóxicas aquellas que reducen el cloruro de trifeniltetrazolio a formazán. Sin embargo, esta técnica no proporciona un recuento muy preciso debido a que muchos mesófilos no psicrotóxicos pueden crecer en estas condiciones.

## ANEXO: ÍNDICE

### **TABLAS**

Características bioquímicas de <i>Enterobacteriaceae</i>	56
Géneros de <i>Enterobacteriaceae</i> con respecto a su origen fecal, reacción en las pruebas de coliformes y a su patogenicidad	57
Clasificación y características bioquímicas del género <i>Clostridium</i>	58
Tablas referidas en “Métodos de muestreo para análisis microbiológicos”	59
Tablas de NMP	64

### **MÉTODOS DE TINCIÓN**

Tinción de Gram-Nicole	67
Tinción negativa	68
Demostración de cápsulas bacterianas	68
Tinción de esporas bacterianas	69
Tinción de bacterias en leche	69
Observación de movilidad de bacterias	69

### **SOLUCIONES Y REACTIVOS**

Solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 1%	70
Solución de tetraciclina	70
Solución de telurito de potasio (3,5 %)	70
Reactivo de Kovacs	70
Reactivo de Voges-Proskauer	70
Reactivo para la prueba de reducción de nitrato	70
Reactivo para determinar diacetilo en jugo de fruta	71
Reactivo para oxidasa	71
Vaspar	71

### **MEDIOS DE CULTIVO**

Instrucciones generales para su preparación	72
Acetamida <i>Agar</i>	73
Almidón <i>Agar</i>	73
ALOA (Agar <i>Listeria</i> según Ottaviani y Agosti)	73
Azul de toluidina DNA <i>Agar</i>	74
Baird Parker <i>Agar</i>	74
Base sangre <i>Agar</i>	75
Bilis Rojo Neutro Cristal Violeta (ABRV) <i>Agar</i>	76
Bilis Rojo Neutro Cristal Violeta Glucosa <i>Agar</i> según Mossel	76
Bismuto Sulfito <i>Agar</i> (Wilson y Blair)	77
Buenos Aires Medio (BAM)	77
Caseína <i>Agar</i>	79
Casoy <i>Caldo</i>	79
Carne Cocida Medio Comercial	80
Carne Cocida Medio	80
Cerebro Corazón <i>Agar</i>	80
Cerebro Corazón <i>Caldo</i>	81

Cetrimida Agar	81
Citrato de Koser <i>Caldo</i>	81
Citrato de Simmons Agar	81
Clark y Lubs (RMVP) <i>Medio</i>	82
Cristal Violeta Tetrazolium Agar.....	82
Desoxicolato Citrato Agar según Leifson.....	82
Dicloran Glicerol 18 % (DG18) Agar.....	83
Dicloran Rosa De Bengala Cloranfenicol (DRBC) Agar.....	83
Duncan Strong <i>Caldo</i> .....	84
Endo Agar.....	84
Eosina Azul de Metileno (EMB) Agar según Levine.....	85
Escherichia coli <i>Caldo</i> .....	85
Esculina Hierro Agar.....	85
Extracto de Carne Agar.....	86
Extracto de Carne <i>Caldo</i> .....	86
Extracto de Malta Agar.....	86
Fermentación de Azúcares <i>Caldo</i> (Aerobios).....	87
Fermentación de Azúcares <i>Caldo</i> (Anaerobios).....	87
Fluorocult Agar para <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	88
Fraser <i>Caldo</i> .....	88
Gelatina <i>Medio</i> (Aerobios).....	89
Glucosa <i>Caldo</i> .....	89
Grasa de Manteca Agar.....	90
Hígado + Hígado <i>Caldo</i> .....	90
Hígado de Ternera Agar.....	90
Infusión de Cerebro Corazón <i>Caldo</i> .....	91
Infusión de Corazón Agar.....	91
Infusión de Hígado <i>Caldo</i> .....	91
Investigación de H <sub>2</sub> S <i>Caldo</i> .....	92
KF <i>Streptococcus</i> Agar.....	92
KG Agar.....	93
Lactosa <i>Caldo</i> .....	93
Lauril Sulfato <i>Caldo</i> .....	94
Levadura <i>Caldo</i> (Membrana filtrante).....	94
Lisina Hierro Agar.....	94
Leche Agar.....	95
Leche Tornasolada.....	96
Mac Conkey Agar.....	96
Mac Conkey <i>Caldo</i> .....	97
Mac Conkey Sorbitol Agar.....	97
Manitol Lisina Cristal Violeta (MLCB) Agar.....	98
Manitol Sal común Rojo Fenol.....	98
Manitol Yema de Huevo Polimixina (MYP) Agar.....	99
Medio 110 para Estafilococos.....	100
Modified McBride (MMA) Agar.....	100
Movilidad Agar para.....	101
Nitrato <i>Caldo</i> .....	101

Nitrato Movilidad Buffereado <i>Agar</i> .....	102
Oxford Modificado (MOX) <i>Agar</i> .....	102
Palcam <i>Agar</i> .....	103
Papa Dextrosa <i>Agar</i> .....	103
PE-2 <i>Medio</i> .....	104
Pseudomonas: F <i>Agar</i> y P <i>Agar</i> .....	104
Rappaport <i>Caldo de Enriquecimiento</i> según Wauters.....	105
Rappaport Vassiliadis <i>Caldo</i> .....	105
Recuento en placa (APC) <i>Agar</i> .....	105
Salmonella-Shigella <i>Agar</i> .....	106
Selenito <i>Caldo</i> .....	106
Selenito Cistina <i>Caldo</i> .....	107
SIM <i>Agar</i> .....	107
Suero de Naranja (OSA) <i>Agar</i> .....	107
Suero de Naranja (OSB) <i>Caldo</i> .....	108
Sulfito Hierro <i>Agar</i> .....	108
Sulfito Hierro Neomicina <i>Agar</i> .....	108
Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) <i>Agar</i> .....	109
Termoacidurans (TAA) <i>Agar</i> .....	109
Tetrionato <i>Caldo</i> según Mueller-Kauffmann.....	109
Tioglicolato <i>Caldo</i> .....	110
Triple Azúcar Hierro (TSI) <i>Agar</i> .....	110
Tributirina <i>Agar</i> .....	112
Triptona Glucosa (GTA) <i>Agar</i> .....	112
Triptona Glucosa (GTB) <i>Caldo</i> .....	113
Triptona Sulfito Clicloserina (TSC) <i>Agar</i> .....	113
Triptona Sulfito Neomicina (TSN) <i>Agar</i> .....	113
Urea <i>Caldo</i> .....	114
UVM <i>Caldo</i> .....	114
Verde Brillante 2% Sales Biliares (BRILA) <i>Caldo</i> .....	114
Verde Brillante Rojo Fenol Lactosa Sacarosa (BPLS) <i>Agar</i> .....	115
Verde Brillante Rojo Fenol Lactosa Sacarosa (BPLS) <i>Agar</i> modificado.....	115
Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) <i>Agar</i> .....	116
YGC <i>Agar</i> .....	116

## TABLAS

**Tabla 1. Enterobacteriaceae**

	glucosa	gas	lactosa	sacarosa	rojo de metilo	Voges Proskauer	citrato	indol	mov.	SH <sub>2</sub>	ureasa	LDC
<i>E. coli</i>	+	+	+	d	+	-	-	+	+	-	-	d
<i>Shigella flexneri</i>	+	-	-	-	+	-	-	-/+	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	+	+	-	-	+	-	+/-	-	+	+	-	+
<i>P. vulgaris</i>	+	+	-	+	+	-	d	+	+	+	+	-
<i>P. mirabilis</i>	+	+	-	d	+	+/-	+/-	-	+	+	+/-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+/-	+	-	+	+	-	+	-	+/-	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	+/-	-	+	+/-	+	+	-	+	-	d	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	+	-	+	+	+++	-	+/-	++++	-	++	-
<i>Morganella morganii</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	d	-	+	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	d	d	+	-	+	-	+	+/-	d	-

d: tipos bioquímicos diferentes

+/-: mayoría de las cepas +; +/-: mayoría de las cepas -

\* las pruebas se realizan a 28°C, salvo otras indicaciones

\*\* las cepas - para este ensayo pertenecen al biotipo S

\*\*\* la movilidad es + a 21°C y - a 37°C

**Tabla2. Géneros de *Enterobacteriaceae* con especial referencia a su origen fecal o no fecal, a su patogenicidad por vía digestiva y a su puesta en evidencia por varias pruebas**

Género	Predominantemente de origen fecal (F), de origen no fecal (-), o de ambos orígenes (a)	Detectada por las pruebas de coliformes: + =la mayoría de las cepas v = variable (-) = casi ninguna cepa	Patogenicidad: P = la mayoría de las cepas patógenas por vía digestiva para el hombre p = pocas especies entero-patógenas (-) = casi ninguna especie enteropatógena
<i>Arizona</i>	F	V	P
<i>Citrobacter</i>	(-)	+	(-)
<i>Edwardsiella</i>	F	(-)	P (p)
<i>Enterobacter</i>	(-)	+	(-)
<i>Erwinia</i>	(-)	(-)	(-)
<i>Escherichia</i>	F	+	p
<i>Hafnia</i>	a	(-)	(-)
<i>Klebsiella</i>	a	+	p
<i>Proteus</i>	a	(-)	p
<i>Providencia</i>	(-)	(-)	p
<i>Salmonella</i>	F	(-)	P
<i>Serratia</i>	(-)	(-)	(-)
<i>Shigella</i>	F	(-)	P
<i>Yersinia</i>	F	(-)	P (p)

**Tabla Nº 3: Clasificación en grupos del género Clostridium**

A - Espora subterminal	C. butyricum C. pasteurianum C. propionicum y otros	Grupo I	B - Espora terminal	C - Especies con requerimientos nutritivos especiales	C. brevifasciens C. thermocellum y otros
a - no hidroliza la gelatina	C. sporogenes C. botulinum C. perfringens y otros	Grupo II	a - no hidroliza la gelatina	Grupo III	Grupo V
b - hidroliza la gelatina			b - hidroliza la gelatina	Grupo IV	
				C. thermosaccharoliticum y otros	
				C. putrificum C. tetani y otros	

**Tabla Nº 4: Caracteres bioquímicos de especies del grupo I de Clostridium**

	C. butyricum	C. pasteurianum	C. propionicum	C. paraperfringens	C. tyrobutyricum
Reducción de NO <sub>3</sub>	d	-	-	d	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	+	+	-
Movilidad	+	+	-	-	+
Lecitinas	-	-	-	+	-
Almidón	+	-	-	+	-
Glucosa	+	+	-	+	+
Manosa	+	+	-	+	+
Maltosa	+	+	-	+	-
Lactosa	+	-	-	+	-
Salicina	+	d	-	+	-
Leche	Coagula digiere	Sin cambio	Sin cambio	Acidez sin cambio	Acidez sin cambio

**Tabla Nº 5: Caracteres bioquímicos de especies del grupo II de Clostridium**

	C. perfringens	C. sporogenes	Tipos A,B,C,D y F		Tipos B,C,D,E y F		Tipo G
Reducción de NO <sub>3</sub>	d	-	-	-	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	-	+	-	-	-	-	-
Lecitinas	+	-	-	v	+	+	-
Lipasa	-	+	+	+	+	+	-
Movilidad	-	+	+	+	+	+	+
Almidón	+	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	-
Manosa	+	-	-	+	+	+	-
Maltosa	+	v	v	v	v	v	-
Lactosa	+	-	-	-	-	-	-
Salicina	v	d	v	v	v	v	-
Leche	fermentación tumultuosa	digiere	digiere	coagula no digiere	coagula no digiere	digiere lentamente	-

**REFERENCIAS:**

- (+) positivo
- (-) negativo
- (d) difiere según las cepas
- (v) variable dentro de una cepa

**FUENTE:**

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ª Edición, 1974

**Tabla 6**

**Principales bacterias patógenas (o toxinas) causantes de enfermedades de transmisión alimentaria<sup>a</sup>**

Microorganismo	Frecuencia	Distribución	Vehículos <sup>b</sup>	Factores secundarios que influyen en la severidad del programa del muestreo
<b>I MUY PELIGROSOS</b>				
<i>Clostridium botulinum</i> (Botulismo)	Poco frecuente cuando existe un control eficaz de los alimentos	Muy extendido	Alimentos (enlatados o curados) elaborados defectuosamente; productos cárnicos; pescado crudo y ahumado	Alta mortalidad; el reconocimiento rápido y tratamientos específicos pueden ser esenciales para la supervivencia del enfermo
<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> y <i>S. choleraesuis</i> (Fiebres tíficas y paratíficas)	Endémica en muchas partes del mundo; ocasionalmente epidémica	Mundial	Agua; leche y productos lácteos crudos; productos cárnicos y verduras	Dosis infectivas bajas; requiere cuidados médicos prolongados; puede transmitirse por portadores (especialmente <i>S. typhi</i> )
<i>Shigella dysenteriae</i> F ( <i>Shigae</i> ) (Shigelosis, disentería de Shiga)	Esporádica o epidémica	América Central; Méjico, Africa del Norte y Central, Japón y Sureste asiático	Agua, verduras y ensaladas	Alta mortalidad; se diagnostica con frecuencia erróneamente
<i>Vibrio comma</i> (Cólera)	Esporádica, endémica y epidémica ocasionalmente	Asia, Oriente Medio, Africa del Norte y Central	Agua, alimentos diversos	
<i>Brucella melitensis</i> (Brucelosis)	Moderadamente rara pero endémica ocasionalmente	Países del Mediterráneo	Leche y queso de cabra	Convalecencia con frecuencia prolongada
<i>Clostridium perfringens</i> tipo C (Enteritis necrótica)	Rara	Esporádica en Europa, Nueva Guinea	Carnes cocidas	
Virus de la hepatitis infecciosa <sup>d</sup>	Frecuente	Mundial	Agua, leche y productos lácteos, ensaladas, verduras y mariscos	Muy grave para enfermos hepáticos; larga duración

**Tabla 6 (continuación)**

**Principales bacterias patógenas (o toxinas) causantes de enfermedades de transmisión alimentaria<sup>a</sup>**

Microorganismo	Frecuencia	Distribución	Vehículos <sup>b</sup>	Factores secundarios que influyen en la severidad del programa del muestreo
<b>II MODERADAMENTE PELIGROSOS: DIFUSION POTENCIALMENTE EXTENSA<sup>c</sup></b>				
<i>Salmonella typhimurium</i> y otras especies de <i>Salmonella</i> (Salmonelosis)	Frecuente	Mundial	Carne de aves y huevos; otro tipo de carnes; otros muchos alimentos	Grave en individuos jóvenes y viejos
<i>Shigella</i> (ver Sección I) (Shigelosis, Disentería de Flexner y Sonne)	Frecuente, endémica en ciertas áreas	Mundial	Agua, ensaladas, frutas	Grave en individuos jóvenes y viejos; es difícil aislar el microorganismo del alimento
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Frecuente en Japón; en todo el mundo está aumentando la incidencia	Lejano Oriente. Probablemente muy extendido	Pescado procedente del mar; crustáceos	El peligro es más grave cuando procede de pescado crudo o inadecuadamente cocido
<i>Escherichia coli</i> (Enteropatógeno)	Está aumentando en diversas áreas	Extendido probablemente por todo el mundo	Carnes; leche y productos lácteos crudos	Grave en individuos jóvenes
Estreptococos β-hemolíticos	Enfermedad alimentaria poco frecuente	Muy extendido	Leche y productos lácteos crudos; ensaladas de huevo	Ciertos grupos del tipo A pueden causar faringitis, nefritis, artritis y complicaciones cardiovasculares

**Tabla 6 (continuación)**

**Principales bacterias patógenas (o toxinas) causantes de enfermedades de transmisión alimentaria<sup>a</sup>**

Microorganismo	Frecuencia	Distribución	Vehículos <sup>b</sup>	Factores secundarios que influyen en la severidad del muestreo
<b>III MODERADAMENTE PELIGROSOS: DIFUSION LIMITADA<sup>c</sup></b>				
<i>Bacillus cereus</i>	Está aumentando en diversas áreas	Extendido probablemente por todo el mundo	Productos reconstituidos derivados de los cereales; leche; pudín y natilla; arroz	
<i>Brucella abortus</i>	Esporádica en varias partes del mundo	Muy extendido	Leche y crema crudas; queso fresco	
<i>Clostridium perfringens</i>	Frecuente	Extendido probablemente por todo el mundo	Carnes cocidas	
<i>Staphylococcus</i> (enterotoxigénico) (intoxicación estafilocócica)	Frecuente	Mundial	Jamón y otros productos cárnicos; pasteles de crema y alimentos cocidos; postres y salsas; platos preparados con leche, queso y huevos; crustáceos	

*a* Consúltese la obra de Bryan (1971) para mayor información sobre las enfermedades alimentarias

*b* Véanse las Conclusiones de la Comisión Mixta FAO/WHO (1970) para mayor información sobre las enfermedades transmitidas por la leche

*c* *Shigella dysenteriae* causa, a veces, una enfermedad leve

*d* El virus aún no se ha aislado a partir de alimentos

*e* Véanse las Conclusiones de la pág. 38 para la explicación de difusión limitada y extensa

**Tabla 7**

**Programas de muestreo recomendados para combinaciones de diferentes grados de peligrosidad para la salud y diversas condiciones de manipulación (es decir, las 15 “categorías”)**

Grado de importancia en relación con la alteración y el peligro para la salud	Condiciones en que se espera el alimento sea manipulado y consumido después del muestreo <sup>a</sup>		
	Condiciones que reducen el grado de peligrosidad	Condiciones que no modifican el grado de peligrosidad	Condiciones que pueden aumentar la peligrosidad
Sin peligro directo para la salud Vida útil y alteración	Aumento de la vida útil Categoría 1 3-clases $n = 5, c = 3$	Sin modificación Categoría 2 3-clases $n = 5, c = 2$	Reducción de la vida útil Categoría 3 3-clases $n = 5, c = 1$
Peligro para la salud bajo, indirecto (indicadores)	Peligrosidad reducida Categoría 4 3-clases $n = 5, c = 3$	Sin modificación Categoría 5 3-clases $n = 5, c = 2$	Peligrosidad aumentada Categoría 6 3-clases $n = 5, c = 1$
Moderado, directo, difusión limitada <sup>b</sup>	Categoría 7 3-clases $n = 5, c = 2$	Categoría 8 3-clases $n = 5, c = 1$	Categoría 9 3-clases $n = 10, c = 1$
Moderado, directo, difusión potencialmente extensa <sup>b</sup>	Categoría 10 2-clases $n = 5, c = 0$	Categoría 11 2-clases $n = 10, c = 0$	Categoría 12 2-clases $n = 20, c = 0$
Grave, directo	Categoría 13 2-clases $n = 15, c = 0$	Categoría 14 2-clases $n = 30, c = 0$	Categoría 15 2-clases $n = 60, c = 0$

*a* Deben emplearse programas de muestreo más rigurosos para alimentos delicados destinados a poblaciones especialmente sensibles.

*b* Véase “Conclusiones”, pág. 38 para la explicación de difusión extensa y limitada

**Tabla 8**

**Interrelación entre las “categorías” (grado de importancia)<sup>a</sup> y el tipo de alimento, pruebas microbiológicas y condiciones de tratamiento del alimento (se ofrecen ejemplos de diversos tipos de alimentos)**

Tipo de problema	Influencia de las condiciones	Categoría	Producto alimenticio	Pruebas microbiológicas	Tipo de tratamiento a que se someterá el alimento	
Alteración y vida útil	Peligrosidad reducida	1	Pescado fresco congelado	SPC	Se someterá a cocción antes de su consumo Se utilizarán como ingrediente en productos que se tratarán por el calor (p.ej., tartas) Se consumirán inmediatamente después de la descongelación y debidamente cocinados Se consumirán inmediatamente después de la reconstitución y tratados por el calor	
			Huevos congelados			
			Alimentos preparados congelados	SPC		
				Alim. desecados en polvo (leche, alim. para emergenc.)	SPC	
		Sin modificación en la peligrosidad	2	Pescado ahumado refrig.	SPC	Se consumirán sin cocción Embalaje correcto; almacenam. bajo condiciones que garantizan la impermeabilidad del agua Almacenam. bajo congelación; se someterán a tratamiento térmico o se consumirán inmediatamente después de la descongelación Almacenamiento bajo congelación; su consumo se realizará tras la descongelación
	Frutas secas			Mohos, levaduras		
	Clara de huevo congel.			SPC		
				Colas de langosta y gambas cocidas y congeladas	SPC	
		Peligrosidad aumentada	3	Alim. desecados en polvo	SPC	Embalaje defectuoso o a granel; almacenamiento bajo condiciones húmedas Almacenamiento bajo condiciones húmedas Almacenamiento excesivo; refrigeración discontinua o inadecuada Almacenamiento a temperatura ambiente normal Almacenamiento a temperaturas elevadas
	Nueces, granos, frutas secas			Mohos		
	Carnes frescas			SPC		
	Conservas de carnes curadas			“Abombamientos”		
Verduras y mezcla de las mismas enlatadas	Termófilos					
			Alimentos congelados	SPC	Sospecha de almacenamiento inadecuado bajo congelación; período de descongelación largo	
Peligro para la salud indirecto y escaso (m.o. indicadores)	Peligrosidad reducida	4	Egletin ahumado y Refrig.	Coliformes fecales Estafilococos <sup>b</sup>	Se someterán a cocción	
			Verduras escaldadas y congeladas	SPC	Se someterán a cocción	
			Queso	Coliformes	Destinado a la fabricación de queso fundido	
			Alimentos desecados	Colif. fecales Coliformes	Destinados a la preparación de productos que se someterán a tratamiento térmico	
			Gambas crudas congeladas	Coliformes Estafilococos <sup>b</sup>	Se someterán a cocción u otro tipo de tratamiento térmico antes del consumo	
				Coliformes	Se consumirán crudas	
		Sin modificación en la peligrosidad	5	Verduras frescas o refrigeradas	Coliformes	Almacenamiento a temperatura ambiente No se someterá a cocción antes del consumo  Se consumirá inmediatamente después de su reconstitución Se consumirán cocidas insuficientemente  Ser consumirán inmediatamente después de la descongelación Se consumirán cocidos insuficientemente
	Pescado ahumado Refrig.			Colif. fecales		
	Carne de cangrejo de mar preparada a mano y sometida a cocción			Coliformes Estafilococos <sup>b</sup>		
	Leche en polvo <sup>c</sup>			SPC		
	Verduras congeladas			Coliformes SPC		
	Gambas cocidas congeladas			Coliformes Estafilococos <sup>b</sup>		
	Platos precocinados congelados			SPC		
				Coliformes		
				Coliformes		
	Coliformes					
	Peligrosidad aumentada	6	Marisco fresco o congelado	Coliformes	En el caso en que las aguas estén contaminadas o no se hayan analizado (pueden contener <i>Salmonella</i> spp., etc.) El control, tras la reconstitución, será escaso	
Leche en polvo, alimentos para emergencias			SPC Coliformes Estafilococos <sup>b</sup>			
Alimentos congelados en general			SPC Coliformes	En los países que tienen una cantidad insuficiente de congeladores		

**Tabla 8 (Continuación)**

Tipo de problema	Influencia de las condiciones	Categoría	Producto alimenticio	Pruebas microbiológicas	Tipo de tratamiento a que se someterá el alimento
Peligro directo para la salud pero moderado (difusión limitada)	Peligrosidad reducida	7	Carne o productos cárnicos desecados	Estafilococos <sup>b</sup>	Se someterán a tratamiento térmico tras la reconstitución
			Platos cocinados y congelados	Estafilococos <sup>b</sup>	Se volverán a calentar de una forma eficaz
Peligro directo para la salud pero moderado (difusión potencialmente extensa)	Sin modificación en la peligrosidad	8	Ensaladas de verduras refrigeradas o congeladas	<i>Salmonella</i>	Se consumirán crudas
			Pescado ahumado refrigerado	Estafilococos <sup>b</sup>	Almacenamiento, con frecuencia a temperatura ambiente
			Alimentos desecados, leche en polvo	Estafilococos <sup>b</sup>	Se consumirán inmediatamente después de la reconstitución
			Helados	Estafilococos <sup>b</sup>	Se consumirán congelados
			Queso fabricado con leche pasteurizada	Estafilococos <sup>b</sup>	Almacenamiento habitual
	Peligrosidad aumentada	9	Carne cocida	<i>Salmonella</i>	Se consumirán sin descongelar
				<i>C. perfringens</i>	No se refrigerará inmediatamente
			Alimentos amiláceos cocidos, mayonesa	<i>B. cereus</i>	Su consumo no se efectuará inmediatamente
			Queso	Estafilococos <sup>b</sup>	Se añadirá a otros alimentos
			Leche en polvo, alimentos para emergencias	Estafilococos <sup>b</sup>	El control, tras la reconstitución, será inadecuado
Sin modificación en la peligrosidad	Peligrosidad reducida	10	Carne cruda	<i>Salmonella</i>	Se someterá a cocción
			Verduras frescas	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>	Se someterán a cocción
			Productos derivados del huevo	<i>Salmonella</i>	Se someterán a cocción
	Peligrosidad aumentada	11	Pescado fresco y congelado	<i>V. parahaemolyticus</i>	En los países en que se consumen crudos
			Pescado de agua dulce procedente de zonas cálidas	<i>Salmonella</i>	Se someterán a refrigeración
			Marisco cocido y congelado	<i>V. parahaemolyticus</i>	Se consumirán directamente tras la descongelación
Peligrosidad aumentada	12	Carne cruda	<i>Salmonella</i>	Refrigeración inadecuada y contaminaciones cruzadas	
		Pescado fresco y congelado	<i>V. parahaemolyticus</i>	Se destinarán a la preparación de productos fermentados y se consumirán sin cocción	
Peligro directo y grave para la salud	Peligrosidad reducida	13	Carnes perecederas	<i>C. botulinum</i>	Refrigeración
			Carne de ave; huevos en polvo	<i>Salmonella</i>	Cuando estén destinados a individuos sensibles (por ej., hospitales); se someterán a cocción antes del consumo
			Verduras crudas	<i>V. comma</i> <i>Sh. dysenteriae I</i>	En el caso de que las áreas sean endémicas o epidémicas excepto si se someten a cocción antes del consumo
	Sin modificación en la peligrosidad	14	Marisco	<i>S. typhi</i>	En el caso de que se trate de áreas endémicas o epidémicas o de aguas contaminadas y siempre que su consumo se efectúe sin cocción (en crudo)
			Queso elaborado con leche pasteurizada	Enterotoxina estafilocócica	Cuando su destino sea comunidades sensibles
			Peligrosidad aumentada	15	Pescado ahumado
Semiconservas de carne tal como jamón enlatado	<i>C. botulinum</i> B	Almacenamiento a temperaturas templadas; insuficiente cantidad de sal o nitritos; almacenamiento habitual			
Alimentos poco ácidos enlatados	<i>C. botulinum</i> A y B	Alimentos procedentes de fábricas en las que el control del tratamiento sea inadecuado			

**Tabla I. - Número más probable (N.M.P.) de bacterias coliformes por 100 ml de la muestra, sembrando porciones en no más de tres diluciones**

Número de tubos positivos			Combinación de tubos sembrados 10, 1 y 0,1 ml respectivamente																												
			2												2																
			0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5				
10 ml	1 ml	0.1 ml	0	0	1	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5		
0	1	0	.....	4,9	4,9	4,7	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,5	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,3	4,2	4,2	4,2	4,2	4,1	4,1	4,0	4,0	4,0	4,0		
0	1	1	.....	9,7	.....	9,3	9,2	9,2	9,2	9,2	9,1	.....	8,9	8,8	8,8	8,8	8,8	8,7	.....	8,5	8,5	8,4	8,4	.....	8,1	8,1	8,1	8,1	8,0		
0	2	0	.....	.....	.....	9,5	9,5	9,4	9,4	9,3	9,3	9,1	9,1	9,0	9,0	9,0	9,0	8,9	8,9	8,7	8,7	8,6	8,6	8,5	8,5	8,3	8,3	8,2	8,2		
0	2	1	.....	.....	.....	.....	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	13	13	13	13	13	13	13	12	12	12	12	12		
0	3	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	14	14	14	14	14	14	14	14	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
1	0	0	6,9	6,5	6,4	6,1	6,0	6,0	6,0	5,9	5,9	5,7	5,7	5,6	5,6	5,6	5,5	5,4	5,4	5,3	5,3	5,3	5,2	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1		
1	0	1	.....	.....	13	.....	12	12	12	12	12	.....	12	12	12	12	11	.....	11	11	11	11	11	.....	10	9,9	9,9	9,9			
1	1	0	.....	14	14	13	13	13	13	13	13	12	12	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10		
1	1	1	.....	.....	22	.....	20	20	20	20	19	.....	19	19	19	18	18	18	18	17	17	17	17	.....	16	16	16	16	16		
1	1	2	.....	.....	.....	.....	.....	28	27	27	27	.....	.....	26	26	25	25	25	.....	.....	24	24	24	23	.....	.....	22	22	22		
1	2	0	.....	.....	.....	21	21	21	21	20	20	19	19	19	19	19	19	18	18	18	18	18	17	17	17	17	17	17	17		
1	2	1	.....	.....	.....	.....	29	29	28	28	28	.....	27	26	26	26	26	26	25	25	24	24	24	.....	23	23	23	23	23		
1	3	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	28	28	27	27	26	26	26	25	25	25	24	24	24	24	24	23	23		
1	3	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	36	36	36	35	35	35	33	33	33	32	32	32	31	31	30	30	30		
2	0	0	.....	30	30	24	24	23	23	22	22	20	20	20	20	20	19	18	18	18	17	17	17	16	16	16	16	15	15		
2	0	1	.....	.....	95	.....	52	50	48	46	45	.....	38	38	38	37	36	35	.....	32	31	31	30	30	.....	27	27	27	26		
2	0	2	.....	.....	.....	.....	.....	95	91	87	83	.....	65	65	65	63	61	59	.....	50	49	48	47	.....	42	41	40	40			
2	0	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	140	140	130	.....	.....	.....	.....	95	92	90	.....	.....	72	71	69	.....	.....	58	57	56			
2	1	0	.....	.....	240	69	66	62	57	54	51	45	43	42	42	41	40	39	35	34	34	33	33	32	29	29	28	28			
2	1	1	.....	.....	.....	.....	140	130	120	110	110	.....	81	77	77	74	72	69	.....	57	56	54	53	51	.....	46	45	44	43		
2	1	2	.....	.....	.....	.....	.....	210	190	180	170	.....	.....	120	120	120	110	110	.....	85	83	80	78	.....	.....	66	65	64	62		
2	1	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	280	260	240	.....	.....	.....	.....	160	150	150	.....	.....	110	110	110	110	.....	.....	87	86	84		
2	2	0	.....	.....	.....	300	240	200	180	160	110	100	98	98	98	93	89	85	69	67	65	63	61	59	52	51	50	49	47		
2	2	1	.....	.....	.....	.....	690	450	360	300	170	160	160	160	160	150	140	140	.....	100	97	94	91	.....	77	75	73	71	70		
2	2	2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.100	700	510	.....	.....	230	230	210	200	190	.....	.....	140	140	130	130	.....	.....	100	99	96	94	
2	2	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.400	920	.....	.....	.....	.....	290	270	260	.....	.....	.....	170	170	160	.....	.....	.....	130	130	120	
2	2	4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.600	.....	.....	.....	.....	.....	350	340	.....	.....	.....	.....	210	200	.....	.....	.....	150	150		
2	3	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	340	280	280	240	210	190	140	130	130	120	110	110	90	89	86	84	81	79	
2	3	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	690	690	410	290	220	.....	190	180	170	160	160	120	120	120	110	110		
2	3	2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.100	700	510	.....	.....	250	230	220	210	.....	.....	160	150	150	140	
2	3	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.400	920	.....	.....	.....	300	280	270	.....	.....	.....	190	180	180	
2	3	4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.600	.....	.....	.....	.....	360	340	.....	.....	.....	220	210	210	
2	3	5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	420	.....	.....	.....	.....	.....	250	250	
2	4	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	370	300	270	240	220	160	150	150	140	130	130	
2	4	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	690	470	390	330	.....	210	200	190	190	170	
2	4	2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	260	240	230	220	
2	4	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	310	290	280	
2	4	4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	370	350	350
2	4	5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	430	430
2	5	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	290	260	240
2	5	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	400	350
2	5	2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	480	540
2	5	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	700	920
2	5	4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.400	1.600

**Tabla II. - Número más probable (N.M.P.) de bacterias coliformes por 100 ml de la muestra, sembrando porciones en no más de tres diluciones**

Número de tubos positivos			Combinación de tubos sembrados										10, 1 y 0,1 ml respectivamente										
			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
			0	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5
10 ml	1 ml	0.1 ml	0	0	1	0	1	2	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5			
0	1	0	.....	3,3	3,3	3,2	3,2	3,2	3,1	3,1	3,1	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9
1	0	0	4,1	3,9	3,9	3,8	3,7	3,7	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,5	3,5	3,5	3,4	3,4	3,4	3,4	3,3	3,3	3,3
1	1	0	.....	8,1	8,0	7,7	7,7	7,7	7,4	7,4	7,4	7,3	7,3	7,3	7,2	7,1	7,1	7,1	7,1	7,0	6,9	6,9	6,8
1	2	0	.....	.....	.....	12	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10
1	2	1	.....	.....	.....	.....	16	16	.....	16	15	15	15	15	15	15	15	.....	14	14	14	14	14
1	3	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	16	16	16	16	16	16	15	15	15	15	15	15	15	15	14
1	3	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	20	20	20	20	20	20	19	19	19	19	18	18	18	18
2	0	0	11	10	10	9,8	9,8	9,7	9,3	9,3	9,2	9,1	9,1	9,1	8,9	8,8	8,7	8,7	8,5	8,5	8,4	8,3	8,3
2	0	1	.....	.....	16	.....	15	15	.....	15	14	14	14	14	14	14	13	.....	13	13	13	13	13
2	1	0	.....	17	17	16	16	16	15	15	15	14	14	14	14	14	14	13	13	13	13	13	13
2	1	1	.....	.....	24	.....	22	22	.....	21	21	20	20	20	.....	20	19	19	19	19	18	18	18
2	2	0	.....	.....	.....	23	23	23	21	21	21	21	21	21	20	20	20	20	19	19	19	19	19
2	2	1	.....	.....	.....	.....	30	30	.....	28	28	28	28	27	27	26	26	26	.....	25	25	24	24
2	3	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	29	29	29	29	29	28	28	27	27	27	26	26	25	25	25
2	3	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	37	36	36	36	36	36	34	34	33	33	32	32	31	31
2	4	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	35	35	35	35	34	34	33	32
2	4	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	43	43	42	42	42	40	39
2	5	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	42	41	41	40
2	5	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	49	48	
2	5	2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	57	56
3	0	0	.....	34	33	28	27	27	24	24	23	23	23	23	23	21	21	21	21	20	19	19	19
3	0	1	.....	.....	95	.....	53	51	.....	40	39	39	39	38	37	.....	34	33	33	32	32	29	29
3	0	2	.....	.....	.....	.....	.....	95	.....	.....	65	64	64	62	60	.....	.....	51	50	49	48	43	42
3	0	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	95	95	92	90	.....	.....	73	71	69	.....	59	58
3	1	0	.....	.....	.....	71	66	63	46	45	44	43	43	42	41	37	36	36	35	35	34	32	31
3	1	1	.....	.....	.....	.....	140	130	.....	81	78	75	75	72	70	.....	59	57	56	54	53	47	46
3	1	2	.....	.....	.....	.....	.....	210	.....	120	120	120	120	110	110	.....	85	83	81	78	78	67	65
3	2	0	.....	.....	.....	.....	300	240	110	100	98	93	93	89	85	69	67	65	63	61	59	51	49
3	2	1	.....	.....	.....	.....	.....	700	.....	170	160	150	150	140	130	100	100	97	94	91	77	75	
3	2	2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	230	210	210	200	190	.....	.....	140	140	130	130	100	99
3	2	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	290	290	270	260	.....	.....	170	170	160	.....	.....	130
3	2	4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	350	330	.....	.....	210	210	210	.....	.....	150
3	2	5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	420	.....	.....	.....	240	240	.....	.....	180
3	3	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	340	280	240	240	210	190	140	130	130	120	110	110	92	89
3	3	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	690	460	460	370	320	.....	190	180	170	160	160	120	120
3	3	2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.100	1.100	700	530	.....	.....	250	230	220	210	.....	160
3	3	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.400	920	.....	.....	300	280	270	.....	.....	150
3	3	4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.600	.....	.....	.....	360	340	.....	.....	220
3	3	5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	420	420	.....	.....	250
3	4	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	370	300	270	240	220	160	150
3	4	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	710	470	390	330	.....	210
3	4	2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.100	700	540	.....	200
3	4	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.400	920	.....	310
3	4	4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.600	.....	370
3	4	5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	430
3	5	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	390	330
3	5	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	290
3	5	2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	260
3	5	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	480
3	5	3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	700
3	5	4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.400
3	5	4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	920
3	5	4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1.600

Ferramola, "Examen bacteriológico de aguas", 1947

MPN index and 95% confidence limits for various combinations of positive results when various numbers of tubes are used. (Inocula of 0.1, 0.01, and 0.001g)

Combination of positives	3 Tubes per dilution			5 Tubes per dilution		
	MPN index per g	95% Confidence limits		MPN index per g	95% Confidence limits	
		Lower	Upper		Lower	Upper
0-0-0	<3	<0.5	<9	<2	<0.5	<7
0-0-1	3	<0.5	9	2	<0.5	7
0-1-0	3	<0.5	13	2	<0.5	7
0-2-0	-	-	-	4	<0.5	11
1-0-0	4	<0.5	20	2	<0.5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0.5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0.5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0.5	15
1-2-0	11	3	36	6	<0.5	15
2-0-0	9	1	36	5	<0.5	13
2-0-1	14	3	37	7	1	17
2-1-0	15	3	44	7	1	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150	-	-	-
2-3-0	-	-	-	12	3	28
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	39	7	130	11	2	25
3-0-2	64	15	380	-	-	-
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380	-	-	-
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470	-	-	-
3-3-0	240	36	1,300	-	-	-
3-3-1	460	71	2,400	-	-	-
3-3-2	1,100	150	4,800	-	-	-
3-3-3	>1,100	>150	>4,800	-	-	-

FAO, "Manual of Food Control Quality. Microbiological Analysis", 1992.

## MÉTODOS DE TINCIÓN

### TINCIÓN DE GRAM-NICOLE

**-Primer colorante: Violeta de Genciana**

**Solución A:**

Violeta de Genciana 1,0 g  
Alcohol etílico 10,0 mL

**Solución B:**

Fenol 1,0 g  
Agua destilada 100,0 mL

Se mezclan las soluciones A y B

**-Mordiente: Solución de Lugol**

Yodo 1,0 g  
Yoduro de Potasio 2,0 g  
Agua destilada 300,0 mL

Se disuelve primero el yoduro en poca agua, se agrega luego el yodo y una vez disuelto se agrega el resto del agua.

**-Segundo colorante (de contraste): Fucsina Básica**

Fucsina Básica 0,1 g  
Agua destilada 100,0 mL

**Método:**

1. Extender y fijar el material sobre un portaobjetos limpio, desengrasado y seco.
2. Cubrir el preparado durante un minuto con el primer colorante, volcar el colorante y lavar con agua corriente.
3. Cubrir el preparado con el mordiente, dejarlo actuar por un minuto y volcar el exceso.
4. Decolorar con alcohol durante 10 segundos y lavar con agua.
5. Colorear durante 30 segundos con el segundo colorante, lavar con agua y secar.
6. Examinar al microscopio usando objetivo de inmersión.

## **TINCIÓN NEGATIVA**

Es un método muy sencillo y eficaz para poner de manifiesto la forma externa de las bacterias en una extensión. Las bacterias quedan rodeadas de una fina capa de colorante negro y aparecen como objetos blancos sobre fondo gris.

### **Método:**

1. Se prepara una extensión muy fina de la forma habitual utilizando un portaobjetos limpio, desengrasado y seco.
2. Se coloca en un extremo del portaobjetos una gota de solución de nigrosina al 10%.
3. Se toma otro portaobjetos y se apoya sobre el primero formando un ángulo de 30° y tocando la gota de nigrosina. Luego se pasa resbalando, arrastrando la gota de nigrosina, de forma que se extienda por toda la superficie del portaobjetos. De esta manera, la extensión queda cubierta de una fina película de colorante.
4. Se deja secar el colorante y se examina la preparación con objetivo de inmersión.

## **DEMOSTRACIÓN DE CÁPSULAS BACTERIANAS**

### **Método de la Nigrosina**

La técnica de tinción negativa puede usarse en conjunción con una técnica de tinción simple con el fin de poner de manifiesto la presencia de cápsulas. En este caso, la extensión debe cubrirse con fucsina fenicada diluida, lavarse y secarse, antes de hacer el tratamiento con nigrosina.

### **Método con Tinta China**

1. Se coloca un ansa de tinta china sobre un portaobjetos muy limpio.
  2. Se mezcla con la tinta china una pequeña porción del cultivo bacteriano o de la suspensión.
  3. Se coloca un cubreobjetos sobre la mezcla, cuidando que no se formen burbujas de aire, y se presiona firmemente con un papel de filtro hasta que la película de líquido sea muy fina.
  4. Se examina con objetivo seco de gran aumento o con objetivo de inmersión.
- La cápsula se verá como una zona clara en torno a la bacteria.

*Nota:* Siempre debe prepararse y examinarse una película de tinta china como testigo.

## **TINCIÓN DE ESPORAS BACTERIANAS**

### **Técnica de Wirtz, modificada por Shaeffer y Fulton**

- Solución acuosa de Verde de Malaquita al 5%.
- Solución acuosa de Safranina al 0,5%.

#### **Método:**

1. Extender y fijar el material sobre un portaobjetos limpio, desengrasado y seco.
2. Verter la solución de Verde de Malaquita sobre la preparación, calentar hasta emisión de vapores durante 5 minutos (no hervir). Lavar con agua.
3. Colorear por 30 segundos con la solución de Safranina. Lavar con agua y secar.
4. Observar al microscopio con objetivo de inmersión. Las esporas aparecen coloreadas en verde y los cuerpos de las bacterias en rojo.

## **TINCIÓN DE BACTERIAS EN LECHE**

#### **Reactivos:**

- Solución colorante: se prepara una solución al 2% de azul de metileno en alcohol absoluto a 96°. Se toman 30 ml de esta solución madre y se diluyen con 100 ml de agua destilada.
- Desengrasante: xileno.
- Fijador: alcohol absoluto.

#### **Método:**

A partir de los extendidos bacterianos de Breed-Newman se procede a la tinción de la siguiente forma:

1. Luego de la fijación a 45°C se desengrasa el portaobjetos sumergiéndolo durante 5 minutos en xileno. Secar al aire.
2. Para fijar, se coloca el portaobjetos en alcohol absoluto durante 2-3 minutos.
3. Sin dejar secar el alcohol, se introduce el portaobjetos en la solución colorante y se deja allí durante 30 segundos. Luego se lava sucesivas veces con agua, contenida en un vaso de precipitados, hasta que la misma permanezca límpida.

## **OBSERVACIÓN DE MOVILIDAD DE BACTERIAS**

Se observa en preparados frescos sin colorear.

#### **Observación en gota pendiente:**

A partir de un cultivo reciente (de 18 a 24 horas) se toma un ansa de material que se coloca sobre un cubreobjetos; se invierte este sobre la excavación de un portaobjetos excavado y se lo adhiere con vaselina. Se observa de inmediato en seco con objetivo de gran aumento.

## **SOLUCIONES Y REACTIVOS**

### **SOLUCIÓN DE CLORURO DE TRIFENILTETRAZOLIO (TTC) AL 1%**

Esterilizar 3 ml de agua destilada. Una vez fría, agregarle 30 mg de TTC. Disolver y guardar en heladera.

### **SOLUCIÓN DE TETRACICLINA (400 ppm)**

Pesar 40 mg de tetraciclina y llevar a 100 ml con agua estéril en un matraz aforado. Disolver y guardar en heladera.

Usar al 10 %. Concentración final: 40 ppm.

### **SOLUCIÓN DE TELURITO DE POTASIO (3,5 %)**

Se disuelven 350 mg de telurito de potasio en 10 mL de agua estéril. Guardar en heladera.

### **REACTIVO DE KOVACS**

Se disuelven, en baño maría, 5 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 75 mL de alcohol amílico. Luego añadir lentamente y bajo campana 25 mL de HCl concentrado. Guardar en frasco oscuro y en heladera.

### **REACTIVO DE VOGES-PROSKAUER**

#### **a) Solución de $\alpha$ -naftol al 5 %**

Se disuelven 5 g de  $\alpha$ -naftol en 100 mL de alcohol etílico.

#### **b) Solución de KOH al 40 %**

Se disuelven 40 g de KOH en 100 mL de agua destilada.

Ambos reactivos deben guardarse en frasco oscuro y en la heladera.

### **REACTIVO PARA LA PRUEBA DE REDUCCIÓN DE NITRATO**

#### **Solución A:**

Se disuelven 8 g de ácido sulfanílico en 1000 ml de ácido acético 5 N.

#### **Solución B:**

Se disuelven 5 g de  $\alpha$ -naftol en 1000 mL de ácido acético 5 N.

Se agregan 0,5 mL de la **solución A** y 4 gotas de la **solución B** por 9 mL de medio sembrado e incubado.

## **REACTIVO PARA DETERMINAR DIACETILO EN JUGO DE FRUTA**

### **a) Solución de $\alpha$ -naftol 5 %**

Disolver 5 g de  $\alpha$ -naftol en 100 mL de isopropanol de 99 % de pureza.

### **b) Solución de KOH 40 % con creatinina**

Disolver 40 g de KOH en 100 mL de agua destilada. Agregar 0,3 g de creatinina en el momento de usar, y agitar hasta disolución.

Guardar ambos reactivos en la heladera.

## **REACTIVO PARA OXIDASA**

Reactivo de Carpenter, Suhrland y Morrison:

Oxalato de p-aminodimetilanilina	1,0 g
H <sup>2</sup> O destilada	100,0 mL

Disolver 1 g del reactivo en menos de 100 mL de agua destilada. Calentar suavemente hasta su disolución. Pasar a un frasco volumétrico y agregar agua destilada c.s.p. 100 mL.

Dejar descansar 15 minutos antes de su empleo. Si se guarda en frasco de vidrio de color caramelo, tapado, la solución acuosa se mantiene estable por lo menos 6 meses.

## **VASPAR**

Mezclar en partes iguales **vaselina** y **parafina**.

## **MEDIOS DE CULTIVO**

### **Instrucciones generales para su preparación**

1. Agregar los ingredientes pesados en la cantidad de agua destilada que se indique.
2. Ayudar a la disolución de los ingredientes, dejando que se hidraten por 15 minutos.
3. Disolver los ingredientes completamente por ebullición con frecuente agitación.
4. Enfriar el medio de cultivo a temperatura ambiente si es un caldo, o a 50°C si es un agar; si es necesario, reponer el agua que se hubiera evaporado.
5. Clarificar la solución por sedimentación o por filtración, si es necesario.
6. Ajustar el pH del medio, de forma de obtener el pH deseado, después de autoclavar. En los medios no amortiguados, el descenso de pH es generalmente 0,1-0,2 unidades por autoclavado. Efectuar el ajuste de pH empleando soluciones de NaOH 1N y HCl 1N para la mayor parte de los medios.
7. Distribuir el medio de cultivo en el recipiente a autoclavar, sean tubos, botellas o erlenmeyers.
8. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estas condiciones pueden variar para algunos medios de cultivo. Cuando así suceda, se aclarará inmediatamente debajo de la composición.

### **ACETAMIDA AGAR**

Acetamida	2,0 g
Sulfato magnésico	0,158 g
Cloruro sódico	0,2 g
Sulfato ferroso	0,0005 g
Fosfato dipotásico	0,2 g
Molibdato sódico	0,005 g
Rojo fenol	0,012 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L

Disolver los ingredientes en el agua destilada a temperatura ambiente. Comprobar el pH y en caso de ser necesario ajustarlo. Esterilizar en autoclave.

Este medio contiene además de algunas sales inorgánicas, acetamida como única fuente de carbono y nitrógeno. En él solo pueden crecer microorganismos que puedan aprovechar la acetamida. Muchos de ellos, lo hacen formando amoníaco, lo que puede utilizarse como característica taxonómica, por ejemplo, para la diferenciación de las especies de *Pseudomonas*.

### **ALMIDON AGAR**

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Almidón soluble	2,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L

Disolver los ingredientes en el agua destilada, llevar a ebullición agitando regularmente, calentar 3-4 minutos hasta disolución. Enfriar a 50-60°C. Esterilizar en autoclave.

Este medio se utiliza para identificar microorganismos que degradan el almidón. La hidrólisis del almidón se evidencia cubriendo la placa con una solución de Lugol (I<sup>2</sup>-KI). Se forma un complejo color azul con el almidón, ausente en las zonas donde hubo hidrólisis. Si las colonias son almidón positivas, aparece un halo transparente alrededor de las mismas.

### **ALOA (AGAR LISTERIA SEGÚN OTTAVIANI Y AGOSTI)**

Digesto enzimático de tejidos animales	18 g
Digesto enzimático de caseína	6 g
Piruvato de sodio	2 g
Glucosa	2 g
Magnesio glicerofosfato	1 g
MgSO <sub>4</sub> anhidro	0,5 g
NaCl	5 g

Extracto de levadura	10 g
LiCl	10 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	2,5 g
Cromógeno X-glucósido	0,05 g
Agar	12 g
Agua destilada	1,0 L
pH= 7,2 ± 0,2 (25°C)	

Mezclar y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar a alrededor de 50°C y agregar un vial del Suplemento Cromogénico Selectivo para *Listeria* (ácido nalidíxico, polimixina B, ceftazidime, anfotericina) y un vial de Suplemento Diferencial ALOA (solución de L- $\alpha$ -fosfatidilinositol). Mezclar bien y distribuir en placas de Petri.

El cromógeno X-glucósido es clivado por la enzima  $\beta$ -glucosidasa, que es común en *Listeria* spp., observándose color azul-verdoso. Otros microorganismos que poseen esta enzima, como los enterococos, se ven inhibidos por los agentes selectivos. *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son capaces de producir enzimas fosfolipasas, que hidrolizan el fosfatidilinositol, produciendo un halo blanco opaco alrededor de la colonia.

### **AZUL DE TOLUIDINA DNA AGAR**

Buffer TRIS 0,005M	1,0 l
DNA	0,8 g
Agar-agar	.....10,0 g
Solución de CaCl <sub>2</sub> 0,01M	1,0 mL
NaCl	10,0 g
Solución de azul de toluidina 0,1M	30,0 mL

Disolver completamente el DNA y el agar en el buffer a ebullición. Agregar la solución de azul de toluidina. Dividir la mezcla en volúmenes más pequeños y conservar a temperatura ambiente. La mezcla es muy estable, se conserva durante cuatro meses a temperatura ambiente.

Este medio se utiliza para evidenciar DNAsa microbiana. Sirve para la identificación de microorganismos DNAsa positivos, sobre todo de estafilococos coagulasa positivos.

El ácido desoxirribonucleico forma un complejo color azul con el azul de toluidina, ausente en las zonas donde hubo hidrólisis. Las colonias DNAsa positivas hidrolizan a su alrededor al ácido desoxirribonucleico contenido en el medio de cultivo. Dichas colonias aparecen rodeadas por halos rosados luminosos en contraste con el resto del medio de cultivo, que permanece azul. Los microorganismos DNAsa negativos no forman halo. Se incuba 18 a 24 horas a 37°C.

### **BAIRD PARKER AGAR**

Triptona	10,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Extracto de levadura	1,0 g

Piruvato de sodio	10,0 g
Glicina	5,0 g
LiCl	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L

Esterilizar en autoclave. Enfriar a 50°C y agregar 50 mL de suspensión de yema de huevo y 3 mL de telurito de potasio al 3,5 %.

pH = 7,0±0,2

El medio completo debe usarse dentro de las 48 h de preparado. Largos períodos de almacenamiento reducen su selectividad. Este efecto puede ser revertido por el agregado al medio preparado de una solución de piruvato de sodio al 20 %, para obtener una concentración final del 1 %. El medio base libre de piruvato es estable durante un mes. En el momento de ser usada, se cubre la placa con 0,5 mL de solución de piruvato de sodio al 20 % y se seca a 50°C.

### **Emulsión yema de huevo**

Sumergir el huevo en solución alcohólica al 70 % durante 4 horas. Romperlo asépticamente y separar la yema en una probeta estéril. Se agrega a la misma un volumen igual de NaCl 0,85 %. Este medio se emplea para el aislamiento e identificación de estafilococos coagulasa positivos. El medio contiene telurito de potasio y cloruro de litio como inhibidores de la flora acompañante. El piruvato de sodio y la glicina favorecen el crecimiento de los estafilococos. El medio de cultivo es opaco debido a su contenido en yema de huevo. Las colonias de estafilococos coagulasa positivos muestran las siguientes características diagnósticas: están rodeadas por una zona opaca de precipitación formada por sales de calcio y magnesio de los ácidos grasos liberados por lipólisis. Está seguida de un halo claro debido a la actividad proteolítica. Ambas características constituyen la reacción “**yema de huevo**”. Las colonias presentan generalmente centro negro debido a la reducción de telurito a telurio. La reacción “**yema de huevo**” y la reducción de telurito se correlacionan bien con la presencia de coagulasa y, por lo tanto, pueden utilizarse como índices de la misma.

### **BASE SANGRE AGAR**

Infusión de corazón	500,0 g
Triptosa	10,0 g
NaCl	15,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 6,8	

Esterilizar en autoclave, dejar enfriar a 45°C, incorporar 6 % de sangre desfibrinada y verter en placas.

Este medio se utiliza para el cultivo y aislamiento de microorganismos, sobre todo patógenos, y para la determinación de sus formas hemolíticas. Su abundante base nutritiva ofrece condiciones óptimas de crecimiento de todos los microorganismos presentes. El valor de pH es especialmente favorable para la formación de halos de hemólisis.

Incubación: 24 a 48 h a 37°C.

### **BILIS ROJO NEUTRO CRISTAL VIOLETA (ABRV) AGAR**

Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	7,0 g
Sales biliares	1,5 g
Lactosa	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal Violeta	0,002 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,4	

Este medio se utiliza para el aislamiento y enumeración del grupo coliformes, inclusive *E. coli*, a partir de alimentos, agua y otros. El cristal violeta junto con las sales biliares inhiben el crecimiento de la flora acompañante Gram positiva. La degradación de lactosa a ácido se pone de manifiesto por el viraje al rojo del indicador de pH rojo neutro, y por un halo de precipitación de sales biliares alrededor de las colonias. Las colonias de coliformes en este medio son rojas oscuras, no menores de 0,5 mm de diámetro, con un halo de precipitación rojizo. Aparecen entre las 24±2 horas de incubación a 32°C. Para la expresión de resultados es conveniente contar las placas conteniendo entre 15 y 150 colonias. En placas con excesivo crecimiento, las colonias de coliformes pueden presentar características atípicas o medir menos de 0,5 mm de diámetro. Además, en estas placas, algunas colonias de levaduras y bacterias no coliformes son comparables en color y tamaño a las de los coliformes. En tales casos, es necesario realizar una prueba confirmatoria. Esta consiste en sembrar la colonia en un tubo de fermentación que contiene caldo Verde Brillante 2 % sales biliares. La formación de gas entre las 48±2 horas de incubación a 32°C confirma la presencia de coliformes.

### **BILIS ROJO NEUTRO CRISTAL VIOLETA GLUCOSA AGAR según Mossel**

Peptona de carne	7,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
NaCl	5,0 g
Glucosa	10,0 g
Sales biliares	1,5 g
Rojo neutro	30,0 mg
Cristal Violeta	2,0 mg
Agar-agar	13,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH 7,3±0,2	

Este medio se utiliza para la enumeración de gérmenes totales tipo enterobacteriáceas en alimentos. El Cristal Violeta y las sales biliares inhiben considerablemente la flora acompañante. La

degradación de la glucosa con formación de ácido se pone de manifiesto por el viraje del indicador de pH al rojo y eventual precipitación de ácidos biliares alrededor de las colonias correspondientes. Todas las enterobacteriáceas degradan glucosa, por lo tanto son fácilmente reconocibles en este medio. Sin embargo algunos gérmenes que crecen al mismo tiempo, como *Aeromonas*, pueden dar la misma reacción. Las colonias sospechosas de ser enterobacteriáceas deben ser reinvestigadas para su confirmación.

La incubación es de 18 a 24 h a 37°C.

### **BISMUTO SULFITO AGAR (WILSON Y BLAIR)**

Peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Dextrosa	5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anh.)	4 g
FeSO <sub>4</sub> (anh.)	0,3 g
Bismuto sulfito	8 g
Verde Brillante	0,025 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

Este medio se utiliza para el aislamiento y diferenciación de *Salmonella typhi* y otras especies de *Salmonella*. El verde brillante y el bismuto sulfito inhiben a los gérmenes acompañantes. Las colonias de *Salmonella* spp. sulfhídrico positivas presentan ennegrecimiento debido al sulfuro de hierro. La reducción de los iones bismuto a bismuto metálico produce brillo metálico alrededor de las correspondientes colonias, que suele aparecer a las 48 h de incubación. Las colonias típicas de *Salmonella* spp. (excepción de *Salmonella paratyphi* A y *S. pollarum*) son con centro negro, borde claro, precipitado negro con brillo metálico alrededor de las colonias (“ojo de conejo” u “ojo de pez”).

### **BUENOS AIRES MEDIO (BAM)**

#### **(A)**

Peptona	2,0 g
Agar-agar	0,3 g
Agua destilada	93,2 g

#### **(B)**

Solución acuosa de urea 50 %	2,0 mL
Indicador de Andrade	1,5 mL
Solución de Azul de Timol	0,3 mL
Solución acuosa de urea 10 %	3,0 mL

Se calienta (A) hasta disolución, se enfría a 20°C y se ajusta el pH a 6,8. Esterilizar en autoclave. Al volumen (A) fundido a 70°C, agregar (B) y pasarlo a tubos estériles. Se lleva a baño de agua hirviente durante diez minutos y se lo enfría rápidamente.

### **Indicador de Andrade**

Fucsina ácida .....	0,25 mL
NaOH 0,1N	16,0 mL
Agua destilada	100,0 mL

### **Indicador Azul de Timol**

Azul de timol	1,6 mL
NaOH 0,1N	34,4 mL
Agua destilada	100,0 mL

Este medio se utiliza para diferenciar entre otras bacterias, *E. coli*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* y *Citrobacter*.

El medio de cultivo se coloca en tubos pequeños de 3 a 4 mL por tubo. Es semisólido y de color pajizo.

La siembra se realiza por punción con ansa recta, a partir de cultivos puros.

Este medio permite revelar:

a) La hidrólisis de urea con producción de álcali, que se evidencia por el viraje al azul del indicador básico Azul de Timol.

b) La fermentación de lactosa con formación de ácido, con o sin formación de gas. El ácido producido se evidencia por el viraje al rojo del indicador ácido de Andrade.

c) La producción de indol a partir de triptofano. Se evidencia a través de la reacción de Kovacs. El procedimiento consiste en introducir una tirilla de papel de filtro estéril en el interior del tubo ya sembrado, sujetándola con el tapón de algodón.

Luego de la incubación, se retira el papel y se agrega una gota del reactivo de Kovacs; un color rojizo indica un cultivo positivo, un color amarillo, negativo.

d) La producción de sulfhídrico a partir de peptonas.

Se evidencia por la formación de PbS negro en una tirilla de papel de filtro embebida en acetato de plomo.

Luego de la incubación, un ennegrecimiento indica un cultivo productor de sulfhídrico.

e) Apreciación directa de la movilidad.

Se evidencia por un crecimiento difuso a partir de la zona de siembra.

Los resultados son observados a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

### **Identificación bacteriana en Medio Buenos Aires**

	<b>Microorganismo</b>	<b>movilidad</b>	<b>indol</b>	<b>H<sup>2</sup>S</b>	<b>gas</b>
Sin cambio de color del medio de cultivo	<i>Salmonella</i>	+ (-)	-	+ (-)	-
	<i>Shigella</i>	-	- (+)	-	-
Cambio de color del medio de cultivo al azul	<i>Proteus rettgeri</i>	+	+	-	-
	<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+	-
	<i>Proteus morganii</i>	+	+	+	-
Cambio de color del medio de cultivo al rojo	<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	-
	<i>Enterobacter</i>	+	-	-	+
	<i>Escherichia</i>	+ (-)	+	-	+
Cambio de color al azul verdoso	<i>Klebsiella (x)</i>	-	-	-	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-

(x) Después de 24 horas, puede virar al azul a 36°C.

( ) No frecuente.

### **CASEINA AGAR**

Peptona de carne	5,0 g
Extracto de carne	3,0 g
NaCl	5,0 g
Caseína	2,5 g
CaCl <sub>2</sub>	0,05 g
Agar-agar	13,5 g
Agua destilada	1,0 L

Suspender los ingredientes, calentar a baño maría hasta disolución y mantener 10 minutos. Esterilizar en autoclave, fraccionar en placas.

pH = 7,2

Se pueden agregar 5-10 g de leche descremada para reforzar turbidez.

Este medio se utiliza para la investigación de microorganismos proteolíticos. Estos son capaces de degradar la caseína, y aparecen con un halo transparente alrededor de las colonias. Si el halo no es muy visible, agregar ácido acético 1N, que refuerza la opacidad del medio por desnaturalización de la caseína, y se destaca el halo de degradación.

### **CASOY CALDO**

Peptona de caseína	17,0 g
Peptona de harina de soja	3,0 g
D(+) glucosa	2,5 g
NaCl	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Agua destilada	1,0 L
pH 7,3 ± 0,1	

Este es un medio de cultivo universal, exento de sustancias inhibidoras, concebido para un amplio espectro de aplicaciones. Por su rica y abundante base nutritiva, este medio se utiliza para el cultivo de microorganismos exigentes.

### **CARNE COCIDA MEDIO COMERCIAL**

Peptona	10,0 g
Extracto de carne	10,0 g
Proteína de soja tiernizada	30,0 g
NaCl	5,0 g
Agua destilada	1,0 L

### **CARNE COCIDA MEDIO**

Corazón bovino	500,0 g
Proteosa peptona	20,0 g
NaCl	5,0 g
Glucosa	2,0 g
Agua destilada	1,0 L

Picar la carne, agregar el agua y hervir durante 45 minutos. Incorporar los otros ingredientes y hervir 10 minutos más. Filtrar por gasa y llevar a volumen inicial. Dejar en la heladera 24 horas y separar la grasa solidificada.

Filtrar por papel de filtro, fraccionar en tubos con tapa de rosca (2/3 de carne y 1/3 de caldo). Esterilizar en autoclave.

Este medio se utiliza para el aislamiento de microorganismos, especialmente anaerobios, a partir de alimentos. Es un medio rico en nutrientes. Se puede observar ennegrecimiento del medio.

### **CEREBRO CORAZON AGAR**

Infusión de cerebro	12,5 g
Infusión de corazón	5,0 g
Proteosa peptona	10,0 g
D-(+)-Glucosa	2,0 g
NaCl	5,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L

Este medio de cultivo es adecuado para el crecimiento de bacterias exigentes, como estreptococos. También puede utilizarse para el cultivo de hongos patógenos por adición de antibióticos.

### **CEREBRO CORAZON CALDO**

Idem anterior, excepto el Agar-agar.

El caldo es especialmente adecuado para el cultivo de estafilococos destinados al ensayo de coagulasa y para la realización de hemocultivos.

### **CETRIMIDA AGAR**

Peptona de caseína	20,0 g
MgCl <sub>2</sub>	1,4 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,0 g
Bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio	0,3 g
Agar-agar	13,6 g
Glicerol	10,0 L
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,2	

Este medio se utiliza para aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa*, a partir de diversos materiales. La cetrimida es un potente inhibidor de la flora acompañante. Las colonias de *P. aeruginosa* forman en este medio un pigmento verde azulado (piocianina), y son fluorescentes a la luz U.V.

### **CITRATO DE KOSER CALDO**

Fosfato de sodio y amonio	1,5 g
K <sup>2</sup> HPO <sup>4</sup>	1,0 g
MgSO <sup>4</sup>	0,2 g
Citrato de sodio	3,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 6,7	

### **CITRATO DE SIMMONS AGAR**

NH <sup>4</sup> H <sup>2</sup> PO <sup>4</sup>	1,0 g
K <sup>2</sup> HPO <sup>4</sup>	1,0 g
NaCl	5,0 g
Citrato de sodio	2,0 g
MgSO <sup>4</sup>	0,2 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar-agar	12,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 6,6	

Este medio se utiliza para la identificación de microorganismos, especialmente enterobacteriáceas, y ciertos hongos, basado en el empleo de citrato como única fuente de carbono. El empleo de citrato por ciertos microorganismos da lugar a una alcalinización del medio de cultivo, lo que se manifiesta por un viraje al azul oscuro del indicador de pH Azul del bromotimol. Se incuba 24-48 h a 37°C.

### **CLARK Y LUBS (RMVP) MEDIO**

Polipeptona	7,0 g
Glucosa	5,0 g
K <sup>2</sup> HPO <sup>4</sup>	5,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 6,9	

Distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave.

### **CRISTAL VIOLETA TETRAZOLIUM AGAR**

Agregar al agar para recuento en placa.

Cristal Violeta 0,1%	1 mL/L
Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC) 1%	5 ml/L

Disolver el agar para recuento en placa, agregar el Cristal Violeta y esterilizar en autoclave. Agregar el TTC estéril en forma aséptica al agar fundido y enfriado a 45°C.

### **Solución de Cristal Violeta**

Cristal Violeta	0,1 g
Etanol	100,0 mL

Este medio se utiliza para un ensayo orientativo rápido de bacterias psicrotróficas. Por lo general las bacterias psicrotróficas son Gram (-), por esa razón se agrega al medio de cultivo el colorante que inhibe el crecimiento de la flora Gram (+). Se cuentan como bacterias psicrotróficas aquellas que reducen el TTC a formazano, lo que se manifiesta por la formación de colonias rojas. Incubación 48 h a 32°C.

### **DESOXICOLATO CITRATO AGAR según Leifson**

Extracto de carne	5,0 g
Peptona de carne	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5,4 g

Citrato de Amonio y de Hierro (III)	1,0 g
Citrato de Sodio	6,0 g
Desoxicolato de Sodio	3,0 g
Rojo Neutro	20,0 mg
Agar-agar	12,0 g
Agua destilada	1,0 L

Este medio se utiliza para el aislamiento de Salmonellas y Shigellas. Las altas concentraciones de desoxicolato inhiben la flora Gram (+) y los coliformes resultan inhibidos más o menos intensamente. Las Salmonellas crecen sin obstáculos, algunas Shigellas son algo inhibidas. La degradación de lactosa con formación de ácido se evidencia por el viraje del indicador de pH rojo neutro al rojo. La reducción de tiosulfato a sulfuro se observa por la formación de sulfuro ferroso negro.

Los microorganismos lactosa positivo forman colonias rojo-rosadas que debido a la acidificación aparecen rodeadas por un halo turbio de precipitación de desoxicolato. Las colonias de microorganismos lactosa negativo son incoloras.

La incubación es de 18 a 24 h a 37°C.

### **DICLORÁN GLICEROL 18 % (DG18) AGAR**

Glucosa	10,0 g
Peptona	5,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Glicerol	220,0 g
Agar	15,0 g
Dicloran (0,2% w/v en etanol, 1 mL)	2,0 mg
Cloranfenicol	100,0 mg
Agua destilada	1,0 L
pH = 5,5-5,8	

Agregar los componentes minoritarios y el agar hasta c.a. 800 mL de agua destilada. Calentar a baño maría hasta disolución del agar y completar hasta 1,0 L de agua destilada. Agregar el glicerol (notar que la concentración final es 18% w/w, no w/v). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. La actividad acuosa final del medio es 0,955. Este medio se utiliza especialmente para el aislamiento de hongos xerófilos.

### **DICLORAN ROSA DE BENGALA CLORANFENICOL (DRBC) AGAR**

Glucosa	10,0 g
Peptona bacteriológica	5,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Agar	15,0 g
Rosa de Bengala (5% w/v en agua, 0,5 mL)	25,0 mg

Dicloran (0,2% w/v en etanol, 1 mL)	2,0 mg
Cloranfenicol	100,0 mg
Agua destilada	1,0 L
pH = 5,5-5,8	

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Almacenar en oscuridad, ya que los productos de fotodescomposición del Rosa de Bengala son altamente inhibitorios para algunos hongos. En oscuridad el medio es estable por al menos 1 mes a 1-4°C. Las soluciones stock de Rosa de Bengala y Dicloran no requieren esterilización y son estables por períodos prolongados. El cloranfenicol es un antibiótico muy efectivo que no se afecta por la esterilización en autoclave.

Este medio se utiliza para el aislamiento y enumeración de mohos y levaduras en alimentos.

### **DUNCAN STRONG CALDO**

Extracto de levadura	4,0 g
Proteosa peptona	15,0 g
Almidón soluble	4,0 g
Tioglicolato de sodio	1,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,0	

Fraccionar en tubos con tapa de rosca, dejando poco espacio libre. Esterilizar en autoclave.

Este caldo se utiliza para inducir la esporulación de *Clostridium perfringens*. La esporulación se produce debido a la ausencia de azúcares fermentables, ya que el medio sólo contiene almidón (poco fermentable). El tioglicolato genera el ambiente reductor necesario para el crecimiento de microorganismos anaerobios.

Si el medio ha sido preparado en el momento, utilizar inmediatamente; si no, eliminar el O<sub>2</sub> disuelto por ebullición en baño de agua hirviente durante 15 minutos. Enfriar rápidamente. Sembrar 0,1 - 0,2 mL del cultivo o dilución en el fondo del tubo con pipeta sin burbujear.

### **ENDO AGAR**

Peptona	10,0 g
Hidrogenofosfato dipotásico	2,5 g
Sulfito sódico (anh.)	3,3 g
Pararosanilina (Fucsina)	0,3 g
Agar	12,5 g
Agua destilada	1 L
pH = 7,4	

Este es un medio selectivo que se utiliza para el aislamiento de *E. coli* fecal y coliformes en diversos materiales. El sulfito sódico y la fucsina inhiben las bacterias Gram positivas. *E. coli* y coliformes consumen lactosa formando aldehído y ácido. Por otra parte, el aldehído libera fucsina

a partir de la combinación fucsina-sulfito, lo cual da lugar a la coloración roja de las colonias. En el caso de *E. coli*, esta reacción es tan intensa que la fucsina llega a cristalizar dando a las colonias un brillo metálico estable, de reflejo verde típico.

### **EOSINA AZUL DE METILENO (EMB) AGAR según Levine**

Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
Eosina	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,1	

Este medio se utiliza para aislamiento y diferenciación de enterobacterias y *Escherichia coli*. Los colorantes contenidos en su fórmula inhiben a muchos gérmenes Gram positivos de acompañamiento.

Incubación: 24-48 h a 37°C.

Se consideran colonias típicas de coliformes las de aspecto oscuro/rojo/rosado y/o mucoso, con o sin brillo metálico

### **ESCHERICHIA COLI CALDO**

Peptona de caseína	20,0 g
Sales biliares	1,5 g
Lactosa	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
NaCl	5,0 g
Agua destilada	1,0 L

Distribuir en tubos provistos de sendas campanitas de Durham. Esterilizar en autoclave.

Este medio se utiliza para la demostración selectiva de coliformes y *Escherichia coli* en aguas, alimentos y otros materiales. La lactosa favorece el crecimiento de bacterias lactosa positivas, especialmente coliformes y *E. coli*. Las sales biliares inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas. Los gérmenes lactosa positivos consumen lactosa con producción de gas.

Incubación: 48 horas a 37°C y/o 45,5°C.

### **ESCULINA HIERRO AGAR**

Extracto de carne	3,0 g
Peptona de carne	5,0 g

Bilis de buey	40,0 g
Esculina	1,0 g
Citrato férrico	0,5 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 6,6	

Esterilizar en autoclave. Enfriar a 45°C y agregar 5% de suero (optativo).

Este medio se utiliza para la investigación preliminar de enterococos (grupo serológico D).

La hidrólisis de la esculina y la tolerancia a la bilis se consideran características constantes y fidedignas de los enterococos.

Numerosas bacterias acompañantes resultan notablemente inhibidas en su crecimiento por las sales biliares. Los enterococos hidrolizan al glucósido esculina convirtiéndolo en esculetina y glucosa.

La esculetina, con los iones hierro (III) forman un complejo color verde oliva hasta negro.

Añadiendo suero de caballo al medio puede optimizarse el crecimiento de los enterococos.

Incubación: hasta tres días a 37°C.

En presencia de enterococos, se produce, por lo regular ya al cabo de 24 horas, una coloración oscura del medio de cultivo alrededor de las colonias. Cuando las colonias son numerosas y llegan a confluir, puede llegar a oscurecerse todo el medio.

Si al cabo de tres días no se ha producido oscurecimiento, se acepta que el material sembrado no contenía enterococos.

### **EXTRACTO DE CARNE AGAR**

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 6,4 - 7,0	

### **EXTRACTO DE CARNE CALDO**

Se prepara de igual manera que el anterior, pero sin agregar el agar.

### **EXTRACTO DE MALTA AGAR**

Extracto de Malta en polvo	20,0 g
Peptona	1,0 g
Glucosa	20,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 5,6	

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. No esterilizar por períodos más prolongados, ni sobrecalentar ya que el medio puede ablandarse. Este medio se utiliza principalmente para el aislamiento de mohos y levaduras.

### **FERMENTACION DE AZUCARES CALDO (AEROBIOS)**

Tripticasa (o proteosa peptona n° 3)	10,0 g
Extracto de carne	1,0 g
NaCl	5,0 g
Rojo fenol	0,018 g
Hidrato de carbono	1,0 g
Agua destilada	1,0 L

a) Preparar el medio basal y esterilizar en autoclave.

Preparar las soluciones de carbohidratos y esterilizarlas por filtración. Agregar al medio basal para obtener una concentración final de 1 g por litro.

b) Preparar el medio basal y agregar el carbohidrato (todos al 1% excepto salicina, 0,5%).

Fraccionar en tubos de hemólisis. Colocar campanitas de Durham sólo a los tubos con glucosa.

Esterilizar en autoclave a 118°C durante 10 minutos.

pH = 7,4±0,2.

La degradación de distintos azúcares por distintas vías metabólicas produce ácido o gas. El ácido se detecta por el viraje al amarillo del indicador rojo fenol, y el gas por la formación de burbujas que quedan atrapadas en la campanita.

Prueba positiva: color amarillo con o sin gas.

Prueba negativa: color rojo con ausencia de gas.

### **FERMENTACION DE AZUCARES CALDO (ANAEROBIOS)**

Peptona	10,0 g
NaCl	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Extracto de carne	2,0 g
Clorhidrato de cisteína	0,3 g
Agar-agar	0,5 g
Hidrato de carbono	1,0 g
Agua destilada	1,0 L

Preparar el medio base. Fraccionar en tantas porciones como azúcares se prueben. Pesar los azúcares y agregarlos a cada una de ellas. Fraccionar en tubos con tapa de rosca. Esterilizar en autoclave 10 minutos a 118°C.

La degradación de los azúcares produce ácido y/o gas. El ácido produce un descenso del pH del medio, que se detecta agregando unas gotas del indicador **púrpura de bromocresol** al 0,04%.

Prueba positiva: color amarillo-ácido.

Prueba negativa: color púrpura-alcalino.

### **FLUOROCULT AGAR PARA *Escherichia coli* O157:H7**

Peptona de caseína	20,0 g
NaCl	5,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Extracto de carne	2,0 g
Sorbita	10,0 g
Citrato de amonio y hierro (III)	0,5 g
4 metil umbeliferil beta D glucurónido	0,1 g (MUG)
Tiosulfato de sodio	2,0 g
Azul de bromotimol	0,025 g
Desoxicolato de sodio	1,12 g
Agar-agar	13,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH: 7,4±0,1	

El desoxicolato sódico inhibe en gran medida la flora Gram positiva. La sorbita, junto con el indicador sirven para demostrar la fermentación del azúcar. Las colonias sorbita positivas son amarillas, y las negativas resultan de color verdoso, sin cambio en el color del medio de cultivo. El tiosulfato y el hierro III evidencian las colonias de gérmenes productores de sulfuro de hidrógeno, las colonias tienen precipitado negro-parduzco de sulfuro de hierro. Esta característica es muy importante para diferenciar *Proteus mirabilis* de *Escherichia coli* O157:H7. El MUG sirve para evidenciar las cepas beta glucuronidasa positivas ya que son fluorescentes a la radiación con luz UV de larga longitud de onda. La mayoría de las cepas de *Escherichia coli* dan positivo, mientras que *Escherichia coli* O157:H7 da negativa.

### **FRASER CALDO**

Peptona Proteosa	5,0 g
Peptona de caseína	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Extracto de carne	5,0 g
NaCl	20,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,35 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,0 g
Esculina	1,0 g
LiCl	3,0 g
Agua destilada	1,0 L
Suplementos:	
Citrato de amonio y hierro (III)	500 mg
Acido Nalidíxico	10 mg
Acriflavina	12,5 mg

Autoclavar a 121°C, 15 minutos. Disolver el de citrato de amonio férrico y el suplemento de ácido nalidíxico y acriflavina en 1 mL, en cada caso, de agua destilada estéril y añadir al caldo base enfriado por debajo de 50°C.

Este medio se utiliza para la investigación de *Listeria*. El crecimiento de flora acompañante es inhibido por el cloruro de litio, el ácido nalidíxico y la acriflavina. La esculina y el citrato de amonio y hierro permiten evidenciar la acción de la  $\beta$ -D-glucosidasa, que escinde la esculina en esculetina y glucosa. La esculetina forma un complejo verde oliva a negro con los iones hierro (III). En caso de crecimiento de *Listeria* en el caldo, se observa un ennegrecimiento en el mismo. El caldo Half Fraser es una modificación de este medio que contiene la mitad de la concentración de ácido nalidíxico y la acriflavina para favorecer la recuperación de células estresadas.

### **GELATINA MEDIO (AEROBIOS)**

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Gelatina	120,0 g
Agua destilada	1,0 L

Mezclar la gelatina con el agua y dejar reposar durante 15 minutos. Calentar a ebullición, agregar los otros ingredientes y seguir calentando hasta que se disuelvan, sin sobrecalentar. Ajustar el pH a 6,8-7,0.

Distribuir en tubos, esterilizar en autoclave. Enfriar en posición vertical.

Los microorganismos productores de gelatinasa causan licuefacción. Esta propiedad varía con la cepa y con la temperatura de incubación. Es importante referirse a un tubo patrón sin sembrar. Se debe tener en cuenta que a la temperatura de incubación, 37°C, la gelatina está líquida, por lo tanto, es necesario enfriar para interpretar los resultados. Algunos microorganismos se deben incubar por más de 48 horas.

### **GLUCOSA CALDO**

Peptona de caseína	10,0 g
Extracto de carne	3,0 g
NaCl	5,0 g
Glucosa	10,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,3 $\pm$ 0,1	

Este medio de cultivo se utiliza para el crecimiento y multiplicación de diversos microorganismos. Como no contiene más hidratos de carbono que la glucosa, el medio es adecuado para la demostración de fermentación de glucosa cuando se agrega previamente un indicador de pH.

### **GRASA DE MANTECA AGAR**

Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L

#### **Emulsión grasa de manteca**

Grasa de manteca	20,0 g
Goma arábica	2,5 g
Agua destilada	1,0 L

Fundir manteca no salada en baño de agua a 50°C, separar la grasa pipeteando cuidadosamente. Esterilizar en autoclave.

En el momento de preparar las placas, la solución de goma arábica y la grasa se mezclan y emulsionan en un homogeneizador estéril.

#### **Emulsión de goma arábica**

Suspender la goma en agua fría, calentar hasta disolución. Esterilizar en autoclave.

**Preparación de las placas:** Fundir el medio y llevarlo a 50-55°C. Agregar entonces 5 mL de la emulsión de grasa de manteca a 100 mL del mismo. Mezclar y verter en placas de Petri.

### **HIGADO + HIGADO CALDO**

Hígado bovino	750,0 g
Agua destilada	2,0 L

Cortar el hígado en trozos pequeños agregar el agua y dejar en la heladera 24 h. Hervir una hora, enfriar y llevar a volumen. Filtrar y ajustar el pH a 7,6.

Distribuir en tubos de ensayo y colocar un trocito de hígado en cada uno. Esterilizar en autoclave. Este medio rico en nutrientes es especial para la recuperación de microorganismos anaerobios. El crecimiento de los mismos se evidencia por el enturbiamiento con o sin producción de gas. Las cepas proteolíticas degradan los pedacitos de hígado.

### **HÍGADO DE TERNERA AGAR**

Infusión de hígado	50,0 g
Infusión de ternera	500,0 g
Proteosa peptona	20,0 g
Neopeptona	1,3 g
Triptona	1,3 g
Dextrosa	5,0 g
Almidón soluble	10,0 g
Caseína isoeléctrica	2,0 g
NaCl	5,0 g
NaNO <sub>3</sub>	2,0 g
Gelatina	20,0 g
Agar-agar	15,0 g

Agua destilada 1,0 L  
pH = 7,3

Prehidratar y disolver los ingredientes, distribuir en tubos y esterilizar en autoclave.  
Este medio se utiliza para el aislamiento y cultivo de organismos anaerobios, favoreciendo su esporulación.

### **INFUSIÓN DE CEREBRO CORAZÓN CALDO**

Corazón de vaca 500,0 g  
Tryptona 10,0 g  
NaCl 5,0 g  
Agua destilada 1,0 L

Mezclar los ingredientes, excepto el NaCl, hervir una hora y llevar a pH 7,4-7,6. Agregar el NaCl y hervir durante 10 minutos, filtrar. El pH final debe ser 7,0-7,4. Si se requiere agregar un trozo de corazón en cada tubo. También se comercializa el medio deshidratado.

Este medio se utiliza para el mantenimiento e identificación de clostridios y otros anaerobios a partir de carne y otros alimentos. Las sustancias reductoras contenidas en el tejido producen a su alrededor un medio suficientemente anaerobio, incluso para gérmenes anaerobios exigentes.

El tejido rico en nutrientes es utilizado por enzimas proteolíticas como sustrato. Si el microorganismo es proteolítico se produce degradación, si es sacarolítico se produce enrojecimiento, y si es productor de sulfhídrico se produce ennegrecimiento. También se observa producción de gas. Si el medio no es utilizado inmediatamente, calentar a ebullición durante 15 min. para eliminar el O<sub>2</sub> disuelto.

Sembrar en el fondo del tubo sin burbujear, con pipeta. Sellar con tapón de VASPAR o agar 2 % a 55°C, haciéndolo gotear en el fondo del tubo.

### **INFUSION DE CORAZON AGAR**

Se agrega al caldo Infusión de corazón 15 g de agar por litro. Esterilizar en autoclave.

### **INFUSIÓN DE HIGADO CALDO**

Hígado de buey 750,0 g  
HCl (cc) 2,0 mL  
Agua destilada 2,0 L

Se corta el hígado en trozos pequeños se agrega el agua y el ácido y se deja en la heladera durante 24 hs.

Luego se hierve durante una hora, se filtra, se ajusta el pH a 7,6; se lo distribuye en tubitos de ensayo en los que se ha colocado un trocito de hígado fresco y se esteriliza el medio en la forma habitual. Se comercializa el medio deshidratado.

El medio se utiliza para el cultivo de clostridios y otros anaerobios. Su fundamento y uso es similar al del caldo corazón.

### **INVESTIGACION DE H<sup>2</sup>S CALDO**

Peptona tríptica	10,0 g
NaCl	5,0 g
Extracto de carne	2,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Clorhidrato de cisteína	0,2 g
FeSO <sub>4</sub>	0,2 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,3 g
Agar-agar	0,5 g
Agua destilada	1,0 L

Ajustar el pH a 7,2. Repartir en tubos de 160 x 16. Colocar 12 mL por tubo.

Este medio se utiliza para el crecimiento y la identificación de microorganismos productores de H<sub>2</sub>S. El H<sub>2</sub>S producido a partir del Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> reacciona con el FeSO<sub>4</sub> dando FeS negro que precipita.

Si el medio no es utilizado en el momento, hervir durante 15 minutos a ebullición para eliminar el O<sub>2</sub> disuelto justo antes de usar.

Sembrar con pipeta en profundidad antes de usar.

### **KF STREPTOCOCCUS AGAR**

Proteosa peptona	10,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
NaCl	5,0 g
Glicerolfosfato de sodio	10,0 g
Maltosa	20,0 g
Lactosa	1,0 g
Azida sódica	0,4 g
Púrpura de bromocresol	0,015 g
Agar-agar	20,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,2	

Luego de esterilizado el medio y enfriado a 60°C, agregar 10 mL de una solución al 1 % de cloruro de trifeniltetrazolio.

### **Solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 1 %**

Esterilizar 3 mL de agua destilada. Una vez fría, agregarle 30 mg de TTC. Disolver y guardar en

la heladera.

Este medio se utiliza para el crecimiento y la enumeración de enterococos en agua y otros alimentos.

La maltosa y la lactosa son utilizadas por los enterococos con producción de ácido.

Los gérmenes acompañantes son reprimidos por la azida de sodio.

El agregado de TTC tiene como finalidad diferenciar *S. faecalis* del resto de los enterococos, aprovechando la habilidad del primero de reducir el tetrazolio a formazano. Estos derivados del tetrazolio son sustancias incoloras que al reaccionar con un azúcar se transforman en compuestos poco solubles de color rojo (formazanos).

Como indicador se utiliza el púrpura de bromocresol. Azul: indica pH neutro o básico. Amarillo: indica pH ácido.

Las colonias se presentan pequeñas de color rojo, de 0,3-2 mm; el medio alrededor de las mismas viras al amarillo.

Incubación: 48 horas a 37°C.

### **KG AGAR**

Peptona	1,0 g
Extracto de levadura	0,5 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar-agar	18,0 g
Agua destilada	1,0 L

Disolver los ingredientes en agua, ajustar el pH a 6,8. Esterilizar en autoclave. Enfriar a 50°C y agregar 100 mL de suspensión yema de huevo y 1 mL de solución de sulfato de polimixina B (10 mg/mL) estéril. Distribuir en placas. Este medio se utiliza para el aislamiento y la identificación de *B. cereus* en alimentos. El Rojo fenol y la Polimixina B inhiben buena parte de la flora acompañante. El medio promueve la esporulación de *Bacillus*, lo que permite la confirmación directa de las colonias lecitinasas positivas, como las del grupo I de *Bacillus*, y *B. cereus* en particular. Ciertas colonias de *Bacillus* del grupo II lecitinasas positivas, que serán *B. cereus* presuntivas en MYP, no dan la reacción en este medio relativamente pobre en nutrientes.

### **LACTOSA CALDO**

Peptona de gelatina	5,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Lactosa	5,0 g
Agua destilada	1,0 L

El medio se utiliza para ensayos orientativos de bacterias coliformes, especialmente *E. coli*; no contiene sustancias inhibidoras.

La utilización de la lactosa se demuestra por producción de gas, que se recoge en campanitas de Durham. El medio se utiliza también como caldo de enriquecimiento no selectivo para Salmonellas.

En presencia de una flora mixta, la fermentación de lactosa provoca una disminución del pH, con lo que se inhibe la flora competitiva, especialmente coliformes. El crecimiento de *Salmonellas* no se ve afectado por el descenso de pH; esto permite su recuperación sin pérdidas al cabo de hasta una semana.

Incubación: 24 horas a 37°C.

### **LAURIL SULFATO CALDO**

Triptosa	20,0 g
Lactosa	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lauril sulfato de sodio	0,1 g
Hidrógeno fosfatodipotásico	2,75 g
Dihidrógeno fosfato potásico	2,75 g
Agua destilada	1,0 L

El medio es selectivo para coliformes en la investigación en aguas, productos lácteos y otros alimentos. El gas formado se visualiza por la incorporación de campanitas de Durham al tubo con medio.

Debido a su elevada calidad nutritiva y al tampón de fosfatos que contiene este medio de cultivo, se garantiza el rápido crecimiento y la intensa formación de gas, incluso en el caso de coliformes que fermenten lentamente la lactosa. El contenido en lauril sulfato inhibe notablemente el crecimiento de la flora acompañante indeseable.

### **LEVADURA CALDO (MEMBRANA FILTRANTE)**

Extracto de malta	20,0 g
Triptona	1,5 g
Proteosa peptona	1,5 g
Dextrina	5,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 4,8	

Este medio se utiliza para el crecimiento selectivo de levaduras a partir de alimentos. El pH bajo favorece el crecimiento de levaduras inhibiendo el crecimiento bacteriano.

### **LISINA HIERRO AGAR**

Peptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Glucosa	1,0 g
L - lisina	10,0 g
Citrato férrico amónico	0,5 g

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,04 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 6,7	

Este medio se utiliza para la demostración simultánea de lisina descarboxilasa y la producción de ácido sulfhídrico. Permite la identificación de enterobacterias, sobre todo de *Salmonella* y *Arizona*. La lisina puede ser descarboxilada por microorganismos LD-positivos, que la transforman en la amina cadaverina. Esto produce un viraje al violeta del indicador de pH púrpura de bromocresol. Puesto que la descarboxilación sólo tiene lugar a pH inferior a 6,0, es necesario que se produzca acidificación del medio por fermentación de la glucosa. Por este motivo, el medio de cultivo sólo debe ser utilizado para organismos fermentadores de glucosa. Los microorganismos LD-negativos pero fermentadores de glucosa, producen un viraje al amarillo de la totalidad del medio de cultivo. La incubación prolongada puede ocasionar una alcalinización del medio. La producción de sulfhídrico se pone de manifiesto por la formación de sulfuro de hierro negro. Las cepas del grupo *Proteus providencia*, con excepción de algunas cepas de *Proteus morganii*, desaminan la lisina a ácido ceto-carbónico; este último, con la sal de hierro y en presencia de O<sub>2</sub>, forma sustancias pardo-rojizas en la región superficial del medio de cultivo. Se siembra en profundidad y en superficie; se incuba durante 24 horas.

Microorganismos	Color del medio de cultivo		Producción de H <sub>2</sub> S
	Columna vertical	Superficie inclinada	
<i>Arizona</i>	Violeta	Violeta	+
<i>Salmonella</i> *	Violeta	Violeta	+
<i>Proteus mirabilis</i>	Amarillo	Pardo-rojizo	+
<i>Proteus vulgaris</i>	Amarillo	Pardo-rojizo	+
<i>Morganella morganii</i>	Amarillo	Pardo-rojizo	-
<i>Providencia</i>	Amarillo	Pardo-rojizo	-
<i>Citrobacter</i>	Amarillo	Violeta	+
<i>Escherichia coli</i>	Amarillo	Violeta	-
<i>Shigella</i>	Amarillo	Violeta	-
<i>Klebsiella</i>	Violeta	Violeta	-
<i>Yersinia</i>	Amarillo	Violeta	-

\* Excepción de *S. paratyphi*: Columna vertical amarilla; Superficie inclinada violeta.

### **LECHE AGAR**

Peptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Leche en polvo descremada	1,0 g
Agar-agar	12,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,2±0,2	

Esterilizar por tinalización 30 minutos. Este medio se utiliza para la demostración de la hidrólisis

de la caseína por microorganismos aerobios. El medio es blanquecino opaco. La proteólisis se evidencia por halos claros transparentes alrededor de las colonias (debidos a la degradación de la caseína).

### **LECHE TORNASOLADA**

Leche descremada en polvo	100,0 g
Clorhidrato de cisteína	0,3 g
Agar-agar	0,5 g
Tornasol (Litmus)	0,75 g
Agua destilada	1,0 L

Disolver la leche en el agua tibia, agregar los otros ingredientes y calentar a baño maría. Fraccionar en tubos con tapa de rosca. Esterilizar por tinalización (30 minutos a 100°C, tres días consecutivos).

pH = 6,8

Este medio se utiliza para determinar varias funciones metabólicas:

**Fermentación de lactosa.** La leche tornasolada presenta un color purpúreo a pH = 6,8. Si el microorganismo fermenta la lactosa con producción de ácido láctico, el descenso de pH hace virar el indicador a color rojo rosado. Si la bacteria no fermenta la lactosa, y por su metabolismo se alcaliniza el medio, el indicador vira de púrpura a púrpura azulado.

**Formación y digestión del coágulo** (peptonización). La coagulación puede deberse a la precipitación de la caseína por la formación de ácidos, o por la conversión de la caseína en para-caseína por la enzima *renina*. En el primer caso, el coágulo es firme y gelatinoso, no se separa de las paredes del tubo y se disuelve en medio alcalino. En el segundo caso, el coágulo es blando, se separa de las paredes del tubo dando un líquido grisáceo (suero). La peptonización o digestión del coágulo se produce si la bacteria posee la enzima *caseasa*.

**Formación de gases.** Se generan como producto final de la degradación de la lactosa. Se produce una fermentación turbulenta que puede llegar a descomponer el coágulo ácido (*Clostridium perfringens*).

### **MAC CONKEY AGAR**

Peptona de caseína	17,0 g
Proteosa peptona o Peptona de carne	3,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	1,5 g
NaCl	5,0 g
Agar-agar	13,5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal Violeta	0,001 g
Agua destilada	1,0 L

pH = 7,1

Disolver los ingredientes en agua destilada calentando y agitando. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Este medio de cultivo se utiliza para el aislamiento de *Salmonella*, *Shigella* y bacterias coliformes, a partir de alimentos, heces, orina y aguas contaminadas.

Las sales biliares y el Cristal Violeta inhiben la flora Gram positiva. La lactosa, junto con el indicador de pH Rojo neutro, sirve para comprobar la degradación de dicho azúcar.

Incubación: 18-24 horas a 37°C.

Las colonias lac (-) son incoloras.

Las colonias lac (+) son rojas, con un halo de precipitación debido al descenso de pH provocado por los ácidos biliares.

### **MAC CONKEY CALDO**

Peptona	20,0 g
Lactosa	10,0 g
Púrpura de bromocresol	0,01 g
Bilis de buey	5,0 g
Agua destilada	1,0 L

pH = 7,3

Este es un medio selectivo, orientativo para coliformes o *Escherichia coli* en leche y agua. El caldo contiene lactosa, cuya degradación a ácido con formación de gases señalan, por definición, la presencia de coliformes.

El gas producido es recogido en campanitas de Durham y la formación de ácido se comprueba mediante el viraje a amarillo del indicador Púrpura de bromocresol.

La bilis de buey favorece el crecimiento de bacterias intestinales y es inhibitoria para microorganismos extraentéricos.

Incubación: 48 horas a 37°C.

Producción de ácido y gas: sospecha de presencia de *E. coli* y coliformes.

Producción de ácido sin gas: sospecha de presencia de coliformes, sin *E. coli*.

### **MAC CONKEY SORBITOL AGAR**

Digerido pancreático de gelatina	17,0 g
Digerido pancreático de caseína	1,5 g
Digerido péptico de tejido animal	1,5 g
Sales biliares	1,5 g
Sorbitol	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agar-agar	13,5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal Violeta	0,001 g
Agua destilada	1,0 L

pH = 7,1

Este medio de cultivo se utiliza para el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7, a partir de alimentos y de heces. Se emplea la característica de dicho organismo de no fermentar este azúcar, a diferencia de la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* que son sorbitol +.

Las sales biliares y el Cristal Violeta inhiben la flora Gram positiva. El sorbitol, junto con el indicador de pH Rojo neutro, sirven para comprobar la degradación de dicho azúcar.

Incubación: 18-24 horas a 37°C.

Las colonias sorbitol (-) son incoloras.

Las colonias sorbitol (+) son rojas, con un halo de precipitación debido al descenso de pH provocado por los ácidos biliares.

Otras versiones de este medio incluyen el agregado de telurito y cefixime para aumentar la selectividad.

### **MANITOL LISINA CRISTAL VIOLETA (MLCB) AGAR**

Extracto de levadura	5,0 g
Peptona	10,0 g
NaCl	4,0 g
Manitol	3,0 g
Cloruro de L-lisina	5,0 g
Citrato férrico amónico	1,0 g
Na <sup>2</sup> S <sup>2</sup> O <sup>3</sup>	4,0 g
Verde Brillante	0,005 g
Cristal Violeta	0,01 g
“Lab-Lemco” polvo	2,0 g
Agar-agar	16,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 6,8	

Calentar a ebullición durante 15 minutos. No esterilizar en autoclave.

Verde Brillante: Se agrega 1 mL de solución al 0,5 %.

Cristal Violeta: Se agregan 10 mL de solución 0,1 %.

El medio se utiliza para el crecimiento selectivo de *Salmonella*.

Los colorantes presentes en el medio inhiben la flora de acompañamiento. El tiosulfato es reducido por *Salmonella* a H<sub>2</sub>S que junto con la sal de hierro forma FeS negro.

El agregado de “Lab-Lemco” polvo reemplaza al extracto de carne.

Las colonias de *Salmonella* en este medio son grandes con centro negro.

### **MANITOL SAL COMÚN ROJO FENOL**

Peptona de carne	10,0 g
------------------	--------

Extracto de carne	1,0 g
D (-) manitol	10,0 g
NaCl	75,0 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar-agar	12,0 g
Agua destilada	900,0 mL

Este medio se utiliza para el aislamiento y la identificación de estafilococos a partir de alimentos y otros materiales. Sobre este medio crecen sólo microorganismos que poseen una elevada tolerancia a la sal común.

Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo. Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal, y pueden, o no, fermentar el manitol.

Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color.

Los estafilococos que no fermentan el manitol, se visualizan como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura.

### **MANITOL YEMA DE HUEVO POLIMIXINA (MYP) AGAR**

Peptona de carne	10,0 g
Extracto de carne	1,0 g
D (-) manitol	10,0 g
NaCl	10,0 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar-agar	12,0 g
Agua destilada	900,0 mL
Emulsión yema de huevo	100,0 mL
Polimixina B (0,01 a 0,1 g)	
pH = 7,1±0,1	

Al medio esterilizado y enfriado a 50°C, agregar la suspensión yema de huevo a la misma temperatura, mezclando bien, y la solución de Polimixina B.

Este medio se utiliza para el aislamiento y la identificación de *Bacillus cereus* a partir de alimentos. La Polimixina B inhibe la flora usual de acompañamiento, en tanto que el *B. cereus* puede desarrollarse sin dificultad.

El medio contiene manitol y el indicador de pH rojo fenol. La flora acompañante es normalmente manitol (+), lo que hace virar al indicador a amarillo, por acidificación del medio, como consecuencia de la fermentación del manitol. El *Bacillus cereus* es manitol (-), por lo tanto el medio aparece de color rosado, por alcalinización debida al metabolismo nitrogenado.

Finalmente, *B. cereus* posee la enzima lecitinasa, una fosfolipasa que hidroliza la lecitina de la yema del huevo, cuyos productos precipitan dando un halo blanco opaco alrededor de las colonias. El *B. cereus* en este medio aparece en forma de colonias rugosas con sustrato rosado o púrpura,

rodeadas de un espeso precipitado blanco, opaco. Las colonias de la flora acompañante aparecen con sustrato amarillo.

El recuento en este medio es presuntivo, se deben confirmar las colonias sospechosas (gelatina, reducción de nitratos, fermentación anaeróbica de glucosa).

### **MEDIO 110 PARA ESTAFILOCOCOS**

Peptona de caseína	10,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,0 g
Gelatina	30,0 g
Lactosa	2,0 g
D (-) manitol	10,0 g
NaCl	75,0 g
Agar-agar	12,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,0±0,2	

Este medio se utiliza para el aislamiento y la identificación de estafilococos a partir de alimentos y otros materiales. Sobre este medio crecen sólo microorganismos que poseen una elevada tolerancia a la sal común.

Las colonias de estafilococos son diferenciables utilizando como criterios, entre otros, la fermentación de manitol, la licuefacción de la gelatina y la formación de pigmento.

Las colonias que producen pigmento aparecen de color amarillo dorado. De ellas se aíslan colonias para la prueba de coagulasa. La producción de ácido a partir de manitol se pone de manifiesto por el viraje al amarillo del indicador de pH azul de bromotimol.

La licuefacción de la gelatina se pone de manifiesto por la reacción de Stone. Esta consiste en inundar la placa con solución saturada de sulfato de amonio o una solución al 20 % de ácido salicílico. Después de 10 minutos aparecen zonas claras alrededor de las colonias que licuaron la gelatina.

### **MODIFIED MCBRIDE (MMA) AGAR**

Triptosa	10,0 g
Extracto de carne	3,0 g
NaCl	5,0 g
LiCl	0,5 g
Feniletanol	2,5 g
Glicina	10,0 g
Cicloheximida	0,2 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,3 ± 0,2.	

Autoclavar a 121°C, 15 minutos. Opcional adición de sangre.

Este medio se utiliza para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* con o sin la adición de sangre. Se recomienda para el aislamiento de *Listeria* a partir de muestras clínicas, leche cruda y alimentos en general. Cuando se adiciona sangre se observa una zona delgada de  $\beta$ -hemólisis alrededor de las colonias de *Listeria*.

La triptosa y el extracto de carne son fuentes de nitrógeno, vitaminas y minerales. El NaCl mantiene el balance osmótico del medio. El LiCl, la glicina y el feniletanol actúan como agentes selectivos, inhibiendo a los gram-negativos y a algunos gram-positivos, con excepción de *Listeria*. La cicloheximida aumenta la selectividad del medio.

### **MOVILIDAD, AGAR PARA**

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agar-agar	4,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,3	

Distribuir en tubos, esterilizar en autoclave. Enfriar en posición vertical.

Los microorganismos móviles migran desde la zona de siembra y difunden en el medio de cultivo, provocando turbiedad.

Los microorganismos no móviles crecen sólo en la zona de siembra.

Es importante la temperatura de incubación, pues algunos microorganismos son móviles a 37°C y otros a 22-25°C.

### **NITRATO CALDO**

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
KNO <sup>3</sup>	1,0 g
Agua destilada	1,0 L

Disolver a baño maría y fraccionar en tubos (2 mL por tubo). Esterilizar en autoclave.

pH = 7,0

La reducción de NO<sup>3-</sup> a NO<sup>2-</sup> y N<sub>2</sub> se da en condiciones anaeróbicas en las que el NO<sup>3-</sup> actúa como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. Muchas bacterias anaerobias facultativas pueden crecer en anaerobiosis reduciendo nitrato.

El fundamento de la prueba consiste en la detección del nitrito formado, que al reaccionar con los reactivos para la prueba de reducción de nitrato forman un compuesto diazoico rojo.

Si la reacción es débil, y no aparece color dentro de los 30 segundos, se agrega polvo de zinc, que actúa como agente reductor, en medio ácido acético y reduce al compuesto formado, con aparición de color rojo dentro de los treinta segundos. Si no aparece color, la prueba se considera negativa.

### **NITRATO MOVILIDAD BUFFEREADO AGAR**

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
KNO <sup>3</sup>	5,0 g
Na <sup>2</sup> HPO <sup>4</sup>	2,5 g
Galactosa	5,0 g
Glicerol	5,0 g
Agar-agar	3,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,4	

Colocar en tubos con tapa en porciones de 10 mL. Esterilizar en autoclave.

### **Reactivo para la prueba de reducción de nitrato**

#### **Solución A:**

Se disuelven 8 g de ácido sulfanílico en 1000 mL de ácido acético 5 N.

#### **Solución B:**

Se disuelven 5 g de  $\alpha$ -naftol en 1000 mL de ácido acético 5 N.

Este medio se utiliza para la demostración de bacterias que reducen nitrato a nitrito.

El nitrito formado durante la incubación se detecta agregando 0,5 mL de la solución A y 4 gotas de la solución B en el tubo de fermentación.

El fundamento y la interpretación corresponden a los de los medios para nitrato y movilidad respectivamente. Este medio se utiliza para la investigación de la movilidad y de la reducción de nitrato por *Clostridium perfringens*.

### **OXFORD MODIFICADO (MOX) AGAR**

Agar Columbia (o agar tripteína-soya, TSY)	42,0 g
Agar-agar	2,0 g
Esculina	1,0 g
Citrato de amonio férrico	0,5 g
LiCl	15,0 g
Colistina (sol. 1%)	1,0 mL
Agua destilada	1,0 L

#### **Agar base Columbia**

Sustrato especial nutritivo	23,0 g
Almidón	1,0 g
NaCl	5,0 g
Agar-agar	13,0 g
pH = 7,2.	

Autoclavar a 121°C, 10 minutos. Enfriar a 46°C y añadir 2,0 mL de solución 1% de moxalactam, en buffer fosfato de potasio de pH: 6,0, esterilizada por filtración. Las colonias típicas de *L. monocytogenes* están rodeadas por una zona marrón oscura o negra por hidrólisis de la esculina.

### **PALCAMAGAR**

Peptona	23,0 g
Almidón	1,0 g
NaCl	5,0 g
Agar-agar	13,0 g
Manitol	10,0 g
Citrato de hierro y amonio	0,5 g
Esculina	0,8 g
Dextrosa	0,5 g
LiCl	15,0 g
Rojo fenol	0,08 g
pH: 7,2 ± 0,1.	

Autoclavar 121°C, 15 minutos. Enfriar a 51°C y agregar el suplemento.

### **Suplemento (para 500 mL de medio)**

Polimixina	5,0 mg
Ceftazidín	10,0 mg
Acriflavina	2,5 mg

Disolver el suplemento previamente en agua estéril.

Las colonias típicas de *L. monocytogenes* en este medio son gris-verdosas con halo negro parduzco (hidrólisis de esculina) y medio virado a rojo (manitol negativo).

### **PAPA DEXTROSA AGAR**

Papas peladas	200,0 g
Glucosa	20,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L

Hervir las papas en el agua durante una hora, filtrar por algodón o gasa. Agregar el agar y la glucosa y calentar hasta disolución. Esterilizar en autoclave.

En el momento de uso, se ajusta el pH a 4,5 con ácido tartárico al 10 % estéril. Una vez ajustado el pH, no volver a calentar, pues se hidrolizaría el agar. También se comercializa el medio deshidratado.

Este medio se utiliza para el aislamiento y recuento de hongos y levaduras a partir de alimentos. El pH bajo inhibe el crecimiento de bacterias.

## PE-2 MEDIO

Peptona	20,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Agua destilada	1,0 L
Púrpura de bromocresol 1 %	4,0 mL
Arvejas	6 por tubo

Disolver los ingredientes, fraccionar en tubos con tapa de rosca, agregar 6 arvejas por tubo. Este medio se utiliza para la recuperación primaria de microorganismos anaerobios en el análisis de conservas alteradas.

## PSEUDOMONAS: F AGAR Y P AGAR

### **F AGAR**

Peptona de caseína	10,0 g
Peptona de carne	10,0 g
MgSO <sub>4</sub>	1,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
Agar-agar	12,0 g
Agua destilada	1,0 L
Aditivo: Glicerina	10,0 mL

### **P AGAR**

Peptona de gelatina	20,0 g
MgCl <sub>2</sub>	1,4 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,0 g
Agar-agar	12,6 g
Agua destilada	1,0 L
Aditivo: Glicerina	10,0 mL

Estos medios de cultivo se utilizan para el estudio de *Pseudomonas*, fundamentado en la formación de los pigmentos: **piocianina** y/o **piorrubina** y **fluoresceína**.

El agar F estimula la producción de fluoresceína y disminuye la producción de piocianina. El agar P actúa de manera opuesta. El uso de ambos medios de cultivo simultáneamente permite una identificación simple y rápida de *Pseudomonas*, porque algunas cepas sólo pueden formar piocianina, otras sólo fluoresceína y sólo algunas, ambos pigmentos.

Incubación: hasta una semana a 37°C.

Solamente *Pseudomonas aeruginosa* forma colonias sobre agar P con una zona de pigmentación de azul hasta verde (piocianina) o rojiza (piorrubina). Estos pigmentos son extraíbles con cloroformo. Sobre el agar F las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* aparecen con zona amarilla o amarillo-verdosa (fluoresceína). La formación simultánea de piocianina da lugar a un color verde

luminoso, que presenta fluorescencia a la luz ultravioleta.

### **RAPPAPORT CALDO DE ENRIQUECIMIENTO según Wauters**

Peptona de caseína	5,0 g
NaCl	8,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8 g
MgCl <sub>2</sub>	80,0 g
Verde de Malaquita	0,12 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 6,0	

Esterilizar en autoclave. Agregar 1 mL de solución de Carbencilina (2,4 mg/l) en forma estéril.

Este medio se utiliza para el aislamiento de *Yersinia* a partir de alimentos.

El Verde de Malaquita y el MgCl<sub>2</sub> inhiben notablemente el crecimiento de la flora intestinal normal, en tanto que *Yersinia* se multiplica sin obstáculos.

Se incuba 16-18 h a 28°C.

### **RAPPAPORT VASSILIADIS CALDO**

<b>A)</b> Peptona	5,0 g	<b>B)</b> MgCl <sub>2</sub>	400,0 g	<b>C)</b> Oxalato de Verde de Malaquita	4,0 g
NaCl	8,0 g	Agua dest.	1,0 l	Agua destilada	1,0 l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 g				
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g				
Agua dest.	1,0 l				

Se prepara mezclando 1 litro de la solución A, 100 mL de la solución B y 10 mL de la solución C.

Esterilizar 15 minutos a 115°C.

pH = 5,2 - 5,3

Este medio se utiliza para el enriquecimiento selectivo de Salmonellas a partir de material de origen fecal.

El Verde de Malaquita y el MgCl<sub>2</sub> inhiben el crecimiento de la flora intestinal normal, en tanto que la Salmonella se desarrolla sin obstáculos.

### **RECUENTO EN PLACA AGAR**

Peptona de caseína	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L

Medio de cultivo exento de sustancias inhibitoras y de indicadores, concebido esencialmente para

la determinación del número total de microorganismos en alimentos. Se siembra generalmente por el procedimiento de vertido en placa.

Para la determinación de microorganismos caseolíticos agregar, antes de la esterilización, 10 mL/l de leche descremada o 1,0 g/l de leche descremada en polvo.

Las colonias de caseolíticos producen un halo claro que contrasta con el resto del medio, opaco.

### **SALMONELLA-SHIGELLA AGAR**

Extracto de carne	5,0 g
Proteosa peptona	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	8,5 g
Citrato de sodio	8,5 g
Tiosulfato de sodio	8,5 g
Citrato férrico	1,0 g
Verde Brillante	0,00033 g
Rojo neutro	0,025 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,0	

Disolver los ingredientes en agua a ebullición. No esterilizar en autoclave.

Se utiliza para el aislamiento y la identificación de *Salmonella* y *Shigella* a partir de alimentos contaminados. El Verde Brillante, la bilis de buey y la elevada concentración de citrato inhiben considerablemente la flora acompañante. Con el hierro y el tiosulfato se pone de manifiesto la formación de FeS negro y el ennegrecimiento de las correspondientes colonias.

Las colonias de coliformes quedan señaladas por la degradación de la lactosa a ácido, que se manifiesta por el viraje al rojo del indicador de pH Rojo neutro.

Incubación: 18-24 horas a 37°C.

<b>Colonias</b>	<b>Microorganismos</b>
Incoloras transparentes translúcidas	<i>Shigella</i> spp. y la mayoría de <i>Salmonella</i> spp.
Transparentes con centro negro	Algunas <i>Salmonellas</i> y <i>Proteus</i>
Rosadas rojas, medio rojo	<i>Escherichia coli</i> y demás coliformes

### **SELENITO CALDO**

Triptona	5,0 g
Lactosa	4,0 g

Na <sup>2</sup> HPO <sup>4</sup>	10,0 g
Selenito de sodio	4,0 g
Agua destilada	1,0 L

pH = 7,0

Esterilizar en vapor fluente durante 30 minutos. **No autoclavar.**

Este medio se utiliza para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* y, eventualmente, *Shigella sonnei* a partir de alimentos, agua, heces y orina. El medio inhibe el crecimiento de bacterias intestinales coliformes y enterococos. *Salmonella* y *Proteus* son inhibidos en menor grado por el selenito de sodio.

Incubación: 24 horas a 37°C o 6-12 horas a 43°C.

### **SELENITO CISTINA CALDO**

Peptona de caseína	5,0 g
L (-) cistina	0,01 g
Lactosa	4,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
Selenito de sodio	1,0 L

pH = 7,0

Esterilizar por filtración. **No autoclavar.** Si aparece, precipitado rojo, el medio no es utilizable.

Se utiliza para el crecimiento de *Salmonella* a partir de agua, heces y alimentos. Posee más de un agente selectivo (selenito, cistina), lo cual aumenta la recuperación de *Salmonella*, *Shigella* y *Proteus*.

### **SIM AGAR**

Peptona de caseína	20,0 g
Peptona de carne	6,6 g
Citrato de amonio e hierro (III)	0,2 g
Tiosulfato sódico	0,2 g
Agar-agar	3,0 g
Agua destilada	1,0 L

pH = 7,3 ± 0,1

Disolver los ingredientes, distribuir en tubos (aproximadamente 4 cm de altura) y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Dejar solidificar en posición vertical.

Medio de cultivo de ensayo para comprobar la formación de sulfuro, de indol y la motilidad de Enterobacteriáceas.

### **SUERO DE NARANJA (OSA) AGAR**

Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Glucosa	4,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0 g
Suero de naranja	200,0 mL
Agar-agar	17,0 g
Agua destilada	200,0 mL
pH = 5,5	

Esterilizar 15 minutos a 115°C; no sobrecalentar.

Este medio se utiliza para el aislamiento y demostración del número de bacterias de putrefacción ácido tolerantes, en zumos de frutas, sencillos o concentrados, especialmente cítricos.

Por su contenido en suero de naranja, este medio está ajustado a los requisitos de la flora existente en los jugos cítricos; entre los microorganismos mencionados están: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, hongos.

### **SUERO DE NARANJA (OSB) CALDO**

Se prepara como el anterior, omitiendo el agar.

### **SULFITO HIERRO AGAR**

Triptona	10,0 g
Na <sup>2</sup> SO <sup>3</sup>	0,5 g
Citrato de hierro (II)	0,5 g
Agar-agar	25,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,1	

Este medio se utiliza para el aislamiento y la enumeración de clostridios en medios cárnicos.

El medio contiene sulfito, que es una sustancia inhibitoria para otros microorganismos pero no lo es para los clostridios. El *C. perfringens* y otros clostridios reducen el sulfito a sulfuro, el cual reacciona con la sal de hierro para dar FeS negro. La incubación debe realizarse en condiciones de anaerobiosis, 48 horas a 37°C.

Las colonias de clostridios presentan en este medio color pardo oscuro o negro.

### **SULFITO HIERRO NEOMICINA AGAR**

Al agar sulfito hierro fundido y enfriado a 50°C, se le agrega solución de sulfato de neomicina estéril, de manera de obtener en el medio una concentración final de 50 ppm.

La neomicina actúa como agente selectivo, inhibiendo la flora de acompañamiento y permitiendo el crecimiento de *C. perfringens* y otros clostridios.

### **SULFITO POLIMIXINA SULFADIAZINA (SPS) AGAR**

Peptona de caseína	15,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Citrato férrico	0,5 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0,5 g
Sulfato de Polimixina B	0,01 g
Sulfadiazina sódica	0,12 g
Agar-agar	14,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,0	

El medio de cultivo posee antibióticos que inhiben el crecimiento de la flora acompañante de *Clostridium perfringens*, incluso otros reductores de sulfito. El sulfito es reducido a sulfuro, que reacciona con el hierro para dar sulfuro de hierro negro en las colonias. Para la identificación de *C. perfringens* se deben hacer pruebas complementarias.

### **TERMOACIDURANS (TAA) AGAR**

Extracto de levadura	5,0 g
Proteosa peptona	5,0 g
Glucosa	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 g
Agar-agar	20,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 5,0	

Este medio se utiliza para el aislamiento y enumeración de bacterias acidúricas de alteración, principalmente del “flat sour”, que causan alteración en conservas ácidas.

Puede incubarse a 37°C, para recuento total de mesófilas, y a 55°C, para la detección de termófilas, (por ejemplo, el *Bacillus coagulans*). Para la detección de anaerobios se siembra en profundidad en tubos largos.

### **TETRATIONATO CALDO según Mueller-Kauffmann**

Extracto de carne	0,9 g
Peptona de carne	4,5 g
Extracto de levadura	1,8 g
NaCl	4,5 g
CaCO <sub>3</sub>	25,0 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	40,7 g
Bilis de buey desecada	4,75 g
Aditivos: KI, I <sub>2</sub> , Verde Brillante	

Disolver y calentar brevemente (enfriar rápidamente). **No esterilizar en autoclave**. Antes de usar, añadir 20 mL/L de solución de I<sub>2</sub>-KI (5,0 g de I<sub>2</sub> y 6,0 g de KI en un litro de agua destilada); y 10 ml/L de solución al 0,1 % de Verde Brillante.

pH = 7,0±0,1

Este medio de cultivo se utiliza para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* a partir de diversos alimentos.

El tetratiónato inhibe el crecimiento de coliformes y otras bacterias de acompañamiento. En cambio, las bacterias reductoras de tetratiónato, como, por ejemplo, *Salmonella* y *Proteus*, pueden desarrollarse sin obstáculos. El ácido procedente de la reducción del tetratiónato es neutralizado por el carbonato.

Las sales biliares inhiben el crecimiento de microorganismos de presencia no obligatoria en el intestino. El Verde Brillante sirve para reprimir la flora Gram (+). Dado que el Verde Brillante posee un efecto inhibitor muy intenso, se recomienda no agregarlo para obtener un mayor rendimiento.

### **TIOGLICOLATO CALDO**

Extracto de levadura	5,0 g
Peptona	15,0 g
Glucosa	5,5 g
Cistina	0,5 g
NaCl	2,5 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,5 g
Agua destilada	1,0 L

pH = 7,1±0,2

Fraccionar en tubos con tapa de rosca, dejando poco espacio libre. Esterilizar en autoclave.

Si el medio no es utilizado inmediatamente, calentar a ebullición 15 minutos y enfriar rápidamente en el momento de usar.

Se utiliza para el crecimiento de microorganismos anaerobios estrictos. La cistina y el tioglicolato proporcionan una anaerobiosis suficiente, incluso para anaerobios exigentes. Sembrar con pipeta en el fondo del tubo, sin burbujear.

### **TRIPLE AZUCAR HIERRO (TSI) AGAR**

Extracto de carne	3,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	20,0 g
NaCl	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Glucosa	1,0 g
Citrato férrico	0,3 g

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,3 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar-agar	12,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,4	

El medio se coloca en tubos y se solidifica en posición inclinada.

Este medio se utiliza para la identificación de enterobacterias. En este medio se observa la capacidad de los microorganismos para fermentar glucosa, lactosa y sacarosa. La acidificación del medio se pone de manifiesto por el viraje al amarillo del indicador de pH Rojo fenol. El rango de viraje del mismo es pH: 6,8-8,4. A pH alcalino, el medio vira al rojo, a pH ácido, el medio vira al amarillo.

La detección de las reacciones de fermentación depende de los siguientes factores:

- 1) El balance de las concentraciones de azúcares y compuestos nitrogenados. La glucosa está presente en concentración diez veces menor que la lactosa y la sacarosa.
- 2) La difusión lenta de los productos de fermentación ácidos y de los productos alcalinos del metabolismo nitrogenado a través del medio.
- 3) La mayor producción de ácido en la profundidad del tubo (fermentación) comparado con la superficie aerobia (respiración).

Las bacterias que fermentan azúcares más concentrados, lactosa o sacarosa, determinarán la formación de suficiente cantidad de ácido para difundir a través del medio y acidificar incluso la superficie. La degradación de azúcar con formación de ácido se pone de manifiesto por el viraje al amarillo del indicador de pH Rojo fenol. La alcalinización del medio se pone de manifiesto por un viraje al rojo del indicador.

El tiosulfato es reducido por algunos gérmenes a ácido sulfhídrico, que forma sulfuro de hierro negro con la sal férrica presente en el medio. No se recomienda el uso de este medio para la identificación de especies tales como *Citrobacter* o *Proteus*, debido a que la fermentación de sacarosa enmascara la formación de sulfuro de hierro.

### Interpretación

Microorganismos	Color del medio de cultivo		Formación de H <sup>2</sup> S
	Pico de flauta	Fondo	
<i>Salmonella typhi</i>	OA	S	+ solamente en la parte superior de la columna vertical, frecuentemente formación de anillo, eventualmente sólo a las 48 horas.
<i>Salmonella paratyphi A</i>	OA	SG	-
<i>Salmonella cholerae suis</i>	OA	SG	-
<i>Salmonella paratyphi B</i>	OA	SG	+ columna vertical
<i>Salmonella typhimurium</i>	OA	SG	+ columna vertical
<i>Shigella flexneri</i>	OA	S	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	SG	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	SG	-

<i>Escherichia coli</i>	S	SG	-
<i>Citrobacter</i>	S	SG	+
<i>Klebsiella</i>	S	SG	-
<i>Proteus vulgaris</i>	S	SG**	+ verde negruzco
<i>Proteus mirabilis</i>	A/S	SG**	+ verde negruzco
<i>Morganella morganii</i>	OA	SG**	-
<i>Proteus rettgeri</i>	OA	S (A)	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OA	S/SG	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OA*	OA	-
<i>Al. faecalis</i>	OA	OA	-

\* - Eventualmente por formación de pigmento.

\* - muchas cepas A, eventualmente sin producción de gas.

A: viraje al rojo por formación de álcali.

OA: sin alteración del color original del medio de cultivo, o rojo por formación de álcali.

S: viraje al amarillo, por formación de ácido.

SG: viraje al amarillo y producción de gas.

+: ennegrecimiento por formación de H<sub>2</sub>S.

-: ausencia de ennegrecimiento.

### **TRIBUTIRINA AGAR**

Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	5,0 g
Tributirina	10,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,5	

El medio se utiliza para la identificación de microorganismos lipolíticos. La degradación de tributirina produce halos de aclaramiento alrededor de las colonias, en contraste con el resto del medio que permanece turbio. La incubación es de hasta 72 h en condiciones óptimas.

### **TRIPTONA GLUCOSA (GTA) AGAR**

Peptona de caseína	10,0 g
Glucosa	5,0 g
Púrpura de bromocresol	40,0 mg
Agar-agar	12,0 g
Agua destilada	1,0 L

Se utiliza para la enumeración y detección de agentes del “flat sour” en alimentos de acidez baja y media, tanto mesófilos como termófilos.

Si se desea hacer un recuento total de aerobios, se cuentan todas las colonias. El recuento de bacterias del “flat sour” se realiza considerando sólo las colonias rodeadas de un halo amarillo por viraje del indicador, debido a la acidez.

Las bacterias termófilas del “flat sour” (ej. *B. stearothermophilus*) presentan colonias típicamente

circulares, de 2 a 5 mm de diámetro, con centro opaco rodeadas de una zona amarilla debido a la producción de ácido.

### **TRIPTONA GLUCOSA (GTB) CALDO**

Peptona de caseína	10,0 g
Glucosa	5,0 g
Púrpura de bromocresol	40,0 mg
Agua destilada	1,0 L

Este medio se utiliza para la detección de bacterias que causan alteración en conservas de acidez baja y media, tanto mesófilas como termófilas del “flat sour”. Se observa turbidez y viraje al amarillo debido a la acidificación del medio y la presencia del indicador de pH Púrpura de bromocresol.

### **TRIPTONA SULFITO CICLOSERINA (TSC) AGAR**

Triptona	15,0 g
Peptona de soja	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
NaHSO <sub>3</sub>	1,0 g
Citrato de amonio y hierro III	1,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 L

Luego de esterilizar se agrega 10 mL de cicloserina al 5% esterilizada por filtración.

La cicloserina inhibe la flora acompañante de *C. perfringens* cuyas colonias aparecen negras debido a la reducción del sulfito y formación de sulfuro ferroso negro. El medio se utiliza para el aislamiento de *C. perfringens* en alimentos. Deben realizarse pruebas confirmatorias para su identificación.

### **TRIPTONA SULFITO NEOMICINA (TSN) AGAR**

Triptona	15,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Sulfito sódico	1,0 g
Neomicina sulfato	0,05 g
Polimixina B	0,02 g
Citrato férrico	0,5 g
Agar-agar	13,5 g
pH = 7,2±0,2	

Autoclavar durante 10 minutos a 121°C. No volver a calentar. El medio de cultivo preparado debe utilizarse en lo posible en el día.

Con este medio altamente selectivo, es posible realizar una investigación cuantitativa, relativamente rápida de *Clostridium perfringens*.

### **UREA CALDO**

Extracto de levadura	0,1 g
Dihidrogenofosfato potásico	9,1 g
Hidrogenofosfato disódico	9,5 g
Urea	20,0 g
Rojo fenol	0,01 g

En este medio de cultivo sólo crecen aquellos microorganismos que pueden utilizar urea como única fuente de carbono. Los gérmenes que utilizan urea producen un viraje del indicador hacia el rojo y turbidez del medio de cultivo.

### **UVM CALDO**

Peptona Proteosa	5,0 g
Triptona	5,0 g
“Lab Lemco” Polvo	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
NaCl	20,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,35 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,0 g
Esculina	1,0 g
Acido Nalidíxico (2% en 0,1 M NaOH)	1,0 mL
Clorhidrato de acriflavina	12,0 mg
Agua destilada	1,0 L
pH = 7,2	

Autoclavar a 121°C, 15 minutos Este medio se utiliza para el enriquecimiento selectivo de *Listeria*. La combinación de diferentes peptonas, extractos, sales y sustancias tampón permite un buen crecimiento de *Listeria*. La selectividad del medio viene dada por el ácido nalidíxico y el clorhidrato de acriflavina, que son sustancias inhibidoras del crecimiento.

### **VERDE BRILLANTE 2% SALES BILIARES (BRILA) CALDO**

Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	20,0 g
Verde Brillante	13,3 mg
Agua destilada	1,0 l
pH = 7,2	

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacterias coliformes. La bilis y el Verde Brillante se utilizan para inhibir el crecimiento de la flora acompañante, inclusive *C. perfringens* (degradador de lactosa). La fermentación de la lactosa con producción de gas indica la presencia de coliformes. La investigación se realiza en tubos de fermentación.

Se incuba 48 h a 37°C para coliformes totales y 48 h a 44,5°C para coliformes fecales.

#### **VERDE BRILLANTE ROJO FENOL LACTOSA SACAROSA (BPLS) AGAR**

Extracto de levadura	3,0 g
Proteosa peptona	10,0 g
NaCl	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Rojo fenol	80,0 mg
Verde Brillante	12,5 mg
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 l
pH = 6,9	

Este medio se utiliza para el aislamiento de Salmonellas. Contiene Verde Brillante como agente selectivo, que inhibe el crecimiento de bacterias Gram (+), permitiendo el desarrollo sin restricciones de coliformes. El rojo fenol vira al rojo en medio alcalino y al amarillo en medio ácido, lo que lleva a distinguir las colonias fermentadoras de las no fermentadoras de lactosa. Las colonias de Salmonellas son pequeñas translúcidas o incoloras y el medio a su alrededor vira al rojo debido a que no fermentan lactosa. Las colonias de coliformes aparecen grandes, cremosas y de color amarillo; el medio vira al amarillo verdoso.

#### **VERDE BRILLANTE ROJO FENOL LACTOSA SACAROSA (BPLS) AGAR MODIFICADO**

Peptona de carne	10,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
NaK <sup>2</sup> PO <sup>4</sup>	0,6 g
Na <sup>2</sup> H PO <sup>4</sup>	1,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Rojo fenol	90,0 mg
Verde Brillante	4,7 mg
Agar-agar	12,0 g
Agua destilada	1,0 l
pH = 6,9 ± 0,1	

Este medio se utiliza para la demostración de *Salmonella*, excepto *S. typhi* y *Shigella*, en carnes,

derivados cárnicos y otros alimentos.

La flora acompañante Gram positiva, así como *S. typhi* y *Shigella* resultan muy reprimidos por el Verde Brillante. Para la inhibición del grupo *Proteus* se recomienda la adición de 0,2% de desoxicolato de sodio. Puesto que las Salmonellas no degradan lactosa ni sacarosa, se diferencian de la flora acompañante lactosa y/o sacarosa positiva. La degradación de los azúcares con formación de ácido se pone de manifiesto por el viraje del indicador Rojo fenol al amarillo.

Se obtiene un rendimiento óptimo en Salmonellas realizando un enriquecimiento previo en Caldo Tetrionato según Mueller-Kauffmann durante 18 h a 43°C. A continuación, se siembra en superficie sobre agar BPLS y se incuba 18-24 h a 37°C.

<b>Colonias</b>	<b>Microorganismos</b>
Rojas, con halo luminoso	<i>Salmonella</i> , <i>Proteus</i> (sin dispersión)
	<i>Pseudomonas</i> (colonias pequeñas y dentadas)
Amarillas, con halo opaco	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> y otros

### **XILOSA LISINA DESOXICOLATO (XLD) AGAR**

Extracto de levadura	3,0 g
L-lisina	5,0 g
Xilosa	3,75 g
Lactosa	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Desoxicolato de sodio	2,5 g
Citrato de amonio y hierro	0,8 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
NaCl	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Rojo fenol	80,0 mg
Agua destilada	1,0 l
pH = 7,4	

Este medio se utiliza para el aislamiento de enterobacteriáceas patógenas, especialmente *Salmonella* y *Shigella*.

La degradación de los azúcares se pone de manifiesto por el viraje al amarillo del indicador Rojo fenol. Las bacterias que descarboxilan la lisina con formación de cadaverina se reconocen por un color rojo púrpuro alrededor de las colonias.

Incubación: 48 horas a 37°C.

### **YGC AGAR**

Extracto de levadura	5,0 g
D(+)-glucosa	20,0 g
Cloranfenicol	0,1 g
Agar-agar	14,9 g
pH = 6,6±0,2	

Esterilizar en autoclave, 15 minutos a 121°C.

Agar selectivo para la enumeración y aislamiento de mohos y levaduras en leche, productos lácteos y otros alimentos.

Las prácticas que se realizan en los laboratorios presentan riesgos propios de cada actividad. Las reglas básicas aquí indicadas son un conjunto de normas destinadas a proteger la salud de los alumnos y a evitar accidentes y contaminaciones tanto dentro del ámbito de trabajo, como hacia el exterior.

Es un elemento clave en la seguridad la información que permita reconocer y minimizar o evitar los riesgos presentes en el laboratorio. Será fundamental respetar la metodología de cada técnica, y trabajar con cuidado y en forma ordenada.

### MEDIDAS GENERALES

1. Se deberá conocer la ubicación de los elementos de seguridad en el lugar de trabajo, tales como: matafuegos, salidas de emergencia, mantas ignífugas, lavaojos, gabinete para contener derrames, accionamiento de alarmas, etc.
2. No se debe comer, beber, fumar o maquillarse en el laboratorio.
3. No se debe guardar alimentos en heladeras que contengan drogas o preparados.
4. Se debe utilizar vestimenta apropiada para realizar trabajos de laboratorio, guardapolvo abrochado (preferentemente de algodón y de mangas largas) y zapatos cerrados. Evitar el uso de accesorios colgantes (aros, pulseras, collares, etc.). Llevar el cabello recogido.
5. Las mesadas de trabajo, deben estar despejadas, sin libros, ni abrigos ni objetos personales. Es imprescindible mantener el orden y la limpieza. Cada persona es responsable directa de la zona que le ha sido asignada y de todos los lugares comunes.
6. Las manos deben lavarse cuidadosamente después de cualquier manipulación de laboratorio y antes de retirarse del mismo.
7. Se deben utilizar guantes apropiados para evitar el contacto con sustancias química o material biológico. Toda persona cuyos guantes se encuentren contaminados no deberá tocar objetos, ni superficies, tales como: teléfono, lapiceras, manijas de cajones o puertas, cuadernos, etc.
8. No se permite correr en los laboratorios.
9. No se deben bloquear las rutas de escape o pasillos con bancos, sillas, equipos, máquinas u otros elementos que entorpezcan la correcta circulación.

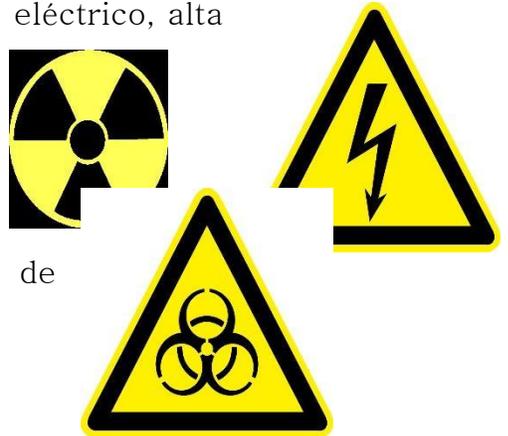
10. De aviso inmediato al docente responsable si encuentra instalaciones eléctricas y de gas precarias o provisionarias.

11. No utilice equipos (Ej. Rotavap, columnas de destilación, sonicadores, hornos etc.) sin haber recibido entrenamiento previo y sin supervisión durante su uso.

12. Toda herida o abrasión, aún los pequeños cortes que puedan producirse durante el trabajo práctico deben ser informados al Docente. Los laboratorios cuentan con un botiquín de primeros auxilios con los elementos indispensables para atender casos de emergencia.

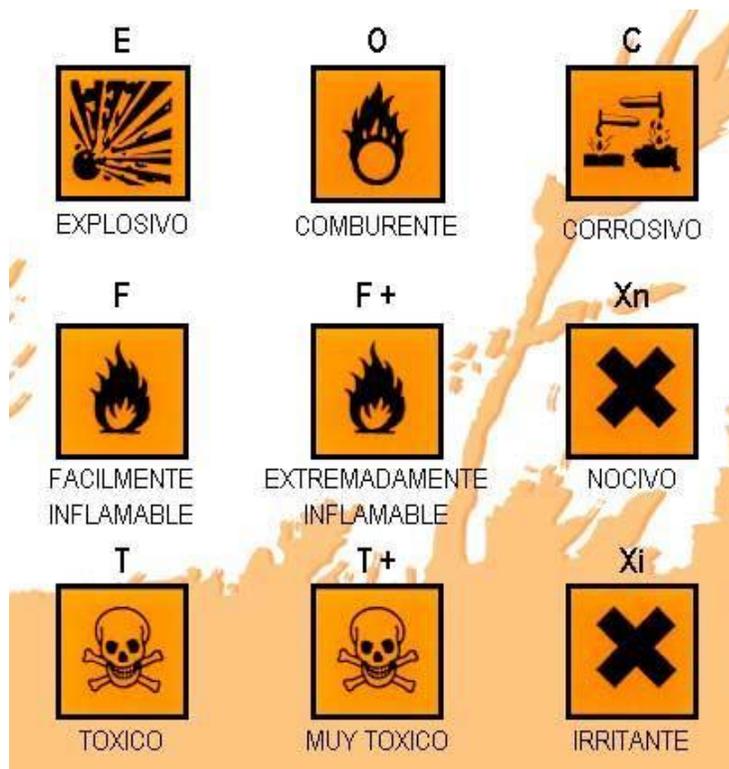
13. Respete las señales de advertencia. (ej.: riesgo eléctrico, alta temperatura, radiaciones, etc.)

14. Todo residuo generado debe colocarse en los recipientes destinados para tal fin según las indicaciones del docente (ver Pautas para Gestión de Residuos)



## LABORATORIOS DE QUÍMICA

1. No se permite pipetear con la boca.
2. Siempre que sea necesario proteger los ojos y la cara de salpicaduras o impactos se utilizarán anteojos de seguridad, viseras o pantallas faciales u otros dispositivos de protección. Cuando se manipulen productos químicos que emitan vapores o puedan provocar proyecciones, se evitará el uso de lentes de contacto.
3. No utilice el contenido de un recipiente que no esté identificado. Los envases que contengan agentes químicos deben adecuadamente etiquetados con la denominación del compuesto y el tipo de riesgo (Ej.: corrosivo, tóxico, inflamable, oxidante, radiactivo, explosivo o nocivo).



4. Cuando sea necesario manipular grandes cantidades de materiales inflamables (más de 5 litros) deberá tenerse a mano un extintor apropiado para ese material en cuestión.
5. Al almacenar sustancias químicas se debe considerar las incompatibilidades que dan lugar a reacciones peligrosas. Consultar con el Docente.
6. No almacenar en estantes sobre mesadas sustancias corrosivas y en caso de ácidos o álcalis concentrados (mayor de 2N) deben ser mantenidos en bandejas de material adecuado.
7. Las prácticas que produzcan gases, vapores, humos o partículas, y que puedan ser riesgosas por inhalación deben llevarse a cabo bajo campana.

8. Se debe verificar la ausencia de vapores inflamables antes de encender una fuente de ignición.
9. No se debe trabajar con materiales inflamables o solventes sobre llamas directas o cerca de las mismas. Para calentamiento, sólo se utilizarán resistencias eléctricas o planchas calefactoras blindadas. Se prestará especial atención al punto de inflamación y de autoignición del producto.
10. Está prohibido descartar líquidos inflamables o tóxicos o corrosivos por los desagües de las piletas, sanitarios o recipientes comunes para residuos. Se deben seguir las pautas para la gestión de residuos.
11. Los cilindros de gases comprimidos y licuados deben estar en posición vertical sujetos con correas o cadenas a la pared en sitios de poca circulación, de ser posible fuera del lugar de trabajo, protegidos de la humedad y fuentes de calor.
12. El material de vidrio roto no se depositará con los residuos comunes. Será conveniente envolverlo en papel y ubicarlo en cajas resistentes.
13. Todo recipiente que hubiera contenido agentes químicos puede ser descartado junto a los residuos comunes vaciado totalmente, enjuagado apropiadamente y sin etiquetas.
14. Está terminantemente prohibido hacer experimentos no autorizados por el Docente. No substituya nunca un producto químico por otro en una práctica.

## LABORATORIOS DE BIOLOGIA

1. Leer Reglas Básicas para Laboratorios de Química.
2. Se deben utilizar mascarillas descartables cuando exista riesgo de producción de aerosoles (mezcla de partículas en medio líquido) o polvos durante operaciones de pesada de sustancias tóxicas o biopatógenas, apertura de recipientes con cultivos después de agitación, etc.
3. Está prohibido descartar material biológico por los desagües de las piletas, sanitarios o recipientes comunes para residuos. En cada caso se deberán seguir los procedimientos establecidos para la gestión de residuos.
4. La superficie de trabajo se deberá descontaminar una vez terminadas las tareas o luego de cada derrame de material viable, utilizando productos probadamente efectivos contra los agentes con que se trabaja.
5. El derrame o caída de muestras contaminadas, diluciones y medios sembrados o inoculados será informada al docente de inmediato. Se procederá a tratar el área afectada con la solución desinfectante que corresponda, la cual se dejará actuar y se recogerá con papel absorbente que será luego descartado con los residuos patogénicos.
6. En caso de rotura del recipiente de vidrio que contiene microorganismos, proceder de igual forma pero no tocar los residuos antes que el desinfectante haya actuado.

7. Cuando proceda a la limpieza de una superficie con alcohol, verifique que no haya mecheros encendidos.
8. Consulte con el Docente si el material biológico debe ser descontaminado previo a su descarte en recipiente de residuos patogénicos (bolsa roja).

## PAUTAS PARA LA GESTIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS Y PATOGENICOS

Peligrosos (ácidos, álcalis, oxidantes, corrosivos, guantes, trapos, etc.):

Los residuos líquidos se deberán acumular en bidones provistos por el Servicio de Higiene y Seguridad. Mantenerlos tapados. No mezclar sin consultar al Docente. Los residuos sólidos se deberán acumular en bolsas negras dentro de cajas provistas por el Servicio de Higiene y Seguridad. No tirar residuos domésticos.

Patogénicos (tips, guantes, cajas de petri, etc.):

Los residuos biológicos (sangre, tejidos animales o humanos y todo el material que haya estado en contacto con ellos) se deberán acumular en bolsas rojas dentro de cestos con tapa provistos por el Servicio de Higiene y Seguridad. Quedan exceptuados los elementos corto-punzantes (agujas, hojas de bisturíes), que se recogerán en contenedores especiales.

### **ANTE CUALQUIER DUDA CONSULTE CON EL DOCENTE**

La seguridad la disfrutamos todos. Actuemos responsablemente

## PAUTAS DE ACTUACIÓN EN CASO DE EMERGENCIAS

En caso de accidente, avisar inmediatamente al Docente.
---

### EMERGENCIAS MÉDICAS

Si ocurre una emergencia tal como cortes o abrasiones, quemaduras o ingestión accidental de algún producto químico, tóxico o peligroso, se deberá proceder en la siguiente forma:

1. A los accidentados se les proveerá los primeros auxilios
2. Se da aviso al Departamento de Seguridad y Control (Int. 58311 Emergencias)
3. El Docente responsable del turno o una autoridad del Departamento, deberá completar el Formulario de Incidentes y enviarlo al Servicio de Higiene y Seguridad para su conocimiento y evaluación.

### CENTROS PARA REQUERIR AYUDA MÉDICA

*S.A.M.E. Teléfono 107*

*Hospital Pirovano*

Av. Monroe 3555 Tel. 4542-5552 / 9279

### *INTOXICACIONES:*

*Hospital de Niños. Dr. R. Gutiérrez*

Sánchez de Bustamante 1399. Capital Federal. Tel: 4962-6666.

Hospital de Niños. Dr. P. de Elizalde

Av. Montes de Oca 40 Tel. 4307-7491 Toxicología 4300-2115

### *QUEMADURAS:*

Hospital de Quemados

P. Goyena 369 Tel. 4923-4082 / 3022

### **OFTALMOLOGÍA**

Hospital Santa Lucía

San Juan 2021 Tel. 4941-7077

Hospital Dr. P. Lagleyze

Av. Juan B. Justo 4151 Tel. 4581-0645 / 2792

#### 1. Quemaduras.

Las pequeñas quemaduras producidas por material caliente, baños, placas o mantas calefactoras, etc., se tratan lavando la zona afectada con agua fría durante 10-15 minutos. Las quemaduras más graves requieren atención médica inmediata. No utilices cremas y pomadas grasas en las quemaduras graves.

#### 2. Cortes.

Los cortes se tienen que lavar bien, con abundante agua corriente, durante 10 minutos como mínimo. Si son pequeños y dejan de sangrar en poco tiempo, lávalos con agua y jabón y tápalos con una venda o apósito adecuados. Si son grandes y no paran de sangrar, requiere asistencia médica inmediata.

#### 3. Derrame de productos químicos sobre la piel.

Los productos químicos que se hayan vertido sobre la piel han de ser lavados inmediatamente con agua corriente abundante, como mínimo durante 15 minutos. Es necesario sacarle toda la ropa contaminada a la persona afectada lo antes posible. El lavado es muy importante para reducir la gravedad y la extensión de la herida. Requiere asistencia médica.

#### 4. Actuación en caso de producirse corrosiones en la piel.

Por ácidos. Sacar o cortar lo más rápidamente posible la ropa. Lavar con agua corriente abundante la zona afectada. Neutralizar la acidez con bicarbonato sódico durante 15-20 minutos. Esperar la asistencia médica.

Por álcalis. Lavar la zona afectada con agua corriente abundante y luego con una solución saturada de ácido bórico. Secar y esperar la asistencia médica.

#### 5. Fuego en el cuerpo.

Si se te incendia la ropa, pide ayuda. El afectado no correrá, tiene que tirarse en el suelo y rodar sobre sí mismo para apagar las llamas. Es tu responsabilidad ayudar a alguien que se esté quemando. Cubrirlo con una manta antifuego, conducirlo hasta la ducha de seguridad, si está cerca. No utilices nunca un extintor sobre una persona. Una vez apagado el fuego, mantener a la persona tendida, hasta que llegue la asistencia médica.

#### 6. Actuación en caso de producirse corrosiones en los ojos.

En este caso el tiempo es esencial (menos de 10 segundos). Cuanto antes se lave el ojo, menos grave será el daño producido. Lavar los dos ojos con agua corriente abundante durante 15 minutos como mínimo en una ducha de ojos, o con solución fisiológica. Es necesario mantener los ojos abiertos con la ayuda de los dedos para facilitar el lavado debajo de los párpados. Es necesario recibir asistencia médica, por pequeña que parezca la lesión.

#### 7. Actuación en caso de ingestión de productos químicos.

Antes de cualquier actuación concreta pide asistencia médica. Si el paciente está inconsciente, ponerlo en posición inclinada, con la cabeza de lado. Si está consciente, mantenerlo apoyado. No dejarlo sólo. No provocar el vómito si el producto ingerido es corrosivo.

#### 8. Actuación en caso de inhalación de productos químicos.

Identificar el vapor tóxico. Si se trata de un gas, utilizar el tipo adecuado de máscara para gases durante el tiempo que dure el rescate del accidentado. No arriesgarse. Conducir inmediatamente la persona afectada a un sitio con aire fresco. Requiere asistencia médica lo antes posible. Ante el primer síntoma de dificultad respiratoria, iniciar la respiración artificial boca a boca.

### INCENDIOS

#### 1. Fuego en el laboratorio.

Mantenga la calma.

Informe al docente responsable.

Se dará aviso inmediatamente al Dpto. de Seguridad y Control (Interno 58311) informando el lugar y las características del siniestro

#### 2. Fuegos pequeños

Si el fuego es pequeño y localizado, y sabe utilizar un extintor, trate de apagarlo utilizando un extintor adecuado, arena, o cubriendo el fuego con un recipiente de tamaño adecuado que lo ahogue.

Retirar los productos químicos inflamables que estén cerca del fuego.

No utilices nunca agua para extinguir un fuego provocado por la inflamación de un solvente.

### 3. Fuegos grandes

Si el fuego es de consideración, no se arriesgue y manteniendo la calma ponga en marcha el plan de evacuación. Apague los equipos eléctricos y cierre las llaves de gas y ventanas.

Acate las indicaciones de los brigadistas.

Evacue la zona por la ruta asignada.

No corra, camine rápido, cerrando a su paso la mayor cantidad de puertas. No utilice ascensores. Descienda siempre que sea posible.

No lleve consigo objetos, pueden entorpecer su salida.

Si pudo salir por ninguna causa vuelva a entrar. Deje que los equipos especializados se encarguen.

### ☞ DERRAME MAYORES DE PRODUCTOS QUÍMICOS

– Avise al Departamento de Seguridad y Control (int. 58311 o ext. 5285-8311 Emergencias)

– Atender a cualquier persona que pueda haber sido afectada.

– Notificar a las personas que se encuentren en las áreas cercanas acerca del derrame. Buscar los elementos en el Gabinete para contener derrames.

– Coloque la cinta de demarcación para advertir el peligro.

– Evacuar a toda persona no esencial del área del derrame.

– Si el derrame es de material inflamable, apagar las fuentes de ignición, y las fuentes de calor.

– Evite respirar los vapores del material derramado, si es necesario utilizar una máscara respiratoria con filtros apropiados al tipo de derrame.

– Ventilar la zona.

– Utilizar los elementos de protección personal tales como equipos de ropa resistente a ácidos, bases y solventes orgánicos y guantes.

– Confinar o contener el derrame, evitando que se extienda. Para ello extender los cordones en el contorno del derrame.

– Luego absorber con los paños sobre el derrame.

– Deje actuar y luego recoger con pala y colocar el residuo en la bolsa roja (patogénicos) o negra (peligrosos) y ciérrela.

- Si el derrame es de algún elemento muy volátil deje dentro de la campana hasta que lo retire para su disposición.
  - Disponer la bolsa con los residuos (consultar al Servicio de Higiene y Seguridad, int. 58174)
  - Lave el área del derrame con agua y jabón. Seque bien.
  - Cuidadosamente retire y limpie todos los elementos que puedan haber sido salpicados por el derrame.
  - Lave los guantes, la máscara y ropa.
-

Fecha: .....

Declaro haber leído las REGLAS BÁSICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD EN  
LABORATORIOS DE QUÍMICA Y BIOLOGÍA – PROCEDIMIENTOS ANTE  
EMERGENCIAS que aparecen en la guía de Trabajos Prácticos de la  
Materia .....

Turno de Laboratorio: .....

Firma:.....

Aclaración:.....

L.U. N°: .....

# **BROMATOLOGÍA**

## **GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS**

### **LICENCIATURA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**2022**

## **PROGRAMA DE BROMATOLOGÍA**

### **UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES LICENCIATURA EN CIENCIAS QUIMICAS**

**FACULTAD:** Ciencias Exactas y Naturales

**DEPARTAMENTO:** Química Orgánica - Área Bromatología

**MATERIA:** Bromatología

**CARACTER:** Obligatorio

1 Alimento: calidad y nutrición. Atributos de calidad y seguridad. Legislación alimentaria. Funciones específicas que cumplen los distintos tipos de nutrientes en el organismo. Requerimientos de energía. Balance energético. Nutrientes esenciales. Fibra dietaria. Concepto de calidad nutricional de proteínas.

2 Agua. Propiedades físicas del agua. Importancia en la manifestación de las propiedades funcionales de los componentes alimentarios. Interacciones agua-soluto. Presión de vapor relativa, movilidad molecular y estabilidad de alimentos.

3 Hidratos de carbono. Azúcares de importancia en alimentos. Polisacáridos. Almidones: Gelatinización, retrogradación. Almidones modificados. Sustancias pécticas. Gomas. Aplicaciones en alimentos. Propiedades físicas y funcionales de azúcares y polisacáridos.

4 Proteínas. Reacciones de importancia en alimentos. Cambios físicos, químicos y nutricionales que ocurren durante el procesado. Propiedades funcionales: espumante, emulsificante, gelificante, espesante, formadora de masa panificable y otras. Enzimas en los alimentos: ejemplos de actividad enzimática en tejidos vegetales y animales. Pardeo enzimático.

5 Lípidos. Ácidos grasos esenciales. Propiedades físicas, y funcionales. Cristalización. Polimorfismo. Propiedades funcionales de los lípidos: rol en la percepción del flavor, plasticidad y otras.

6 Propiedades sensoriales de los alimentos. Componentes que imparten color, aroma, gusto. Pigmentos naturales: ejemplos y ocurrencia, características, solubilidad, estabilidad. .

7 Métodos analíticos de uso general en Bromatología. Necesidad de normalización de las técnicas. Preparación y toma de muestra. Determinaciones físicas. Fundamento de los métodos para determinar hidratos de carbono, sustancias nitrogenadas, minerales, vitaminas y lípidos. Criterios de selección de métodos, causas de error e interferencia. Expresión de los resultados y su interpretación.

9 Aditivos alimentarios. Definición. Clasificación general y usos. Requisitos para su utilización en alimentos: inocuidad, justificación de su uso, aceptación por la legislación vigente. Estimación de los niveles probablemente seguros para el ser humano: ingesta diaria admisible. Beneficios y riesgos de su utilización.

10 Leche. Definición. Composición química. Propiedades físicas. Estabilidad. Características físicas y fisicoquímicas relacionadas con el estado higiénico y la genuinidad. Valor nutritivo. Legislación.

11 Carnes. Estructura y composición del músculo. Cambios bioquímicos post-mortem. Maduración de la carne. Características de las carnes frescas. Factores que influyen en la calidad. Alteraciones.

12 Alteraciones físicas, químicas y biológicas de materias primas y productos alimenticios. Clasificación de alteraciones: físicas, químicas y biológicas. Ejemplos y discusión de cada una. Reacciones de pardeamiento no enzimático. Reacciones de hidrólisis y oxidación de lípidos. Factores que influyen en las alteraciones. Alteraciones consecutivas, ejemplos.

## **BIBLIOGRAFIA**

### **Libros generales**

- Badui Dergal, Salvador. Química de los alimentos. Pearson Educación, 4a. ed. 2006
- Baltes, Werner. Química de los alimentos. Acribia, Zaragoza, 2007
- Belitz, H.D. y Grosch, W., Food Chemistry, 4ª ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009.
- Belitz, H.D. y Grosch, W., Química de los alimentos, 2ª ed., Acribia, Zaragoza, 1997.
- Coultate, T.P., Alimentos: Química de sus componentes, Acribia, Zaragoza, 1986.
- Fennema, O (Ed.), Food Chemistry, 3ª ed., Marcel Dekker Inc., New York., 1996.
- Fennema, O. (Ed.), Química de los alimentos, Acribia, Zaragoza, 1993.
- Otles, S., Handbook of Food Analysis Instruments. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, Estados Unidos, 2009.
- Potter, N.W. y Hotchkiss, J.H., Ciencia de los alimentos, Acribia, Zaragoza, 1998.
- Schwartzberg, H.G. & Hartel, R.W., Physical chemistry of foods, Marcel Dekker, New York, 1992.
- Wong, D.W.S., Química de los alimentos: mecanismos y teoría, Acribia, Zaragoza, 1995.
- Yildiz, Fatih.; Advances in food biochemistry, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2010.

### **Libros de temas específicos**

- Alais, C., Ciencia de la leche, Reverté, Barcelona, 1985.
- Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th ed., 2000.
- Belton, Peter S. The chemical physics of food. Blackwell Pub, Oxford, 2007.
- Boekenoogen, H.A., Analysis and Characterization of Oils, Fats and Fat Products, Vol.1 y 2, Interscience Pub., 1964.
- Branen, A.L., Davidson, P.M. y Salminen, S., eds., Food additives, Marcel Dekker, New York, 1990.
- Cui, Steve W. (ed.) Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications. Taylor and Francis, Boca Raton, 2005.
- Damodaran, S. y Paraf, A., Food proteins and their applications. Marcel Dekker, New York, 1997.
- Derache, R., Toxicología y seguridad de los alimentos, Omega, Barcelona, 1990.
- Egan, H., Kirk, R.S. y Sawyer, R., Análisis químico de los alimentos de Pearson, Ed.Continental, México, 1987.
- Eliasson, A.C., Carbohydrates in foods, Marcel Dekker, New York, 1996.
- Fisher, C, Scott, T.R. Flavores de los alimentos: Biología y química, 1a. ed. Anaya Multimedia, Madrid, 2000.
- Forrest, J.C.; Aberle, E.D.; Hedrick, H.B.; Judge, M.D.; Merkel, R.A., Fundamentos de la ciencia de la carne, Acribia, Zaragoza, 1979.
- Gunstone, F. y Padley, F.B., Lipid technologies and applications, Marcel Dekker, New York, 1997.
- Gunstone, F., Fatty acid and lipids chemistry, Blackie Academic & Professional, London, 1996.
- Hart, F.L. y Fisher, H.J., Análisis moderno de los alimentos, 2ª reimpresión, Acribia, Zaragoza, 1991.

- Hosney, R.C., Principios de ciencia y tecnología de los cereales, Acribia, Zaragoza, 1991.
- Hui, Yiu H. (ed.). Handbook of food science, technology and engineering. CRC Press, Boca Raton, 2006.
- Kent, N.L., Tecnología de los cereales, 2a. ed., Acribia, Zaragoza, 1987.
- Multon, J.L., Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias, 2ª ed., Acribia, Zaragoza, 1998.
- Nielsen, S. Suzanne. Análisis de los alimentos. Acribia, Zaragoza: 2009.
- Ötles, Semih. Handbook of food analysis instruments. CRC Press, Boca Raton, FL: 2009.
- Pearson, D., Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos, 2ª reimpresión, Acribia, Zaragoza, 1986.
- Pomeranz, Y y Meloan, C.E., Food Analysis: Theory and Practice, 3rd ed., Chapman & Hall, New York., 1994.
- Pomeranz, Y., Modern cereal science and technology, VCH Pub., New York, 1987.
- Prandl, O.; Fischer, A.; Schimdhoffer, T. y Sinell, H.J., Tecnología e higiene de las carnes, Acribia, Zaragoza, 1994.
- Walstra, P. y Jenness, R., Química y física lactológica, Acribia, Zaragoza, 1987.
- Willard, H.H., Merritt, L.L. y Dean, J.A., Métodos instrumentales de análisis, Compañía Editorial Continental, 1985.

#### **Páginas web de interés**

- Código Alimentario Argentino actualizado. <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>
- Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca. <http://www.minagri.gob.ar/site/index.php>
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasa.gov.ar/indexhtml.php>
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. <http://inta.gob.ar/>
- Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/Food/default.htm>
- Joint Expert Committee on Food Additives. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/search.html?lang=es>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [http://www.fao.org/index\\_es.htm](http://www.fao.org/index_es.htm)
- Unión Europea, legislación sobre alimentos. [http://ec.europa.eu/food/food/foodlaw/index\\_es.htm](http://ec.europa.eu/food/food/foodlaw/index_es.htm)
- Normas internacionales sobre alimentos. <http://www.codexalimentarius.org/codex-home/es/>

**REGLAS BÁSICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD PARA ALUMNOS DE LABORATORIOS DE QUÍMICA Y BIOLOGÍA - PAUTAS DE ACTUACION EN CASOS DE EMERGENCIAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES - SERVICIO DE HIGIENE Y SEGURIDAD

Las prácticas que se realizan en los laboratorios presentan riesgos propios de cada actividad. Las reglas básicas aquí indicadas son un conjunto de normas destinadas a proteger la salud de los alumnos y a evitar accidentes y contaminaciones tanto dentro del ámbito de trabajo, como hacia el exterior.

Es un elemento clave en la seguridad la información que permita reconocer y minimizar o evitar los riesgos presentes en el laboratorio. Será fundamental respetar la metodología de cada técnica, y trabajar con cuidado y en forma ordenada.

**MEDIDAS GENERALES**

1. Se deberá conocer la ubicación de los elementos de seguridad en el lugar de trabajo, tales como: matafuegos, salidas de emergencia, mantas ignífugas, lavaojos, gabinete para contener derrames, accionamiento de alarmas, etc.
2. No se debe comer, beber, fumar o maquillarse en el laboratorio.
3. No se debe guardar alimentos en heladeras que contengan drogas o preparados.
4. Se debe utilizar vestimenta apropiada para realizar trabajos de laboratorio, guardapolvo abrochado (preferentemente de algodón y de mangas largas) y zapatos cerrados. Evitar el uso de accesorios colgantes (aros, pulseras, collares, etc.) y cabello recogido.
5. Las mesadas de trabajo, deben estar despejadas, sin libros, ni abrigos ni objetos personales. Es imprescindible mantener el orden y la limpieza. Cada persona es responsable directa de la zona que le ha sido asignada y de todos los lugares comunes.
6. Las manos deben lavarse cuidadosamente después de cualquier manipulación de laboratorio y antes de retirarse del mismo.
7. Se deben utilizar guantes apropiados para evitar el contacto con sustancias química o material biológico. Toda persona cuyos guantes se encuentren contaminados no deberá tocar objetos, ni superficies, tales como: teléfono, lapiceras, manijas de cajones o puertas, cuadernos, etc.
8. No se permite correr en los laboratorios.
9. No se deben bloquear las rutas de escape o pasillos con bancos, sillas, equipos, máquinas u otros elementos que entorpezcan la correcta circulación.
10. De aviso inmediato al docente responsable si encuentra instalaciones eléctricas y de gas precarias o provisionarias.
11. No utilice equipos (Ej. Rotavap, columnas de destilación, sonicadores, hornos etc.) sin haber recibido entrenamiento previo y sin supervisión durante su uso.
12. Toda herida o abrasión, aún los pequeños cortes que puedan producirse durante el trabajo práctico deben ser informados al Docente. Los laboratorios cuentan con un botiquín de primeros auxilios con los elementos indispensables para atender casos de emergencia.
13. Respete las señales de advertencia. (ej.: riesgo eléctrico, alta temperatura, radiaciones, etc.)
14. Todo residuo generado debe colocarse en los recipientes destinados para tal fin según las indicaciones del docente (ver Pautas para Gestión de Residuos)



### LABORATORIOS DE QUÍMICA

1. No se permite pipetear con la boca.
2. Siempre que sea necesario proteger los ojos y la cara de salpicaduras o impactos se utilizarán anteojos de seguridad, viseras o pantallas faciales u otros dispositivos de protección. Cuando se manipulen productos químicos que emitan vapores o puedan provocar proyecciones, se evitará el uso de lentes de contacto.
3. No utilice el contenido de un recipiente que no esté identificado. Los envases que contengan agentes químicos deben adecuadamente etiquetados con la denominación del compuesto y el tipo de riesgo (Ej.: corrosivo, tóxico, inflamable, oxidante, radiactivo, explosivo o nocivo).



4. Cuando sea necesario manipular grandes cantidades de materiales inflamables (más de 5 litros) deberá tenerse a mano un extintor apropiado para ese material en cuestión.
5. Al almacenar sustancias químicas se debe considerar las incompatibilidades que dan lugar a reacciones peligrosas. Consultar con el Docente.
6. No almacenar en estantes sobre mesadas sustancias corrosivas y en caso de ácidos o álcalis concentrados (mayor de 2N) deben ser mantenidos en bandejas de material adecuado.
7. Las prácticas que produzcan gases, vapores, humos o partículas, y que puedan ser riesgosas por inhalación deben llevarse a cabo bajo campana.
8. Se debe verificar la ausencia de vapores inflamables antes de encender una fuente de ignición.
9. No se debe trabajar con materiales inflamables o solventes sobre llamas directa o cerca de las mismas. Para calentamiento, sólo se utilizarán resistencias eléctricas o planchas calefactoras blindadas. Se prestará especial atención al punto de inflamación y de autoignición del producto.

10. Está prohibido descartar líquidos inflamables o tóxicos o corrosivos por los desagües de las piletas, sanitarios o recipientes comunes para residuos. Se deben seguir las pautas para la gestión de residuos.

11. Los cilindros de gases comprimidos y licuados deben estar en posición vertical sujetos con correas o cadenas a la pared en sitios de poca circulación, de ser posible fuera del lugar de trabajo, protegidos de la humedad y fuentes de calor.

12. El material de vidrio roto no se depositará con los residuos comunes. Será conveniente envolverlo en papel y ubicarlo en cajas resistentes,

13. Todo recipiente que hubiera contenido agentes químicos puede ser descartado junto a los residuos comunes vaciado totalmente, enjuagado apropiadamente y sin etiquetas.

14. Está terminantemente prohibido hacer experimentos no autorizados por el Docente. No substituya nunca, un producto químico por otro en una práctica.

### LABORATORIOS DE BIOLOGIA

1. Leer Reglas Básicas para Laboratorios de Química.

2. Se deben utilizar mascarillas descartables cuando exista riesgo de producción de aerosoles (mezcla de partículas en medio líquido) o polvos, durante operaciones de pesada de sustancias tóxicas o biopatógenas, apertura de recipientes con cultivos después de agitación, etc.

3. Está prohibido descartar material biológico por los desagües de las piletas, sanitarios o recipientes comunes para residuos. En cada caso se deberán seguir los procedimientos establecidos para la gestión de residuos.

4. La superficie de trabajo se deberá descontaminar una vez terminadas las tareas o luego de cada derrame de material viable, utilizando productos probadamente efectivos contra los agentes con que se trabaja.

5. El derrame o caída de muestras contaminadas, diluciones y medios sembrados o inoculados será informada al docente de inmediato. Se procederá a tratar el área afectada con la solución desinfectante que corresponda, la cual se dejará actuar y se recogerá con papel absorbente que será luego descartado con los residuos patogénicos.

6. En caso de rotura del recipiente de vidrio que contiene microorganismos, proceder de igual forma, pero no tocar los residuos antes que el desinfectante haya actuado.

7. Cuando proceda a la limpieza de una superficie con alcohol, verifique que no haya mecheros encendidos.

8. Consulte con el Docente si el material biológico debe ser descontaminado previo a su descarte en recipiente de residuos patogénicos (bolsa roja).

### PAUTAS PARA LA GESTIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS Y PATOGENICOS

Peligrosos (ácidos, álcalis, oxidantes, corrosivos, guantes, trapos, etc.):

Los residuos líquidos se deberán acumular en Bidones provistos por el Servicio de Higiene y Seguridad. Mantenerlos tapado. No mezclar sin consultar al Docente.

Los residuos sólidos se deberán acumular en bolsas negras dentro de cajas provistas por el Servicio de Higiene y Seguridad. No tirar residuos domésticos.

Patogénicos (tips, guantes, cajas de petri, etc.):

Los residuos biológicos (sangre, tejidos animales o humanos y todo el material que haya estado en contacto con ellos) se deberán acumular en bolsas rojas dentro de cestos con tapa provistos

por el Servicio de Higiene y Seguridad. Quedan exceptuados los elementos corto-punzantes (agujas, hojas de bisturíes), que se recogerán en contenedores especiales.

**ANTE CUALQUIER DUDA CONSULTE CON EL DOCENTE**

*La seguridad la disfrutamos todos. Actuemos responsablemente*

**PAUTAS DE ACTUACIÓN EN CASO DE EMERGENCIAS**

En caso de accidente, avisar inmediatamente al Docente.

☞ **EMERGENCIAS MÉDICAS**

Si ocurre una emergencia tal como cortes o abrasiones, quemaduras o ingestión accidental de algún producto químico, tóxico o peligroso, se deberá proceder en la siguiente forma:

1. A los accidentados se les proveerá los primeros auxilios
2. Se da aviso al Departamento de Seguridad y Control (Int. 58311 Emergencias)
3. El Docente responsable del turno o una autoridad del Departamento, deberá completar el Formulario de Incidentes y enviarlo al Servicio de Higiene y Seguridad para su conocimiento y evaluación.

**CENTROS PARA REQUERIR AYUDA MEDICA**

S.A.M.E. Teléfono 107

Hospital Pirovano

Av. Monroe 3555 Tel. 4542-5552 / 9279

**INTOXICACIONES:**

Hospital de Niños. Dr. R. Gutiérrez

Sánchez de Bustamante 1399. Capital Federal. Tel: 4962-6666.

Hospital de Niños. Dr. P. de Elizalde

Av. Montes de Oca 40 Tel. 4307-7491 Toxicología 4300-2115

**QUEMADURAS:**

Hospital de Quemados

P.Goyena 369 Tel. 4923-4082 / 3022

**OFTALMOLOGÍA**

Hospital Santa Lucía

San Juan 2021 Tel. 4941-7077

Hospital Dr. P. Lagleyze

Av. Juan B. Justo 4151 Tel. 4581-0645 / 2792

**1. Quemaduras.**

Las pequeñas quemaduras producidas por material caliente, baños, placas o mantas calefactoras, etc., se tratarán lavando la zona afectada con agua fría durante 10-15 minutos. Las quemaduras más graves requieren atención médica inmediata. No utilices cremas y pomadas grasas en las quemaduras graves.

**2. Cortes.**

Los cortes se tienen que lavar bien, con abundante agua corriente, durante 10 minutos como mínimo. Si son pequeños y dejan de sangrar en poco tiempo, lávalos con agua y jabón y tápalos con una venda o apósito adecuados. Si son grandes y no paran de sangrar, requiere asistencia médica inmediata.

### 3. Derrame de productos químicos sobre la piel.

Los productos químicos que se hayan vertido sobre la piel han de ser lavados inmediatamente con agua corriente abundante, como mínimo durante 15 minutos. Es necesario sacarle toda la ropa contaminada a la persona afectada lo antes posible. El lavado es muy importante para reducir la gravedad y la extensión de la herida. Requiere asistencia médica.

### 4. Actuación en caso de producirse corrosiones en la piel.

Por ácidos. Sacar o cortar lo más rápidamente posible la ropa. Lavar con agua corriente abundante la zona afectada. Neutralizar la acidez con bicarbonato sódico durante 15-20 minutos. Esperar la asistencia médica.

Por álcalis. Lavar la zona afectada con agua corriente abundante y luego con una solución saturada de ácido bórico. Secar y esperar la asistencia médica.

### 5. Fuego en el cuerpo.

Si se te incendia la ropa, pide ayuda. El afectado no correrá, tiene que tirarse en el suelo y rodar sobre sí mismo para apagar las llamas. Es tu responsabilidad ayudar a alguien que se esté quemando. Cubrirlo con una manta anti fuego, conducirlo hasta la ducha de seguridad, si está cerca. No utilices nunca un extintor sobre una persona. Una vez apagado el fuego, mantener a la persona tendida, hasta que llegue la asistencia médica.

### 6. Actuación en caso de producirse corrosiones en los ojos.

En este caso el tiempo es esencial (menos de 10 segundos). Cuanto antes se lave el ojo, menos grave será el daño producido. Lavar los dos ojos con agua corriente abundante durante 15 minutos como mínimo en una ducha de ojos, o con solución fisiológica. Es necesario mantener los ojos abiertos con la ayuda de los dedos para facilitar el lavado debajo de los párpados. Es necesario recibir asistencia médica, por pequeña que parezca la lesión.

### 7. Actuación en caso de ingestión de productos químicos.

Antes de cualquier actuación concreta pide asistencia médica. Si el paciente está inconsciente, ponerlo en posición inclinada, con la cabeza de lado. Si está consciente, mantenerlo apoyado. No dejarlo sólo. No provocar el vómito si el producto ingerido es corrosivo.

### 8. Actuación en caso de inhalación de productos químicos.

Identificar el vapor tóxico. Si se trata de un gas, utilizar el tipo adecuado de máscara para gases durante el tiempo que dure el rescate del accidentado. No arriesgarse. Conducir inmediatamente la persona afectada a un sitio con aire fresco. Requiere asistencia médica lo antes posible. Ante el primer síntoma de dificultad respiratoria, iniciar la respiración artificial boca a boca.



## INCENDIOS

### 1. Fuego en el laboratorio.

Mantenga la calma.

Informe al docente responsable.

Se dará aviso inmediatamente al Dpto. de Seguridad y Control (Interno 58311) informando el lugar y las características del siniestro

### 2. Fuegos pequeños

Si el fuego es pequeño y localizado, y sabe utilizar un extintor, trate de apagarlo utilizando un extintor adecuado, arena, o cubriendo el fuego con un recipiente de tamaño adecuado que lo ahogue.

Retirar los productos químicos inflamables que estén cerca del fuego.

No utilices nunca agua para extinguir un fuego provocado por la inflamación de un solvente.

### 3. Fuegos grandes

Si el fuego es de consideración, no se arriesgue y manteniendo la calma ponga en marcha el plan de evacuación. Apague los equipos eléctricos y cierre las llaves de gas y ventanas.

Acate las indicaciones de los brigadistas.

Evacue la zona por la ruta asignada.

No corra, camine rápido, cerrando a su paso la mayor cantidad de puertas. No utilice ascensores. Descienda siempre que sea posible.

No lleve consigo objetos, pueden entorpecer su salida.

Si pudo salir por ninguna causa vuelva a entrar. Deje que los equipos especializados se encarguen.

## ☞ DERRAME MAYORES DE PRODUCTOS QUÍMICOS

- Avise al Departamento de Seguridad y Control (int.58311 Emergencias)
- Atender a cualquier persona que pueda haber sido afectada.
- Notificar a las personas que se encuentren en las áreas cercanas acerca del derrame. Buscar los elementos en el Gabinete para contener derrames.
- Coloque la cinta de demarcación para advertir el peligro.
- Evacuar a toda persona no esencial del área del derrame.
- Si el derrame es de material inflamable, apagar las fuentes de ignición, y las fuentes de calor.
- Evite respirar los vapores del material derramado, si es necesario utilizar una máscara respiratoria con filtros apropiados al tipo de derrame.
- Ventilar la zona.
- Utilizar los elementos de protección personal tales como equipos de ropa resistente a ácidos, bases y solventes orgánicos y guantes.
- Confinar o contener el derrame, evitando que se extienda. Para ello extender los cordones en el contorno del derrame.
- Luego absorber con los paños sobre el derrame.
- Deje actuar y luego recoger con pala y colocar el residuo en la bolsa roja (patogénicos) o negra (peligrosos) y ciérrela.
- Si el derrame es de algún elemento muy volátil deje dentro de la campana hasta que lo retire para su disposición.
- Disponer la bolsa con los residuos (consultar al Servicio de Higiene y Seguridad, int 58174)
- Lave el área del derrame con agua y jabón. Seque bien.
- Cuidadosamente retire y limpie todos los elementos que puedan haber sido salpicados por el derrame.
- Lave los guantes, la máscara y ropa.

Fecha: .....

Declaro haber leído las REGLAS BÁSICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD EN LABORATORIOS DE QUÍMICA Y BIOLOGÍA – PROCEDIMIENTOS ANTE EMERGENCIAS que aparecen en la guía de Trabajos Prácticos de la Materia

.....

Turno de Laboratorio: .....

Firma:.....

Aclaración:.....

L.U. N°: .....

**Lista de materiales personales para el trabajo en el laboratorio de Bromatología:**

- Guardapolvos
- Libreta de laboratorio
- Anteojos de seguridad
- Espátula metálica
- Pera de goma
- Algodón
- Alcohol
- Marcador de vidrio
- Detergente
- Repasador o trapo rejilla
- Pañuelos de papel

### CRONOGRAMA DE CLASES

Fecha	Clase	Tema
16-ago	Teórica	Nutrición y legislación Leche
23-ago	Teórica	Agua Carne
30-ago	TP	Entrega de cajones y parcialito Leche/carne
06-sep	TP	Leche Carne
13-sep	TP	Leche Carne
20-sep	TP	Leche Carne
27-sep	Teórica	Proteínas Enzimas y aditivos
		Consultas
<b>11-oct</b>	<b>1º PARCIAL</b>	
18-oct	Teórica	Hidratos de carbono Polisacáridos
25-oct	Teórica	Sensorial y pigmentos Lípidos 1 y 2
01-nov	Teórica	Lípidos 3
	TP	Parcialito y TP miel/aceites
08-nov	TP	Miel Aceites
15-nov	TP	Miel Aceites
22-nov	TP	Miel Aceites
		Consultas
<b>29-nov</b>	<b>2º PARCIAL</b>	

## REGIMEN DE APROBACION DE TRABAJOS PRACTICOS 2º CUATRIMESTRE 2022

- Se permitirá un máximo de **2 (dos) ausentes** a las clases (teóricas y prácticas) durante todo el cuatrimestre. La asistencia se tomará a los 15 minutos del horario de inicio de la clase; en caso de llegar más tarde, el alumno podrá realizar trabajos en el laboratorio, pero se lo considerará como ausente.
- La aprobación de los trabajos prácticos incluye la realización de las prácticas de laboratorio y los exámenes parciales. Asimismo, deberá devolverse tanto el material de uso común como la totalidad del material de uso individual entregado a principios de cuatrimestre.

### PRÁCTICAS DE LABORATORIO

- La aprobación de las prácticas de laboratorio requiere:
  - a) la aprobación de un interrogatorio inicial,
  - b) la realización del trabajo experimental y,
  - c) la aprobación de un informe final escrito.
- En caso de desaprobación el interrogatorio inicial deberá rendirse nuevamente y no podrá continuar con la práctica hasta su aprobación.
- El interrogatorio inicial se rendirá previamente a la realización del trabajo práctico en forma oral. En caso de desaprobación, deberá rendirse nuevamente.
- Los análisis mal informados podrán repetirse una única vez. No se podrá exceder en todo el cuatrimestre en 2 (dos) el número de resultados mal informados luego de su repetición.
- No podrá iniciarse una práctica hasta tanto no haya sido aprobada la práctica anterior

### PARCIALES

- Para rendir el parcial deben estar aprobadas las prácticas correspondientes al mismo.
- Se tomarán 2 (dos) parciales con temas de los trabajos prácticos, que serán aprobados con un mínimo de 6 (seis) puntos cada uno. Si el alumno no alcanzara el puntaje mínimo para aprobar o si hubiese estado ausente, podrá recuperar él o los parciales en cuestión en la fecha de recuperatorio. Cada parcial podrá ser recuperado sólo una vez.

**PROMOCIÓN OPCIONAL:** en la misma fecha de los parciales prácticos, se podrán rendir los parciales teóricos. Para poder promocionar la materia, los parciales deberán ser aprobados con más de 7 (siete) puntos y con un promedio de 8 (ocho) puntos.

## **INTERROGATORIOS INICIALES**

### **PARTE 1**

#### **Determinación de componentes mayoritarios de alimentos**

Fundamento de todas las determinaciones realizadas en TPs. Normas de higiene y seguridad a tener en cuenta durante las prácticas. Legislación argentina. Composición global de los alimentos. Contenido de agua. Contenido de grasa. Nitrógeno total y proteína bruta.

#### **Leche.**

Definición. Composición química, propiedades físicas, evaluación del estado higiénico y del tratamiento térmico.

#### **Productos cárneos.**

Definición de carne. Nociones sobre composición de carne fresca y chacinados. Evaluación de resultados y conclusiones sobre genuinidad y estado higiénico. Evidencias o conjeturas sobre adulteraciones.

---

### **PARTE 2**

#### **Productos azucarados**

Miel. Definición del CAA. Características generales. Composición. Parámetros de calidad fijados por el CAA relacionados con la genuinidad y el estado higiénico. Fundamento de las técnicas incluidas en la guía de TP. Normas de higiene y seguridad a tener en cuenta durante la práctica. Legislación argentina.

Muestra: la provee la cátedra.

#### **Lípidos**

Generalidades de composición, propiedades funcionales y reacciones de oxidación de lípidos. Técnicas para medir la oxidación de lípidos. Fundamentos de las determinaciones incluidas en la guía de TP. Normas de higiene y seguridad a tener en cuenta durante la práctica. Legislación argentina.

Muestra: la provee la cátedra.

## MODELO DE INFORME

Informe N°  
Fecha de entrega:  
Nombre y apellido:

## NOMBRE DE LA PRÁCTICA

Muestra analizada.....  
Características:.....

### DETERMINACIONES REALIZADAS:

- a) Nombre de la determinación (referencia de la metodología)  
Resultado obtenido
- b) Nombre de la determinación (referencia de la metodología)  
Resultado obtenido

### CONCLUSIONES

- a) Código Alimentario Argentino  
Registrar las especificaciones de esta norma respecto de determinaciones físico químicas para este tipo de alimento (o el más parecido). Comparar con los resultados obtenidos.
- b) En caso de contar con el rotulado,  
Copiar los valores dados en el rotulado nutricional y comparar con los resultados obtenidos.

---

## ANEXO DE DATOS DE LABORATORIO

### DETERMINACIONES REALIZADAS

- a) Nombre de la determinación  
Datos de laboratorio (masa de muestra, pesadas, diluciones, etc.)  
Resultado obtenido
- b) Nombre de la determinación  
Datos de laboratorio (masa de muestra, pesadas, diluciones, etc.)  
Resultado obtenido

### OBSERVACIONES

## **PARTE 1**

### **LECHE**

#### **Leche fluida**

##### **Finalidad del análisis**

Las determinaciones que se realizan comúnmente en el análisis físico-químico de la leche, permiten comprobar si sus valores responden a los característicos de composición genuina, poner al descubierto alteraciones y adulteraciones o fraudes e indicar (entre ciertos límites) el estado de conservación.

Un examen rutinario incluye frecuentemente las determinaciones de densidad, grasa, sólidos totales, acidez, descenso crioscópico, estimación del estado higiénico (ensayos de azul de metileno o resazurina).

##### **Preparación de la muestra de leche fluida (AOAC 925.21, 2000)**

Antes de tomar porciones para el análisis, llevar la muestra a aproximadamente 20°C y mezclar por trasvase a otro recipiente limpio, repitiendo la operación hasta asegurar una muestra homogénea. Si no han desaparecido los grumos de crema, entibiar la muestra en baño de agua hasta casi 38°C, mezclar y luego enfriar a 15-20°C. En caso de tener que medir un volumen para alguna determinación, llevar la muestra a esa temperatura antes de pipetear.

##### **Densidad**

Puede determinarse con balanza hidrostática, picnómetro o lactodensímetro, a la temperatura de 15°C.

##### **Determinación de densidad con lactodensímetro (AOAC 925.22, 2000)**

Se vierte la leche preparada para el análisis, en un recipiente cilíndrico, evitando formación de espuma e incorporación de aire. Introducir el lactodensímetro de modo que ocupe la parte central del líquido, se espera a que alcance el nivel correspondiente y luego se lee la densidad cuidando que el visual enrase con la superficie libre de la leche. Leer la temperatura.

Un tipo difundido de lactodensímetro, es el Quevenne, cuyo vástago con escala graduada comprende valores entre 15 y 40 que corresponden a las milésimas de densidad por encima de la unidad, es decir, que el número 32 del lactodensímetro indica la densidad 1,032.

El instrumento está calibrado a 15°C y a esa temperatura, por lo tanto, el número leído representa la densidad de la leche. A temperaturas diferentes, debe recurrirse a tablas especiales de corrección.

Cuando la discrepancia con respecto a los 15°C no es mucha (no más de  $\pm 5^\circ\text{C}$ ), se puede obtener la corrección sumando o restando 0,0002 a la densidad hallada, o bien 0,2 a los grados leídos en el lactodensímetro, por cada grado de temperatura respectivamente superior o inferior a 15°C.

##### **Extracto seco (Sólidos totales) (AOAC, 925.23, 2000)**

Lo constituye el residuo remanente de la evaporación de las materias volátiles de la leche a la temperatura de ebullición del agua.

A un cristizador de diámetro no menor de 5 cm se agrega arena calcinada de manera que quede una capa delgada en el fondo del mismo. El conjunto se seca en estufa a 100°C durante 1 hora, se enfría y tara, luego se agregan al cristizador 5,0 mL de leche, exactamente medidos, y se pesa nuevamente. Evaporar en baño de agua hirviendo durante 10-15 min., exponiendo a la acción del vapor la máxima superficie posible del fondo del recipiente. Colocar luego en estufa de 98-100°C, secando hasta constancia de peso. En todos los casos enfriar en desecador y pesar rápidamente. Referir el residuo a % en volumen de muestra, informándolo como "sólidos totales".

## **Materia grasa**

### **Método de Gerber** (CAA, Tomo II, 13-8, 1989)

Este método volumétrico, muy difundido en el control de rutina de leche, en especial, y de productos lácteos en general, consiste en la separación de la materia grasa por disolución en ácido sulfúrico de todos los componentes, seguida por centrifugación en tubos especialmente calibrados.

El método emplea también alcohol amílico, que ayuda a romper la emulsión de las grasas y previene la carbonización de las mismas.

Reactivos:

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para Gerber (dens. 1,813-1,817 a 20 - aprox. 90 %)
- Alcohol amílico puro (dens. 0,809-0,813 a 20°C), libre de grasa, comprobado por un ensayo en blanco.

Medir con pipeta 11 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para Gerber e introducirlos en el butirómetro evitando mojar las paredes internas del cuello. Luego, agregar con rapidez 11,0 mL de leche con pipeta aforada, cuidando que forme un estrato encima del ácido y no se mezcle con él, e inmediatamente agregar 1 mL de alcohol amílico. Se tapa el butirómetro con el tapón especial correspondiente y se agita en forma efectiva, pero con cuidado (\*), teniendo en cuenta que se produce una fuerte elevación de la temperatura. Se coloca el butirómetro en un baño de agua a 65-70°C por 5-10 min. (con el tapón hacia abajo). Retirado del baño, se seca exteriormente y se centrifuga 3-5 min. La centrifuga consiste en un plato chato en el cual, mediante tubos metálicos, se adaptan los butirómetros dispuestos de forma tal que los tapones de cierre queden dirigidos hacia afuera y la porción graduada hacia el eje de la centrífuga. Se vuelve al baño de agua por 4-5 min., se lee inmediatamente el espesor de la capa de grasa acumulada en la parte superior calibrada del butirómetro. Por ajuste adecuado del tapón de cierre, se puede hacer coincidir la base de la columna de grasa con el cero de la escala. Leyendo a la altura del menisco de la columna de grasa, se obtiene directamente el % de grasa de leche. Si no es posible ajustar la superficie inferior de la columna de grasa a cero, se ajusta a la marca de % completo más próxima, y se tiene en cuenta al efectuar la lectura del menisco superior.

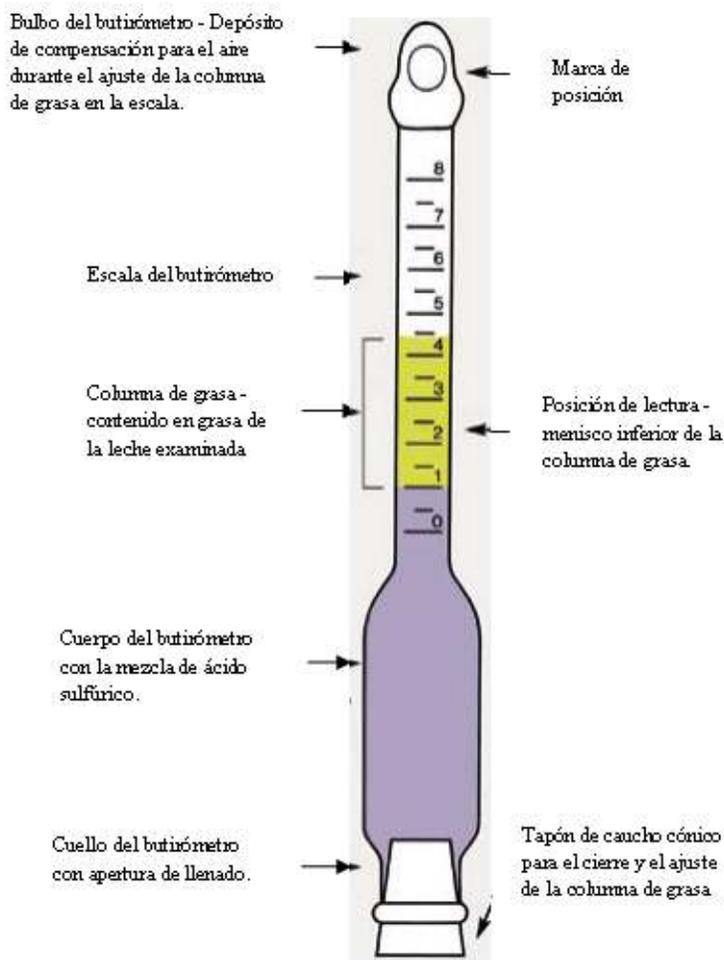
La lectura del butirómetro corresponde a % g de grasa por 100 cm<sup>3</sup> de leche.

Si se verificara aguado en la leche analizada, deberá recalcularse el % de grasa para determinar si existe desgrasado respecto del tenor graso especificado en el CAA para la leche analizada.

(\*) Para proteger la mano del calor que se desprende, conviene tomar el butirómetro con un trapo, sujetando con el dedo pulgar el tapón de goma, con firme presión. Los tres líquidos del interior se mezclan volteando varias veces el butirómetro. En algunos casos, se forman coágulos albuminoides que persisten; los mismos se eliminan agitando (siempre con precaución) fuertemente, después de un tiempo prudencial.

Nota 1: Siendo dificultosa la separación de los glóbulos pequeños de grasa en leches "homogeneizadas", se recomienda volver a centrifugar después de calentar en baño de 65-70°C, procediendo así hasta que la lectura alcance un máximo.

Nota 2: Se recomienda la realización de este ensayo por duplicado simultáneo, sirviendo cada butirómetro como mutuo contrapeso para el equilibrio de la centrífuga.



*Esquema de Butirómetro de Gerber*

### **Extracto seco no graso (CAA, Tomo II, 13.9, 1989)**

Se determina por diferencia de los valores porcentuales de extracto seco y de grasa, obtenidos anteriormente (a la hora de calcular esta diferencia tener en cuenta que las unidades del extracto seco y de grasa sean coherentes).

El valor del extracto seco no graso (ESNG) constituye un valor bastante constante para todas las leches, debido a que dentro del conjunto de sustancias que forman el extracto seco total, el tenor graso es el más variable.

Si el valor de % ESNG hallado resultara inferior al especificado en el CAA, deberá calcularse el % de aguado como:

$$\% \text{ de aguado} = 100 * \frac{(\% \text{ESNG}_{\text{CAA}} - \% \text{ESNG})}{\% \text{ESNG}_{\text{CAA}}}$$

### **Acidez (AOAC, 947.05, 2000)**

La leche fresca, en estado normal, no contiene prácticamente ácido láctico. Al determinarse la acidez total, el gasto de álcali es debido al CO<sub>2</sub> disuelto, fosfatos ácidos, proteínas (principalmente caseína), y citratos ácidos contenidos en la leche. El ácido láctico producido durante el "agriado", se debe fundamentalmente a la acción de microorganismos del tipo de los estreptococos lácticos, sobre la lactosa.

Reactivos:

- Solución de NaOH 0,05 N valorada.
- Solución de fenolftaleína 0,5 % en etanol 95 %.

Medir con pipeta aforada, 10,0 mL de muestra y colocarlos un Erlenmeyer pequeño (utilizar para titular un fondo blanco detrás) Añadir 4 gotas de fenolftaleína. Titular con bureta de 10,0 mL con NaOH 0,1 N hasta aparición de color rosa débil persistente (utilizar como contraste un fondo blanco).

Los resultados se expresan en ácido láctico % de muestra (p/v).

Para expresar la acidez en grados Dornic (forma corriente en la industria láctea), se multiplica por 100 el resultado anterior.

Si se verificara aguado en la leche analizada, deberá recalcularse la acidez para comparar con la especificación del CAA para este parámetro.

### **Determinación de pH (CAA, Tomo II, 13.10, 1989)**

Se medirá el pH con pH-metro. Se realiza la calibración del equipo por medio de buffers adecuados (pH 4,00 - 7,00), y luego se procede directamente a la medición del valor de pH correspondiente a la muestra en estudio. (Consultar al personal docente para el uso del equipo).

### **Análisis de la Fosfatasa Alcalina**

La determinación de fosfatasa alcalina está destinada a decidir si un producto lácteo ha sido pasteurizado en condiciones de tiempo y temperatura adecuadas. El CAA y las Normas Mercosur exigen que la prueba de fosfatasa alcalina en productos lácteos dé negativa.

#### **• Fundamento del método:**

La determinación de actividad fosfatasa se basa en la hidrólisis enzimática, en medio alcalino, del fenilfosfato disódico (NaFF) a fenol y posterior determinación colorimétrica del fenol liberado con 4-aminoantipirina (4-aminofenazona) y ferricianuro como agente oxidante.

Reactivos

- solución sustrato: NaFF (1,4 mM) en buffer de pH 10 de aminometilpropanol (3 M) y 4-aminoantipirina (29 mM). Conservar en heladera durante no más de 5 meses.

- reactivo de color: ferricianuro de K (10 mM). Estable durante 5 meses a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

Procedimiento:

Preincubar 0,5 mL de solución de sustrato unos minutos a 37 °C. Luego, agregar 50 µl de muestra, mezclar e incubar exactamente 10 min. Agregar 2,5 mL de reactivo de color y retirar los tubos del baño.

El producto final se detecta por una reacción colorimétrica cualitativa. Debe hacerse un ensayo en blanco en las mismas condiciones con la misma leche previamente hervida y enfriada.

### **Leche en polvo**

#### **Determinación de materia grasa. Método de Rose-Gottlieb (A.O.A.C., 989.05, 2000)**

La determinación de materia grasa se realizará en base a una modificación del método de Rose Gottlieb utilizado en leche. Por razones de organización en el laboratorio de T.P. esta determinación deberá realizarse A PRIMERA HORA.

Se pesan 0,5 g de muestra en un papel satinado previamente tarado (lo más pequeño posible). Encerrarla parcialmente en el papel para que tome contacto con los reactivos, e introducirla hasta el fondo de una probeta de 50 mL con tapa. Agregar 5 mL de agua y agitar hasta que la muestra se disuelva (si es necesario, calentar en baño María a 60°C).

Enfriar y adicionar 1 mL de NH<sub>4</sub>OH conc. Agitar y agregar 5 mL de etanol. Agitar y agregar con pipeta aforada 10 mL de éter etílico. Agitar 30 segundos y agregar, también con pipeta aforada, 10 mL de éter de petróleo. Volver a agitar y leer bien el volumen total de la mezcla. Dejar reposar en heladera por lo menos dos horas para que se separen las fases (hay que evitar la evaporación de solventes; si esto ocurriera se notará una disminución en el volumen leído). Con pipeta aforada tomar 10 mL de la fase superior etérea y evaporarlos en un pequeño cristizador tarado. Dejar enfriar en desecador, pesar y expresar % de grasas teniendo en cuenta la alícuota que se pipeteó.

#### **Reactivos**

- NH<sub>4</sub>OH concentrado
- Etanol
- Éter etílico
- Éter de petróleo

El método original es el que se detalla a continuación:

Pesar una cantidad adecuada de muestra en el Mojonnier previamente tarado. En el caso de muestras sólidas o semisólidas diluir con agua a 10 mL aproximadamente para disolver la muestra. Si es necesario, calentar en baño María a 60°C

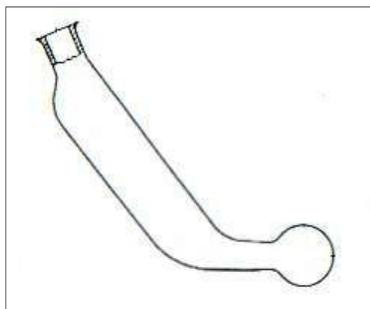
Enfriar, adicionar 1,5 mL de NH<sub>4</sub>OH y agitar. Adicionar 3 gotas de fenolftaleína para facilitar la visualización de la interfase entre el éter y el agua durante la extracción. Adicionar 10 mL de etanol, tapar y agitar durante 15 segundos.

Para la primera extracción agregar 25 ml de éter etílico, tapar el recipiente y agitar vigorosamente durante 1 minuto destapando para liberar la presión si fuera necesario. Agregar

25 mL de éter de petróleo, tapar y repetir la agitación 1 minuto. Centrifugar a 600 rpm. Trasvasar la solución etérea, cuidando de no volcar parte de la fase acuosa, a un Erlenmeyer esmerilado de 250 mL previamente pesado.

Para la segunda extracción adicionar 5 mL de etanol, tapar y agitar 15 segundos. Agregar 15 mL de éter etílico y agitar 1 minuto. Agregar 15 mL de éter de petróleo y agitar 1 minuto nuevamente. Centrifugar a 600 rpm y volcar la solución etérea al Erlenmeyer junto con el primer extracto.

Repetir una tercera extracción omitiendo el agregado de etanol. Evaporar el solvente en evaporador rotatorio. Colocar luego en estufa a 100°C durante 30 minutos. Dejar enfriar en desecador y pesar.



Tubo de extracción Mojonnier

### Acidez

Reactivos:

- Solución de NaOH 0,1 N valorada.
- Solución de fenolftaleína 0,5 % en etanol 95 %.

Se pesan 5 g de la muestra y se colocan en un matraz Erlenmeyer, se llevan a 100 mL con agua destilada (hervida y enfriada) y se agitan vigorosamente (utilizar para titular un fondo blanco detrás). Añadir 4 gotas de fenolftaleína. Titular con bureta de 10,0 mL con NaOH 0,1 N hasta aparición de color rosa débil persistente (utilizar como contraste un fondo blanco).

Los resultados se expresan como mL NaOH 0,1 N/ 10 g sólidos no grasos.

### Contenido de agua. Método de Karl Fischer.

La determinación de humedad es importante porque está relacionada con la estabilidad del polvo durante el almacenamiento. Se determinará por titulación automática empleando un equipo titulador Karl Fisher TIM980 Titration Manager.

Es un método volumétrico de aplicación general, esto es, para cualquier tipo de alimento, y en particular para los que presentan un bajo contenido en agua, tales como margarina, leche en polvo o aceite. Además, permite determinar el agua tanto libre (solvente) como aquella que interactúa fuertemente con los sólidos.

El método se basa en la reacción estequiométrica entre el SO<sub>2</sub> y el I<sub>2</sub> en presencia de agua:



### **Dispersabilidad y Humectabilidad**

La instantaneidad de la leche en polvo, que se define como la capacidad de transformarse en un producto líquido cuando se le agrega agua, depende de propiedades tales como la humectabilidad (tiempo de humectación), solubilidad y dispersabilidad.

### **Dispersabilidad – Adaptación de la norma FIL 89:1979**

Es la cantidad (masa) de muestra que puede ser dispersada en agua, expresada como % (m/m). Una porción de muestra de leche en polvo de humedad conocida se esparce uniformemente sobre una superficie de agua a 25 °C, luego de agitar manualmente durante un tiempo determinado se filtra en tamiz, determinándose el contenido de sólidos totales del líquido filtrado. El cálculo de la dispersabilidad se realiza a partir de la masa pesada para el ensayo, el valor de la humedad de la muestra y el contenido de sólidos totales del líquido filtrado.

#### **Toma de muestra:**

La muestra debe ser acondicionada a 25 °C.

-Leche en polvo entera:  $34 \pm 0,1$  g

-Leche en polvo descremada:  $26 \pm 0,1$  g

Pesar exactamente, según sea la porción indicada para cada tipo de muestra en un cristalizador de 8 mm de diámetro sin pico vertedor (consultar con docente). Tapar con placa de vidrio. Pesar 250 g  $\pm$  0,1 g de agua en vaso de precipitado de 600 mL limpio y seco. Colocar sobre el vaso la placa de vidrio con el cristalizador y la muestra. Ubicar la muestra en el centro del vaso de precipitado, retirar cuidadosamente la placa de vidrio de manera tal que la leche en polvo caiga paulatinamente sobre la superficie del agua. Agitar suavemente con movimientos completos, adelante y atrás (un movimiento por segundo) durante 20 segundos con espátula, rotando (360°) el vaso de precipitado de forma tal que se evite la acumulación de polvo en las paredes del mismo (ayudarse con la espátula). Luego de pasados los 20 segundos dejar reposar durante 30 segundos más y filtrar en tamiz. Mezclar el líquido filtrado y tomar 10 mL del mismo y colocarlo en una caja de Petri previamente tarada. Secar en una estufa a 105°C por 2 h. La dispersabilidad (% m/m) se calcula por diferencia de peso (el peso de la muestra en base seca, según humedad determinada por Karl Fischer)

### **Humectabilidad – Adaptación de la norma FIL 89:1979**

Es el tiempo en segundos que se requiere para que una porción de muestra de leche en polvo se humedezca totalmente cuando se coloca en una superficie de agua. Una porción de muestra de leche en polvo de humedad conocida se esparce uniformemente sobre la superficie del agua del mismo modo que se realizó en el ensayo de dispersabilidad. Se mide el tiempo que se requiere para que todas las partículas de la muestra se humedezcan.

Proceder de la misma manera que se realizó en dispersibilidad pero pesar 10 g de muestra. El cronómetro comienza a funcionar una vez que la muestra esté sobre la placa de vidrio, luego de

60 segundos se retira la placa, detener el cronómetro una vez que toda la muestra se encuentre húmeda. Se informa en unidades de tiempo (segundos).

### Isoterma de sorción de agua

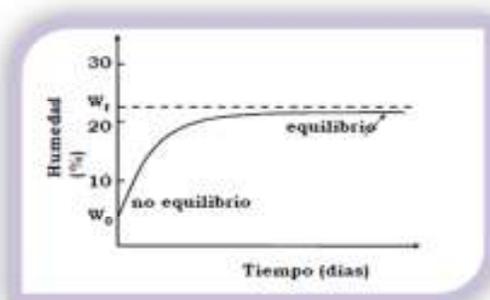
Se construirán isotermas de sorción de agua a 20°C de leche en polvo entera y descremada por el método isopiéctico. Los valores se obtendrán a partir de muestras equilibradas a distintas humedades relativas (En el trabajo práctico se trabajará con las muestras ya equilibradas, o sea a partir del punto 3 mencionado más abajo).

Procedimiento para construir una isoterma:

1. Se coloca una porción de leche en polvo en distintos de secadores en presencia de soluciones saturadas de sales proveyendo diferentes humedades relativas (HR):

Sal	HR, % (a 20°C)
Acetato de Potasio	22
Cloruro de Magnesio	33
Carbonato de Potasio	43
Nitrato de Magnesio	53
Cloruro de Sodio	75

2. Se almacenan las muestras durante 15 días hasta llegar al equilibrio:



3. Se determina el contenido de agua por el método de Karl Fischer previamente descripto.
4. Se grafican las isotermas de ambos tipos de leche y se comparan los resultados.

## **PRODUCTOS CÁRNEOS**

### **Finalidad del análisis**

El examen veterinario y bacteriológico de las carnes y derivados, es irremplazable, y resulta de fundamental importancia para apreciar el estado higiénico de las mismas, siendo completado por la realización de algunos exámenes físico y químicos.

Para carnes, el análisis de su composición química tiene interés desde el punto de vista nutricional. En el caso de productos cárneos tales como los chacinados, el análisis químico permite, además, controlar el cumplimiento de las disposiciones alimentarias vigentes y, por otra parte, poner al descubierto determinados fraudes o adulteraciones.

Para los chacinados frescos resultan de interés las determinaciones del contenido en agua, grasas, nitrógeno total, cenizas, sal y almidón; pudiendo necesitarse llevar a cabo, también, test para otros posibles ingredientes como colorantes, conservadores, etc.

### **Preparación de la muestra (AOAC, 983.18, 2000)**

En el caso de salchichas y otros embutidos se analiza el contenido sin la piel (para ello se retira el material que interesa con una cuchara, tratando de no tocarlo con las manos). La masa del embutido se debe moler y mezclar muy bien en un mortero. Si el producto ya es una pasta mezclar bien en un mortero o recipiente apropiado (se pueden utilizar homogeneizadores rotatorios como los "starmix", "multimix" y tipos parecidos. En estos casos evitar que a causa de la gran velocidad se origine el calentamiento de la muestra). Será necesario disponer de una cantidad de muestra preparada, igual al total necesario para efectuar todas las determinaciones por duplicado. Normalmente con 100-150 g es suficiente para los ensayos, pero la composición de algunos productos cárneos no es homogénea, y aún esa cantidad puede no garantizar un buen resultado medio. Resulta obvia la importancia de una homogeneización lo más completa posible para evitar errores analíticos. La muestra preparada se guarda en envases herméticos y en lugar fresco; o bien se separa una parte para determinar la humedad y el resto se deseca, se muele y se guarda para otras determinaciones.

### **Determinación de agua (AOAC, 934.01, 2000)**

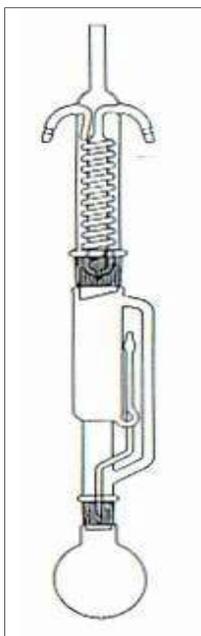
Preparar un cristalizador de paredes altas y de 5-6 cm de diámetro, forrándolo interiormente con papel "aluminio". Agregar arena calcinada de manera que quede una capa delgada cubriendo el fondo del mismo y una varilla de vidrio corta. Tatar el conjunto. Pesar 3-4 g de muestra preparada, añadir 5 mL de alcohol etílico 95°, mezclando totalmente y extendiendo sobre la base del cristalizador en forma de capa fina. Realizar un presecado en baño María hasta evaporación del etanol (demanda aprox. 20 min.). Llevar a estufa de vacío a 100-105°C durante 2 hs. Enfriar en desecador y pesar, continuando luego el secado por períodos de 30 min. hasta peso constante.

### **Determinación de grasas (AOAC, 985.15, 2000)**

Transferir cuantitativamente el contenido del cristalizador utilizado en la determinación de agua, a un cartucho de celulosa. Al realizar esta operación es conveniente perforar con la varilla el papel "aluminio" o instalarlo en el cartucho de tal manera que permita la circulación y drenaje continuo del solvente en el cartucho de celulosa. Cubrir con un poco de algodón y colocar en el cuerpo del extractor Soxhlet.

En el balón de extracción colocar 2 o 3 piedras pómez chicas y cargar el cuerpo del extractor una vez y media con cloruro de metileno (ver esquema adjunto). Extraer durante 4 hs. como mínimo, calentando con una intensidad tal que se logre una condensación de 5-6 gotas por minuto.

Una vez finalizada la extracción, evaporar en Rotavap (en campana) recuperando el solvente. Pasar luego el extracto a un Erlenmeyer chico tarado, con la ayuda de un poco de solvente y secar a 100°C durante 30 min. Enfriar y pesar. Referir el dato a % p/p de muestra.



**Extractor Soxhlet**

**Proteínas totales** (Método de Kjeldahl-Arnold-Gunning, A.O.A.C., 928.08, 2000).

Reactivos:

- $K_2SO_4$  p.a. ó  $Na_2SO_4$  p.a.
- $CuSO_4$  p.a. (puede usarse  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ )
- $H_2SO_4$  concentrado.
- Solución  $H_2SO_4$  0,1 N valorado.
- Solución concentrada de NaOH (40 o 45 %).
- Solución NaOH 0,1 N valorada.
- Solución de rojo de metilo en etanol (0,5 % p/v).

**Etapa de digestión:**

Pesar exactamente 0,5-0,75 g de muestra (de acuerdo al contenido estimado de nitrógeno) en un pequeño trozo de papel satinado. Envolverla y dejarla caer en un tubo de digestión de Kjeldahl. Agregar 6 g de  $Na_2SO_4$  y 0,8 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  y 12 mL de  $H_2SO_4$  concentrado. Consulte con un

docente y siga las instrucciones del equipo para digerir la muestra, utilizando las siguientes condiciones:

- 1º paso: 125°C – 30 minutos
- 2º paso: 270°C – 30 minutos
- 3º paso: 400°C – 120 minutos

**Etapa de destilación:**

Dejar enfriar el tubo de digestión a temperatura ambiente y agregar aproximadamente 20 mL de agua (¡cuidado con la violencia de la reacción!). Colocar 50,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N en un erlenmeyer de 500 mL y agregar 4 ó 5 gotas del indicador rojo de metilo. Realizar la destilación de acuerdo con las instrucciones del equipo.

El destilado se titula con solución de NaOH 0,1 N valorado.

Factores para la conversión de N a proteína:

- Carne: 6,25 (es el más empleado si se desconoce la procedencia de la proteína)
- Leche: 6,38
- Gelatina: 5,55
- Soja: 5,71
- Arroz: 5,95
- Huevos: 6,68

## **PARTE 2**

### **PRODUCTOS AZUCARADOS**

Como ejemplo de producto azucarado se encarará el análisis de miel. Ésta, como cualquier producto alimenticio, debe cumplir con normas de calidad organolépticas fisicoquímicas, y microbiológicas.

#### **MIEL**

Se entiende por miel el producto alimenticio producido por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores (miel de néctar de flores) o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de plantas (miel de mielada), que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena.

La miel constituye el único material endulzante que puede ser almacenado y usado tal cual es producido en la naturaleza. Para apreciar sus propiedades particulares, no requiere procesamiento o purificación alguna.

El Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de Miel establece:

#### **a) COMPOSICIÓN**

La miel es una solución concentrada de azúcares, mayoritariamente glucosa y fructosa. Contiene además una mezcla compleja de otros hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, pigmentos, cera y granos de polen.

#### **b) REQUISITOS**

##### **i) CARACTERÍSTICAS SENSORIALES:**

- Color: Será variable desde casi incolora hasta pardo oscuro, pero siendo uniforme en todo el volumen del envase que la contenga.
- Sabor y aroma: Deberá tener sabor y aroma característicos y estar libre de sabores y aromas objetables.
- Consistencia: Podrá ser fluida, viscosa o cristalizada total o parcialmente.

##### **ii) CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS**

- Madurez: Azúcares reductores (calculados como azúcar invertido): Miel de flores: mínimo 65%. Miel de mielada y su mezcla con miel de flores: mínimo 60%.
- Humedad: máximo 18% (CAA), 20% para Mercosur.
- Sacarosa aparente: Miel de flores: máximo 5%. Miel de mielada y sus mezclas: máximo 10%.
- Limpieza: Sólidos insolubles en agua: máximo 0,1 %, excepto en miel prensada que se tolera hasta el 0,5%.
- Minerales (cenizas): máximo 0,6%. En miel de mielada y sus mezclas con mieles de flores se tolera hasta 1%.

##### **iii) DETERIORO**

El deterioro se refiere a la alteración de las características propias de la miel, consecuencia del sobrecalentamiento, el almacenamiento prolongado y la fermentación. Esto se mide a través de la acidez libre, la actividad enzimática y la cuantificación del hidroximetilfurfural (HMF). También se tiene en cuenta el contenido de polen, el cual no debe ser eliminado en el procesamiento de la miel.

#### **iv) ACONDICIONAMIENTO**

Las mieles podrán presentarse "a granel" (tambores de 300 kg.) o fraccionadas. Deberán acondicionarse en envases bromatológicamente aptos, adecuados para las condiciones previstas de almacenamiento y que confieran una protección adecuada contra la contaminación. La miel en panales y la miel con trozos de panal sólo estarán acondicionadas en envases destinados al consumidor final (fraccionada).

#### **Toma de muestra (A.O.A.C., 969.38 B, 2000).**

Las mieles que presentan cristalización de azúcares (granulación) deben homogeneizarse introduciendo el envase en un baño de agua a una temperatura no mayor de 60 °C. Agitar hasta disolución de los cristales, enfriar y tomar la porción para el análisis. Si no se observa granulación basta agitar con una varilla.

#### **Humedad, método refractométrico (A.O.A.C., 969.38 B, 2000):**

La miel es un alimento de humedad intermedia. Su contenido de agua suele oscilar entre 14 a 20 %, dependiendo de las condiciones climáticas, periodo del año, humedad inicial del néctar y grado de maduración alcanzado en la colmena, así como de su origen biogeográfico. La variación de la humedad interviene en los fenómenos de granulación y marca la estabilidad del producto desde el punto de vista microbiológico. El índice de refracción, la humedad y el contenido de sólidos solubles totales, son parámetros correlacionados. El porcentaje máximo de humedad permitido es del 18 % según la legislación vigente.

Se determina por refractometría a 20 °C o por secado en estufa de vacío a 60-70 °C. En el Laboratorio se determinará por refractometría

#### **Procedimiento:**

1. Encender el instrumento (refractómetro AR200, Reichert) presionando la tecla "CAL".
2. Colocar agua destilada y presionar "CAL".
3. Una vez finalizada la calibración el equipo presenta el mensaje "Set point cal successful".
4. Colocar una pequeña cantidad de miel en el refractómetro y permitir que se establezca la temperatura durante un minuto y presionar la tecla "READ". Realizar la medición utilizando el modo "nd-TC" que entrega los resultados como índice de refracción compensado por temperatura (20°C). Hacer 2 o 3 lecturas y promediarlas.
5. Calcular el % de agua a partir de la siguiente tabla (A.O.A.C., 940.39, 2000):

Table 969.38 Relationship between refractive index and water contents of honeys<sup>a</sup>

Water content, %	Refractive index			Water content, %	Refractive index		
	20°C <sup>b</sup>	60°F <sup>c</sup>	40°C		20°C <sup>b</sup>	60°F <sup>c</sup>	40°C
13.0	1.5044	1.5053	1.4998	19.0	1.4890	1.4900	1.4845
13.2	1.5038	1.5048	1.4993	19.2	1.4885	1.4895	1.4840
13.4	1.5033	1.5043	1.4988	19.4	1.4880	1.4890	1.4835
13.6	1.5028	1.5038	1.4983	19.6	1.4875	1.4885	1.4829
13.8	1.5023	1.5033	1.4978	19.8	1.4870	1.4880	1.4824
14.0	1.5018	1.5027	1.4973	20.0	1.4865	1.4875	1.4819
14.2	1.5012	1.5022	1.4968	20.2	1.4860	1.4870	1.4814
14.4	1.5007	1.5017	1.4962	20.4	1.4855	1.4865	1.4809
14.6	1.5002	1.5012	1.4957	20.6	1.4850	1.4860	1.4804
14.8	1.4997	1.5007	1.4952	20.8	1.4845	1.4855	1.4799
15.0	1.4992	1.5002	1.4947	21.0	1.4840	1.4850	1.4794
15.2	1.4987	1.4997	1.4942	21.2	1.4835	1.4845	1.4788
15.4	1.4982	1.4992	1.4937	21.4	1.4830	1.4840	1.4783
15.6	1.4976	1.4986	1.4932	21.6	1.4825	1.4835	1.4778
15.8	1.4971	1.4981	1.4927	21.8	1.4820	1.4830	1.4773
16.0	1.4966	1.4976	1.4922	22.0	1.4815	1.4825	1.4768
16.2	1.4961	1.4971	1.4916	22.2	1.4810		
16.4	1.4956	1.4966	1.4911	22.4	1.4805		
16.6	1.4951	1.4961	1.4906	22.6	1.4800		
16.8	1.4946	1.4956	1.4901	22.8	1.4795		
17.0	1.4940	1.4951	1.4896	23.0	1.4790		
17.2	1.4935	1.4946	1.4891	23.2	1.4785		
17.4	1.4930	1.4940	1.4886	23.4	1.4780		
17.6	1.4925	1.4935	1.4881	23.6	1.4775		
17.8	1.4920	1.4930	1.4876	23.8	1.4770		
18.0	1.4915	1.4925	1.4870	24.0	1.4765		
18.2	1.4910	1.4920	1.4865	24.2	1.4760		
18.4	1.4905	1.4915	1.4860	24.4	1.4755		
18.6	1.4900	1.4910	1.4855	24.6	1.4750		
18.8	1.4895	1.4905	1.4850	24.8	1.4745		
				25.0	1.4740		

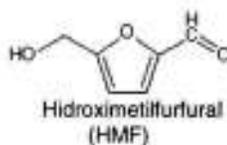
<sup>a</sup> Values for 20°C and 60°F are Wedmore's calculations [*Bee World* 36, 197(1955)]; 40°C values are calculated from Auerbach and Borries equation [*Z. Nahr. Genussm.* 22, 353–358(1924)]. Values >22.0% were extended by FAO/WHO Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (1968).

<sup>b</sup> If refractive index is measured at temperature above (below) 20°C, add (subtract) 0.00023/°C above (below) 20°C before using table.

<sup>c</sup> If refractive index is measured at temperature above (below) 60°F, add (subtract) 0.00013/°F above (below) 60°F before using table.

## Hidroximetilfurfural (HMF) y posible presencia de Dextrinas

El 5-hidroximetil-2-furaldehído o hidroximetilfurfural (HMF) es un producto generado por la deshidratación -catalizada por ácidos- de azúcares y/o por reacción de Maillard a partir de azúcares reductores.



La miel recién extraída contiene muy poca cantidad de HMF, sin embargo, su contenido puede aumentar por sobrecalentamiento y también durante su procesamiento y posterior almacenamiento. Este producto suele ser sometido a tratamiento térmico con el fin de reducir la viscosidad y prevenir la cristalización y/o la fermentación. Con respecto al almacenamiento, si la miel se mantiene por largos períodos a temperaturas promedio entre 12 y 15 °C, la formación del HMF será mínima, pero a temperaturas superiores se verá favorecida, debido principalmente al valor de acidez propio de la miel.

Por otra parte, la miel, compuesta principalmente por azúcares, ha sido tradicionalmente objeto de adulteraciones con jarabes. Éstos se obtienen de manera muy económica a partir de la hidrólisis ácida del almidón. Durante este tratamiento se forman dextrinas y HMF en cantidades importantes, con lo cual, la presencia de altos niveles de estos compuestos en miel sugiere la posibilidad de que el alimento haya sido adulterado con este tipo de productos.

Por lo que la presencia de HMF puede ser indicio de cualquiera de los dos fraudes, del calentamiento excesivo y de la adición de jarabes de azúcares. Por lo anteriormente expuesto, el contenido de HMF constituye un parámetro de genuinidad de importancia en miel. Según el Código Alimentario Argentino (C.A.A.) la cantidad máxima permitida de HMF en la miel es de 40 mg/kg.

### **Determinación de hidroximetilfurfural por H.P.L.C.**

Principio: El hidroximetilfurfural será determinado en una solución acuosa de miel, clara y filtrada, utilizando cromatografía líquida de alta performance en fase reversa, equipada con un detector UV-visible. Se cuantificará utilizando una curva de calibración construida a partir de las señales de estándares conocidos.

### **Reactivos**

- Agua bidestilada o Millipore necesaria para preparar todas las soluciones a utilizar.
- Fase móvil: agua-metanol (70:30), ambos calidad HPLC.
- Solución acuosa estándar de HMF (aproximadamente 400 mg/L).
- Solución de Carrez I: disolver 15 g de  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  en agua y llevar a 100 mL.
- Solución de Carrez II: disolver 30 g de  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  y llevar a 100 mL.

### **Equipamiento**

Equipo para HPLC marca Spectra System P2000, Thermo Separation Products, equipado con una válvula inyectora Reodyne provista de un loop de inyección de 10  $\mu$ l, detector UV-visible Spectra 100, Thermo Separation Products, y un integrador Data Jet Integrator, Thermo Separation Products. La columna a utilizar será Phenomenex Spherclone S u ODS (2); 250 mm x 4,6 mm id x 5  $\mu$ m. La detección se realizará a  $\lambda = 272$  nm.

### **Curva de calibración:**

Preparar, a partir de la solución madre entregada por el docente, soluciones estándar de HMF de concentraciones 1, 2, 5 y 10 mg/L (consultar).

Inyectar por triplicado 20  $\mu$ L de cada una de las soluciones estándar de HMF. Las corridas se realizarán en modo isocrático, a temperatura ambiente, con un flujo de 1 mL/min. A partir de los resultados obtenidos, grafique la curva de calibración correspondiente (Área vs. concentración estándar de HMF).

### **Muestra:**

Pesar exactamente 5 g de miel en un vaso de precipitados de 50 mL. Disolver la muestra en aproximadamente 25 mL de agua (bidestilada o millipore) y transferir cuantitativamente a un matraz de 50 mL. Agregar 0,5 mL de la solución de Carrez I y mezclar. Agregar 0,5 mL de solución de Carrez II, mezclar y llevar a volumen con agua (pueden agregarse unas gotas de etanol para prevenir la formación de espuma). Filtrar en papel, descartando los primeros 10 mL del filtrado. Posteriormente, filtrar a través de un filtro de membrana de 0,45  $\mu$ m.

Inyectar la muestra por triplicado. A partir de las áreas obtenidas y utilizando la curva de calibración, calcule el valor, en mg/kg, del contenido de HMF del producto analizado.

### **Determinación de presencia de dextrinas**

La concentración de dextrinas es naturalmente muy baja o despreciable en la miel, sin embargo, cuando se adultera la miel con el agregado de jarabes se puede detectar su presencia.

Procedimiento: Colocar aproximadamente 1 g de miel en un vaso de precipitado de 50 mL. Agregar 4 mL de agua destilada y disolver completamente la miel. Tomar 2 mL de la solución anterior, colocarlos en un tubo de ensayos y agregar 1 mL de etanol.

Observar el resultado:

- a) Líquido limpio: miel no adulterada.
- b) Líquido blanco-lechoso: miel adulterada.

### **Acidez Libre (A.O.A.C., 962.19, 2000)**

La acidez libre se mide en función de los ácidos orgánicos que naturalmente contiene la miel. Los valores normales de acidez se incrementan si la miel ha fermentado y esto sucede en mieles con elevados porcentajes de humedad donde se han desarrollado mohos y levaduras. El CAA establece un valor máximo permitido.

Reactivos

Solución de NaOH (0,05 N)

Procedimiento: Disolver 5 g de muestra en un vaso de precipitados de 250 ml y agregarle 75 mL de agua destilada. Agitar y disolver completamente. Colocar el electrodo del pHímetro en la solución, registrar el pH inicial y luego agregar NaOH 0,05 N con un flujo aproximado de 5 mL/min hasta alcanzar un pH de 8,50. Expresar los resultados como meq /Kg de muestra.

### **Actividad Diastásica**

Las enzimas son componentes minoritarios de la miel, pero su actividad enzimática es fundamental para la transformación del néctar en miel, ya que modifica azúcares complejos en simples, de fácil asimilación. El Código Alimentario Argentino contempla la determinación de la actividad diastásica (una de las enzimas de la miel) como una forma de valorar calidad, no por su importancia dietaria, sino por su sensibilidad al calor e inactivación por sobrecalentamiento o envejecimiento de la miel.

Principio del método: El sustrato de almidón tamponado, se incuba con la muestra, produciéndose la hidrólisis enzimática, que se determina por el agregado de reactivo de iodo, el cual produce coloración con el remanente del almidón no hidrolizado.

### **Materiales**

Buffer acetato – pH: 5,3 (1,59 M)

Solución de cloruro de sodio 1 %

Solución de almidón (0,05 %)

Solución de Iodo 0,1 N

### **Preparación de la muestra**

Pesar 10,00 g de muestra de miel en un vaso de precipitado de 50 mL y añadir 10 mL de buffer pH: 5,3.

### Procedimiento

Colocar en una gradilla 10 tubos de ensayo y agregarle 1 mL de solución de cloruro de sodio al 1 %. Agregar al primer tubo 1 mL de la muestra y mezclar. Pasar luego 1 mL del primer tubo al segundo, mezclar y continuar así hasta el noveno tubo, desechando el último mL (las diluciones serán: 1/2; 1/4; 1/8; hasta 1/512). El tubo décimo sirve de testigo. Colocar a cada tubo 1 mL de solución de almidón 0,050 % e incubar por 30 minutos a 37 °C. Retirar, enfriar rápidamente y colocar una gota de solución de trabajo de iodo a cada tubo y agitar. Observar la coloración.

### Expresión de los resultados

U.D = (dilución mayor que permanece incolora) x 2

Valor normal de miel: Escala de Gothe: mínimo 8.

Cantidades menores a 8 (escala Gothe) corresponden a una miel vieja, calentada, mal procesada o adulterada. Existen mieles de bajo contenido de diastasa, por ejemplo, mieles de citrus.

Tabla de equivalencias del método de Bianchi y el I.D que corresponde al número de de la escala de Gothe.

U.D. Bianchi	ID (Gothé)	
	Mínimo	Máximo
0	0,99	2,88
4	2,93	4,16
8	4,32	5,70
16	7,28	8,08
32	9,01	14,68
64	15,22	27,25
128	33,48	67,87

## GRASAS Y ACEITES

Las sustancias grasas están constituidas fundamentalmente por ésteres de ácidos grasos con glicerol y por una pequeña proporción de materia insaponificable.

El CAA considera aceites alimenticios o aceites comestibles a los obtenidos de semillas y frutos oleaginosos y que son admitidos como aptos para la alimentación. Las grasas animales son los productos obtenidos por la fusión de tejidos grasos de músculos y huesos conexos de animales bovinos, ovinos o porcinos.

En la presente práctica se llevarán a cabo algunas de las técnicas utilizadas en el análisis de productos grasos, con el objetivo de realizar una caracterización general de los mismos, su tendencia a la oxidación y sus propiedades funcionales.

### **Muestras:**

Se utilizarán diferentes aceites y grasas disponibles en el mercado.

### **Preparación de la muestra. (A.O.A.C., 981.11, 1990)**

Antes de proceder al examen de una sustancia grasa es necesario eliminar las impurezas groseras y el agua que pueda contener; por lo tanto, si la muestra no está completamente límpida, se la deja en reposo durante un tiempo en la estufa a 50°C hasta que se clarifique si es líquida, y para que funda completamente si es sólida; recién entonces se filtra por papel (a T = 50°C) una o más veces, evitando dejar caer el agua que pudiera existir debajo de la grasa. La muestra debe mantenerse en lugar fresco y protegida de la luz y el aire para retardar la rancidez.

## CARACTERIZACIÓN GENERAL

### **Índice de refracción. (A.O.A.C., 921.08, 2000).**

Se informa a la temperatura de 25°C para los aceites y 40°C para las grasas. El instrumento puede chequearse con agua destilada a 20°C (I. refracción = 1,3330).

### **Procedimiento:**

- Encender el instrumento (refractómetro AR200, Reichert) presionando la tecla “CAL”.
- Colocar agua destilada y presionar “CAL”.
- Una vez finalizada la calibración el equipo presenta el mensaje “Set point cal succesful”.
- Colocar una pequeña cantidad de la muestra en el refractómetro y permitir que se estabilice la temperatura durante un minuto y presionar la tecla “READ”. Realizar la medición utilizando el modo “nd-TC” que entrega los resultados como índice de refracción compensado por temperatura (20 °C). Hacer 2 o 3 lecturas y promediarlas.
- Leer el índice de refracción directamente, hacer 2 o 3 lecturas, expresarlas a 25 °C o 40 °C por medio de la siguiente fórmula y promediarlas:

$$n = n' + K (T' - T)$$

donde K = 0.00038; n' = índice leído a T'; n = índice a T standard. El índice de refracción decrece con el aumento de temperatura.

### Índice de iodo

Se define como el número de gramos de iodo absorbidos por 100 g de grasa. Es la constante más usada en la determinación del grado de insaturación.

Como el iodo posee baja velocidad de adición, se emplean reactivos halogenantes de grado intermedio que reaccionan más fácilmente con los dobles enlaces no conjugados. Las dos técnicas empleadas comúnmente para estimar este índice son la de Hanus y la de Wijs que usan respectivamente monobromuro de iodo y monoclورو de iodo como agentes halogenantes. Se basan en los principios de la titulación diferencial, o sea en el agregado de un exceso del reactivo el cual es medido luego que se completa la reacción, por medio de una iodometría.

### Método de Hanus. (A.O.A.C., 920.158, 2000).

#### Reactivos

- Solución iodada (13,2 g de iodo puro en 1 L de AcOH (99,5 %) y posterior agregado de bromo hasta duplicar exactamente el contenido en halógeno).
- $\text{Cl}_3\text{CH}$
- Solución de KI al 15 %
- Solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N valorada.
- Solución de almidón al 1 %

Pesar en un recipiente adecuado limpio y seco (dedal de vidrio) la cantidad de muestra indicada en la tabla según el índice de yodo esperado de acuerdo a la composición acídica del aceite o grasa a analizar. Luego se transfiere, usando una pinza, a un frasco de 500 mL limpio y seco, con tapa esmerilada; disolver el aceite en 10 mL de  $\text{Cl}_3\text{CH}$ . Conducir simultáneamente el duplicado y un blanco (título del reactivo), teniendo en cuenta los tiempos de análisis de cada muestra (largar con 10 min de diferencia cada uno).

Cargar el reactivo de Hanus en pipeta aforada de 25,0 mL con ayuda de una pera de goma y agregarlo rápidamente sobre la muestra, dejando drenar la pipeta un tiempo definido. En todos los recipientes debe agregarse exactamente la misma cantidad de reactivo sacado de una misma botella; tanto ésta como los frascos de reacción deben taparse inmediatamente para que la concentración de bromuro de iodo no varíe sensiblemente. El exceso de reactivo debe ser por lo menos el 60 % de la cantidad agregada.

Dejar durante 30 minutos exactos en oscuridad agitando ocasionalmente. Luego adicionar (tan ligero como se pueda y en el orden que se consigna) 10 mL de IK 15 % y 100 mL de agua, arrastrando cualquier resto de  $\text{I}_2$  libre que existe en el cuello y tapón del frasco. Titular, agitando continuamente, con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N agregándolo gradualmente y con cierta rapidez para evitar la pérdida de iodo. Cuando el color amarillo de la solución se atenúa colocar algunas gotas del indicador (aprox. 1 mL) y continuar titulando gota a gota hasta que el tono azul negro casi desaparece. Cerrar bien el frasco, agitar violentamente para que el iodo remanente en la capa orgánica (inferior) pase a la capa acuosa y completar la titulación.

$$II = \frac{(B - M) \times N \times f}{1000} \times \frac{PM(I_2)}{2} \times \frac{100}{g_{muestra}}$$

M = mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastados en la titulación de la muestra.

B = mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastados en la titulación del blanco.

N = normalidad de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

f = factor de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

g = masa de muestra (g)

Peso molecular del  $\text{I}_2 = 253.8$

Importante: esta determinación exige extremo cuidado en cada uno de sus pasos. Los duplicados que se informen en el laboratorio de T.P. no deben diferir en más de 2 unidades.

Tabla

Índice de Iodo esperado	Masa de muestra, g
3	10,58-8,46
10	3,17-2,54
20	1,59-1,27
40	0,79-0,63
80	0,40-0,32
120	0,26-0,21
160	0,20-0,16
200	0,16-0,13

## PROPIEDADES FUNCIONALES

La determinación del perfil de grasa sólida en función de la temperatura es esencial para establecer los parámetros de formulación y control de proceso en la industria de grasas y aceites. Tradicionalmente se realizó por dilatometría pero en la actualidad existe un método oficial que emplea una técnica más rápida y precisa basada en la resonancia magnética nuclear (RMN) resuelta en el tiempo.

En este trabajo práctico se determinará el contenido de grasa sólida por RMN de baja resolución resuelta en el tiempo, usando el método oficial de la AOCS Cd 16b-93. En este método, el contenido de grasa sólida (SFC) está definido como una relación, expresada en porcentaje, entre la respuesta de los núcleos de hidrógeno de las fases sólida y líquida de la muestra.

### Procedimiento

- 1) Calibrar el instrumento con los estándares provistos por el fabricante.
- 2) Colocar 4 mL de aceite en tubos estandarizados para RMN.
- 3) Proceso de estabilización y templado
  - a) Fundir la muestra a  $100^\circ\text{C}$  y almacenarla durante 15 minutos a  $100^\circ\text{C}$
  - b) Almacenar la muestra al menos 5 minutos a  $60^\circ\text{C}$
  - c) Almacenar la muestra durante  $60 \pm 2$  minutos a  $0^\circ\text{C}$

- d) Almacenar la muestra durante 30 – 35 minutos entre 5 y 50°C
- 4) Medir las muestras a cada temperatura empleando el método para SFC. Obtener los valores de SFC a cada temperatura.
- 5) Graficar SFC de las muestras en función de la temperatura y concluir sobre posibles aplicaciones de las mismas.

El equipo calcula directamente el valor de SFC empleando la siguiente fórmula:

$$SFC = \frac{(E11 - E70) \times F}{E70 + ((E11 - E70) \times F) + D}$$

E11= Señal de RMN medida a los 11 µseg después del pulso.

E70= Señal de RMN medida a los 70 µseg después del pulso.

F y D= Factor empírico de corrección.

## PARAMETROS DE DETERIORO

La autooxidación de los lípidos es una de las causas principales del deterioro de los alimentos, la cual da lugar a la aparición de olores y sabores desagradables, por lo que constituye un gran problema en la industria alimentaria. Esta reacción ocurre fundamentalmente con los ácidos grasos insaturados a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres. En los alimentos con alto contenido de lípidos, la formación y descomposición de los hidroperóxidos genera una serie de compuestos oxidados como cetonas, aldehídos, alcanos y alquenos de bajo peso molecular y de alta volatilidad. Este fenómeno que afecta el valor sensorial del alimento se denomina rancidez.

Otra reacción de deterioro que ocurre también es la lipólisis que se produce a partir de la hidrólisis de enlaces éster de los lípidos (enzimático por acción de las lipasas o por calor en presencia de agua). En las grasas animales la lipólisis libera ácidos grasos, algunos (los de cadena corta) son responsables de sabores y olores extraños. Ocurre también durante el almacenamiento o manipulación de semillas de oleaginosas, eliminándose en la refinación de los aceites vegetales.

Algunos de los índices químicos más frecuentemente usados para medir el desarrollo de oxidación son el índice peróxido (IP), que mide la cantidad de peróxidos formados y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que cuantifican los productos secundarios de la oxidación lipídica, los que al reaccionar con este ácido forman productos coloreados.

En el presente trabajo práctico se empleará para la evaluación de la estabilidad oxidativa el método de Schaal Oven en el cual las muestras se almacenan en envases abiertos a una temperatura constante de 62,5 °C en una estufa. Luego de intervalos regulares de tiempo las muestras se retiran y se analiza su estabilidad oxidativa mediante diferentes parámetros de deterioro. Cada alumno recibirá dos muestras correspondientes a distintos tiempos de tratamiento, siendo una de ellas la muestra control (sin calentamiento).

## Índice de peróxido (IP) (A.O.A.C., 965.33, 2000; A.O.C.S., Cd 8-53, 1963)

Este método determina todas las sustancias que, bajo las condiciones del test, oxidan al yoduro de potasio, y las expresa en términos de miliequivalentes de peróxido por 1000 g de muestra. Se asume generalmente que todas las sustancias son peróxidos u otros productos similares de la

oxidación de grasa. Es aplicable a todas las grasas y aceites típicos, incluidas las margarinas. El método es altamente empírico y cualquier cambio en el procedimiento puede provocar variación de los resultados. Realizar por duplicado.

Reactivos:

- Mezcla ácido acético-cloroformo (3:2)
- Solución saturada de KI (se prepara en el momento- consultar docentes)
- Solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N (valorada).
- Solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 N (valorada).
- Solución de almidón 1%.

Pesar  $2,50 \pm 0,02$  g de muestra en un Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, con tapa esmerilada. Agregar 15 mL de la mezcla de solventes. Agitar hasta disolución total de la muestra. Agregar 0,5 mL de la solución saturada de KI. Dejar la solución exactamente 1 min., con ocasional agitación, y agregar después 30 mL de agua destilada.

Titular con solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 N, agregándole gradualmente y con agitación constante y vigorosa. Continuar la titulación hasta que el color amarillo haya casi desaparecido. Agregar aproximadamente 0,5 ml de solución indicadora de almidón. Continuar la titulación agitando vigorosamente el Erlenmeyer cerca del punto final, para liberar todo el  $\text{I}_2$  de la capa clorofórmica. Agregar la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gota a gota hasta desaparición del color azul. Conducir paralelamente un blanco (el volumen gastado debe ser  $< 0,1$  ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 N).

#### Cálculo de resultados:

$$\text{IP (meq. de peróxido / 1000g muestra)} = (\text{M} - \text{B}) \times \text{N} \times \text{f} \times 1000 / \text{mM}$$

Donde:

M = mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastados en la titulación de la muestra.

B = mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastados en la titulación del blanco.

N = normalidad de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

f = factor de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

mM = masa de muestra (g)

#### Índice de acidez. (IUPAC, II.D.1, modificado)

Los aceites y grasas, debido a la acción de las lipasas, contienen ácidos grasos libres en mayor o menor cantidad según sean las condiciones de manufactura y tiempo de almacenamiento del producto. El Código Alimentario Argentino menciona el máximo valor de acidez libre permitido en aceites comestibles (Art. 525).

Se expresa en mg de KOH requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres presentes en 1 g de grasa.

Reactivos:

- Sol. de etanol: éter etílico (1:1 v/v) neutralizada = 60 mL.
- NaOH 0,05 N valorado.
- Sol. de fenolftaleína al 1 %

Realizar por duplicado. Pesar exactamente 6 g de muestra en un Erlenmeyer tarado de 125 mL, y disolverla en 60 mL de la mezcla de solventes previamente neutralizada a la fenolftaleína con NaOH diluido. Agitar y titular con NaOH 0,05 N valorado.

Calcular e informar la acidez libre en mg de KOH por g de aceite y en g de ácido oleico por 100 g de aceite, que es otra forma común de expresarla. (PM ácido oleico = 282,4).

Nota: Punto final: que la coloración rosa del indicador permanezca 15-30 seg.

Cálculo de resultados:

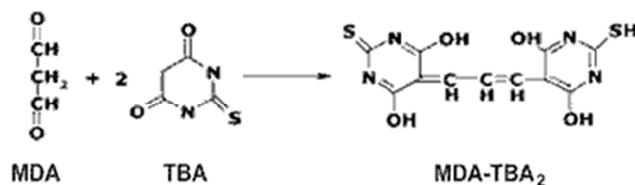
$$IA \text{ (mg KOH / 1 g grasa)} = (V \times N \times f)_{NaOH} M_{KOH} / m_M$$

$$IA \text{ (g ácido oleico / 100 g aceite)} = (V \times N \times f)_{NaOH} M_{ACIDO\ OLEICO} \times 100 / (1000 \times m_M)$$

Donde: IA: índice de acidez  
 $N_{NaOH}$ : normalidad del NaOH  
 $m_M$ : masa de muestra (g)  
 $V_{NaOH}$ : mL de NaOH gastados en la titulación  
 $f_{NaOH}$ : factor del NaOH

### Determinación de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS).

Junto con el índice de peróxido, el método del ácido tiobarbitúrico (TBARS) es uno de los más empleados para determinar el desarrollo de la oxidación de lípidos en alimentos. Su principio se basa en la reacción de condensación entre dos moléculas de TBA con una de malonaldehído en la que se produce un compuesto cromógeno de color rojo cuya concentración se determina espectrofotométricamente a 532 nm.



### Procedimiento:

Determinación de los compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS):

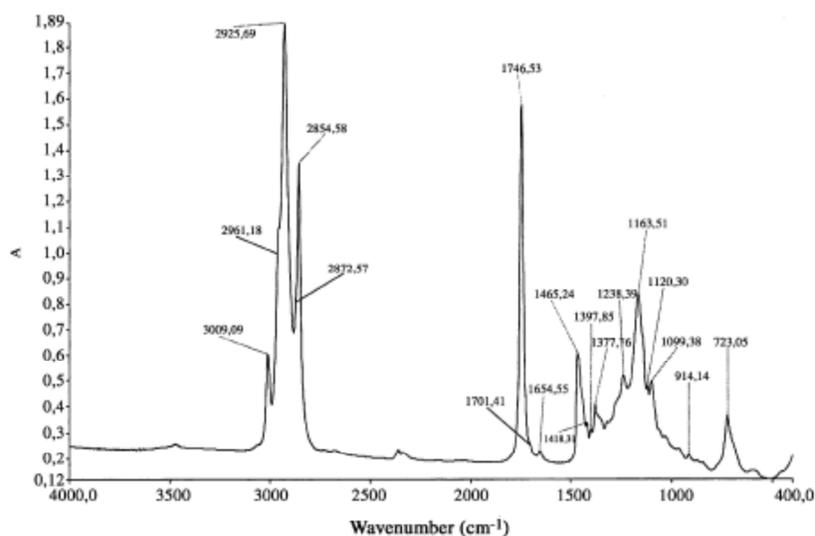
- Realizar por duplicado. Pesar exactamente la muestra (ver tabla abajo) en tubos tipo Falcon de 15 mL, previamente tarados (Verificar que el cierre sea correcto). Agregar 2,5 mL del reactivo de trabajo (0,02M ácido tiobarbitúrico en ácido acético glacial al 90%).
- Tapar muy bien los frascos con la tapa a rosca. Colocar en baño de agua a 80 °C durante 45 minutos.
- Enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Centrifugar las muestras a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Tomar cuidadosamente con pipeta 2 mL del fondo del tubo y medir la absorbancia a 532 nm.
- Convertir los valores de absorbancia a mg de malonaldehído por 100g de aceite/grasa empleando una curva de calibración (ver datos en anexo).

Masa de muestra ensayo de TBARs		
Muestra	Tiempo Cero	Tiempos 20 / 30 días
Grasa	0,2 g	0,2 g
aceites	0,2 g	0,05 g

### Aplicación de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo por transformada de Fourier para analizar la oxidación de aceites comestibles.

La espectroscopía en la región del infrarrojo medio (MIR) es una de las técnicas analíticas disponibles más importantes para obtener información sobre aspectos cualitativos y cuantitativos de analitos en los procesos de elaboración de alimentos. Los cambios en los espectros de los aceites ocurridos luego del calentamiento se pueden observar principalmente en las regiones espectrales 3050-2800 y 1745  $\text{cm}^{-1}$  y se atribuyen a modificaciones debidas a la oxidación.

Ejemplo de un espectro de un aceite de maíz fresco:



Muestras: muestras de aceites comestibles frescos y almacenados a 62.5°C.

Metodología: Se trabajará con un equipo de espectroscopía infrarroja FTIR Spectrum SP 400 (Perkin Elmer).

#### Procedimiento:

- Seleccionar el menú "Setup"
  - o Seleccionar la opción "Instrument"
    - En el menú "Beam" seleccionar la opción MIR ATR
    - En el menú "Instrument" seleccionar la la resolución espectral "4" y el número de scan: 32.
    - En el menú "Scan" seleccionar la variable "Absorbancia" y elegir "Background" (y luego de haber hecho el background cambiar la opción a "Sample").
    - En el menú "Sample" realizar el background, luego medir las muestras y comparar los espectros obtenidos.
    - Colocar una gota de muestra sobre el cristal y realizar la medición.

### ANEXO - Instrucciones uso HPLC

- 1) Colocar la columna de fase reversa.
- 2) Utilizar los solventes sonicados
- 3) Ubicar el solvente a utilizar en el equipo. Verificar que la manguera quede bien sumergida en el solvente ANTES DE APRETAR RUN (entrará aire al equipo).
- 4) Encender el registrador y la computadora
- 5) Conectar bomba, detector y registrador.
- 6) Seleccionar la longitud de onda en el detector (cuidado con la perilla).
- 7) En la bomba, STATUS muestra las condiciones del equipo. Si la manguera A es la sumergida en el solvente a utilizar, entonces debe decir %A 100. (El tapón que engancha en la botella muestra si la manguera es A o B).
- 8) Purgar:
  - a- Abrir purga (perilla negra ubicada a la izquierda del inyector).
  - b- Colocar flujo a 5,0 mL/min. Para modificar el flujo: Presionar STATUS.  
Moverse hacia abajo con la flecha.  
Modificar flow con + y -.  
Presionar ENTER.
  - c- Presionar RUN.
  - d- Verificar que sale solvente. Revisar que no se vean burbujas en la manguera.
  - e- Presionar STOP.
  - f- Cerrar purga.
- 9) Colocar flow entre 0,75 y 1,00 mL/min y presionar RUN (no operar a flujos más altos porque se estropea la columna). De este modo empezará a circular el solvente. Observar que no haya pérdidas en la columna (si se produjeran pérdidas, apretar STOP para que cese el flujo de solvente, desconectar y volver a conectar la columna, y presionar RUN nuevamente, verificando que las pérdidas hayan cesado definitivamente. Si esto no sucede, consultar antes de seguir utilizando). Dejar estabilizar con la fase móvil antes de comenzar a inyectar (15 a 20 minutos).
- 10) Presionar ZERO en el detector.
- 11) Setear el registrador.
  - a) Abrir el programa del registrador
  - b) En Edit, clickear en channel: elegir channel 2 y fijarse que no haya otra opción
  - c) Aceptar
- 12) Inyección: asegurarse de usar una jeringa para HPLC (50 µl, con punta roma).
  - a- Verificar que la perilla del inyector esté en posición de carga (LOAD).
  - b- Inyectar 50 µl.
  - c- Girar la perilla a la posición de inyección (INJECT). En la computadora clickear RUN
  - d- Sacar la jeringa del inyector y volver la perilla a la posición de carga.
- 13) Al finalizar la corrida poner Stop en la computadora y Seleccionar en View, luego Results: Recognizer: 2. Integration: anotar el area de los picos.
- 14) Al finalizar todas las mediciones, poner STOP en la bomba. Colocar metanol grado HPLC previamente sonicado y repetir los pasos 7 y 8 para lavar el equipo. Dejar correr metanol por la columna con flow 1 ml/min durante 15 minutos.
- 15) Apagar bomba, detector y registrador.
- 16) Retirar la columna de la cátedra (no dejar al equipo sin una columna alternativa o los tapones correspondientes).