

NORMA Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

MIKEL ANDONI ARRIOLA PEÑALOSA, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en lo dispuesto por el artículo 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3 fracción XXII, 17 Bis fracción III, 115 fracciones IV y VI, 194 fracción I, 195, 199, 210, 212, 215 fracciones I, II, III y IV y 216 de la Ley General de Salud; 3 fracción XI, 38 fracción II, 40 fracciones I, XI y XII, 41, 43, 47 fracción IV, 51 y 52 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 y 33 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 1 fracción XII, 25, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 y 151 del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 2 inciso C fracción X y 36 del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 3 fracciones I incisos c, d y I, y II, 10 fracciones IV y VIII del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, y

CONSIDERANDO

Que en cumplimiento a lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, el Subcomité de Productos y Servicios presentó el 27 de abril de 2011 al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha del 13 de febrero de 2012, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que con fecha previa, fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación, las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en los términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, tengo a bien expedir y ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-131-SSA1-2012, PRODUCTOS Y SERVICIOS. FORMULAS PARA LACTANTES, DE CONTINUACION Y PARA NECESIDADES ESPECIALES DE NUTRICION. ALIMENTOS Y BEBIDAS NO ALCOHOLICAS PARA LACTANTES Y NIÑOS DE CORTA EDAD. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS Y NUTRIMENTALES. ETIQUETADO Y METODOS DE PRUEBA

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes organismos e instituciones:

Secretaría de Salud.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Instituto Nacional de Pediatría.

Instituto Nacional de Perinatología.

Procuraduría Federal del Consumidor.

Sistema para el Desarrollo Integral de la Familia del Distrito Federal.

Instituto Politécnico Nacional.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Escuela de Dietética y Nutrición del ISSSTE.

Asociación Mexicana de Productos Infantiles A.C.

PBM Products México, S. de R.L. de C.V.

Vázquez Tercero y Asociados, S.C.

Asociación Pro Lactancia Materna.

Cámara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC).

Abbott Laboratories de México, S.A. de C.V.

Bayer de México, S.A. de C.V.

Danone de México, S.A. de C.V.

Mead Johnson. Nutricionales de México, S. de R.L. de C.V.

Nestlé México, S.A. de C.V.

Wyeth, S. de R.L. de C.V.

Cámara Nacional de la Industria de la Transformación (CANACINTRA)/Rama 61.

Confederación de Cámaras Industriales de los Estados Unidos Mexicanos (CONCAMIN).

INDICE

1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones
4. Símbolos y abreviaturas
5. Clasificación
6. Disposiciones sanitarias generales
7. Disposiciones sanitarias para fórmulas
8. Disposiciones sanitarias para alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad
9. Muestreo y métodos de prueba
10. Etiquetado
11. Envase y embalaje
12. Concordancia con normas internacionales
13. Bibliografía
14. Observancia de la norma
15. Vigencia
16. Apéndices Normativos
 - "A" Sustancias nutritivas
 - "B" Métodos de prueba

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta norma establece las disposiciones y especificaciones sanitarias, nutrimentales y de etiquetado que deben cumplir:

- las fórmulas para lactantes,
- las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición,
- las fórmulas de continuación,
- las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición, y
- los alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad.

Así como los métodos de prueba.

1.2 Esta norma es de observancia obligatoria para las personas físicas y morales que se dedican al proceso y/o importación de los productos objeto de la misma, que van a ser comercializados en el territorio nacional.

2. Referencias

Esta norma se complementa con las siguientes Normas Oficiales Mexicanas, sus modificaciones o las que las sustituyan:

2.1 Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993, Atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio.

2.2 Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados. Información comercial y sanitaria.

2.3 Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.

2.4 Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995, Bienes y Servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

2.5 Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.

3. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

3.1 Ablactación o alimentación complementaria, a la incorporación a la dieta del lactante de alimentos distintos a la leche materna o su sucedáneo, realizándose gradual y progresivamente a partir de los 6 meses de edad o de acuerdo con las necesidades específicas de cada lactante.

3.2 Ácidos grasos trans, a todos los isómeros geométricos de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados que poseen en la configuración trans dobles enlaces carbono-carbono no conjugados.

3.3 Aditivo alimentario (Aditivo), cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición al producto con fines tecnológicos en sus fases de producción, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del producto o un elemento que afecte a sus características (incluidas las organolépticas). Esta definición no incluye "contaminantes" o sustancias añadidas al producto para mantener o mejorar las cualidades nutrimentales.

3.4 Agua para uso y consumo humano (agua potable), al agua que no contiene contaminantes objetables, químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos para la salud.

3.5 Alimento, a cualquier sustancia o producto, sólido, semisólido, natural o transformado, que proporciona al organismo elementos para su nutrición.

3.6 Alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad, a los productos elaborados principalmente con uno o más cereales molidos, que constituirán al menos el 25 % de la mezcla final en base seca, adicionados o no de otros ingredientes, destinados a complementar la dieta de los lactantes a partir de los seis meses en adelante y para los niños de corta edad como parte de una dieta progresivamente diversificada.

3.7 Alimentos deshidratados, aquellos en los que se ha eliminado agua por medios físicos a fin de evitar su descomposición y son reconstituidos mediante dilución, no incluye los alimentos a base de cereales.

3.8 Alimentos y bebidas no alcohólicas listos para ser consumidos, a los sometidos a tratamiento térmico antes o después de ser envasados en recipientes herméticamente cerrados, los cuales deben ser comercialmente estériles.

3.9 Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad, son los productos industrializados que se utilizan principalmente durante el período normal de ablactación de los lactantes o en la alimentación de los niños de corta edad. Se preparan para ser consumidos directamente o deshidratados para ser reconstituidos.

3.10 Bajo peso al nacer, el que se refiere a un lactante que pesa al nacimiento menos de 2500 g.

3.11 Bebida no alcohólica, cualquier líquido, natural o transformado, que proporcione al organismo elementos para su nutrición.

3.12 Contaminante, a cualquier agente biológico o químico, materia extraña u otras sustancias no añadidas intencionalmente a los alimentos y bebidas, que puedan comprometer la inocuidad o la aptitud de los alimentos.

3.13 Chupón, al objeto de goma o plástico con forma de pezón que se les da a los bebés para que succionen la leche.

3.14 Destete, a la suspensión de la lactancia al pecho.

3.15 Envase, a cualquier recipiente o envoltura en el cual está contenido el producto preenvasado para su venta al consumidor.

3.16 Etiqueta, a cualquier rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra materia descriptiva o gráfica, escrita, impresa, estarcida, marcada, grabada en alto o bajo relieve, adherida, sobrepuesta o fijada al envase del producto preenvasado o, cuando no sea posible por las características del producto, al embalaje.

3.17 Fórmula para lactantes, al sucedáneo de la leche materna especialmente fabricado para satisfacer, por sí solo, las necesidades nutrimentales de los lactantes durante sus primeros meses de vida hasta la introducción de la ablactación o alimentación complementaria correspondiente.

3.18 Fórmula de continuación, al alimento destinado a ser utilizado como componente líquido de la dieta de destete del lactante a partir del sexto mes y para niños de corta edad.

3.19 Fórmula de continuación para necesidades especiales de nutrición, al alimento destinado a ser utilizado como componente líquido de la dieta de destete del lactante a partir del sexto mes de vida y para niños de corta edad, en casos de trastornos, enfermedades o condiciones médicas específicas.

3.20 Fórmula para lactantes con necesidades especiales de nutrición, al sucedáneo de la leche materna o de la fórmula para lactantes, especialmente fabricado para satisfacer, por sí solo, las necesidades nutrimentales de los lactantes con trastornos, enfermedades o condiciones médicas específicas durante sus primeros meses de vida hasta la introducción de la ablactación o alimentación complementaria correspondiente. Incluye a los fortificadores de leche materna o humana.

3.21 Fortificador de leche materna o humana, al producto que puede añadirse a la leche de la especie humana para proporcionar nutrimentos adicionales en la alimentación de los lactantes con bajo peso al nacer y recién nacidos pretérmino.

3.22 Inocuo, lo que no hace o causa daño a la salud.

3.23 Información nutrimental, a toda descripción destinada a informar al consumidor sobre las propiedades nutrimentales de un alimento o bebida no alcohólica preenvasado. Comprende dos aspectos:

- La declaración nutrimental obligatoria.
- La declaración nutrimental complementaria.

3.24 Lactantes, a los niños hasta los doce meses de edad.

3.25 Leche materna o humana, a la secreción producida por las glándulas mamarias de la especie humana después del calostro y cuya función es alimentar al lactante. Esta leche contiene los nutrimentos, así como una serie de compuestos bioactivos y componentes celulares que ejercen diferentes efectos biológicos que el lactante requiere para su crecimiento y desarrollo. Representa el único alimento del lactante en los primeros meses de vida.

3.26 Límite, a la cantidad establecida de nutrimentos, aditivos, microorganismos, materia extraña, plaguicidas, biotoxinas, residuos de medicamentos y metales pesados.

3.27 Limpieza, a la acción que tiene por objeto quitar la suciedad.

3.28. Materia extraña, aquella sustancia, resto o desecho orgánico o inorgánico, que se presenta en el producto sea por contaminación o por manejo poco higiénico del mismo durante su elaboración, distribución y comercialización que resultan perjudiciales para la salud.

3.29 Metal pesado o metaloide, aquellos elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo, aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de la dosis en que se ingieren, así como de su acumulación en el organismo.

3.30 Métodos de prueba, a procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.

3.31 Niños de corta edad, a los mayores de doce meses y hasta los treinta y seis meses de edad.

3.32 Nivel superior de referencia, al que se aplica a los nutrimentos sobre los que no se dispone de suficiente información para realizar una evaluación de riesgos basada en conocimientos científicos, dichos niveles son valores derivados considerando las necesidades nutrimentales de los lactantes y un historial establecido de uso aparente inocuo. Pueden ajustarse de acuerdo con los progresos científicos y tecnológicos pertinentes. La finalidad de un nivel superior de referencia es proporcionar orientación a los fabricantes y no deben interpretarse como valores deseables.

3.33 Prácticas de higiene, a las medidas necesarias para garantizar la inocuidad de los productos.

3.34 Proceso, al conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio o suministro al público de productos.

3.35 Recién nacido pretérmino, al producto de la concepción de 28 semanas a menos de 37 semanas de gestación.

3.36 Sucedáneo de la leche materna o humana, a las fórmulas comercializadas presentadas como sustituto parciales o totales de la leche materna o humana.

4. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

A	absorbancia
ARA	ácido araquidónico
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
°C	grados Celsius
cm	centímetro
cm ²	centímetro cuadrado
DHA	ácido docosahexaenoico
EPA	ácido eicosapentaenoico
eq	equivalente
g	gramo
h	hora
IDR	Ingesta Diaria Recomendada
IDS	Ingesta Diaria Sugerida
kcal	kilocalorías
kg	kilogramo
kJ	kilojoules
l	litro
L	levógiro
m	masa
mg	miligramo
min	minutos
ml	mililitro

mM	milimolar
mm	milímetro
m/m	masa masa
mOsm	miliosmol
mv	milivolt
M	molar
N	normal
NaCl	cloruro de sodio
N.A.	no aplica
ng	nanogramo
nm	nanómetro
NMP	Número Más Probable
No.	número
NSR	Nivel Superior de Referencia
oz	onza
pH	potencial de hidrógeno
REP	Relación de Eficiencia Proteica
rpm	revoluciones por minuto
T	transmitancia
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
U.I.	Unidad Internacional
µg	microgramo
µm	micrómetro
S.E.	sin especificación
seg	segundos
VNR	Valores Nutrimientales de Referencia
v/v	volumen a volumen
/	por
%	por ciento
=	menor o igual
>	mayor que
<	menor que

Cuando en esta Norma se mencionen los siguientes términos, debe entenderse:

Acuerdo, el "Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias".

CICOPLAFEST, la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas.

Fórmula, las fórmulas reguladas por este ordenamiento.

Productos, los regulados por este ordenamiento, según corresponda.

Reglamento, el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.

Secretaría, la Secretaría de Salud.

5. Clasificación

Los productos se clasifican en:

5.1 Fórmulas:

5.1.1 Para lactantes.

5.1.2 Para lactantes con necesidades especiales de nutrición.

5.1.3 De continuación.

5.1.4 De continuación para necesidades especiales de nutrición.

5.2 Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad:

5.2.1 A base de cereales:

5.2.1.1 Cereales que deben ser preparados para el consumo añadiendo leche u otros líquidos nutritivos idóneos (fórmulas).

5.2.1.2 Cereales que deberán utilizarse después de ser cocidos en agua hirviendo u otros líquidos apropiados, incluidas las pastas.

5.2.1.3 Galletas y otros productos de panificación.

5.2.2 Listos para ser consumidos.

5.2.3 Deshidratados.

6. Disposiciones sanitarias generales

Los establecimientos que se dediquen al proceso de los productos objeto de esta norma, deben:

6.1 Cumplir con lo establecido en la NOM-251-SSA1-2009, señalada en el apartado de referencias y para los productos importados lo correspondiente a esta Norma.

6.2 Instrumentar un plan de análisis de peligros y puntos críticos de control de conformidad con lo establecido en el Apéndice Normativo A de la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, señalada en el apartado de referencias.

6.3 Los productos y materias primas utilizadas en su elaboración deben cumplir con lo establecido en el Reglamento, las materias primas además:

6.3.1 Deben estar limpias y ser inocuas.

6.3.2 No deben exceder los límites máximos residuales de plaguicidas establecidos en el Catálogo Oficial de Plaguicidas de la CICOPLAFFEST, ni contener cualquiera de los plaguicidas prohibidos en dicho Catálogo, según corresponda por la naturaleza de la materia prima.

6.3.3 Cumplir con las normas oficiales mexicanas correspondientes.

6.4 Los productos y las materias primas que se utilicen en su elaboración no deben ser tratados con radiaciones ionizantes.

6.5 Todos los procedimientos de elaboración y de desecación de los productos se deben llevar a cabo de manera que la pérdida de nutrimentos en los productos sea mínima, y se garanticen las cantidades de éstos que se declaran en la etiqueta.

6.6 Los productos no deben contener residuos de hormonas, antibióticos y otros contaminantes o sustancias farmacológicamente activas.

6.7 El responsable del producto debe contar con la evidencia documental que demuestre que cumple con las especificaciones establecidas en esta norma, para cada producto que elabore o comercialice.

6.8 En la elaboración de los productos objeto de esta norma se podrán utilizar los aditivos listados en el Acuerdo, bajo las especificaciones establecidas en el mismo.

6.9 El responsable de la fabricación del producto debe disponer de:

6.9.1 Medios tecnológicos y procedimientos de elaboración que permitan la incorporación de los nutrimentos en forma satisfactoria, y

6.9.2 Métodos de medición y control de las concentraciones de los nutrimentos añadidos a los productos.

6.10 Los productos no podrán usar como ingrediente aceites o grasas hidrogenadas comercialmente.

7. Disposiciones sanitarias para fórmulas

7.1 Los responsables del expendio o suministro al público de fórmulas deben cumplir con el Código Internacional de Comercialización de Sucedáneos de la Leche Materna y Resoluciones Posteriores de la Organización Mundial de la Salud.

7.2 En las unidades médicas, no se permite la distribución gratuita ni la promoción de fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición directamente a las madres, queda sujeta la entrega y/o indicación de estas fórmulas a menores de seis meses de edad únicamente bajo prescripción médica y con justificación por escrito en las unidades de atención del parto y en las de consulta externa.

7.3 En las unidades médicas, guarderías o cualquier otro establecimiento similar en donde se preparan o administran fórmulas, los responsables de su preparación deben seguir al pie de la letra las indicaciones sugeridas por el fabricante, en la reconstitución y conservación de la misma.

7.4 Las fórmulas deben ser preparadas a base de leche de vaca o de otros animales o de mezclas de ellos y/o de otros ingredientes que se haya demostrado científicamente que son idóneos para la alimentación del grupo de edad al que van dirigidas y elaboradas de tal manera que eviten su deterioro o contaminación en todas las condiciones normales de manipulación, conservación y distribución.

7.5 Una vez preparada según las instrucciones de uso dadas en la etiqueta, la fórmula estará exenta de grumos o partículas gruesas, para que pueda ser administrada mediante un chupón de goma o de plástico.

7.6 Especificaciones

7.6.1 Microbiológicos

7.6.1.1 Las fórmulas, deben cumplir con los criterios microbiológicos establecidos en la Tabla No. 1.

Tabla No. 1

Fórmulas en polvo

Microorganismos	n	c	m	M	Clase del Plan
<i>Enterobacter sakazakii</i> (especie de <i>Cronobacter</i>) *	30	0	0 UFC/10 g	N.A.	2
<i>Salmonella</i> spp.	60	0	0 UFC/25 g	N.A.	2
Bacterias aerobias mesófilas **	5	2	500 UFC/g	5 000 UFC/g	3
Enterobacteriaceas	10	2	0 UFC/10 g	N.A.	2

n: número de muestras a ser analizadas

c: máximo número admisible de unidades de muestras defectuosas en un plan de dos clases, o de unidades de muestras marginalmente aceptables en un plan de tres clases

m: un límite microbiológico que separa la buena calidad de la calidad defectuosa en un plan de dos clases o la buena calidad de la calidad marginalmente aceptable en un plan de 3 clases

M: un límite microbiológico que separa, en un plan de tres clases, la calidad marginalmente aceptable de la defectuosa

*Solo aplica para fórmula para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición en polvo y cuando se detecte presencia de Enterobacterias

**No aplica para aquellos productos que contienen probióticos en su formulación

7.6.1.2 Las fórmulas líquidas sujetas a tratamiento térmico y envasadas en recipientes de cierre hermético, además de cumplir con lo establecido en este ordenamiento, deben cumplir con la NOM-130-SSA1-1995, señalada en el apartado de referencias.

7.6.2 Físicoquímicos

7.6.2.1 Metales pesados o metaloides

Tabla No. 2

Especificaciones	Límite máximo (mg/kg)
Arsénico (As)	0,10
Mercurio (Hg)	0,05
Plomo (Pb)	0,02*

* Límite establecido para producto listo para ser consumido

7.6.2.2 Materia extraña. Las fórmulas deben estar exentas de materia extraña.

7.6.3 Nutrimientales

7.6.3.1 Contenido energético

7.6.3.1.1 Las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición deben proporcionar no menos de 60 kcal (o 250 kJ) y no más de 70 kcal (o 295 kJ) por 100 ml del producto listo para ser consumido, comercializado tal cual o reconstituido según las instrucciones del fabricante.

7.6.3.1.2 Las fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición deben proporcionar no menos de 60 kcal (o 250 kJ) y no más de 85 kcal (o 355 kJ) por 100 ml del producto listo para ser consumido, comercializado tal cual o reconstituido según las instrucciones del fabricante.

7.6.3.2 Vitaminas y nutrimentos inorgánicos (minerales)

7.6.3.2.1 Las vitaminas y nutrimentos inorgánicos (minerales) que se adicionen a las fórmulas debe hacerse bajo las formas que se señalan en el Apéndice Normativo A.

7.6.3.2.2 Las fórmulas deben contener las siguientes vitaminas dentro de los límites que se señalan a continuación:

Tabla No. 3

Vitaminas	Fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición			Fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición	
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal	NSR/ 100 kcal	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal
Vitamina A	200 U.I. o 60 µg expresados en retinol	600 U.I. o 180 µg expresados en retinol	-	250 U.I. o 75 µg expresados en retinol	750 U.I. o 225 µg expresados en retinol
Vitamina D	1 µg o 40 U.I.	2,5 µg o 100 U.I.	-	40 U.I. o 1 µg	120 U.I. o 3 µg
Vitamina C (Ac. ascórbico)	10 mg	S.E.	70 mg ⁽¹⁾	8 mg	S.E.
Tiamina (B₁)	60 µg	S.E.	300 µg	40 µg	S.E.
Riboflavina (B₂)	80 µg	S.E.	500 µg	60 µg	S.E.
Niacina (B₃)	300 µg	S.E.	1500 µg	250 µg	S.E.
Piridoxina (B₆)	35 µg ⁽²⁾	S.E.	175 µg	45 µg ⁽²⁾	S.E.
Acido fólico (B₉)	10 µg	S.E.	50 µg	4 µg	S.E.
Acido pantoténico (B₅)	400 µg	S.E.	2000 µg	300 µg	S.E.
Cianocobalamina (B₁₂)	0,1 µg	S.E.	1,5 µg	0,15 µg	S.E.
Vitamina K₁	4 µg	S.E.	27 µg	4 µg	S.E.
Biotina (H)	1,5 µg	S.E.	10 µg	1,5 µg	S.E.
Vitamina E (alfa tocoferol)	0,5 mg de alfa tocoferol/g de ácidos grasos poliinsaturados ⁽³⁾	S.E.	5	0,7 U.I./g de ácido linoleico o por gramo de ácidos grasos poliinsaturados expresados en ácido linoleico pero en ningún caso menos de 0,7 U.I. por 100 kcal utilizables	S.E.

(1) En el caso de productos en polvo debería procurarse conseguir NSR más bajos.

(2) Las fórmulas que contengan más de 1,8 g de proteínas por cada 100 kcal, deben incrementar el contenido de piridoxina en al menos 15 µg de piridoxina por cada gramo de proteína arriba de dicho valor, en la fórmula lista para ser consumida de acuerdo con las instrucciones descritas en la etiqueta.

(3) Aplicando los siguientes factores de equivalencia para adaptar el contenido mínimo de vitamina E al número de dobles enlaces de ácidos grasos en el preparado: 0,5 mg de alfa tocoferol/1g de ácido linoleico; 0,75 mg de alfa tocoferol/1g de ácido alfa linoléico; 1 mg de alfa tocoferol/1g de ARA; 1,25 mg de alfa tocoferol/1g de EPA; 1,5 mg alfa tocoferol/1g de DHA.

7.6.3.2.3 Las fórmulas deben contener los siguientes nutrimentos inorgánicos (minerales) dentro de los límites que se señalan a continuación:

Tabla No. 4

Nutrimentos inorgánicos (minerales)	Fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición			Fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición	
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 Kcal	NSR/100 kcal	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal
Sodio (Na)	20 mg	60 mg	-	20 mg	85 mg
Potasio (K)	60 mg	180 mg	-	80 mg	S.E.
Cloro (Cl)	50 mg	160 mg	-	55 mg	S.E.
Calcio (Ca)	50 mg ⁽¹⁾	S.E.	140 mg ⁽¹⁾	90 mg	S.E.
Fósforo (P)	25 mg ⁽¹⁾	S.E.	100 mg ⁽¹⁾	60 mg	S.E.
Magnesio (Mg)	5 mg	S.E.	15 mg	6 mg	S.E.
Hierro (Fe)	0,45 mg	S.E.	S.E.	1 mg	2 mg
Yodo (I)	10 µg	S.E.	60 µg	5 µg	S.E.
Cobre (Cu)	35 µg ⁽²⁾	S.E.	120 µg ⁽²⁾	-	-
Cinc (Zn)	0,5 mg	S.E.	1,5 mg	0,5 mg	S.E.
Manganeso (Mn)	1,0 µg	S.E.	100 µg	-	-
Selenio (Se)	1 µg	S.E.	9 µg	-	-

⁽¹⁾ La relación Ca:P no será menor de 1,1 ni mayor de 2,1.

⁽²⁾ En los lugares con suministro hídrico con elevado contenido de cobre es necesario ajustar estos niveles.

7.6.3.2.4 No debe añadirse fluoruro a las fórmulas para lactantes. En todo caso, su nivel no deberá ser superior a 100 µg/100 kcal (24 µg/100 kJ) en las fórmulas para lactantes listas para ser consumidas, según las instrucciones del fabricante.

7.6.3.2.5 El contenido de nutrimentos en las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición no debe superar los NSR a menos que no puedan evitarse niveles de nutrimentos más elevados debido a su contenido alto o variable en los ingredientes de las fórmulas o debido a razones tecnológicas. Cuando un tipo o forma de producto ha contenido normalmente niveles inferiores a los NSR los fabricantes no deben aumentar los niveles de nutrimentos a fin de aproximarse a los NSR.

7.6.3.2.6 Las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición, se ajustarán a las disposiciones establecidas en los numerales 7.6.3.1, 7.6.3.2, 7.6.3.3, 7.6.3.4 y 7.6.3.5, excepto en determinadas especificaciones sobre la composición, que deberá modificarse para satisfacer los requerimientos nutrimentales especiales consecuentes al trastorno, condiciones médicas específicas o afección para cuyo tratamiento dietético se haya formulado, etiquetado y presentado cada tipo de fórmula.

7.6.3.2.7 Además de los requisitos estipulados en el numeral 7.6.3.2.5, las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición destinadas a recién nacidos pretérmino deben cumplir con las especificaciones nutrimentales señaladas en las Tablas No. 3 y 4 a excepción de las siguientes vitaminas:

Tabla No. 5

Vitamina	Límite mínimo /100 kcal	Límite máximo /100 kcal
Vitamina A	204 µgER ⁽¹⁾ o 700 U.I.	380 µgER ⁽¹⁾ o 1254 U.I.
Vitamina D	1,8 µg calciferol o 75 U.I.	6,75 µg calciferol o 270 U.I.
Vitamina E	2mg α-TE ⁽²⁾ o 3 U.I.	8 mg α-TE ⁽²⁾ o 12 U.I.

⁽¹⁾ ER equivalentes de retinol

⁽²⁾ α-TE Alfa tocoferoles

7.6.3.2.8 Las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición podrán adicionar además:

Tabla No. 6

Nutrimento	Fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición		
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal	NSR/100 kcal
Colina	7 mg	S.E.	50 mg
Mioinositol	4 mg	S.E.	40 mg
L-carnitina	1,2 mg	S.E.	-
Taurina	-	12 mg	-
DHA*	-	S.E.	0,5 % de los ácidos grasos
Nucleótidos	1,9 mg	16 mg	-

* si se añade ácido docosahexaenoico (DHA), el contenido de ácido araquidónico debe ser al menos el mismo que el de DHA y el contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) no debe exceder el contenido de DHA.

7.6.3.2.9 Además, las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición podrán adicionar los nutrimentos siguientes en los límites señalados:

Tabla No. 7

Nutrimento	Fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición		
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal	NSR/100 kcal
Cromo (Cr)	1,5 µg	S.E.	10 µg
Molibdeno (Mo)	1,5 µg	S.E.	10 µg

7.6.3.3 Proteínas

7.6.3.3.1 Las fórmulas de acuerdo con su fuente de proteína se sujetarán a los siguientes límites:

Tabla No. 8

Fuente de proteína	Fórmulas para lactantes		Fórmulas de continuación	
	Mín g/100 kcal utilizables	Máx g/100 kcal utilizables	Mín g/100 kcal utilizables	Máx g/100 kcal utilizables
a) Leche de vaca	1,8	3	3,0	5,5
b) Hidrolizados de proteína	2,25	3	2,25	S.E.
c) Aislados de proteína de soya sola o mezclada con proteínas	2,25	3	2,25	S.E.

de leche de vaca.				
-------------------	--	--	--	--

7.6.3.3.2 La Relación de Eficiencia Proteica (REP) de las proteínas no debe ser inferior al 85% de la calidad de la caseína.

7.6.3.3.3 Para mejorar la calidad nutritiva de las proteínas, podrán añadirse aminoácidos indispensables, únicamente en las cantidades estrictamente necesarias, los cuales deben ser en su forma natural L, de acuerdo a lo que se indica en la Tabla A3. del Apéndice Normativo A.

7.6.3.4 Ácidos grasos y lípidos o grasas

7.6.3.4.1 El contenido de lípidos o grasas y ácidos grasos en las fórmulas deben cumplir con lo establecido en la Tabla No. 9.

Tabla No. 9

Nutrimento	Fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición		Fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición	
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal
Grasas	4,4 g	6 g	3 g	6 g
Acido linoléico	300 mg	1400 mg NSR	300 mg	S.E.
Acido alfa-linolénico	50 mg	S.E.	50 mg	S.E.

La proporción de ácido linoleico/alfa-linolénico mínimo 5:1, máximo 15:1.

7.6.3.4.2 El contenido de ácidos grasos trans no será superior al 3% del contenido total de ácidos grasos en las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición.

7.6.3.5 Hidratos de carbono

7.6.3.5.1 El contenido mínimo de hidratos de carbono totales en fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición debe ser de 9 g/100 kcal y máximo de 14 g/100 kcal.

7.6.3.5.2 La lactosa y polímeros de glucosa deben ser los hidratos de carbono preferidos para las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición a base de proteínas de la leche de vaca y de proteínas hidrolizadas.

7.6.3.5.3 En las fórmulas para lactantes y en las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición, sólo podrán añadirse almidones naturalmente exentos de gluten precocidos y/o gelatinizados hasta un máximo de 30% del contenido total de hidratos de carbono y hasta un máximo de 2 g/100 ml.

7.6.3.5.4 En las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición debe evitarse el uso de sacarosa, así como la adición de fructosa como ingrediente, salvo cuando sea necesario por justificación tecnológica.

7.6.3.5.5 En las fórmulas de continuación y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición el contenido de hidratos de carbono debe ajustarse al contenido energético indicado en el numeral 7.6.3.1.2. El producto debe contener hidratos de carbono nutrimentalmente asimilables que sean adecuados para la alimentación de los lactantes mayores de seis meses de edad y los niños de corta edad.

7.6.3.6 Nutrimentos o ingredientes opcionales

7.6.3.6.1 En las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición podrán añadirse otros nutrimentos/ingredientes normalmente presentes en la leche materna o humana en cantidad suficiente con la finalidad de lograr el efecto nutrimental o fisiológico de ésta, sobre la base de las cantidades presentes en la leche materna y para asegurarse que sea adecuado como fuente única de la nutrición del lactante. Su idoneidad e inocuidad debe estar demostrada científicamente.

7.6.3.6.2 En las fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición, además de las vitaminas y minerales señalados, pueden añadirse otros nutrimentos/ingredientes, cuando sean necesarios para asegurar que el producto sea adecuado para formar parte de un plan de alimentación mixta, destinado a ser utilizado después del sexto mes de edad.

7.6.3.6.3 Se debe contar con evidencia científica que demuestre la utilidad de los nutrimentos/ingredientes opcionales que se utilicen y estar a disposición de la Secretaría cuando ésta lo solicite.

7.6.3.6.4 Para las fórmulas de continuación y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición las concentraciones de sodio y potasio que derivan de los ingredientes vitamínicos y minerales deben ajustarse a los límites establecidos para el sodio y el potasio en la Tabla No. 4.

7.6.3.6.5 Sólo se podrán utilizar cultivos que produzcan ácido láctico L(+), para el caso de las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición se podrán utilizar siempre y cuando se haya comprobado que son inocuos y adecuados para estas poblaciones vulnerables, el sustento debe estar a disposición de la Secretaría cuando ésta lo solicite.

8. Disposiciones sanitarias para alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad

8.1 Los productos que se modifiquen en su composición, deben cumplir con lo establecido en la NOM-086-SSA1-1994, señalada en el apartado de referencias.

8.2 Los ingredientes como carne de aves, bovino o pescado deben someterse a operaciones que aseguren la eliminación de trozos de hueso y espinas.

8.3 Para los productos a base de cereales podrán utilizarse todos los cereales molidos aptos para el consumo humano.

8.4 Las leguminosas deben ser sometidas a tratamiento térmico para eliminar, en la medida de lo posible, los factores antinutricios presentes normalmente, tales como las lectinas (hemaglutininas), así como los inhibidores de la tripsina y quimotripsina.

8.5 No se permite el uso de las habas (*Vicia faba L.*) como ingrediente en estos productos, debido al peligro de favismo.

8.6 Los cereales, leguminosas y semillas oleaginosas deben tratarse previamente para disponer de materias primas limpias y de buena calidad. Dentro de los tratamientos se pueden considerar los siguientes:

8.6.1 Limpieza o lavado: para eliminar la suciedad, granos dañados, granos extraños y semillas nocivas, insectos y excrementos de insectos y cualquier material adherido.

8.6.2 Descascarado: en caso de ser necesario, para: leguminosas, semillas oleaginosas y determinados cereales, tales como avena, cebada, sorgo y mijo. Estos deben ser descascarados lo más completamente posible para reducir el contenido de fibra cruda a niveles aceptables y para eliminar los taninos y otras sustancias fenólicas que puedan reducir la digestibilidad de las proteínas.

8.7 Los productos comercialmente estériles deben cumplir con lo establecido en las disposiciones sanitarias de la NOM-130-SSA1-1995, señalada en el apartado de referencias.

8.8 El cacao se podrá adicionar únicamente en aquellos productos que se destinen a niños mayores de nueve meses de edad, en una cantidad que no exceda de 5% m/m en base seca.

8.9 Especificaciones

8.9.1 Microbiológicas

8.9.1.1 Deben estar exentos de microorganismos patógenos.

8.9.1.2 Los alimentos a base de cereales, deben cumplir con lo siguiente:

Tabla No. 10

Alimentos a base de cereales para lactantes (6 a 12 meses de edad) para consumirse directamente, incluye las galletas y los bizcochos

Microorganismos	n	c	m	M	Clase del Plan
Bacterias aerobias mesófilas	5	2	1 000 UFC	10 000 UFC	3

Enterobacteriaceas	5	1	< 0,3 NMP	9,3 NMP	3
Salmonella spp.	60	0	0 UFC/25 g	N.A.	2

n: número de muestras a ser analizadas

c: máximo número admisible de unidades de muestras defectuosas en un plan de dos clases, o de unidades de muestras marginalmente aceptables en un plan de tres clases

m: un límite microbiológico que separa la buena calidad de la calidad defectuosa en un plan de dos clases o la buena calidad de la calidad marginalmente aceptable en un plan de 3 clases

M: un límite microbiológico que separa, en un plan de tres clases, la calidad marginalmente aceptable de la defectuosa

Tabla No. 11

Alimentos a base de cereales para niños de corta edad (mayores de 12 a 36 meses de edad) para consumirse directamente

Microorganismos	n	c	m	M	Clase del Plan
Bacterias aerobias mesófilas	5	2	3 000 UFC	30 000 UFC	3
Enterobacteriaceas	5	1	2,9 NMP	21 NMP	3
Salmonella spp.	60	0	0 UFC /25 g	N.A.	2

n: número de muestras a ser analizadas

c: máximo número admisible de unidades de muestras defectuosas en un plan de dos clases, o de unidades de muestras marginalmente aceptables en un plan de tres clases

m: un límite microbiológico que separa la buena calidad de la calidad defectuosa en un plan de dos clases o la buena calidad de la calidad marginalmente aceptable en un plan de 3 clases

M: un límite microbiológico que separa, en un plan de tres clases, la calidad marginalmente aceptable de la defectuosa

Tabla No. 12

Alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad (6 a 36 meses de edad) que llevan tratamiento térmico antes de su consumo

Microorganismos	n	c	m	M	Clase del Plan
Bacterias aerobias mesófilas	5	3	10 000 UFC	100 000 UFC	3
Enterobacteriaceas	5	2	100 UFC	1 000 UFC	3
Salmonella spp.	10	0	0 UFC /25 g	N.A.	2

n: número de muestras a ser analizadas

c: máximo número admisible de unidades de muestras defectuosas en un plan de dos clases, o de unidades de muestras marginalmente aceptables en un plan de tres clases

m: un límite microbiológico que separa la buena calidad de la calidad defectuosa en un plan de dos clases o la buena calidad de la calidad marginalmente aceptable en un plan de 3 clases

M: un límite microbiológico que separa, en un plan de tres clases, la calidad marginalmente aceptable de la defectuosa

8.9.1.3 Los productos deshidratados deben cumplir con lo siguiente:

Tabla No. 13

Alimentos deshidratados

Microorganismos	Límite máximo
-----------------	---------------

Bacterias aerobias mesófilas	2 500 UFC/g o 100 000 UFC/g*
Salmonella spp	0 UFC/25 g
Coliformes totales	20 NMP/g

* Si deben ser sometidos a tratamiento térmico antes de su consumo.

8.9.2 Contaminantes

8.9.2.1 Los productos para lactantes y niños de corta edad deben cumplir con las especificaciones de metales pesados y materia extraña perjudicial a la salud establecidas en el punto 7.6.2 para fórmulas, excepto en el límite de plomo, el cual debe ser 0,20 ppm.

8.9.2.2 Los alimentos a base de cereales no deben exceder de 20 µg aflatoxinas/kg de producto.

8.9.3 Nutrimientales

8.9.3.1 El contenido energético de los productos elaborados a base de cereales no debe ser inferior a 0,8 kcal/g.

8.9.3.2 Contenido de sodio

8.9.3.2.1 Para los alimentos a base de cereales el contenido de sodio en el cereal seco y harinas de cereal no debe exceder los 100 mg/100 kcal del producto, calculado en relación con el producto preparado listo para ser consumido con base en las instrucciones de empleo.

8.9.3.2.2 Los demás alimentos para lactantes y niños de corta edad no deben exceder de 200 mg/100 g o de 200 mg/100 kcal de producto, calculado en relación con el producto preparado listo para ser consumido de conformidad con las instrucciones de empleo, ni agregar sal (NaCl) a los productos de fruta y a los postres a base de fruta.

8.9.3.3 Contenido de vitaminas

8.9.3.3.1 En los alimentos a base de cereales la cantidad de vitamina B₁ (tiamina) no deberá ser inferior a 50 µg/100 kcal.

8.9.3.4 Contenido de proteínas

8.9.3.4.1 Podrán añadirse aminoácidos indispensables (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, arginina e histidina) en sus formas L, sólo en las cantidades necesarias para mejorar la calidad de la proteína presente, de acuerdo con lo que se establece en la Tabla A3. del Apéndice Normativo A.

8.9.3.5 Contenido de hidratos de carbono

8.9.3.5.1 Se podrán añadir los siguientes hidratos de carbono: lactosa, maltosa, sacarosa, glucosa, fructosa, miel y jugo de frutas, maltodextrina, jarabe de glucosa, jarabe de glucosa deshidratada y sus combinaciones, almidón pretostado, almidón gelatinizado; los dos últimos deben ser sin gluten.

8.9.3.5.2 La cantidad total de hidratos de carbono en néctares no debe exceder de 14 g/100 g del producto listo para ser consumido y en las papillas preparadas con fruta y/o cereal y/o yogurt y postres no debe ser superior a 20 g/100 g del producto listo para ser consumido.

8.9.3.5.3 Para los alimentos a base de cereales, excepto las pastas, la cantidad de azúcares añadidos no podrá ser superior a 7,5 g/100 kcal cuando se agregue como sacarosa, glucosa, jarabes de glucosa o miel, si se añade como fructosa no podrá ser superior a 3,75 g/100 kcal.

8.9.3.6 Contenido de lípidos

8.9.3.6.1 Los cereales que deben ser preparados para el consumo añadiendo leche u otros líquidos idóneos (fórmulas) y las galletas y otros productos de panificación, no deben exceder un contenido máximo de 3,3 g/100 kcal de lípidos.

8.9.3.7 Ingredientes facultativos

8.9.3.7.1 Sólo podrán utilizarse cultivos productores de ácido láctico.

9. Muestreo y métodos de prueba

9.1 El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta Norma se sujeta a lo que establece la Ley General de Salud.

9.2 Para la verificación de las especificaciones sanitarias y nutrimentales que se establecen en esta Norma se deben aplicar los métodos de prueba señalados en el Apéndice Normativo B.

10. Etiquetado

10.1 La etiqueta de los productos debe cumplir con lo establecido en el Reglamento y en la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 señalada en el apartado de referencias, en lo que no se oponga con la presente norma.

10.2 Deben ostentar fecha de caducidad, a excepción de los alimentos y bebidas no alcohólicas para niños de corta edad comercialmente estériles que podrán declarar fecha de consumo preferente.

10.3 Fórmulas

10.3.1 Deben denominarse conforme con la clasificación señalada en el numeral 5.1, según corresponda.

10.3.2 No se deben utilizar términos como "**humanizado**", "**maternizada**" o similares.

10.3.3 Las fórmulas que no contengan leche ni algún derivado lácteo deben incluir en la denominación el término "**no láctea**".

10.3.4 Las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición que contengan como mínimo 1 mg de hierro por 100 kcal utilizables, podrán ostentar dentro de la denominación "**con hierro**".

10.3.5 Las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición, deben indicar en términos descriptivos adecuados como parte de la denominación, la característica esencial de la fórmula, pero no el trastorno, la enfermedad o la condición médica específica a la que están destinadas, ejemplos: "**proteína hidrolizada**", "**libre de lactosa**". La única condición médica específica que puede ser incluida es el uso de los términos "**pretérmino**" o "**de bajo peso al nacer**".

10.3.6 Para el caso de las fórmulas que contengan nutrimentos o ingredientes opcionales, diferentes de los establecidos en las Tablas No. 3, No. 4, No. 6 y No. 7 se permite incluir dentro de la denominación la presencia de éstos, siempre y cuando cumplan con los numerales 7.6.3.6.1, 7.6.3.6.3, 7.6.3.6.5 y 10.3.8.2. Por ejemplo "**con probióticos**", "**con prebióticos**", "**con luteína**".

10.3.7 En la etiqueta figurará la lista completa de ingredientes, por orden decreciente de proporciones, salvo las vitaminas y/o nutrimentos inorgánicos (minerales), que se podrán indicar como grupos separados.

10.3.8 Información nutrimental, debe declararse el valor nutritivo del producto, como sigue:

10.3.8.1 La cantidad en gramos de proteínas, hidratos de carbono y grasas o lípidos por 100 kcal, indicando la cantidad de producto equivalente a 100 kcal del producto listo para ser consumido.

10.3.8.2 La cantidad total en las unidades correspondientes de vitaminas y nutrimentos inorgánicos (minerales), colina y de cualquier otro nutrimento declarado en la lista de ingredientes por 100 kcal.

10.3.8.3 Adicionalmente se podrá declarar el contenido de nutrimentos por 100 g o por 100 ml del producto listo para ser consumido que se haya preparado de acuerdo con las indicaciones señaladas en la etiqueta.

10.3.8.4 En las fórmulas para lactantes líquidas, además, se debe declarar el contenido energético y la cantidad en gramos de proteínas, hidratos de carbono, grasas y demás nutrimentos por presentación (envase).

10.3.8.5 Las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición, deben declarar la cantidad total de los nutrimentos específicos a los que se debe la característica esencial que hace que la fórmula se destine a esa necesidad especial por 100 kcal y opcionalmente por 100 g o 100 ml del producto comercializado tal cual.

10.3.9 No podrán incluir ningún tipo de declaración de propiedades nutrimentales ni saludables.

10.3.10 Instrucciones para su almacenamiento, conservación, uso, preparación y consumo.

10.3.10.1 Las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición deben incluir instrucciones en forma escrita y gráfica, sobre la manera de prepararla y utilizarla de modo que no induzca a desistir de la lactancia materna. Asimismo, deben incluirse instrucciones sobre la conservación del producto, antes y después de abrir el envase y una vez preparado el producto, y una declaración que indique que el almacenamiento prolongado y temperaturas excesivas deben evitarse. En el caso de fórmulas líquidas las instrucciones gráficas podrán incluirse en el envase colectivo únicamente.

10.3.10.2 Las fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición deben contener instrucciones sobre la preparación en forma escrita y gráfica, uso, su almacenamiento y conservación antes y después de abrir el envase y en su caso una vez preparado el producto, incluyendo una declaración que indique que el almacenamiento prolongado y temperaturas excesivas deben evitarse.

10.3.10.3 Las fórmulas deben ostentar una leyenda que indique que deben ser preparadas con agua hervida por cinco minutos y enfriada hasta que quede tibia. En caso de no contar con ésta se podrá utilizar agua purificada a temperatura ambiente.

10.3.10.4 Con la finalidad de evitar el riesgo de causar graves quemaduras, en las fórmulas se debe incluir una leyenda indicando que no se debe calentar usando horno de microondas.

10.3.11 No deben ostentar imágenes o textos que sugieran a las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición como idénticas y superiores a la leche materna o humana, conforme con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para la comercialización de sucedáneos de la leche materna.

10.3.12 Se debe indicar cerca de la denominación, el intervalo de edad al que está dirigida la fórmula, sin que esto sea parte de la misma.

10.3.13 Opcionalmente puede ser incluida en cualquier parte de la etiqueta la presentación de las fórmulas, siendo ésta líquida o en polvo, sin que esto sea parte de la denominación de las mismas.

10.3.14 Deben ostentar la leyenda "Aviso Importante" o su equivalente. Posteriormente lo siguiente:

10.3.14.1 Una leyenda donde se afirme la superioridad de la lactancia materna, por ejemplo: "**La leche materna es el mejor alimento para el bebé**", "**La leche materna contiene hormonas, enzimas activas y otros compuestos que no pueden ser duplicados en ninguna fórmula para lactantes**", y señalar en las fórmulas para lactantes, "**El uso de este producto debe hacerse bajo orientación médica**" y en el caso de las fórmulas de continuación, "**El uso de este producto debe hacerse bajo orientación de un profesional de la salud (médico o nutriólogo)**" o leyendas equivalentes, con un tamaño de letra que sea fácilmente visible, con negritas y en un fondo contrastante.

10.3.15 Las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición deben contener una declaración referente a que los lactantes, además del consumo de la fórmula, también deben ser ablactados a partir de una edad que sea apropiada para su crecimiento específico y necesidades de desarrollo según la orientación del profesional de salud (médico o nutriólogo) y en cualquier caso a partir de los seis meses de edad.

10.3.16 Las fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición deben contener una declaración que indique que son parte de la ablactación o alimentación complementaria y no deben ser introducidas antes del sexto mes de vida.

10.3.17 Una leyenda sobre las consecuencias de una preparación y uso inadecuado del producto, tal como "**La salud de su hijo depende de que siga cuidadosamente las instrucciones para la preparación y uso**" o alguna equivalente.

10.3.18 Las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición deben incluir una declaración destacada y en negritas que diga "**UTILICESE BAJO SUPERVISION MEDICA**" separada de toda información escrita, impresa o gráfica.

10.3.19 Los fortificadores de leche materna o humana deben incluir una declaración destacada y en negritas que diga "**EXCLUSIVAMENTE PARA USO HOSPITALARIO**".

10.4 Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad.

10.4.1 La denominación debe indicar el grupo de edad al que va dirigido el producto, ejemplo "**cereal seco para lactantes (y/o para niños de corta edad)**", "**galletas para lactantes (y/o para niños de corta edad)**".

10.4.2 La sal yodada, debe declararse como tal en la lista de ingredientes.

10.4.3 Cuando la declaración de fibra dietética, vitaminas y nutrimentos inorgánicos (minerales) se haga en porcentaje de los VNR se deben considerar los valores que corresponda al grupo de edad al que va dirigido el producto, conforme con la Tabla No. 14.

Tabla No. 14

Valores Nutrimientales de Referencia para la Población Mexicana por segmento

Nutrimiento/unidad de medida	Edad		
	0 a 6 meses	7 a 12 meses	1 a 3 años
Fibra g	s.i.	s.i.	14** (1)
Vitamina A µgER	s.i.	s.i.	300**
Vitamina D µg (como colecalciferol)	5**	5**	5**
Vitamina E mg (equivalente de tocoferol)	4**	5**	6*
Vitamina K ₁ µg	2**	2,5**	30**
Tiamina (B ₁) mg	0,2**	0,3**	0,4*
Riboflavina (B ₂) mg	0,3**	0,4**	0,4*
Piridoxina (B ₆) mg	0,1**	0,3**	0,4*
Niacina mg	2**	4**	6*
Vitamina B ₁₂ µg (cobalamina)	0,3**	0,5**	0,8*
Acido fólico µg (folacina)	76**	96**	168**
Vitamina C mg (ácido ascórbico)	40*	50*	15*
Acido pantoténico mg	1,7**	1,8**	2**
Calcio mg	210**	270**	500**
Cobre µg	220**	220**	340*
Cromo µg	0,2**	5,5**	11**
Fósforo mg	100**	275**	460*
Flúor mg	0,01**	0,45**	0,6**
Hierro mg	s.i.	16**	13**
Yodo µg	110**	130**	65*
Magnesio mg	36**	90**	80*

Selenio µg	14**	21**	20*
Zinc mg	s.i.	3,8**	4*

(1) Corresponde al intervalo de edad de 2 a 3 años

* Corresponden a IDR

** Corresponden a IDS

s.i. sin información suficiente para establecer una IDS

10.4.4 Las instrucciones para su preparación y uso, así como sobre su almacenamiento y conservación antes y después de que se haya abierto el envase debe figurar en la etiqueta.

10.4.5 Se debe indicar cerca de la denominación, el intervalo de edad al que está dirigido el producto. Para los productos destinados a la ablactación o alimentación complementaria, la edad de inicio no deberá ser inferior a los seis meses de edad para ningún producto; asimismo, la etiqueta debe contener la indicación de que la decisión sobre el momento preciso en que se comenzará la ablactación incluida cualquier excepción con respecto al límite de los seis meses de edad debe adoptarse en consulta con un profesional de la salud (médico o nutriólogo), basándose en las necesidades específicas de crecimiento y desarrollo del lactante.

10.4.6 Cuando el producto contenga remolacha o espinacas, se debe indicar en la etiqueta "**Para niños de más de doce semanas de edad**".

10.4.7 Cuando el producto esté compuesto de ingredientes y aditivos exentos de gluten podrá incluirse en la etiqueta la declaración "**exento de gluten**".

10.4.8 En los cereales que deben ser preparados para el consumo añadiendo leche u otros líquidos nutritivos idóneos debe indicarse la leyenda "**Utilícese leche o fórmula pero no agua**" para prepararlo o una indicación equivalente.

10.4.9 En los cereales que deben ser preparados para el consumo añadiendo leche u otros líquidos nutritivos idóneos debe incluirse una leyenda que indique que dichos ingredientes añadidos deben ser recomendados por un profesional de la salud (médico o nutriólogo).

11. Envase y embalaje

11.1 Envase

Los productos objeto de esta Norma se deben envasar en recipientes elaborados con materiales inocuos y resistentes a distintas etapas del proceso, de tal manera que no reaccionen con el producto o alteren sus características físicas, químicas y sensoriales.

11.2 Embalaje

Se debe usar material resistente que ofrezca la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez que faciliten su manipulación, almacenamiento y distribución.

12. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma es parcialmente equivalente con las siguientes normas:

12.1 Codex Alimentarius. Norma para preparados para lactantes y preparados para usos medicinales especiales destinados a los lactantes. CODEX STAN 72-1981. Rev. 2007. Enmienda 2011.

12.2 Codex Alimentarius. Norma del Codex para Alimentos envasados para lactantes y niños. CODEX STAN 73-1981. Enmienda 1989.

12.3 Codex Alimentarius. Norma del Codex para alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños pequeños. CODEX STAN 74-1981. Rev. 2006.

12.4 Codex Alimentarius. Norma del Codex para preparados complementarios. CODEX STAN 156-1987. Enmienda 2011.

12.5 Codex Alimentarius. Listas de referencia de compuestos de nutrientes para su utilización en alimentos para fines dietéticos especiales destinados a los lactantes y niños pequeños. CAC/GL 10 -1979. Enmienda 2009.

12.6 World Health Organization. International Code of Marketing of Breast-milk Substitutes. Ginebra: WHO, 1981.

13. Bibliografía

13.1 Secretaría de Economía. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, 2009.

- 13.2** Secretaría de Salud. Ley General de Salud. México, 2012.
- 13.3** Secretaría de Economía. Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, 1999.
- 13.4** Secretaría de Salud. Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. México, 1999
- 13.5** Secretaría de Salud. Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. México, 2004.
- 13.6** Norma Oficial Mexicana NOM-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas.
- 13.7** Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002. Sistema General de Unidades de Medida.
- 13.8** Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999. Para la atención a la salud del niño.
- 13.9** Codex Alimentarius. Norma general para el etiquetado y declaración de propiedades de alimentos preenvasados para regímenes especiales. CODEX STAN 146-1985. Enmienda 2009.
- 13.10** Codex Alimentarius. Directrices sobre etiquetado nutricional. CAC/GL 2-1985. Enmienda 2010.
- 13.11** Codex Alimentarius. Código de prácticas de higiene para los preparados en polvo para lactantes y niños pequeños. CAC/RCP 66-2008.
- 13.12** Codex Alimentarius. Directrices generales sobre declaraciones de propiedades. CAC/GL 1-1979. Enmienda 2009.
- 13.13** Codex Alimentarius. Directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables. CAC/GL 23-1997. Enmienda 2011.
- 13.14** Directiva 2006/141/CE de la Comisión del 22 de diciembre de 2006 relativa a los Preparados para lactantes y preparados de continuación y por lo que se modifica la Directiva 1999/21/CE.
- 13.15** Directiva 2006/125/CE de la Comisión de 5 de diciembre de 2006 relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.
- 13.16** FDA/DEA/ONDPC. Code of Federal Regulations. 21CFR107. USA, 2011.
- 13.17** Agostoni, C., Braegger, C. Breast-feeding: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009; 49: 112-125.
- 13.18** Agostoni, C., Buonocore, G. Enteral Nutrient Supply for Preterm Infants: Commentary From the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010; 50 (1):1-9.
- 13.19** Bourges R.H., Casanueva E., Rosado J.L. (ed). Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases Fisiológicas. I. México. Editorial Médica Panamericana, 2005.
- 13.20** Bourges R.H., Casanueva E., Rosado J.L (ed). Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases Fisiológicas. II. Energía, proteínas, lípidos, hidratos de carbono y fibra. México. Editorial Médica Panamericana, 2008.
- 13.21** Canadian Food Inspection Agency and Health Canada. Letter to industry: Requirements Related to Nutrition Information and Nutrition and Health Claims for Infant Formula. Canadá: 2007.
- 13.22** European Commission. Report of the Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formulae and Follow-on Formulae. SCF/CS/NUT/IF/65. 2003.
- 13.23** Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula. Meeting Report. Microbiological Risk Assessment. Series 10. Roma: FAO/WHO, 2010.
- 13.24** García, A.J. Papel de los cereales en la alimentación de ablactación, nutrición del lactante y preescolar. *Acta Pediatr Mex*, 1998; 19(S): 17-21.
- 13.25** Makihiro S., Norifumi S., Taku N., Tadahi I., Ichiro N. Profile of Nucleotides and Nucleosides of Human Milk. Received November 5. 1994.
- 13.26** Koletzco B, Baker S, Cleghorn G, Neto UF, Gopalan S, Hernell O, Hock QS, Jirapinyo P, Lonnerdal B, Pencharz p, Pzyrembel H, Ramírez-Mayans J, Shamir R, Turck D, Yamashiro Y, Zong-Yi D. Global standard for the composition of infant formula: recomendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastroenterol*, 2001; 5:584-599.
- 13.27** Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. España.

13.28 Sisk M.P., Lovelady A.Ch., Dillard, G.R., Gruber J.K. Lactation counseling for mothers of very low birth weight infants: effect on maternal anxiety and infant intake of human milk. *Pediatric*, 2006; 117(1): e67-e75.

13.29 Udaeta-Mora E., Toussaint-Martínez.G. Uso de una fórmula para prematuros adicionada con ácidos poliinsaturados de cadena larga: aceptabilidad y tolerancia. *Gac Med Mex*, 2005; 141(1): 1-5.

14. Observancia de la norma

La vigilancia en el cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud y a los Gobiernos de las Entidades Federativas en el ámbito de sus respectivas competencias.

15. Vigencia

15.1 La presente norma entrará en vigor a los ciento veinte días naturales posteriores al de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

15.2 El numeral 6.8 entrará en vigor el mismo día en que entre en vigor el Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios.

15.3 El cumplimiento del Apartado 10 de Etiquetado, será aplicable a los productos elaborados a partir de la fecha de entrada en vigor de la presente norma.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 16 de agosto de 2012.- El Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Mikel Andoni Arriola Peñalosa**.- Rúbrica.

Apéndice Normativo A.

Sustancias nutritivas

Tabla A1. Sales Minerales

Nutrimento	Fuente
Calcio	Carbonato de calcio Cloruro de calcio Citrato de calcio Fosfato cálcico monobásico Fosfato cálcico dibásico Fosfato cálcico tribásico Glicerofosfato cálcico Gluconato cálcico Hidróxido de cálcico L-Lactato de calcio Oxido cálcico Sulfato cálcico
Fósforo	Acido fosfórico Fosfato cálcico monobásico Fosfato cálcico dibásico Fosfato cálcico tribásico Fosfato magnésico dibásico Fosfato magnésico tribásico Fosfato potásico monobásico Fosfato potásico dibásico Fosfato sódico dibásico

	<p>Ortofosfato férrico</p> <p>Glicerofosfato magnésico</p> <p>Fosfato diácido de sodio (fosfato sódico monobásico)</p> <p>Fosfato Trisódico (Fosfato sódico tribásico)</p> <p>Glicerofosfato potásico</p> <p>Glicerofosfato de manganeso (II)</p>
Hierro	<p>Bisglicinato ferroso</p> <p>Carbonato ferroso estabilizado con sacarosa</p> <p>Citrato ferroso</p> <p>Citrato ferroamónico</p> <p>Citrato férrico</p> <p>Difosfato férrico (pirofosfato férrico)</p> <p>Fumarato ferroso</p> <p>Gluconato ferroso</p> <p>Hierro reducido de hidrógeno</p> <p>Hierro electrolítico</p> <p>Hierro carbonilo</p> <p>Lactato ferroso</p> <p>Ortofosfato férrico</p> <p>Sacarato férrico</p> <p>Succinato ferroso</p> <p>Sulfato ferroso</p> <p>Difosfato férrico de sodio</p>
Magnesio	<p>Acetato magnésico</p> <p>Carbonato de magnesio</p> <p>Carbonato ácido de magnesio</p> <p>Cloruro magnésico</p> <p>Oxido magnésico</p> <p>Fosfato magnésico dibásico</p> <p>Fosfato magnésico tribásico</p> <p>Gluconato magnésico</p> <p>Glicerofosfato magnésico</p> <p>Hidróxido magnésico</p> <p>Lactato magnésico</p> <p>Sales magnésicas de ácido cítrico</p> <p>Sulfato magnésico</p>
Sodio	<p>Bicarbonato de sodio</p> <p>Carbonato de sodio</p>

	Cloruro sódico Citrato sódico Gluconato sódico L- Lactato de sodio Fosfato sódico monobásico Fosfato sódico dibásico Fosfato sódico tribásico Sulfato sódico Hidróxido de sodio
Potasio	Bicarbonato potásico Carbonato de potasio Cloruro potásico Citrato potásico Glicerofosfato potásico Gluconato potásico Fosfato potásico monobásico Fosfato potásico dibásico Fosfato potásico tribásico L- Lactato de potasio Hidróxido de potasio
Cobre	Gluconato de cobre Carbonato cúprico Citrato cúprico Sulfato cúprico
Yodo	Yoduro potásico Yoduro sódico Yodato potásico Yodato sódico
Zinc	Acetato de zinc Carbonato de zinc Cloruro de zinc Gluconato de zinc Lactato de zinc Oxido de zinc Sulfato de zinc
Manganeso	Carbonato de manganeso II Cloruro de manganeso II Citrato de manganeso II

	Glicerofosfato de manganeso II Gluconato de manganeso II Sulfato de manganeso II
Selenio	Selenato sódico Selenito sódico Selenito sódico hidrógeno
Cromo	Sulfato de cromo III Cloruro de cromo III
Molibdeno	Molibdato de sodio Molibdato de amonio
Flúor	Fluoruro de sodio Fluoruro de potasio Fluoruro de calcio

Tabla A2. Vitaminas

Vitamina	Fuente
Vitamina A	Todo trans retinol Acetato de retinilo Palmitato de retinilo
Provitamina A	Beta caroteno
Vitamina D ₂	Ergocalciferol
Vitamina D ₃	Colecalciferol
Vitamina E	d-alfa tocoferol dl-alfa tocoferol d-alfa tocoferil acetato dl-alfa tocoferil acetato Succinato ácido d-alfa tocoferil Succinato ácido dl-alfa tocoferil Succinato de dl-alfa tocoferil polietileno glicol 1000
Tiamina (Vitamina B ₁)	Hidrocloruro de tiamina cloruro Tiamina mononitrato
Riboflavina (Vitamina B ₂)	Riboflavina Riboflavina 5'-fosfato sódico
Niacina	Nicotinamida Acido nicotínico
Vitamina B ₆	Hidrocloruro de piridoxina Piridoxal 5- fosfato
Biotina (vitamina H)	D-biotina
Acido fólico	Acido N-pteroil-L-glutámico

	L-metilfolato cálcico
Acido pantoténico	D-Pantotenato cálcico D-Pantenol DL-Pantenol D-pantotenato sódico
Vitamina B ₁₂	Cianocobalamina Hidroxocobalamina
Vitamina K ₁	Fitomenadiona (2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona/filoquinona/fitonadiona)
Vitamina C	Acido L-ascórbico L-Ascorbato sódico L-Ascorbato cálcico Acido 6- palmitil-L-ascórbico (palmitato de ascorbilo) L-Ascorbato potásico

Tabla A3. Aminoácidos y otros nutrimentos nitrogenados

L-ácido glutámico
L-glutamina
L-alanina
L-arginina-L aspartato
L- cistina
Diclorhidrato de L-cistina
L-arginina
Clorhidrato de L-arginina
L-ácido aspártico
L-citrulina
L-ornitina
Monoclorhidrato de L-ornitina
N-acetil –L-cisteína
N-acetil –L-metionina
Acetato de L-lisina
L-aspartato de L-lisina
L-glutamato dihidrato de L-lisina
L-aspartato de magnesio
L-glutamato de calcio
L-glutamato de potasio
Citidina 5-monofosfato
L-histidina
Clorhidrato de L-histidina
Glicina
L-iso-leucina
Clorhidrato de L-iso-leucina
L-leucina
Clorhidrato de L-leucina
L-lisina
Monoclorhidrato de L-lisina
L-cisteína
Clorhidrato de L-cisteína
L-metionina

L-fenilalanina
L-prolina
L-serina
L-treonina
L-triptófano
L-tirosina
L-valina
L-carnitina
Clorhidrato de L-carnitina
Tartrato de L-carnitina
Adenosina 5'-monofosfato
Uridina 5'-monofosfato y su sal disódica
Guanosina 5'-monofosfato y su sal disódica
Inosina 5'-monofosfato y su sal disódica
Bitartrato de colina
Citrato de colina
Colina
Cloruro de colina
Hidrógeno tartrato de colina
Mioinositol
Taurina

APENDICE NORMATIVO B**METODOS MICROBIOLÓGICOS****B.1 PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLÓGICO****B.1.1 Fundamento**

Se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en la porción de muestra.

B.1.2 Reactivos y materiales**B.1.2.1 Reactivos**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico. Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

B.1.2.1.1 Preparación de reactivos**B.1.2.1.1.1 Solución de hidróxido de sodio 1 N****FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Hidróxido de sodio	4 g
Agua	100 ml

Preparación: Disolver el hidróxido de sodio y llevar a 100 ml con agua.

B.1.2.1.1.2 Soluciones diluyentes**B.1.2.1.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).****FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Fosfato de sodio monobásico	34 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N. Llevar a un litro con agua. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

B.1.2.1.1.2.2 Agua peptonada

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	1 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a $7,2 \pm 0,2$ con hidróxido de sodio 1 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar obscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

B.1.2.2 Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio deberán esterilizarse mediante:
- Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o Autoclave, durante 15 min como mínimo a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.
- El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por esterilización repetida y éste debe ser químicamente inerte.

B.1.3 Aparatos e instrumentos

- Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C .
- Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.
- Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de $0,1^\circ\text{C}$ y que mantenga la temperatura a $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
- Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).
- Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.
- Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

B.1.4 Procedimiento

B.1.4.1 Preparación de la dilución primaria.

B.1.4.1.1 A partir de muestras líquidas:

Para muestras líquidas no viscosas (agua, leche, refrescos, etc.) en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable por medios mecánicos (agitación, etc.).

Para muestras congeladas de un alimento originalmente líquido o licuable, fundir por completo en baño de agua de 40 a 45°C un tiempo máximo de 15 min y homogeneizar agitando vigorosamente.

Para la parte líquida de una muestra heterogénea la cual sea considerada suficientemente representativa de la muestra total (Por ejemplo la fase acuosa de grasas animales y vegetales).

B.1.4.1.1.1 Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 seg. Tomar 1 ml de la muestra y diluir con 9 ml del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

B.1.4.1.1.2 Siempre que la cantidad de muestra lo permita, tomar alícuotas mayores, por ejemplo volúmenes de 10 u 11 ml, diluidos con 90 o 99 ml, de la misma forma que se describió anteriormente.

B.1.4.1.2 A partir de muestras sólidas o semisólidas.

Las muestras sólidas y semisólidas congeladas, deben descongelarse en refrigeración de 4 a 8°C durante 18 h y no más de 24 h antes de proceder a su análisis.

B.1.4.1.2.1 Pesar una cantidad de 10 u 11 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado.

B.1.4.1.2.2 Adicionar un volumen de 90 a 99 ml del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra.

B.1.4.1.2.3 Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 min hasta obtener una suspensión completa y homogénea según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Aun en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2,5 min.

B.1.4.1.2.4 Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión.

Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual debe tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes o expresión de resultados.

El homogeneizador peristáltico (Stomacher) puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Debe ser utilizado sólo cuando exista evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.

B.1.4.2 Preparación de las diluciones decimales adicionales.

B.1.4.2.1 Transferir 1 ml o un múltiplo, por ejemplo, 10 u 11 ml de la dilución primaria 1 + 9 (10^{-1}), en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

B.1.4.2.2 Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera que se describe en (B.1.4.1.1.1).

B.1.4.2.3 La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquellas que se van a inocular, dependen del número esperado de microorganismos en la muestra, con base a los resultados de análisis previos y de la información que se obtenga del personal de inspección que la haya colectado. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta.

B.1.4.2.4 Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera nunca debe ser menor al 10% de la capacidad total de la pipeta.

B.1.4.2.5 Si la pipeta es terminal y se transfiere un volumen de líquido equivalente a su capacidad total, escurrir aplicando la punta de la pipeta una sola vez en un área de la caja Petri sin líquido.

B.1.4.2.6 Mientras se afora el líquido de la pipeta, la punta de ésta debe apoyarse en el interior del cuello del frasco y mantenerla en posición vertical, para lo cual este último debe inclinarse lo necesario.

En estudios donde se busca la presencia o ausencia de una determinada especie de microorganismos en 0,1 ml o 0,1 g, no es necesario preparar diluciones mayores.

El criterio para seleccionar las diluciones a preparar de acuerdo con el número de microorganismos esperado es:

Para la técnica del número más probable utilizar tres tubos: donde sea posible demostrar el microorganismo en 10 ml de la dilución más alta.

Para la técnica de cuenta en placa, considerar aquellas en las que se puedan contar de 25 a 250 colonias en un mínimo de una de tres diluciones en el método de cuenta de bacterias aerobias en placa. En el caso de otros grupos microbianos, considerar el número especificado de colonias en la Norma Oficial Mexicana correspondiente.

B.1.4.3 Duración del procedimiento.

En general, las diluciones de la muestra deben ser preparadas inmediatamente antes del análisis y éstas deben ser usadas para inocular el medio de cultivo dentro de los 20 min posteriores a su preparación.

B.2 DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES. TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE

B.2.1 Fundamento

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 h, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

B.2.2 Reactivos y materiales

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico. Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada con pH cercano a la neutralidad.

B.2.2.1 Reactivos

B.2.2.1.1 Soluciones diluyentes

B.2.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Fosfato monopotásico	34 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N. Llevar a un litro con agua. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

B.2.2.1.1.2. Agua peptonada

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	1 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de la esterilización los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar obscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

B.2.2.1.2 Medios de cultivo.

Caldo lactosado (medio de enriquecimiento para agua potable y hielo).

Caldo lauril sulfato triptosa (medio de enriquecimiento selectivo).

Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación).

En el caso del análisis de agua potable y hielo puede utilizarse caldo lactosado o caldo lauril sulfato triptosa con púrpura de bromocresol (concentración 0,01 g/l de medio), como alternativa al uso de campanas de fermentación. Los tubos positivos se manifiestan por el vire del indicador a color amarillo.

B.2.2.1.2.1 Caldo lactosado

Ingrediente	Medio de concentración	Medio de concentración sencilla
	1,5	
Extracto de carne	4,5 g	3 g
Peptona de gelatina	7,5 g	5 g
Lactosa	7,5 g	5 g
Agua destilada	1000 ml	1000 ml

Disolver los ingredientes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH final de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,9 \pm 0,2$ a 25°C . Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Enfriar rápidamente para evitar una exposición excesiva al calor. El aspecto del caldo es claro y de color beige. Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml del caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de la muestra.

B.2.2.1.2.2 Caldo lauril sulfato triptosa.

Ingrediente	Medio de concentración	Medio de concentración sencilla
	1,5	
Triptosa	30 g	20 g
Lactosa	7,5 g	5 g
Fosfato dipotásico	4,125 g	2,75 g
Fosfato monopotásico	4,125 g	2,75 g
Cloruro de sodio	7,5 g	5 g
Lauril sulfato de sodio	0,15 g	0,1 g
Agua destilada	1000 ml	1000 ml

Disolver los componentes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio de cultivo completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,8 \pm 0,2$ a 25°C . Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de

16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Se recomienda almacenar el medio una vez preparado. Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización. Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml de caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de muestra.

B.2.2.1.2.3 Lactosa bilis verde brillante

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	20 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de 7,2 a 25°C . Distribuir el medio en cantidades de 10 ml en tubos de 16 x 160 mm conteniendo campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

B.2.2.2 Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Tubos de cultivo 20 x 200 mm y de 16 x 160 mm con tapones metálicos o de rosca.
- Campanas de fermentación (tubos de Durham).
- Pipetas bacteriológicas graduadas de 10 y 1 ml
- Gradillas.
- Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro
- Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:
- Horno, durante 2 h a $170\text{-}175^\circ\text{C}$ o 1 h a 180°C o autoclave, durante 15 min como mínimo a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.
- El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.

B.2.3 Aparatos e instrumentos

- Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C .
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1^\circ\text{C}$, provista con termómetro calibrado.
- Termómetro de máximas y mínimas.

- Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25°C .

B.2.4 Preparación de la muestra

Las muestras deben prepararse y diluirse, siempre que sea posible, de acuerdo con el Método de Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

B.2.5 Procedimiento

B.2.5.1 Para alimentos.

Preparar suficiente número de diluciones para asegurar que todos los tubos correspondientes a la última dilución rindan un resultado negativo.

B.2.5.1.1 Prueba presuntiva

B.2.5.1.1.1 Inoculación. Tomar tres tubos de medio de enriquecimiento de mayor concentración. Usar una pipeta estéril para transferir a cada tubo 10 ml de la muestra si es líquida o 10 ml de la dilución primaria inicial, en el caso de otros productos.

B.2.5.1.1.1.1 Tomar tres tubos de concentración sencilla del medio selectivo de enriquecimiento. Usar una pipeta estéril para transferir a cada uno de estos tubos 1 ml de la muestra si es líquida o 1 ml de la dilución primaria en el caso de otros productos.

B.2.5.1.1.1.2 Para las diluciones subsecuentes, continuar como se indica en el párrafo anterior, usando una pipeta diferente para cada dilución. Mezclar suavemente el inóculo con el medio.

B.2.5.2.1.2 Incubación. Incubar los tubos a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 2 h.

B.2.5.1.2 Prueba confirmativa

De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación. Incubar a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h o si la formación de gas no se observa en este tiempo, prolongar la incubación por 48 ± 2 h.

En esta Norma Oficial Mexicana se considera una combinación de tres tubos por cada dilución de la serie. Para algunos productos y siempre que se requiera una mayor precisión en los resultados, será necesario inocular una serie de cinco o diez tubos.

B.2.6 Expresión de los resultados

Tomar la serie de tubos de la prueba confirmativa que dé formación de gas después del periodo de incubación requerido y buscar el NMP en los cuadros correspondientes.

El Cuadro 3 muestra algunos ejemplos que se pueden presentar.

Ejemplos:

Ejemplo 1. Cuando sólo una dilución muestra tres tubos positivos, elegir ésta y las diluciones mayores posteriores.

Ejemplo 2. Cuando más de una dilución muestra tres tubos positivos y la última da menos de tres, elegir esta última y las dos diluciones anteriores más bajas.

Ejemplo 3. Cuando en ninguna dilución hay tres tubos positivos y éstos se encuentran en más de tres diluciones, seleccionar las dos diluciones mayores positivas y la siguiente.

Ejemplos 4 y 5. Cuando los tubos positivos sólo se encuentran en la muestra sin diluir (10 ml o 1 g) y en la primera dilución (1 ml o 10^{-1}), seleccionar las tres primeras diluciones para el cálculo del número más probable.

En cada caso se obtiene un número de tres cifras, lo cual es representado en los cuadros 4 al 7, según corresponda. En la columna que indica el número de tubos positivos se busca el índice del NMP.

La técnica de NMP puede admitir gran cantidad de variaciones. Los resultados obtenidos con esta técnica deben ser utilizados con precaución. Los límites de confianza están representados en los cuadros 4 al 7. Por ejemplo, para una muestra sólida con un NMP de 70 coliformes por gramo, los límites de confianza en el 95% de los casos variarán de 10 a 230 coliformes por gramo (ejemplo 3 del Cuadro 3) y en un producto con 24 de NMP de coliformes por gramo, los límites de confianza son de 3,6 a 130 coliformes por gramo (ejemplo 2 Cuadro 3).

CUADRO 3

Ejemplos de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP

E	Número de tubos positivos obtenidos de tres						NMP	
J	Tubos incubados, para las siguientes cantidades de muestra inoculada por tubo							
E	Producto							
M	Líquido (ml)	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	Producto	Otros
P	Otros Productos (g)	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Líquido	Otros
L	Mayor dilución = menor concentración							
O								

							ml ⁻¹	g ⁻¹
1		3	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	15 (5)	150 (6)
2		3	<u>3</u>	<u>3</u>	0		24 (5)	240 (6)
3		2	2	<u>1</u>	<u>1</u>	0	7 (6)	70 (7)
4		<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	2,4 (4)	24 (5)
5		<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	0	0,21 (4)	2,1 (5)

CUADRO 4

Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 10, 1 y 0,1 g)

Combinación de positivos	Índice del NMP por g	3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
		95% Límites de confianza		Índice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto
0-0-0	< 0,03	<0,005	<0,09	<0,02	<0,005	<0,07
0-0-1	0,03	<0,005	<0,09	0,02	<0,005	0,07
0-1-0	0,03	<0,005	0,13	0,02	<0,005	0,07
0-2-0	---	---	---	0,04	<0,005	0,11
1-0-0	0,04	<0,005	0,20	0,02	<0,005	0,07
1-0-1	0,07	0,01	0,21	0,04	<0,005	0,11
1-1-0	0,07	0,01	0,23	0,04	<0,005	0,11
1-1-1	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
1-2-0	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
2-0-0	0,09	0,01	0,36	0,05	<0,005	0,13
2-0-1	0,14	0,03	0,37	0,07	0,01	0,17
2-1-0	0,15	0,03	0,44	0,07	0,01	0,17

2-1-1	0,20	0,07	0,89	0,09	0,02	0,21
2-2-0	0,21	0,04	0,47	0,09	0,02	0,21
2-2-1	0,28	0,10	1,50	----	---	---
2-3-0	---	---	---	0,12	0,03	0,28
3-0-0	0,23	0,04	1,20	0,08	0,01	0,19
3-0-1	0,39	0,07	1,3	0,11	0,02	0,25
3-0-2	0,64	0,15	3,80	---	---	---
3-1-0	0,43	0,07	2,1	0,11	0,02	0,25
3-1-1	0,75	0,14	2,3	0,14	0,04	0,34
3-1-2	1,20	0,30	3,8	---	---	---
3-2-0	0,93	0,15	3,80	0,14	0,04	0,34
3-2-1	1,50	0,30	4,40	0,17	0,05	0,46
3-2-2	2,10	0,35	4,70	--	--	--
3-3-0	2,40	0,36	13,0	--	--	--
3-3-1	4,60	0,71	24	--	--	--
3-3-2	11,0	1,50	48	--	--	--
3-3-3	>11.0	>1,50	>48	--	--	--
4-0-0	--	---	---	0,13	0,03	0,31
4-0-1	--	---	---	0,17	0,05	0,46
4-1-0	--	---	---	0,17	0,05	0,46
4-1-1	--	--	---	0,21	0,07	0,63
4-1-2	--	--	---	0,26	0,09	0,78
4-2-0	--	--	---	0,22	0,07	0,67
4-2-1	--	---	---	0,26	0,09	0,78
4-3-0	--	---	---	0,27	0,09	0,80
4-3-1	--	---	---	0,33	0,11	0,93
4-4-0	--	---	---	0,34	0,12	0,93
5-0-0	--	---	---	0,23	0,07	0,70
5-0-1	--	---	---	0,31	0,11	0,89
5-0-2	--	---	---	0,43	0,15	1,14
5-1-0	--	---	---	0,33	0,11	0,93
5-1-1	--	---	----	0,46	0,16	1,2
5-1-2	--	---	---	0,63	0,21	1,5
5-2-0	--	---	---	0,49	0,17	1,3

5-2-1	--	---	---	0,70	0,23	1,70
5-2-2	--	---	---	0,94	0,28	2,2
5-3-0	--	---	---	0,79	0,25	1,9
5-3-1	--	---	---	1,10	0,31	2,5
5-3-2	--	---	---	1,4	0,37	3,4
5-3-3	--	---	---	1,80	0,44	5,0
5-4-0	--	---	---	1,30	0,35	3,0
5-4-1	--	---	---	1,70	0,43	4,9
5-4-2	--	---	---	2,20	0,57	7,0
5-4-3	--	---	---	2,80	0,90	8,5
5-4-4	--	---	---	3,50	1,20	10
5-5-0	---	---	---	2,40	0,68	7,5
5-5-1	---	---	---	3,50	1,60	10
5-5-2	---	---	---	5,40	1,80	14,0
5-5-3	----	---	---	9,20	3,0	32
5-5-4	---	---	---	16,09	6,40	58,0
5-5-5	----	---	---	---	---	---

CUADRO 5

Indice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 1, 0,1 y 0,01 g)

		3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
Combinación de positivos	Indice del NMP por g	95% Límites de confianza		Indice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto
0-0-0	<0,3	<0,05	<0,9	<0,2	<0,05	<0,7
0-0-1	0,3	<0,05	<0,9	0,2	<0,05	0,7
0-1-0	0,3	<0,05	1,3	0,2	<0,05	0,7
0-2-0	---	---	---	0,4	<0,05	0,11
1-0-0	0,4	<0,05	2	0,2	<0,05	0,7
1-0-1	0,7	0,1	2	0,4	<0,05	1,1
1-1-0	0,7	0,1	2,3	0,4	<0,05	1,1
1-1-1	1,1	0,3	3,6	0,6	<0,05	1,5
1-2-0	1,1	0,3	3,6	0,6	<0,05	1,5
2-0-0	0,9	0,1	3,6	0,5	<0,05	1,3
2-0-1	1,4	0,3	3,7	0,7	0,1	1,7

2-1-0	1,5	0,3	4,4	0,7	0,1	1,7
2-1-1	2	0,7	8,9	0,9	0,2	2,1
2-2-0	2,1	0,4	4,7	0,9	0,2	2,1
2-2-1	2,8	1,0	15,0	---	---	---
2-3-0	---	---	---	1,2	0,3	2,8
3-0-0	2,3	0,4	12	0,8	0,1	1,9
3-0-1	3,9	0,7	13,0	1,1	0,2	2,5
3-0-2	6,4	1,5	38,0	--	--	--
3-1-0	4,3	0,7	21,0	1,1	0,2	2,5
3-1-1	7,5	1,4	23,0	1,4	0,4	3,4
3-1-2	12	3,0	38,0	--	--	--
3-2-0	9,3	1,5	38,0	1,4	0,4	3,4
3-2-1	15,0	3,0	44,0	1,7	0,5	4,6
3-2-2	21,0	3,5	47,0	--	--	--
3-3-0	24,0	3,6	130,0	--	--	--
3-3-1	46,0	7,1	240,0	--	--	--
3-3-2	110	15,0	480,0	--	--	--
3-3-3	>110	>15,0	>480,0	--	--	--
4-0-0	--	---	---	1,3	0,3	3,1
4-0-1	--	---	---	1,7	0,5	4,6
4-1-0	--	---	---	1,7	0,5	4,6
4-1-1	--	---	---	2,1	0,7	6,3
4-1-2	--	---	---	2,6	0,9	7,8
4-2-0	--	---	---	2,2	0,7	6,7
4-2-1	--	---	---	2,6	0,9	7,8
4-3-0	--	---	---	2,7	0,9	8,0
4-3-1	--	---	---	3,3	1,1	9,3
4-4-0	--	---	---	3,4	1,2	3,0
5-0-0	--	---	---	2,3	0,7	7,0
5-0-1	--	---	---	3,1	1,1	8,9
5-0-2	--	---	---	4,3	1,5	11,4
5-1-0	--	---	---	3,3	1,1	9,3
5-1-1	--	---	---	4,6	1,6	12
5-1-2	--	---	---	6,3	2,1	15,0

5-2-0	--	---	---	4,9	1,7	13,0
5-2-1	--	---	---	7,0	2,3	17,0
5-2-2	--	---	---	9,4	2,8	22
5-3-0	--	---	---	7,9	2,5	19,0
5-3-1	--	---	---	11,0	3,1	25,0
5-3-2	--	---	---	14,0	3,7	34,0
5-3-3	--	---	---	18,0	4,4	50,0
5-4-0	--	---	---	13,0	3,5	30,0
5-4-1	--	---	---	17,0	4,3	49,0
5-4-2	--	---	---	22	5,7	70,0
5-4-3	--	---	---	28,0	9,0	85,0
5-4-4	--	---	---	35,0	12	100,0
5-5-0	--	---	---	24,0	6,8	75,0
5-5-1	--	---	---	35,0	12	100,0
5-5-2	--	---	---	54,0	18,0	140,0
5-5-3	--	---	---	92	30,0	320,0
5-5-4	--	---	---	161,0	64,0	580,0
5-5-5	--	---	---	>161,0	>64,0	>580,0

CUADRO 6

Indice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,1, 0,001 y 0,0001 g)

Combinación de positivos	Indice del NMP por g	3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
		95% Límites de confianza		Indice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	Alto		bajo	alto
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	1,0	17

2-1-0	15	3	44	7	1,0	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	13,0	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	130,0	--	--	--
3-3-1	460	71	240,0	--	--	--
3-3-2	1100	150	480,0	--	--	--
3-3-3	>1100	>150	>480,0	--	--	--
4-0-0	--	---	---	13	3	31
4-0-1	--	---	---	17	5	46
4-1-0	--	---	---	17	5	46
4-1-1	--	---	---	21	7	63
4-1-2	--	---	---	26	9	78
4-2-0	--	---	---	22	7	67
4-2-1	--	---	---	26	9	78
4-3-0	--	---	---	27	9	80
4-3-1	--	---	---	33	11	93
4-4-0	--	---	---	34	12	93
5-0-0	--	---	---	23	7	7
5-0-1	--	---	---	31	11	89
5-0-2	--	---	---	43	15	114
5-1-0	--	---	---	33	11	93
5-1-1	--	---	---	46	16	120
5-1-2	--	---	---	63	21	150

5-2-0	--	---	---	49	17	130
5-2-1	--	---	---	70	23	170
5-2-2	--	---	---	94	28	220
5-3-0	--	---	---	79	25	190
5-3-1	--	---	---	110	31	250
5-3-2	--	---	---	140	37	340
5-3-3	--	---	---	180	44	500
5-4-0	--	---	---	130	35	300
5-4-1	--	---	---	170	43	490
5-4-2	--	---	---	220	57	700
5-4-3	--	---	---	280	90	850
5-4-4	--	---	---	350	120	1000
5-5-0	--	---	---	240	68	750
5-5-1	--	---	---	350	120	1000
5-5-2	--	---	---	540	180	1400
5-5-3	--	---	---	920	300	3200
5-5-4	--	---	---	1600	640	5800
5-5-5	--	---	---	>1600	>640	>5800

CUADRO 7

Indice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,01, 0,001 y 0,0001 g)

		3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
Combinación de positivos	Indice del NMP por g	95% Límites de confianza		Indice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	Alto		bajo	alto
0-0-0	<30	<5	<90	<20	<5	<70
0-0-1	30	<5	<90	20	<5	70
0-1-0	30	<5	130	20	<5	70
0-2-0	---	---	---	40	<5	110
1-0-0	40	<5	200	20	<5	70
1-0-1	70	10	210	40	<5	110
1-1-0	70	10	230	40	<5	110
1-1-1	110	30	360	60	<5	150
1-2-0	110	30	360	60	<5	150
2-0-0	90	10	360	50	<5	130

2-0-1	140	30	370	70	10	170
2-1-0	150	30	440	70	10	170
2-1-1	200	70	890	90	20	210
2-2-0	210	40	470	90	20	210
2-2-1	280	100	1500	---	---	---
2-3-0	---	---	---	120	30	280
3-0-0	230	40	1200	80	10	190
3-0-1	390	70	1300	110	20	250
3-0-2	640	150	3800	--	--	--
3-1-0	430	70	2100	110	20	250
3-1-1	750	140	2300	140	40	340
3-1-2	1200	300	3800	--	--	--
3-2-0	930	150	3800	140	40	340
3-2-1	1500	300	4400	170	50	460
3-2-2	2100	350	4700	--	--	--
3-3-0	2400	360	13000	--	--	--
3-3-1	4600	710	24000	--	--	--
3-3-2	11000	1500	48000	--	--	--
3-3-3	>11000	>1500	>48000	--	--	--
4-0-0	--	---	---	130	30	310
4-0-1	--	---	---	170	50	460
4-1-0	--	---	---	170	50	460
4-1-1	--	---	---	210	70	630
4-1-2	--	---	---	260	90	780
4-2-0	--	---	---	220	70	670
4-2-1	--	---	---	260	90	780
4-3-0	--	---	---	270	90	800
4-3-1	--	---	---	330	110	930
4-4-0	--	---	---	340	120	930
5-0-0	--	---	---	230	70	700
5-0-1	--	---	---	310	110	890
5-0-2	--	---	---	430	150	1140
5-1-0	--	---	---	330	110	930
5-1-1	--	---	---	460	160	1200

5-1-2	--	---	---	630	210	1500
5-2-0	--	---	---	490	170	1300
5-2-1	--	---	---	700	230	1700
5-2-2	--	---	---	940	280	2200
5-3-0	--	---	---	790	250	1900
5-3-1	--	---	---	1100	310	2500
5-3-2	--	---	---	1400	370	3400
5-3-3	--	---	---	1800	440	5000
5-4-0	--	---	---	1300	350	3000
5-4-1	--	---	---	1700	430	4900
5-4-2	--	---	---	2200	570	7000
5-4-3	--	---	---	2800	900	8500
5-4-4	--	---	---	3500	1200	10000
5-5-0	--	---	---	2400	680	7500
5-5-1	--	---	---	3500	1200	10000
5-5-2	--	---	---	5400	1800	14000
5-5-3	--	---	---	9200	3000	32000
5-5-4	--	---	---	16000	6400	58000
5-5-5	--	---	---	>16000	>6400	>58000

B.2.7 Informe de la prueba

Para el informe de resultados multiplicar el valor obtenido en tablas por el factor de concentración de muestra correspondiente y reportar como "número más probable (NMP) de coliformes por gramo o mililitro de muestra".

En caso de muestras de agua informar NMP/100 ml.

B.3 DETERMINACION DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA

B.3.1 Fundamento

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

B.3.2 Reactivos y materiales

B.3.2.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico y cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

B.3.2.1.1 Soluciones diluyentes

B.3.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Fosfato monopotásico	34 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a $7,2 \pm 0,2$ con solución de hidróxido de sodio 1 N. Llevar con agua a un litro. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

B.3.2.1.1.2 Agua peptonada**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Peptona	1 g
NaCl	8,5 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a $7 \pm 0,2$ con hidróxido de sodio 1 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de la esterilización, los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar obscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

B.3.2.1.2 Medio de Cultivo

Agar-rojo- violeta-bilis-lactosa (RVBA)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	7 g
Extracto de levadura	3 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,002 g
Agar	15 g
Agua	1000 ml

Preparación: Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos. Mezclar perfectamente y ajustar el pH a $7,4 \pm 0,2$ con ácido clorhídrico 0,1 N o con hidróxido de sodio 0,1 N a 25°C , de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor. Calentar con agitación constante y hervir durante 2 min. Enfriar inmediatamente el medio en un baño de agua hasta que llegue a 45°C . Evitar el

sobrecalentamiento del medio. No debe esterilizarse en autoclave. Usar el medio dentro de las tres primeras horas después de su preparación. En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

B.3.2.2 Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Cajas Petri.
- Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:
 - Horno, durante 2 h a 170-175°C, o 1 h a 180°C; o en autoclave, durante 15 min como mínimo a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.
 - El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.

B.3.3 Aparatos e instrumentos

- Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.
- Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.
- Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado o verificado y que mantenga la temperatura entre 45 a 48°C o equivalente.
- Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1^\circ\text{C}$, provista con termómetro calibrado.
- Contador de colonias de campo oscuro, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador o equivalente.
- Registrador mecánico o electrónico.
- Microscopio óptico.
- Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25°C.

B.3.4 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo con lo establecido en el método B.1 PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLOGICO.

B.3.5 Procedimiento

B.3.5.1 Colocar en cajas Petri por duplicado 1 ml de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

B.3.5.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

B.3.5.3 Verter de 15 a 20 ml del medio RVBA fundido y mantenido entre 45 a 48°C en baño de agua. En el caso de utilizar cajas de Petri de plástico se vierte de 10 a 15 ml del medio. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 min.

B.3.5.4 Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

B.3.5.5 Preparar una caja control con 15 ml de medio para verificar la esterilidad.

B.3.5.6 Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 ml del medio RVBA mantenido entre 45 a 48°C en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

B.3.5.7 Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 18 a 24 h y en productos lácteos a $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.3.5.8 Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.

B.3.5.9 Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2 mm.

B.3.6 Expresión de los resultados

B.3.6.1 Cálculo del método

B.3.6.1.1 Placas que contienen entre 15 y 150 colonias características.

Separar las placas que contienen el número antes mencionado de colonias características en dos diluciones consecutivas. Contar las colonias presentes. Calcular el número de coliformes por mililitro o por gramo de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente, tomando los criterios del método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.

B.3.6.1.2 Placas que contienen menos de 15 colonias características.

Si cada una de las placas tiene menos de 15 colonias características, reportar el número obtenido seguido de la dilución correspondiente.

B.3.6.1.3 Placas con colonias no características.

Si en las placas no hay colonias características, reportar el resultado como: menos de un coliforme por 1/d por gramo, en donde d es el factor de dilución.

B.3.7 Informe de la prueba

Informar: UFC/g o ml en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 ± 2 h.

En caso de emplear diluciones y no observar crecimiento, informar utilizando como referencia la dilución más baja utilizada, por ejemplo dilución 10^{-1} .

En caso de no observar crecimiento en la muestra sin diluir se informa: "no desarrollo de coliformes por ml".

B.4 DETERMINACION DE *Salmonella* EN ALIMENTOS

B.4.1 Fundamento

La presente técnica para la detección de *Salmonella* en alimentos, describe un esquema general que consiste de 5 pasos básicos:

B.4.1.1 Preenriquecimiento, es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.

B.4.1.2 Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

B.4.1.3 Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

B.4.1.4 Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos presuntivos.

B.4.1.5 Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

B.4.2 Reactivos y materiales

En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, se deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva para su preparación.

Las sustancias químicas usadas para preparar los medios de cultivo y los reactivos deben ser grado analítico.

B.4.2.1 Reactivos

B.4.2.1.1 Medios de pre-enriquecimiento

B.4.2.1.1.1 Agua peptonada

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato sódico dibásico	3,5 g
Fosfato potásico monobásico	1,5 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes en el agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización a $7 \pm 0,2$. Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables con la capacidad necesaria para obtener las porciones necesarias para la prueba. Esterilizar por 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.4.2.1.1.2 Caldo lactosado

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Lactosa	5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $6,9 \pm 0,2$

Preparación: Disolver los ingredientes en agua, calentando a 65°C . Distribuir en porciones de 225 ml, en frascos de 500 ml. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$

B.4.2.1.2 Caldo de enriquecimiento

B.4.2.1.2.1 Caldo selenito-cistina

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Triptona o polipeptona	5 g
Lactosa	4 g
Fosfato disódico	10 g
Selenito ácido de sodio	4 g
L-cistina	0,01 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $7,0 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y distribuir en volúmenes de 10 y 225 ml en recipientes estériles, según se requiera. El caldo así preparado es transparente. De preferencia

usarlo el mismo día de su preparación. Si se desea conservar el medio por varios días, puede exponerse al calor en autoclave por 5 min a $110 \pm 1^\circ\text{C}$, tomando entonces un color salmón.

B.4.2.1.2.2 Caldo tetratonato**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Proteosa peptona o tristona	5 g
Sales biliares	1 g
Carbonato de calcio	10 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	30 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $7,0 \pm 0,1$

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril. Distribuir, agitando constantemente, en porciones de 10 y 225 ml, en recipientes estériles. Guardar en refrigeración. Antes de usar el medio, agregar 2 ml de una solución yodo-yoduro y 1 ml de solución de verde brillante al 0,1% por cada 100 ml de caldo. El medio una vez adicionado de yodo no debe calentarse y debe usarse el mismo día de su preparación.

B.4.2.1.2.3 Vassiliadis-Rappaport

Solución A

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Tristona	5 g
Cloruro de sodio	8 g
Fosfato de potasio dihidrogenado	1,6 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes en el agua por calentamiento cercano a 70°C .

Solución B

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de magnesio hexahidratado	400 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Disolver el cloruro de magnesio en el agua. Como esta sal es muy higroscópica es conveniente disolver el contenido entero de cloruro de magnesio desde un recipiente recientemente abierto de tal modo que la concentración de la solución sea de 0,4 g/ml. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente

Solución C

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Oxalato de verde de malaquita	0,4 g

Agua destilada 100 ml

Preparación: Disolver el oxalato de verde de malaquita en el agua. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Medio completo

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Solución A	1 000 ml
Solución B	100 ml
Solución C	10 ml

Preparación: Adicionar 1 000 ml de la solución A, 100 ml de la solución B y 10 ml de la solución C. Ajustar el pH si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de $5,2 \pm 0,2$. Distribuir antes de usar dentro de tubos en cantidades de 10 ml. Almacenar en refrigeración.

B.4.2.1.2.4 Caldo de Soya Tripticasa

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Tripticasa o triptosa	17 g
Fitona	3 g
Glucosa	2,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $7,3 \pm 0,2$

Preparación: Disolver los ingredientes en 1 l de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa. Distribuir porciones de 225 ml dentro de matraces de 500 ml y esterilizar en autoclave durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.4.2.1.2.5 Leche descremada reconstituida

Suspender 100 g de leche descremada en polvo en un litro de agua destilada. Agitar circularmente hasta disolución. Distribuir en volúmenes de 225 ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min. El volumen final debe corregirse para mantener 225 ml.

B.4.2.1.2.6 Caldo soya tripticasa estéril adicionado con sulfito de potasio.

Adicionar al caldo soya tripticasa 5 g de sulfito de potasio por cada 1000 ml de medio, quedando una concentración final de sulfito de potasio del 0,5%. Adicionar el sulfito de potasio antes de esterilizar en autoclave en la forma habitual.

B.4.2.1.3 Medios de aislamiento

B.4.2.1.3.1 Agar verde brillante (VB)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de levadura	3 g
Polipeptona (Proteosa peptona No. 3)	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Lactosa	10 g

Sacarosa	10 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	20 g
Verde brillante	0,0125 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar a ebullición, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 ± 1°C. El sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad. Enfriar el medio a 50°C y distribuirlo en cajas de petri estériles. El aspecto del medio es oscuro, de color marrón.

B.4.2.1.3.2 Agar con sulfito de bismuto

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne de res	5 g
Mezcla de peptonas	10 g
Glucosa	5 g
Fosfato disódico (anhidro)	5 g
Sulfato ferroso (anhidro)	0,300 g
Sulfito de bismuto	8 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,6 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en un litro de agua. Calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente. Ajustar el pH. Enfriar a 45°C y verter en cajas de petri estériles, distribuyendo de manera homogénea el precipitado propio del medio. El aspecto de las placas es opaco, de color verde pálido y deben usarse el mismo día de su preparación. Si la coloración es parda, no deben utilizarse. El medio no debe esterilizarse en autoclave; el sobrecalentamiento afecta su selectividad.

B.4.2.1.3.3 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Xilosa	3,75 g
L-lisina	5 g
Lactosa	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Extracto de levadura	3 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	15 g

Desoxicolato de sodio	2,5 g
Citrato férrico-amónico	0,8 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 6,9 ± 0,2	

Preparación: Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada, y calentar en baño de agua a 55°C, agitando frecuentemente, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Enfriar a 50°C y verter en cajas de petri estériles. No se esterilice. El sobrecalentamiento produce una precipitación; la reactividad del medio puede ser satisfactoria, pero las colonias suelen ser muy pequeñas. El aspecto del medio es claro y de color rojo brillante.

B.4.2.1.3.4 Agar para Salmonella y Shigella (SS)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	5 g
Polipeptona *	5 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	8,5 g
Citrato de sodio dihidratado	8,5 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	8,5 g
Citrato férrico	1 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro	0,025 g
Verde brillante	0,33 mg
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7,0 ± 0,2	

* La polipeptona se puede sustituir por 2,5 g de peptona de caseína y 2,5 g de peptona de carne.

Preparación: Suspender los ingredientes en 1 l de agua destilada estéril y calentar a ebullición hasta disolución completa. Ajustar el pH. No esterilizar en autoclave. Enfriar a 50°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas. El aspecto del medio fundido es claro y de color rosado.

B.4.2.1.3.5 Agar entérico Hektoen

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Proteosa peptona	12 g
Extracto de levadura	3g
Lactosa	12 g
Sacarosa	12 g
Salicina	2 g
Sales biliares	9 g
Cloruro de sodio	5 g
Tiosulfato de sodio	5 g

Citrato amónico férrico	1,5 g
Azul de bromotimol	0,064 g
Fuscina ácida	0,1 g
Agar	13,5 g
Agua	1000 ml
pH final: 7,5 ± 0,2	

Preparación: Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir con agitación hasta completa disolución del agar. No sobrecalentar. Dejar enfriar a 55-60°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas.

B.4.2.1.4 Medios para pruebas bioquímicas

B.4.2.1.4.1 Agar de tres azúcares y hierro (TSI)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona de carne *	1 g
Peptona de caseína *	1 g
Cloruro de sodio	0,5 g
Lactosa	1 g
Sacarosa	1 g
Glucosa	0,1 g
Agar	1,3 g
Rojo de fenol	2,5 mg
Sulfato ferroso amónico-Pentahidratado	20 mg
Tiosulfato de sodio	20 mg
Agua destilada	100 ml
pH final: 7,3 ± 0,2	

* Estas peptonas se pueden sustituir por 2 g de polipeptona.

Preparación: Suspender los ingredientes en 100 ml de agua destilada. Calentar a ebullición, agitando ocasionalmente, hasta disolución completa. Enfriar a 60°C y ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min. Inclinar los tubos de manera que el medio de cultivo en el fondo alcance una altura de 3 cm y una profundidad de 4 cm. El medio es de color rojo.

B.4.2.1.4.2 Agar de hierro y lisina (LIA)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona de gelatina	0,5 g
Extracto de levadura	0,3 g
Glucosa	0,1 g
L-lisina	1 g
Citrato férrico-amónico	50 mg
Tiosulfato de sodio anhidro	4 mg
Púrpura de bromocresol	2 mg
Agar	1,5 g

Agua destilada 100 ml

pH final: $6,7 \pm 0,2$

Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien, calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm, con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 12 min. Dejar que los tubos se enfríen en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 4 cm y una superficie inclinada de 2 cm.

El medio ya preparado es de color púrpura.

B.4.2.1.4.3 Agar nutritivo

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación: Suspender los ingredientes en agua. Dejar reposar de 5 a 10 min. Calentar a ebullición hasta disolución completa. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm, en cantidades de 1/3 de su volumen. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min. Inclinan los tubos antes que el agar solidifique.

B.4.2.1.4.4 Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona	30 g
Hierro peatonizado	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,025 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $7,3 \pm 0,2$

Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Enfríar a 50°C y ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Se dejan enfriar los tubos en posición vertical.

B.4.2.1.4.5 Agar citrato de Simmons

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Fosfato de amonio	1 g
Fosfato dipotásico	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Citrato de sodio	2 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Azul de bromotimol	0,08 g

Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 6,8 ± 0,2	

Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 15 min. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

B.4.2.1.4.6 Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	7 g
Dextrosa	5 g
Difosfato de potasio	5 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 6,9 ± 0,2	

Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 15 min.

B.4.2.1.4.7 Caldo manitol

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	1 g
Proteosa peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo de fenol	0,018 g
Manitol	10 g
Agua	1000 ml
pH final: 7,4 ± 0,2	

Preparación: Suspender 26 g del medio deshidratado en un litro de agua, mezclar y ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 2 a 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min.

B.4.2.1.4.8 Caldo malonato

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de levadura	1 g
Sulfato de amonio	2 g
Fosfato dipotásico	0,6 g
Fosfato monopotásico	0,4 g
Cloruro de sodio	2 g
Malonato	3 g

Glucosa	0,25 g
Azul de bromotimol	0,025 g
Agua	1000 ml

pH final: 6,7 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en agua, mezclar y ajustar el pH. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm en cantidades de 3 ml. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 15 min.

B.4.2.1.4.9 Caldo Urea

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Urea	20 g
Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato monopotásico	9,1 g
Fosfato disódico	9,5 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua	1000 ml

pH final: 6,8 ± 0,2

Preparación: Disolver los ingredientes en agua destilada. NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana 0,45 µm o en autoclave de 5 a 8 lb de presión durante 15 min. Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.

B.4.2.1.4.10 Caldo de urea rápido

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Urea	20 g
Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato monopotásico	0,091 g
Fosfato disódico	0,095 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua	1000 ml

pH final: 6,8 ± 0,2

Preparación: Disolver los ingredientes en agua destilada. NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana 0,45 µm. Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.

B.4.2.1.4.11 Caldo infusión cerebro corazón

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Infusión cerebro corazón	200 g
Infusión de corazón de res	250 g
Proteosa peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2,5 g
Dextrosa	2 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $7,4 \pm 0,2$

Preparación: Disolver los ingredientes en agua destilada, calentar suavemente. Distribuir y esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

B.4.2.1.5 Soluciones

B.4.2.1.5.1 Solución verde brillante al 0,1% (1:1000)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Verde brillante	0,1 g
Agua destilada estéril	100 ml

Preparación: Disolver 0,1 g de verde brillante en el agua destilada estéril hasta completar 100 ml.

B.4.2.1.5.2 Solución de yodo-yoduro

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Cristales de yodo	6 g
Yoduro de potasio	6 g
Agua destilada	100 ml

Preparación: Disolver los cristales y el yoduro de potasio en el agua destilada hasta completar 100 ml. Conservar en frasco ámbar.

B.4.2.1.5.3 Solución salina al 0,85%

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de sodio	0,85 g
Agua destilada	100 ml

Preparación: Disolver el cloruro de sodio en el agua y esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

B.4.2.1.5.4 Solución salina formalizada

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Solución de formaldehído (36-38%)	6 ml
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 l de agua destilada. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 6 ml de la solución de formaldehído. No esterilizar después de la adición de formaldehído.

B.4.2.1.5.5 Reactivo de Kovac

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
p-dimetil-aminobenzaldehído	5 g
Alcohol amílico	75 ml
Acido clorhídrico concentrado	25 ml

Preparación: Disolver el p-dimetil-aminobenzaldehído en el alcohol amílico y después agregar el ácido clorhídrico lentamente. Conservar en frasco ámbar en refrigeración.

B.4.2.1.5.6 Solución de alfa-naftol al 5%**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Alfa-naftol	5 g
Alcohol	100 ml

Preparación: Disolver 5 g de alfa-naftol en alcohol hasta completar 100 ml.

B.4.2.1.5.7 Solución de rojo de metilo**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Rojo de metilo	0,1 g
Alcohol etílico	300 ml
Agua destilada c.b.p	500 ml

Preparación: Disolver el rojo de metilo en el alcohol etílico y adicionar el agua hasta completar 500 ml.

B.4.2.1.5.8 Solución de hidróxido de potasio al 40%**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Hidróxido de potasio	40 g
Agua destilada	100 ml

Preparación: Disolver 40 g de hidróxido de potasio en el agua hasta completar 100 ml.

B.4.2.1.5.9 Solución de gelatinasa al 5%**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Gelatinasa	5 g
Agua	100 ml

Preparación: Disolver 5 g de gelatinasa en 100 ml de agua destilada. NO CALENTAR.

B.4.2.1.6 Antisueros

- Antisuero polivalente somático (O)
- Antisuero polivalente flagelar (H)
- Antisuero Vi

B.4.2.2 Material

- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Recipientes de boca ancha, de capacidad apropiada para contener las muestras simples y compuestas
- Angulos de vidrio
- Cucharas, bisturís, cuchillos y pinzas
- Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm
- Tubos para serología de 10 x 75 mm o de 13 x 100 mm

- Pipetas bacteriológicas de 10 y 5 ml, graduadas en 0,1 ml y protegidas con tapón de algodón.
 - Pipetas de 1 ml, con graduaciones de 0,01 ml
 - Cajas de Petri estériles de vidrio o desechables
 - Rejillas para tubos de ensaye
 - Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro
 - Papel pH (intervalo de 6-8) con graduaciones máximas de 0,4 unidades de pH para cambios de color
- Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante: horno, durante 2 h, a 170-175°C o autoclave, durante 15 min como mínimo, a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.4.3 Equipo

- Horno para esterilizar que alcance los 180°C
- Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de $\pm 0,1^\circ\text{C}$ y termómetro.
- Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas.
- Baño maría con termostato y termómetro.
- Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g
- Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio).
- Mecheros Bunsen o Fisher
- Potenciómetro

B.4.4 Procedimiento

B.4.4.1 Preparación de los alimentos para el aislamiento de *Salmonella*

Los siguientes métodos se basan en el análisis de 25 g de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra/ caldo. Esta cantidad puede variarse siempre que se mantenga la misma proporción. Se recomienda una muestra de 25 g o más.

B.4.4.1.1 Procedimiento general para la preparación de muestras

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso estéril de licuadora o en bolsa estéril para trabajar en homogeneizador peristáltico (stomacher). Adicionar 225 ml del medio de preenriquecimiento estéril (generalmente caldo lactosado, a menos que se indique otro) y licuar si es necesario durante un min. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y dejar reposar por 60 min a temperatura ambiente con la tapa bien enroscada. Mezclar bien y determinar el pH aproximado con papel pH. Ajustar, si es necesario, a un pH $6,8 \pm 0,2$ con hidróxido de sodio 1 N o ácido clorhídrico 1 N estériles. Mezclar y cubrir el recipiente enroscando suavemente la tapa.

Incubar 18 ± 2 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Continuar como se indica en B.4.4.2.1.

B.4.4.1.2 Procedimiento específico para la preparación

B.4.4.1.2.1 Productos que contienen huevo en su formulación (pastas para sopa, rollos chinos, etc.); ensaladas preparadas (jamón, huevos, pollo, atún, pavo); frutas frescas, congeladas o secas; crustáceos (camarones, cangrejos, jaibas, langostinos, langostas) y pescado.

Preferentemente no descongelar la muestra antes de su análisis, si esto es necesario, utilizar caldo lactosado como medio de preenriquecimiento, licuar dos min. Continuar después de la incubación como en B.4.4.2.1.

B.4.4.1.2.2 Carnes, sustitutos de carnes, derivados cárnicos, sustancias de origen animal, productos glandulares y harinas (pescado, carne y hueso).

B.4.4.1.2.2.1 Productos procesados térmicamente y productos secos. Se sigue el procedimiento señalado en B.4.4.1.1 hasta la homogeneización. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse. Después de reposar, mezclar bien y ajustar el pH como se indica en el procedimiento general. Para emulsionar las grasas, agregar los detergentes en las mismas proporciones y con las mismas recomendaciones que para el

coco. La cantidad de los mismos dependerá en gran medida de la composición del alimento. Los detergentes no serán necesarios en los productos glandulares en polvo. Incubar las muestras como se indica en B.4.4.1.1.

B.4.4.1.2.2 Productos crudos o altamente contaminados. Pesar porciones de 25 g de producto en dos vasos para licuadora. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse y el producto puede pasarse directamente en matraces Erlenmeyer estériles de 500 ml. Adicionar 225 ml de caldo selenito cistina o 225 ml de caldo tetrionato (sin verde brillante) a cada muestra analítica. Licuar por dos min y pasar asépticamente a matraces Erlenmeyer de 500 ml. Dejar reposar y ajustar el pH como se indica en B.4.4.1.1.

Adicionar 2,25 ml de solución de verde brillante 0,1% y 4,5 ml de solución yodo-yoduro a la muestra que se enriquecerá con caldo tetrionato. Homogenizar e incubar. Continuar como se indica en B.4.4.2.1.

B.4.4.2 Aislamiento de *Salmonella*

B.4.4.2.1 Cerrar firmemente el tapón de rosca de los matraces con los cultivos de preenriquecimiento y agitar suavemente, transferir respectivamente 1 ml de la mezcla a un tubo que contenga 10 ml de caldo tetrionato y a otro con 10 ml de caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetrionato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport.

B.4.4.2.2 Incubar de 18 a 24 h a 35°C o, para alimentos fuertemente contaminados a 42°C por el mismo periodo. Estriar los productos que fueron directamente enriquecidos en medios selectivos.

B.4.4.2.3 Mezclar el tubo con caldo selenito cistina y estriar en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB) y una tercera caja con cualquiera de los medios selectivos adicionales (agar entérico Hektoen, agar Sulfito de Bismuto o Agar SS).

Efectuar el mismo procedimiento para el caldo tetrionato.

Incubar las placas 24 ± 2 h a 35°C.

B.4.4.2.4 Examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella*, de acuerdo con las siguientes características:

Agar XLD: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

Agar VB: colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.

Agar entérico Hektoen: colonias verdes o azulverdes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

Agar Sulfito de Bismuto: las colonias típicas de *Salmonella* pueden ser cafés, grises o negras; con o sin brillo metálico. Generalmente el medio circundante (halo) es café, tornándose posteriormente negro. Algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro. Si las placas no muestran colonias típicas o no se observa crecimiento, incubar 24 h adicionales.

Agar SS: colonias translúcidas, ocasionalmente opacas. Algunas colonias dan centro negro. Las colonias fermentadoras de la lactosa son rojas.

B.4.4.3 Identificación bioquímica

B.4.4.3.1 Seleccionar al menos dos colonias típicas de cada medio selectivo, que se encuentren bien aisladas.

Tocar levemente el centro de cada colonia e inocular dos tubos, uno con agar triple azúcar hierro (TSI) y otro con agar hierro lisina (LIA), por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo.

Incubar por 24 ± 2 h a 35°C.

Almacenar en refrigeración de 5 a 8°C las placas con medios selectivos por sí es necesario retomar más colonias.

B.4.4.3.2 Observar el crecimiento en los tubos y considerar presuntivamente positivas para *Salmonella* las colonias que den las siguientes reacciones:

B.4.4.3.2.1 Agar TSI, en el fondo del tubo se observa vire del indicador debido a la fermentación de la glucosa; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso que el medio original debido a la no

fermentación de la lactosa ni de la sacarosa. En la mayoría de los casos se observa coloración negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfhídrico.

B.4.4.3.2.2 Agar LIA, se observa intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina. Considerar negativos aquellos cultivos que produzcan claramente color amarillo en el fondo del agar. La mayoría de las cepas de *Salmonella* producen ácido sulfhídrico en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

B.4.4.3.2.3 Retener todos los cultivos que muestren las reacciones características de *Salmonella* en los medios TSI y LIA para las pruebas adicionales, indicadas en B.4.4.3.3.

B.4.4.3.3 Los cultivos con TSI que no parecen de *Salmonella* pero que presentan reacciones en LIA típicos, deben trabajarse como cultivos presuntivos positivos, ya que en estos casos, el medio LIA permitirá detectar *S. arizonae* y cepas atípicas de *Salmonella* que utilicen lactosa o sacarosa. Descartar solamente los cultivos que muestren reacciones atípicas en ambos medios.

B.4.4.3.4 Continuar el análisis a partir de los tubos de TSI con reacciones típicas. Si el cultivo presenta reacciones atípicas en este medio, tomar colonias adicionales de las placas de donde se obtuvo el cultivo atípico anterior y sembrar las pruebas bioquímicas nuevamente.

B.4.4.3.5 Continuar la identificación bioquímica y serológica a partir de los cultivos recuperados de TSI. Se recomienda trabajar seis cultivos por cada 25 g de unidad analítica seleccionando colonias procedentes de ambos medios de enriquecimiento.

B.4.4.3.6 Prueba de ureasa

B.4.4.3.6.1 Prueba de ureasa (convencional). Con una asa estéril, tomar crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea. Utilizar un control de medio para comparar el vire púrpura de las reacciones positivas con el color del medio original. Incubar 24 ± 2 h a 35°C .

B.4.4.3.6.2 Prueba de ureasa (rápida). Tomar dos asadas de crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea (rápida). Incubar 2 h a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en baño de agua.

Descartar todos los cultivos que den ureasa positiva. Retener los cultivos que den la prueba negativa (sin cambio de color del medio).

B.4.4.4 Identificación serológica

B.4.4.4.1 Ensayo de los antígenos somáticos de *Salmonella* (Antisuero polivalente O).

B.4.4.4.1.1 Colocar con una asa dos gotas separadas de solución salina estéril sobre un portaobjetos o en dos secciones de una placa para aglutinación. Suspender en cada una de las gotas, una porción del cultivo desarrollado en TSI.

B.4.4.4.1.2 Agregar a una de ellas una gota del antisuero polivalente somático (O) y mezclar con el canto del asa o empleando aplicadores de madera.

B.4.4.4.1.3 Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente un min. Observar bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro.

B.4.4.4.1.4 Considerar cualquier grado de aglutinación como positiva.

La prueba positiva resulta cuando se presenta aglutinación en la gota con el cultivo y el antisuero y no aglutinación en la gota que contiene el cultivo y la solución salina.

Si se observa aglutinación en ambas gotas, la prueba no es definitiva y se debe continuar con las pruebas bioquímicas complementarias.

B.4.4.4.2 Cuando la aglutinación es positiva con el suero polivalente O, puede determinarse el subgrupo empleando antisueros para los diferentes subgrupos (los grupos B, C, D y E, suelen ser los más frecuentes).

B.4.4.4.2.1 Si la aglutinación con el antisuero O es negativa, utilizar antisuero Vi y efectuar la prueba. Si hay aglutinación con Vi calentar el cultivo a ebullición y repetir la aglutinación con el antisuero polivalente O.

B.4.4.4.2.2 Si no se cuenta con los sueros grupo-específicos, solicitar la tipificación de la cepa al Laboratorio de Enterobacterias del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia de la Secretaría de Salud o esta Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

B.4.4.4.3 Si se requiere, practicar el ensayo de los antígenos flagelares de *Salmonella* (Antisuero polivalente H).

B.4.4.4.3.1 Inocular el crecimiento del tubo de TSI en agar infusión de cerebro corazón e incubar de 4 a 6 h a 35 °C hasta que se observe crecimiento (para ensayo en el mismo día), o bien, en caldo soya tripticaseína e incubar por 24 ± 2 h a 35°C (para ensayo al día siguiente). Adicionar 2,5 ml de solución salina formalizada a 5 ml del cultivo en caldo o al cultivo en agar cerebro corazón (BHI).

B.4.4.4.3.2 Colocar 0,5 ml del antisuero polivalente flagelar (H) preparado en un tubo para serología (13 x 100 mm aproximadamente). Adicionar 0,5 ml del cultivo formalizado. Preparar un control de solución salina mezclando 0,5 ml de solución salina formalizada con 0,5 ml del antígeno formalizado. Incubar las mezclas en baño de agua a 48-50°C. Observar a intervalos de 15 min por espacio de 1 h. Una prueba positiva es cuando se observa aglutinación en la mezcla de prueba pero no en el control. Debe interpretarse como negativa una prueba en la que ninguna de las mezclas muestre aglutinación. Cuando ambas mezclas se aglutinan, se considera la prueba inespecífica.

B.4.4.5 Pruebas bioquímicas complementarias

Cuando las pruebas serológicas o bioquímicas iniciales, dan resultados atípicos o no concluyentes, realizar las pruebas que se describen a continuación:

B.4.4.5.1 Inocular los cultivos positivos provenientes de TSI y LIA en: medio SIM, agar citrato de Simmons, caldo manitol y caldo RM-VP. Usar caldo malonato para confirmar la presencia de la especie *S. arizonae*.

B.4.4.5.2 Interpretar los cambios en los medios inoculados conforme con lo siguiente:

B.4.4.5.2.1 Agar citrato Simmons

Inocular por estría el tubo.

Incubar 96 ± 2 h a 35 ± 2°C.

- Prueba positiva: crecimiento acompañado de un cambio de color de verde a azul.
- Prueba negativa: ausencia de crecimiento y sin cambio de color.

B.4.4.5.2.2 Medio SIM

Inocular por punción.

Incubar 24 h a 35 ± 2°C.

Movilidad:

- Prueba positiva: crecimiento a lo largo de la punción y en el seno del medio de cultivo.
- Prueba negativa: crecimiento a lo largo de la punción exclusivamente.

Producción de ácido sulfhídrico:

- Prueba positiva: desarrollo de un color negro a lo largo de la punción que puede extenderse a todo el medio.
- Prueba negativa: ausencia de color negro.

Producción de indol:

Adicionar al tubo con medio SIM que presente crecimiento, de 0,2 a 0,3 ml de reactivo de Kovac.

- Prueba positiva: desarrollo de un anillo de color rojo.
- Prueba negativa: sin cambio de color.

B.4.4.5.2.3 Caldo RM-VP

Inocular un tubo con el medio.

Incubar 48 ± 2 h a 35 ± 2°C para la prueba de VP y 96 h para la prueba RM.

B.4.4.5.2.3.1 Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Transferir a un tubo un ml del cultivo de 48 h.

Adicionar 0,6 ml de solución de alfa naftol.

Adicionar 0,2 ml de solución de hidróxido de potasio 40%.

Adicionar algunos cristales de creatinina (opcional).

Interpretar los resultados después de incubar 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ o 4 h a temperatura ambiente:

- Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo.
- Prueba negativa: sin cambio de color.

Reincubar el resto del medio RM-VP 48 h más a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

B.4.4.5.2.3.2 Prueba de rojo de metilo (RM)

Adicionar al medio de cultivo de 96 h de incubación de dos a tres gotas de solución de rojo de metilo.

Interpretar los resultados inmediatamente:

- Prueba positiva: desarrollo de color rojo.
- Prueba negativa: desarrollo de color amarillo.

B.4.4.5.2.4 Caldo malonato

Inocular un tubo conteniendo el medio.

Incubar 40 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

- Prueba positiva: desarrollo de color azul.
- Prueba negativa: sin cambio de color.

B.4.4.5.2.5 Caldo manitol

Inocular un tubo conteniendo el medio.

Incubar 24 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

- Prueba positiva: desarrollo de color amarillo.
- Prueba negativa: sin cambio de color.

B.4.4.5.3 Consultar los resultados obtenidos en el cuadro 2 para la identificación de los géneros de las bacterias investigadas.

Nota: Los sistemas bioquímicos comerciales validados pueden ser usados como alternativa para las pruebas bioquímicas convencionales.

B.4.5 Cálculo y expresión de resultados

B.4.5.1 Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas.

CUADRO 1

REACCIONES BIOQUIMICAS	REACCIONES SEROLOGICAS	INTERPRETACION
Típica	Antígeno O, Vi o H positivo	Cepas consideradas como <i>Salmonella</i>
Típica	Todas las reacciones negativas	
Típica	No probada	Puede ser <i>Salmonella</i>
Reacciones atípicas	Antígeno O, Vi o H positivo	
Reacciones atípicas	Todas las reacciones negativas	No debe ser considerada <i>Salmonella</i>

B.4.5.2 Reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella*

CUADRO 2

PRUEBA O SUSTRATO	POSITIVO	NEGATIVO	REACCION
Glucosa (TSI)	amarillo	rojo	+
Lisina descarboxilasa(LIA)	púrpura	amarillo	+
H ₂ S (TSI y LIA)	negro	no negro	+

Ureasa	rojo-púrpura	no hay cambio de color	-
Caldo de lisina descarboxilasa	púrpura	amarillo	+
Caldo dulcitol rojo de fenol	³ amarillo o gas	no hay ³ cambio de color, ni gas	+ ^b
Caldo KCN	crecimiento	no hay crecimiento	-
Caldo malonato	azul	no hay cambio de color	-
Prueba de indol	superficie color violeta	superficie color amarillo	-
Prueba del antígeno flagelar	aglutinación	no hay aglutinación	+
Prueba del antígeno somático	aglutinación	no hay aglutinación	+
Caldo lactosa rojo fenol	amarillo o gas	no hay cambio de color, ni gas	-
Caldo sacarosa rojo fenol	amarillo o gas	no hay cambio de color, ni gas	-
Prueba Voges-Proskauer	de rosa a rojo	no hay cambio de color	-
Prueba rojo de metilo	rojo difuso	amarillo difuso	+
Citrato de Simmons	crecimiento color azul	no hay crecimiento no hay cambio de color	v

^a +, 90 % o más positivos en 1 ó 2 días; -, 90 % o más negativas en 1 ó 2 días; v, variable.

^b La mayoría de los cultivos *S. arizonae* son negativos.

^c La mayoría de los cultivos *S. arizonae* son positivos.

B.4.5.3 Informe de Resultados

Informar: presencia o ausencia de *Salmonella* en _____ g o _____ ml de muestra.

B.5 METODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA

B.5.1 Fundamento

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

B.5.2 Reactivos y materiales

B.5.2.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico.

Cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada, con pH cercano a la neutralidad.

Medio de Cultivo.

Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de levadura	2,5 g
Triptona	5 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua	1 l

Preparación: Suspender los componentes del medio deshidratado en un litro de agua. Hervir hasta total disolución.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables de capacidad no mayor de 500 ml, cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 15 min. El pH final del medio debe ser $7 \pm 0,2$ a 25°C .

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe fundirse más de una vez.

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

El medio de cultivo anterior es el de uso más generalizado. Para algunos alimentos en particular se requerirá de un medio de cultivo especial que se debe indicar al describir la técnica para ese alimento.

B.5.2.2 Materiales

Todo el material que tenga contacto con las muestras o los microorganismos debe estar estéril.

Se requieren los materiales mencionados en B.1.2.2.

B.5.3 Aparatos e instrumentos

Se requiere, además de los mencionados en B.1.3, los siguientes:

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1^\circ\text{C}$, provista con termómetro calibrado.

Contador de colonias de campo obscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Baño de agua con o sin circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de hasta 1°C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.5.4 Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra, seguir el método señalado en B.1 PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLÓGICO.

B.5.5 Procedimiento

B.5.5.1 Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación; la adición de medio de cultivo y homogenización, se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes previamente a su inoculación y correr por duplicado.

B.5.5.2 Después de inocular las diluciones de las muestras preparadas según el método señalado en B.1 PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLÓGICO, en las cajas Petri agregar de 12 a 15 ml del medio preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

B.5.5.3 Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

B.5.5.4 El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 min.

B.5.5.5 Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) por el tiempo y la temperatura que se requieran, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, véase el Cuadro 1.

CUADRO 1

Grupo Bacteriano	Temperatura	Tiempo de Incubación
Termofílicos aerobios	$55 \pm 2^\circ\text{C}$	48 ± 2 h
Mesofílicos aerobios*	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	48 ± 2 h
Psicrotróficos	$20 \pm 2^\circ\text{C}$	3 - 5 días
Psicrofílicos	$5 \pm 2^\circ\text{C}$	7 - 10 días

* En el análisis de agua potable y agua purificada se debe incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h.

B.5.5.6 En la lectura seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.

B.5.5.7 Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

B.5.6 Expresión de resultados

B.5.6.1 Cálculo del método

B.5.6.1.1 Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Las placas de al menos una de tres diluciones deben estar en el intervalo de 25 a 250. Cuando sólo una dilución está en el intervalo apropiado, véase el Cuadro 2, ejemplo 1. Calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.

B.5.6.1.2 Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada por cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro, véase el Cuadro 2, ejemplo 2.

B.5.6.1.3 Con el fin de uniformar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones no contempladas en los ejemplos anteriores, se presentan las siguientes guías:

B.5.6.1.3.1 Placas con menos de 25 colonias.- Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa.

Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el Cuadro 2, ejemplo 3.

B.5.6.1.3.2 Placas con más de 250 colonias.- Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el Cuadro 2, ejemplo 4.

B.5.6.1.3.3 Colonias extendidas.- Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

B.5.6.1.3.3.1 Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.

B.5.6.1.3.3.2 Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.

B.5.6.1.3.3.3 Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.

B.5.6.1.3.3.4 Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.

B.5.6.1.3.5 Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en B.5.6.1.3.3.4, contar cualquiera de los tipos B.5.6.1.3.3.1, B.5.6.1.3.3.2 o B.5.6.1.3.3.3, como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo B.5.6.1.3.3.1, si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias del tipo B.5.6.1.3.3.2 y B.5.6.1.3.3.3 generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos tipo B.5.6.1.3.3.4, reportarlos como crecimiento extendido. En caso de que una dilución se encuentre dentro del rango y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias, véase el Cuadro 2, ejemplo 5.

B.5.6.1.4 Placas sin colonias.- Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, véase el Cuadro 2, ejemplo 6.

B.5.6.1.5 Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias.- Cuando una placa tiene entre 25 y 250 colonias y su duplicado más de 250 colonias, contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, véase el Cuadro 2, ejemplo 7.

B.5.6.1.6 Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 25 a 250 colonias.-

Cuando una placa dentro de diferentes diluciones contiene el número de colonias especificadas en el intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, véase el Cuadro 2, ejemplo 8.

B.5.6.1.7 Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 a 250 y sólo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquélla con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, véase el Cuadro 2, ejemplo 9.

B.5.6.1.8 Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra. Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, elevar el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor (por ejemplo: 128 redondear a 130). Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenerlo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400):

B.5.7 Informe de la prueba

Reportar como: Unidades formadoras de colonias, ___ UFC/g o ml, de bacterias aerobias en placa en agar triptona extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas _____ horas a _____ °C.

CUADRO 2

Cálculo de los valores de la cuenta en placa (Ensayos por duplicado)				
Ejemplo número	Colonias contadas			UFC/g o ml
	1: 100	1: 1000	1: 10000	
1	> 250a	178	16	180000
	> 250	190	17	
2	> 250	220	25	250000
		238	28	
3	18	2	0	1600b
	14	0	0	
4	> 250	> 250	512	500000b
5	> 250	> 250	495	290000
	> 250	240	34	
	> 250	235	crecimiento extendido	
6	0	0	0	< 100c
7	> 250	240	24	250000
	> 250	268	19	
8	> 250	216	23	280000
	> 250	262	42	
9	> 250	215	20	230000
	> 250	235	26	
	> 250	275	32	270000
	> 250	225	26	

a Cuenta por arriba de 250 colonias.

b Debe aclararse "valor estimado" por encontrarse los valores fuera del intervalo de 25 a 250.

c Debe informarse de acuerdo con la menor dilución ensayada y contada, en este caso 1:100.

B.6 DETERMINACION DE LA ESTIMACION DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE. DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES FECALES Y *Escherichia coli* POR LA TECNICA DE DILUCIONES EN TUBO MULTIPLE

Este método es aplicable a cualquier grupo bacteriano de interés sanitario, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos (10 por g o ml). Ejemplo: Leche, agua,

alimentos; que por su consistencia pueden interferir con la exactitud de la cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

B.6.1 Fundamento

Se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución más alta sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas o crecimiento microbiano.

Para obtener el Número Más Probable (NMP) en los resultados se aplica la teoría de la probabilidad, lo cual tiene como condición lo siguiente:

- Una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra.
- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.
- Los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio, cuando son incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra deberá diluirse para dar cumplimiento a las condiciones. La forma más común de realizar esta prueba es mediante diluciones decimales y usando un inóculo en series de 3, 5 o 10 tubos en serie. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumentan se reducen los límites de confianza.

B.6.2 Equipo, materiales y reactivos.

No aplica.

B.6.3 Procedimientos

B.6.3.1 Uso de tablas de NMP con 95% de límite de confianza

Las tablas 1-3 presentan la estimación estadística de los valores del NMP que corresponden al 95% de límite de confianza cuando se utilizan 3, 5 y 10 tubos. Otras combinaciones de resultados positivos y negativos no encontrados en estas tablas, tienen muy baja probabilidad de que se presenten. Si los resultados no están incluidos en las tablas, se deberá repetir la prueba a partir de la muestra original. Si no es posible, el NMP se puede obtener (para las combinaciones de 3 y 5 tubos) de las tablas 4 y 5; también se puede aplicar una ecuación (véase punto B.2) para obtener el NMP aproximado.

El intervalo del 95% de confianza se interpreta como sigue: si el analista supone que el número real de microorganismos cae dentro de los límites, entonces se asume que será correcto el 95% de las veces. El valor del NMP tabulado representa un intervalo y no un valor absoluto.

Cuando se preparan más de 3 diluciones de una muestra, el NMP deberá determinarse a partir de tres diluciones consecutivas (usando tablas 1-3). Primero, para todas las diluciones que tengan todos los tubos positivos, seleccionar la dilución mayor. Después usar las 2 siguientes diluciones mayores (A y B en las tablas 6 y 7). Cuando en ninguna de las diluciones probadas hubiera crecimiento en todos los tubos, seleccionar (si es posible) las primeras tres diluciones consecutivas (volumen de muestra) para que la dilución media contenga resultados positivos (C de tablas 6 y 7).

Con frecuencia es necesario el NMP desde el inicio con volúmenes diferentes de los enlistados en las tablas 1-5. Si el volumen de muestra es mayor que 0,01 g multiplicar el NMP enlistado en la tabla por 10. El resultado de una determinación de 5 tubos que dé 3 tubos positivos en 0,01 g; 2 tubos positivos en 0,001 g y 1 tubo positivo en 0,0001 g (3-2-1) leer en la tabla No. 2 como 17 y multiplicar por 10 para así obtener 170 como el NMP actual por gramo de muestra. De igual forma si la cantidad más grande utilizada para la tabla de referencia es 1 g en lugar de 0,1 g, dividir el NMP derivado de la tabla entre 10. Por ejemplo el resultado de la determinación del NMP en 3 tubos para *Salmonella* spp que dé 3 tubos positivos en 1 g; 1 tubo positivo en 0,1 g y ningún positivo en 0,01 g (3-1-0) leer en la tabla No. 1 como 43 y dividir entre 10, lo que da 4,3 como el NMP presuntivo por gramo de muestra.

Un método alternativo para obtener el número más probable es usando la siguiente fórmula:

$$NMP / g = (NMP/g \text{ de la tabla} - 100) \times \text{factor de dilución del tubo de en medio}$$

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

B.6.3.2 Cálculo aproximado del NMP y 95% de límite de confianza

Debido a la inherente complejidad para calcular los límites de confianza del NMP lo más común es el uso de tablas. Generalmente estas tablas están limitadas al uso de 3, 5 y 10 tubos por dilución, incluso usando un método aceptado, pueden presentarse datos irregulares o accidentes de laboratorio que causan pérdida de 1 o más tubos de dilución. En este caso una serie de diluciones de por ejemplo: 5,4,4 puede dar una lectura de 5-2-0. Para estos casos se puede aplicar una fórmula sencilla, la cual no corresponde exactamente con los resultados obtenidos teóricamente; sin embargo, las desviaciones generalmente son pequeñas, esta fórmula no debe ser aplicada para fines de regulación. La fórmula no restringe el número de tubos o las diluciones y puede aplicarse para todo tipo de pruebas. El cálculo aproximado está dado por la siguiente ecuación:

$$NMP / g = \frac{P}{(N \times T)^{1/2}}$$

En donde:

P = número de tubos positivos

N = cantidad total de muestra (g) en todos los tubos negativos

T = cantidad total de muestra (g) en todos los tubos.

Por ejemplo, considerando que se tuvieran serie de diluciones al doble:

MUESTRA (G)	No. DE TUBOS	No. DE TUBOS POSITIVOS
8	5	5
4	5	4
2	5	2
1	5	0
0,5	5	1
0,25	5	0

El número de tubos positivos es:

$$P = (5 + 4 + 2 + 1) = 12$$

$$N = (8 \times 0) + (4 \times 1) + (2 \times 3) + (1 \times 5) + (0,5 \times 4) + (0,25 \times 5) = 18,25$$

$$T = 5 \times (8 + 4 + 2 + 1 + 0,5 + 0,25) = 78,75$$

$$NMP / g = \frac{12}{(18,25 \times 78,75)^{1/2}} = 0,32 / g \text{ o } 32 / 100 g$$

Los límites de confianza del 95% estimados, pueden obtenerse del antilogaritmo de base 10 con la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de confianza del 95\% estimado} = \log NMP / g \pm 1,08 \times \left(\frac{\log a}{n} \right)^{1/2}$$

En donde:

a = radio de dilución

n = n es el número de tubos por dilución. Esta expresión asume que el radio de dilución es diferente de 1:10 (por ejemplo 1:2). Para diluciones de 1:10, la cantidad por restar o sumar deberá ser de $1,14(n)^{1/2}$ para la mejor estimación. Si el número de tubos por dilución (n_i) es desigual (por ejemplo: un accidente de laboratorio) para la dilución k reemplazar n por la expresión n_H (media armónica) por el número de tubos por dilución (n_i).

La media armónica se define como:

$$n_H = \frac{k}{\frac{1}{n_i}}$$

En donde:

k = número de diluciones. Por ejemplo: Suponiendo que el resultado de 3 diluciones en n_i fuera 5-4-4.

Por lo tanto:

$$n_H = \frac{3}{\frac{1}{5} + \frac{1}{4} + \frac{1}{4}} = 4,3_i$$

Para el ejemplo anterior el NMP con $n = 5$ y un límite de confianza aproximado de 95% será el siguiente:

$$\text{Límite de confianza del 95\% estimado} = \log 0.32/\text{g} \pm 1.08 \times \left(\frac{\log 2}{5}\right)^{1/2} = -0,495 \pm 0,265$$

Entonces el límite inferior es el antilogaritmo (-0,76) = 0,17/g o 17/100 g y el límite superior es el antilogaritmo (-0,23) = 0,59/g o 59/100 g. Cuando se compara con las tablas el NMP podría ser 0,31/g con límites de confianza de 0,16/g y 0,57/g.

Tabla No. 1

Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 3 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestra

No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza		No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<3,0	-	9,5	2	2	0	21	4,5	42
0	0	1	3,0	0,15	9,6	2	2	1	28	8,7	94
0	1	0	3,0	0,15	11	2	2	2	35	8,7	94
0	1	1	6,1	1,2	18	2	3	0	29	8,7	94
0	2	0	6,2	1,2	18	2	3	1	36	8,7	94
0	3	0	9,4	3,6	38	3	0	0	23	4,6	94
1	0	0	3,6	0,17	18	3	0	1	38	8,7	110
1	0	1	7,2	1,3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3,6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7,4	1,3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3,6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3,6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4,5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4,5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9,2	1,4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3,6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4,5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3,7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4,5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8,7	94	3	3	3	>1100	420	-

^a Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml),

Tabla No. 2

**Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando
5 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestra^a**

No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza		No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<1,8	–	6,8	4	0	2	21	6,8	40
0	0	1	1,8	0,09	6,8	4	0	3	25	9,8	70
0	1	0	1,8	0,09	6,9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3,6	0,7	10	4	1	1	21	6,8	42
0	2	0	3,7	0,7	10	4	1	2	26	9,8	70
0	2	1	5,5	1,8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5,6	1,8	15	4	2	0	22	6,8	50
1	0	0	2	0,1	10	4	2	1	26	9,8	70
1	0	1	4	0,7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1,8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0,7	12	4	3	0	27	9,9	70
1	1	1	6,1	1,8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8,1	3,4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6,1	1,8	15	4	4	0	34	14	100
1	2	1	8,2	3,4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8,3	3,4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3,5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3,5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4,5	0,79	15	5	0	0	23	6,8	70
2	0	1	6,8	1,8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9,1	3,4	22	5	0	2	43	14	100
2	1	0	6,8	1,8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9,2	3,4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4,1	26	5	1	1	46	14	120
2	2	0	9,3	3,4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4,1	26	5	1	3	84	34	220
2	2	2	14	5,9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4,1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5,9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5,9	36	5	2	3	120	36	250
3	0	0	7,8	2,1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3,5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5,6	35	5	3	1	110	34	250
3	1	0	11	3,5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5,6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5,7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6,8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6,8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6,8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6,8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9,8	70	5	4	5	430	150	1,100
3	4	0	21	6,8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9,8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9,8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4,1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5,9	36	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	–

^a Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml),

Tabla No. 3

Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 10 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestra^a

No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza		No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<,90	–	3,1	8	2	0	17	7,7	34
0	0	1	0,9	0,04	3,1	8	2	1	19	9	34
0	0	2	1,8	0,33	5,1	8	2	2	21	10	39
0	1	0	0,9	0,04	3,6	8	2	3	23	11	44
0	1	1	1,8	0,33	5,1	8	3	0	19	9	34
0	2	0	1,8	0,33	5,1	8	3	1	21	10	39
0	2	1	2,7	0,8	7,2	8	3	2	24	11	44
0	3	0	2,7	0,8	7,2	8	3	3	26	12	50
1	0	0	0,94	0,05	5,1	8	4	0	22	10	39
1	0	1	1,9	0,33	5,1	8	4	1	24	11	44
1	0	2	2,8	0,8	7,2	8	4	2	26	12	50
1	1	0	1,9	0,33	5,7	8	4	3	29	14	58
1	1	1	2,9	0,8	7,2	8	5	0	24	11	44
1	1	2	3,8	1,4	9	8	5	1	27	12	50
1	2	0	2,9	0,8	7,2	8	5	2	29	14	58
1	2	1	3,8	1,4	9	8	5	3	32	15	62
1	3	0	3,8	1,4	9	8	6	0	27	12	50
1	3	1	4,8	2,1	11	8	6	1	30	14	58
1	4	0	4,8	2,1	11	8	6	2	33	15	62
2	0	0	2	0,37	7,2	8	7	0	30	14	58
2	0	1	3	0,81	7,3	8	7	1	33	17	73
2	0	2	4	1,4	9	8	7	2	36	17	74
2	1	0	3	0,82	7,8	8	8	0	34	17	73
2	1	1	4	1,4	9	8	8	1	37	17	74
2	1	2	5	2,1	11	9	0	0	17	7,5	31
2	2	0	4	1,4	9,1	9	0	1	19	9	34
2	2	1	5	2,1	11	9	0	2	22	10	39
2	2	2	6,1	3	14	9	0	3	24	11	44
2	3	0	5,1	2,1	11	9	1	0	19	9	39
2	3	1	6,1	3	14	9	1	1	22	10	40
2	4	0	6,1	3	14	9	1	2	25	11	44
2	4	1	7,2	3,1	15	9	1	3	28	14	58
2	5	0	7,2	3,1	15	9	1	4	31	14	58
3	0	0	3,2	0,9	9	9	2	0	22	10	44

3	0	1	4,2	1,4	9,1	9	2	1	25	11	46
3	0	2	5,3	2,1	11	9	2	2	28	14	58
3	1	0	4,2	1,4	10	9	2	3	32	14	58
3	1	1	5,3	2,1	11	9	2	4	35	17	73
3	1	2	6,4	3	14	9	3	0	25	12	50
3	2	0	5,3	2,1	12	9	3	1	29	14	58
3	2	1	6,4	3	14	9	3	2	32	15	62
3	2	2	7,5	3,1	15	9	3	3	36	17	74
3	3	0	6,5	3	14	9	3	4	40	20	91
3	3	1	7,6	3,1	15	9	4	0	29	14	58
3	3	2	8,7	3,6	17	9	4	1	33	15	62
3	4	0	7,6	3,1	15	9	4	2	37	17	74
3	4	1	8,7	3,6	17	9	4	3	41	20	91
3	5	0	8,8	3,6	17	9	4	4	45	20	91
4	0	0	4,5	1,6	11	9	5	0	33	17	73
4	0	1	5,6	2,2	12	9	5	1	37	17	74
4	0	2	6,8	3	14	9	5	2	42	20	91
4	1	0	5,6	2,2	12	9	5	3	46	20	91
4	1	1	6,8	3	14	9	5	4	51	25	120
4	1	2	8	3,6	17	9	6	0	38	17	74
4	2	0	6,8	3	15	9	6	1	43	20	91
4	2	1	8	3,6	17	9	6	2	47	21	100
4	2	2	9,2	3,7	17	9	6	3	53	25	120
4	3	0	8,1	3,6	17	9	7	0	44	20	91
4	3	1	9,3	4,5	18	9	7	1	49	21	100
4	3	2	10	5	20	9	7	2	54	25	120
4	4	0	9,3	4,5	18	9	7	3	60	26	120
4	4	1	11	5	20	9	8	0	50	25	120
4	5	0	11	5	20	9	8	1	55	25	120
4	5	1	12	5,6	22	9	8	2	61	26	120
4	6	0	12	5,6	22	9	8	3	68	30	140
5	0	0	6	2,5	14	9	9	0	57	25	120
5	0	1	7,2	3,1	15	9	9	1	63	30	140
5	0	2	8,5	3,6	17	9	9	2	70	30	140
5	0	3	9,8	4,5	18	10	0	0	23	11	44
5	1	0	7,3	3,1	15	10	0	1	27	12	50
5	1	1	8,5	3,6	17	10	0	2	31	14	58
5	1	2	9,8	4,5	18	10	0	3	37	17	73

5	1	3	11	5	21	10	1	0	27	12	57
5	2	0	8,6	3,6	17	10	1	1	32	14	61
5	2	1	9,9	4,5	18	10	1	2	38	17	74
5	2	2	11	5	21	10	1	3	44	20	91
5	3	0	10	4,5	18	10	1	4	52	25	120
5	3	1	11	5	21	10	2	0	33	15	73
5	3	2	13	5,6	23	10	2	1	39	17	79
5	4	0	11	5	21	10	2	2	46	20	91
5	4	1	13	5,6	23	10	2	3	54	25	120
5	4	2	14	7	26	10	2	4	63	30	140
5	5	0	13	6,3	25	10	3	0	40	17	91
5	5	1	14	7	26	10	3	1	47	20	100
5	6	0	14	7	26	10	3	2	56	25	120
6	0	0	7,8	3,1	17	10	3	3	66	30	140
6	0	1	9,2	3,6	17	10	3	4	77	34	150
6	0	2	11	5	20	10	3	5	89	39	180
6	0	3	12	5,6	22	10	4	0	49	21	120
6	1	0	9,2	3,7	18	10	4	1	59	25	120
6	1	1	11	5	21	10	4	2	70	30	150
6	1	2	12	5,6	22	10	4	3	82	38	180
6	1	3	14	7	26	10	4	4	94	44	180
6	2	0	11	5	21	10	4	5	110	50	210
6	2	1	12	5,6	22	10	5	0	62	26	140
6	2	2	14	7	26	10	5	1	74	30	150
6	2	3	15	7,4	30	10	5	2	87	38	180
6	3	0	12	5,6	23	10	5	3	100	44	180
6	3	1	14	7	26	10	5	4	110	50	210
6	3	2	15	7,4	30	10	5	5	130	57	220
6	4	0	14	7	26	10	5	6	140	70	280
6	4	1	15	7,4	30	10	6	0	79	34	180
6	4	2	17	9	34	10	6	1	94	39	180
6	5	0	16	7,4	30	10	6	2	110	50	210
6	5	1	17	9	34	10	6	3	120	57	220
6	5	2	19	9	34	10	6	4	140	70	280
6	6	0	17	9	34	10	6	5	160	74	280
6	6	1	19	9	34	10	6	6	180	91	350
6	7	0	19	9	34	10	7	0	100	44	210
7	0	0	10	4,5	20	10	7	1	120	50	220

7	0	1	12	5	21	10	7	2	140	61	280
7	0	2	13	6,3	25	10	7	3	150	73	280
7	0	3	15	7,2	28	10	7	4	170	91	350
7	1	0	12	5	22	10	7	5	190	91	350
7	1	1	13	6,3	25	10	7	6	220	100	380
7	1	2	15	7,2	28	10	7	7	240	110	480
7	1	3	17	7,7	31	10	8	0	130	60	250
7	2	0	13	6,4	26	10	8	1	150	70	280
7	2	1	15	7,2	28	10	8	2	170	80	350
7	2	2	17	7,7	31	10	8	3	200	90	350
7	2	3	19	9	34	10	8	4	220	100	380
7	3	0	15	7,2	30	10	8	5	250	120	480
7	3	1	17	9	34	10	8	6	280	120	480
7	3	2	19	9	34	10	8	7	310	150	620
7	3	3	21	10	39	10	8	8	350	150	620
7	4	0	17	9	34	10	9	0	170	74	310
7	4	1	19	9	34	10	9	1	200	91	380
7	4	2	21	10	39	10	9	2	230	100	480
7	4	3	23	11	44	10	9	3	260	120	480
7	5	0	19	9	34	10	9	4	300	140	620
7	5	1	21	10	39	10	9	5	350	150	630
7	5	2	23	11	44	10	9	6	400	180	820
7	6	0	21	10	39	10	9	7	460	210	970
7	6	1	23	11	44	10	9	8	530	210	970
7	6	2	25	12	46	10	9	9	610	280	1300
7	7	0	23	11	44	10	10	0	240	110	480
7	7	1	26	12	50	10	10	1	290	120	620
8	0	0	13	5,6	25	10	10	2	350	150	820
8	0	1	15	7	26	10	10	3	430	180	970
8	0	2	17	7,5	30	10	10	4	540	210	1300
8	0	3	19	9	34	10	10	5	700	280	1500
8	1	0	15	7,1	28	10	10	6	920	350	1900
8	1	1	17	7,7	31	10	10	7	1200	480	2400
8	1	2	19	9	34	10	10	8	1600	620	3400
8	1	3	21	10	39	10	10	9	2300	810	5300
						10	10	10	>2300	1300	-

^a Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml),

Tabla No. 4

Número más probable (NMP) para 1 g de muestra cuando se usan 3 tubos con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml)

Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos			
0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP
0	0	0	3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Tabla No. 5

Número más probable (NMP) para 100 ml de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de 3 diluciones con series geométricas

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos							
10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1					
ml	ml	ml	N M P	ml	ml	ml	N M P	ml	ml	ml	N M P	ml	ml	ml	N M P	ml	ml	ml	N M P				
0	0	0		1	0	0	2	2	0	0	4,5	3	0	0	7,8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1,8	1	0	1	4	2	0	1	6,8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3,6	1	0	2	6	2	0	2	9,1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5,4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7,2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9,0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1,8	1	1	0	4	2	1	0	6,8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3,6	1	1	1	6,1	2	1	1	9,2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5,5	1	1	2	8,1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7,3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9,1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110

0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3,7	1	2	0	6,1	2	2	0	9,3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5,5	1	2	1	8,2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7,4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9,2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5,6	1	3	0	8,3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7,4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9,3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7,5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9,4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9,4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81				

Tabla No. 6

Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de tres tubos con 1 g (ml) de muestra por tubo

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o ml) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o ml ^b
	0,10	0,001	0,001	0,0001	0,00001		
A	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3-2-0	930
B	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	3-2-0	9300
C	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0-1-0	30
D	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3-2-2	2100
E	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3-3-3	110000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

Tabla No. 7

Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de 5 tubos con 1 g (ml) de muestra por tubo

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o ml) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o ml ^b
	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001		
A	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	5-2-0	490
B	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0	4900
C	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	20
D	5/5	5/5	3/5	1/5	1/5	5-2-2	1400
E	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5-5-5	160000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

B.6.3.3 Determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple

B.6.3.3.1 Fundamento

Este método se basa en la propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de glucosa y fermentación de lactosa dentro de las 48 h de incubación a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ (coliformes) y $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (coliformes fecales y *E. coli*).

B.6.3.3.2 Equipo y materiales

- Además de los mencionados en el método Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico, lo siguiente:
- Baño de agua con agitación continua cubierto y con termostato que evite variaciones mayores a $0,2^\circ\text{C}$.
- Termómetro calibrado y verificado 1/10
- Tubos de cultivo de 20 x 200 y de 16 x 160 mm con tapón de rosca
- Campanas de fermentación (tubos de Durham)
- Gradillas
- Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro
- Lámpara de luz ultravioleta de longitud amplia 4 watts.
- Lentes protectores.
- Medios de cultivo: En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, se debe demostrar que cumplen con lo indicado en este método de prueba, para su preparación deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva. Cuando se mencione agua debe entenderse que se trata de "agua destilada" los reactivos a emplear en el método de esta norma deben ser grado analítico.

Caldo lauril

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Bacto triptosa	20 g
Bacto lactosa	5 g
Fosfato potásico, dibásico	2,75 g
Fosfato potásico, monobásico	2,75 g
Cloruro de sodio	5 g
Lauril sulfato de sodio	0,1 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C .

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Ajustar el pH. Distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham. Adicionar 10 ml de medio para cada tubo. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C. Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a 75°C para que no queden burbujas en las campanas de Durham.

Preparación de caldo lauril triptosa

INOCULO (ml)	CANTIDAD DE MEDIO POR TUBO (ml)	VOLUMEN DE MEDIO MAS INOCULO (ml)	CALDO LAURIL TRIPTOSA REQUERIDO g/l
1	10 o más	11 o más	35,6
10	10	20	71,2
10	20	30	53,4
20	10	30	106,8
100	50	150	106,8
100	35	135	137,1
100	20	120	213,6

Caldo EC (*E. coli*)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Bacto triptosa	20 g
Bacto lactosa	5 g
Bacto sales biliares No. 3	1,5 g
Fosfato dipotásico	4 g
Fosfato monopotásico	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 ± 0,2 a 25°C.

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar ligeramente para que se disuelva por completo. Ajustar el pH. Distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham. Adicionar 10 ml de medio para cada tubo. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C. Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a 75°C para evitar que queden burbujas en las campanas de Durham.

Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación)

Lactosa bilis verde brillante

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	20 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua	1 l

Preparación: Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de 7,2 a 25 °C. Distribuir el medio en cantidades de 10 ml en tubos de 16 x 160 mm conteniendo campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 ± 1 °C. Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

Agar McConkey

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Proteasa peptona o polipeptona	3 g
Peptona o gelizante	17 g
Lactosa	10 g
Sales biliares No. 3	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	13,5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $7,1 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver por completo. Ajustar el pH. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Enfriar a $50-60^{\circ}\text{C}$ y vaciar en cajas Petri.

Agar eosina azul de metileno de Levin (EMB-L)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10 g
Lactosa	10 g
K_2HPO_4	2 g
Eosina Y	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $7,1 \pm 0,2$

Preparación: Disolver la peptona, el fosfato y el agar en un litro de agua. Calentar hasta ebullición para la disolución completa. Distribuir en porciones de 100 o 200 ml y esterilizar a no más de 121°C por 15 min. Fundir antes de su uso y adicionar a cada porción de 100 ml.

- a) 5 ml de solución de lactosa al 20%.
- b) 2 ml de solución acuosa de eosina al 2%.
- c) 4,3 ml de solución acuosa de azul de metileno al 0,15%.

Cuando se use el producto deshidratado, disolver todos los ingredientes de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Caldo triptona al 1% (triptofano)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Triptona o tripticasa	10 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $6,9 \pm 0,2$

Preparación: Disolver los ingredientes. Distribuir en porciones de 5 ml en tubos de ensaye de 16 x 125 o 16 x 150 mm. Esterilizar a 121°C por 15 min.

Caldo MR-VP

Medio 1

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona tamponada	7 g
Glucosa	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 ± 0,2

Preparación: Disolver los ingredientes con calentamiento suave si es necesario. Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos de ensaye de 16x150 mm. Esterilizar a 121°C por 15 min.

Caldo citrato de Koser

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
NaNH ₄ HPO ₄ • 4H ₂ O	1,5 g
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	1 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2 g
Citrato de sodio • 2H ₂ O	3 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,7 ± 0,2.

Preparación: Distribuir preferentemente en tubos de ensaye con tapa de rosca. Esterilizar a 121°C por 15 min. Esta formulación se recomienda en los Métodos de Análisis Oficial de AOAC y en los Métodos Estándares para el Análisis de Agua y Aguas de Desecho (APHA). Este difiere de la composición del medio deshidratado disponible comercialmente y es recomendable su uso.

- Reactivos

Reactivo de Kovacs

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
p-dimetilaminobenzaldehído	5 g
Alcohol amílico (normal)	75 ml
HCl concentrado	25 ml

Preparación: Disolver el p-Dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico normal. Adicionar lentamente el HCl. Almacenar a 4°C.

Para la prueba de indol

1. Adicionar 0,2-0,3 ml del reactivo a 5 ml del cultivo de bacteria en caldo triptona.

Se considera una prueba positiva cuando desarrolla un color rojo en la superficie del tubo.

Reactivo de Voges-Proskauer (VP)

Solución 1

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
alfa-naftol	5 g
Alcohol absoluto	100 g

Solución 2

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Hidróxido de potasio	40 g
Agua destilada	para llevar a 100 ml

Prueba de Voges-Proskauer (VP)

1. Transferir 1 ml del cultivo a probar con 48 h de incubación a un tubo de ensaye.
2. Adicionar 0,6 ml de la solución 1 y 0,2 ml de la solución 2.
3. Agitar después de la adición de cada solución.
4. Para intensificar y acelerar la reacción adicionar unos cuantos cristales de creatina y mezclar.
5. Dejar a temperatura ambiente.
6. Leer resultados después de 4 h de adicionar los reactivos.

El desarrollo de una coloración rosa es una prueba positiva.

Reactivos para la coloración de Gram

Cristal violeta

Solución A

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Cristal violeta (colorante 90%)	2 g
Etanol 95%	20 ml

Solución B

Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80 ml

Indicador rojo de metilo (R44)

1. Mezclar la solución A y B. Almacenar por 24 h.
2. Filtrar a través de un papel filtro áspero.

Iodo de Gram

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Iodo	1g
Ioduro de potasio (KI)	2 g
Agua destilada	300 ml

1. Colocar el KI en un mortero.
2. Adicionar el yodo.
3. Triturar con el pistilo por 5 a 10 seg.
4. Adicionar 1 ml de agua y triturar.
5. Adicionar 5 ml de agua y triturar.
6. Adicionar 10 ml de agua y triturar.
7. Vaciar esta solución en una botella de reactivo.
8. Enjuagar el mortero y el pistilo con la cantidad de agua necesaria para completar 300 ml.

Colorante de contraste (solución concentrada)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Safranina O	2,5 g
Etanol al 95%	100 ml

Solución de trabajo: Adicionar 10 ml de la solución concentrada a 90 ml de agua destilada.

Procedimiento para la tinción de Gram

1. Fijar con calor moderado los frotis de la muestra a teñir.
2. Adicionar la solución de cristal violeta al frotis.
3. Dejar actuar por un minuto.
4. Lavar con agua corriente y escurrir.
5. Aplicar la solución de yodo por un minuto.
6. Lavar con agua corriente y escurrir.
7. Decolorar con etanol al 95% hasta que la coloración azul deje de fluir (aproximadamente 30 seg).
8. Inmediatamente después enjuagar con agua corriente.
9. Escurrir.
10. Aplicar el colorante de contraste (safranina) por 30 seg.
11. Enjuagar, escurrir y secar al aire. Examinar al microscopio.

Medio EC-MUG

Preparar el caldo EC y adicionar 50 mg de 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucurónido (MUG) por litro antes de esterilizar (121°C por 15 min). El caldo EC-MUG está comercialmente disponible.

B.6.3.3.3 Procedimiento**B.6.3.3.3.1 Alimentos****B.6.3.3.3.1.1 Prueba presuntiva**

B.6.3.3.3.1.1.1 Preparar la muestra como se indica en el método Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico; y de acuerdo con el tipo de producto, utilizar las diluciones apropiadas, según se indica en el procedimiento de la densidad microbiana por la técnica del número más probable.

Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa y continuar como en el punto (B.6.3.3.3.1.1.2).

B.6.3.3.3.1.2 Prueba confirmativa. Continuar como en el punto (B.6.3.3.3.1.3).

B.6.3.3.3.1.3 Prueba confirmatoria

Confirmar la presencia de *Escherichia coli* en por lo menos el 10% de las pruebas con resultados positivos a coliformes fecales por cultivo en placas de agar McConkey a partir de los tubos que demostraron la presencia de gas en la prueba confirmativa. Incubar las placas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h, observar las colonias típicas fermentadoras de color rojo rodeadas de un halo opaco de precipitación de sales biliares. Seleccionar 1 o más colonias aisladas y pasar a tubos de fermentación con caldo lauril triptosa, continuar como se indica en el punto (B.6.3.3.3.1.1). Hacer tinción de Gram para observación de la morfología de las colonias.

B.6.3.3.3.1.4 Interpretación de resultados

La formación de gas en el tubo de fermentación secundario dentro de las 48 ± 3 h y la demostración de bacilos Gram (-) no esporulados confirma un resultado positivo de la prueba demostrándose la presencia del grupo coliforme.

B.6.3.3.3.1.5 Cálculos

Calcular la densidad microbiana en número más probable conforme con el procedimiento señalado anteriormente, para estimar la población de bacterias coliformes y bacterias coliformes fecales de acuerdo con las diluciones empleadas y expresar en NMP/g o ml para alimentos y NMP/100 ml para agua. En el caso de usar volúmenes de 20 ml de muestras de agua en 5 tubos o 10 ml de muestras de agua en 10 tubos, utilizar las siguientes tablas:

TABLA 1

Indice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 5 tubos con 20 ml de muestra de agua o hielo

No. DE TUBOS Positivos	NMP/100 ml	95% DE LIMITE DE CONFIANZA (APROXIMADO)	
		Inferior	Superior
0	1,1	0	3,0
1	1,1	0,05	6,3
2	2,6	0,3	9,6
3	4,6	0,8	14,7
4	8,0	1,7	26,4
5	8,0	4,0	Infinito

TABLA 2

Indice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 10 tubos con 10 ml de muestra de agua o hielo

No. de Tubos Positivos	NMP/100 ml	95% de Límite de Confianza (aproximado)	
		Inferior	Superior
0	1,1	0,0	3,0
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,3	13,4
5	6,9	2,1	16,8
6	9,2	3,1	21,1
7	12	4,3	27,1
8	16,1	5,9	36,8
9	23,0	8,1	59,5
10	23,0	13,5	Infinito

B.7 METODO DE PRUEBA PARA EL ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS ENVASADOS HERMETICAMENTE Y/O ESTERILIZADOS COMERCIALMENTE

B.7.1 Fundamento

B.7.1.1 Examen microbiológico de latas no alteradas

Este examen tiene por objeto determinar la presencia de microorganismos viables latentes, que resistieron el tratamiento térmico debidamente aplicado y que en determinadas circunstancias pudieran desarrollarse, produciendo alteraciones en el alimento y representando un riesgo para el consumidor.

Los envasados, aun los bien procesados, pueden contener esporas de bacilos termofílicos, las cuales son muy resistentes al calor, pero no se desarrollan en las condiciones normales de almacenamiento y no producen problemas de descomposición del producto ni representan un peligro para el consumidor.

La prueba de esterilidad comercial, puede efectuarse por la observación y análisis del contenido del producto, su apariencia, color, olor, pH y examen microscópico.

Estas observaciones se hacen después de la incubación de las latas y siempre comparándolas con otras no incubadas.

Si es necesario efectuar el cultivo o si el producto después de incubarse presenta cualquier cambio, ya sea en apariencia, olor, color, pH, o bien presencia de gas o espuma, proceder como se indica en (B.7.1 o B.7.2), dependiendo del pH del alimento.

B.7.1.2 Examen microbiológico de latas alteradas

Este análisis tiene por objeto determinar el origen de la alteración, la cual puede ser causada por microorganismos que sobreviven al tratamiento térmico o por la introducción de éstos después del tratamiento, por defectos de las cerraduras o por golpes que lesionen el envase. Conociendo la naturaleza del alimento y su tratamiento, es posible predecir el tipo de organismo responsable de la alteración.

Numerosas investigaciones han demostrado que el tipo de alteraciones guarda relación con el grado de acidez del alimento procesado, por lo que éstos se dividen en dos grandes grupos:

B.7.1.2.1 Alimentos de baja acidez, con $\text{pH} > 4,6$, entre los que se encuentran productos cárnicos, lácteos, marinos, algunos vegetales, guisados, sopas, etcétera.

B.7.1.2.2 Alimentos ácidos, con $\text{pH} \leq 4,6$, entre los que se encuentran tomates, frutas, jugos de cítricos, encurtidos, entre otros.

B.7.2 Reactivos y materiales

A continuación se presentan las fórmulas y los procedimientos para preparar los medios y reactivos empleados en el análisis microbiológico de los productos envasados herméticamente y sometidos a esterilización comercial. En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas equivalentes, se deben seguir las instrucciones del fabricante.

B.7.2.1 Medios de cultivo y soluciones

B.7.2.1.1 Caldo glucosa púrpura de bromocresol (CGPB)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Glucosa	100 g
Extracto de carne	30 g
Peptona (P. Ej. caseína)	50 g
Púrpura de bromocresol	20 ml
(1	6% en etanol)
Agua destilada	1 0000 ml
pH final = $7,0 \pm 0,2$	

Procedimiento: Disolver los ingredientes en el agua, ajustar el pH y envasar en tubos de 22 x 175 mm, en volúmenes de 12 a 15 ml. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min.

7.2.1.2 Caldo de hígado picado o caldo carne cocida (CH o CCC)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Hígado o carne magra de res	500 g
Agua destilada	800 ml
Peptona	10 g
Fosfato dipotásico	1 g
Almidón soluble	1 g
pH final = $7,0 \pm 0,2$	

Procedimiento: Poner el hígado o la carne picada en agua, calentar a ebullición y dejar a fuego lento durante una hora. Enfriar, retirar la capa de grasa, ajustar el pH y hervir otros 10 min. Filtrar a través de gasa o manta de cielo, presionando para quitar el exceso de líquido. Enfriar y agregar al caldo la peptona, el fosfato y el almidón soluble. Ajustar el pH y llevar el volumen del caldo a 1 000 ml con agua destilada. Filtrar a través de papel filtro grueso; en este paso el caldo y la carne pueden guardarse en refrigeración, si el medio no puede terminarse el mismo día. Envasar en tubos de 22 x 175 mm volúmenes de 10 a 12 ml de caldo y depositar suficiente hígado o carne picada para que ocupe una altura de 1,25 cm del fondo del tubo. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min.

B.7.2.1.3 Caldo extracto de malta

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de malta	6 g
Maltosa	1,5 g
Glucosa	6 g
Extracto de levadura	1 g
Agua destilada	1 000 ml

pH final = $4,7 \pm 0,2$

Procedimiento: Disolver los ingredientes con agitación constante. Ajustar el pH a $4,7 \pm 0,2$, envasar en tubos de 22 x 175 mm en volúmenes de 12-15 ml. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min. Exponer al calor el menor tiempo posible.

B.7.2.1.4 Caldo ácido

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Proteosa peptona	5 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico	4 g
Agua destilada	1 000 ml

pH final = $5,0 \pm 0,2$

Procedimiento: Disolver los ingredientes en 1 l de agua y envasar en tubos de 22 x 175 mm en volúmenes de 12 a 15 ml. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min.

B.7.2.1.5 Agar papa dextrosa o dextrosa Sabouraud

B.7.2.1.5.1 Agar papa dextrosa

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Infusión de papa	200 ml
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml

pH final = 3,5

Procedimiento: Lavar, pelar y rebanar papas de tamaño mediano (250 g). Hervir durante 30 min en 290 ml de agua destilada. Filtrar varias veces a través de gasa y algodón. En esta infusión, disolver los demás ingredientes. Añadir agua destilada hasta completar el volumen (1000 ml). Calentar a ebullición, hasta la disolución total de los ingredientes. Ajustar el pH a $5,6 \pm 0,2$. Distribuir en volúmenes de 100 ml y esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Enfriar a $45-48^\circ\text{C}$ y acidificar a pH 3,5 con solución estéril de ácido tartárico al 10% (aproximadamente 1,4 ml de ácido por cada 100 ml de medio). Una vez que se ha agregado el ácido tartárico, no se vuelve a calentar el medio.

B.7.2.1.5.2 Agar dextrosa Sabouraud

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Polipeptona o neopeptona	10 g
Dextrosa	40 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH final = $5,6 \pm 0,2$	

Procedimiento: Calentar hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a $118-121^\circ\text{C}$ por 15 min, no exceder de $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.7.2.1.6 Agar hígado de ternera

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Infusión de hígado	50 g
Infusión de ternera	500 g
Proteosa peptona	20 g
Neopeptona	1,3 g
Triptona	1,3 g
Glucosa	5 g
Almidón soluble	10 g
Caseína isoeléctrica	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Nitrato de sodio	2 g
Grenetina	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH final = $7,3 \pm 0,2$	

Procedimiento: Mezclar los ingredientes con agua destilada y calentar a ebullición hasta su disolución total. Ajustar el pH y esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min.

B.7.2.1.7 Agar nutritivo**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH final = 7,3 ± 0,2

Procedimiento: Suspender los ingredientes en agua destilada y disolverlos por ebullición. Ajustar el pH. Distribuirlo en volúmenes adecuados en matraces o botellas y esterilizar a 121 ± 1°C por 15 min.

B.7.2.1.8 Solución estéril de ácido tartárico al 10%

Disolver 10 g de ácido tartárico y llevar a 100 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C.

B.7.2.1.9 Colorante de azul de metileno

Solución A:

Azul de metileno (pureza no < 90%) 0,3 g

Etanol (95%) 90,0 ml

Solución B:

Solución 0,01% de hidróxido de potasio 100 ml

Mezclar A y B.

B.7.2.1.10 Colorante de cristal violeta

Cristal violeta (pureza no < 90%) 2 g

Etanol (95%) 20,0 ml

Agua destilada 80,0 ml

B.7.2.1.11 Colorante de Gram

Solución A;

Cristal violeta (pureza no < 90%) 2 g

Etanol (95%) 20,0 ml

Solución B:

Oxalato de amonio 0,8 g

Agua destilada 80,0 ml

Mezclar solución A y B, dejar reposar 24 h al abrigo de la luz, filtrar por papel filtro grueso.

B.7.2.1.12 Solución de yodo para Gram

Yodo (cristales) 1 g

Yoduro de potasio 2 g

Agua destilada 300,0 ml

Mezclar el yodo y el yoduro de potasio en un mortero y triturar hasta fino polvo. Agregar 1 ml de agua y mezclar, agregar 5 ml de agua y mezclar, agregar 10 ml de agua y mezclar. Vaciar esta solución a un frasco reactivo, lavar el mortero y el pistilo con suficiente agua hasta completar los 300 ml.

(Continúa en la Quinta Sección)

(Viene de la Cuarta Sección)

B.7.2.2 Materiales

- Mecheros de Bunsen o Fischer.
- Abrelatas sanitarios.
- Pinzas, espátulas y cucharas.
- Charolas.
- Pipetas serológicas de 10 ml con tapón de algodón.
- Pipetas despuntadas o tubos de 8 mm de diámetro con tapón de algodón.
- Propipeta o bulbo para pipeta.
- Tubos de cultivo de 18 x 150 o de 22 x 175 mm.
- Embudos grandes de tallo corto.
- Portaobjetos.
- Cajas de Petri estériles.
- Punzón para latas.
- Asa de platino o nicromel en porta-asas.
- Cepillo para lavar las latas.
- Toallas o gasas estériles.
- Solución de yodo al 4% (en etanol al 70%).
- Sistema de anaerobiosis.
- Varillas de vidrio de 20 cm de longitud y 3 mm de grueso, dobladas en ángulo recto de 5 cm en uno de sus extremos.
- Azul de metileno, cristal violeta o equipo para tinción de Gram.

B.7.3 Aparatos e instrumentos

- Autoclave con termómetro o manómetro.
- Horno para esterilizar a 180°C.
- Incubadoras con termómetro y termostato que evite variaciones > de 0,1°C.
- Potenciómetro de escala expandida.
- Microscopio compuesto.

B.7.4 Preparación de las muestras

B.7.4.1 Llevar un registro en el laboratorio en donde se anoten:

B.7.4.1.1 El número de lote (o señalar si éste no existe o está incompleto)

B.7.4.1.2 Todos los datos importantes para la identificación del producto que aparezcan en la etiqueta; identificar la muestra en forma indeleble, antes de remover la etiqueta. Conservar el envase y la etiqueta.

B.7.4.1.3 Los defectos físicos que se observen en el envase como abolladuras, golpes que lo deformen, oxidación, derrames, defectos aparentes de las cerraduras, abombamiento, etcétera.

Según su apariencia externa clasificarlas como sigue:

B.7.4.2 Latas

B.7.4.2.1 Latas planas o normales.

B.7.4.2.2 Abombamiento ligero (Flipper), Grado I. Únicamente uno de los extremos de la lata se encuentra ligeramente abombado, pero puede comprimirse fácilmente.

B.7.4.2.3 Abombamiento elástico (Springer), Grado II. Uno de los extremos se encuentra abombado; al presionarle el extremo opuesto se abulta.

B.7.4.2.4 Hinchazón (Soft swell), Grado III. Ambos extremos se encuentran abombados, pero pueden comprimirse o ceden ligeramente a la presión.

B.7.4.2.5 Hinchazón (Hard swell), Grado IV. Ambos extremos se encuentran abombados y no pueden comprimirse: la lata puede reventar.

B.7.4.3 Frascos de vidrio

B.7.4.3.1 Tapa normal

B.7.4.3.2 Tapa abombada

B.7.4.4 Incubación de los envases

B.7.4.4.1 Incubación de productos en envases de apariencia normal.

La prueba más confiable para determinar la esterilidad comercial es la incubación del producto a temperaturas apropiadas y por un tiempo suficiente para que cualquier microorganismo que se encuentre pueda desarrollarse bajo las condiciones del producto envasado, dando origen a manifestaciones ya sea en el envase o en el producto. Incubar de 30 a 35°C por 10 a 14 días.

Observar diariamente los envases. La manifestación de crecimiento es la hinchazón en diferentes grados y en los envases de vidrio se pueden observar los cambios en el alimento o la formación de burbujas. En cuanto se detecte hinchazón en el producto o cualquier otra desviación suspender la incubación.

Al final del periodo de incubación, abrir las latas para descubrir descomposición ácida (flat sour), por cambios en el color, olor, consistencia y pH del alimento. Preparar extensiones, teñirlas con azul de metileno o tinción de Gram y observarlas microscópicamente. El hallazgo de cualquier anomalía indica que el producto no está comercialmente estéril y se debe proceder como para los envases alterados.

B.7.4.4.2 Incubación de envases sospechosos o alterados

Analizar de inmediato una o varias unidades de la muestra e incubar el resto de las latas que no presenten alteración evidente o con abombamiento de grado I de 30 a 35°C por 10 a 14 días.

Los envases con abombamiento muy evidente no deben incubarse. Aquellas que se clasifiquen como grado III o IV de no analizarse en el momento, deberán refrigerarse.

B.7.4.5 Apertura de las latas o envases

B.7.4.5.1 Área de trabajo

Se debe trabajar preferentemente en un gabinete de flujo laminar que proporcione un ambiente ultra-limpio, clase 100 (el equipo debe proveer un ambiente libre de partículas de 0,3 micras con una eficiencia del 99,99% en un flujo de 100 pies 3/min). La desinfección de la superficie de trabajo se puede hacer con alcohol o sales cuaternarias de amonio a la concentración recomendada por el fabricante. Posteriormente se debe poner a trabajar el flujo, 30 min antes de efectuar el trabajo.

Para controlar la eficacia del flujo, se deben poner como testigos cajas con medio de cultivo abiertas, a los lados y al centro del área de trabajo, durante todo el tiempo que dure la operación.

Si no se tiene el equipo necesario, se puede utilizar un cuarto o cubículo perfectamente limpio, lavado con agua y jabón, desinfectándolo con un agente bactericida apropiado. En este caso se trabajará entre dos mecheros Bunsen.

B.7.4.5.2 Personal

El personal debe trabajar con bata limpia. Si tiene el pelo largo, debe usar turbante. El uso de mascarillas quirúrgicas es opcional. El personal enfermo con gripe o cualquier otro problema infeccioso no debe intervenir en el análisis.

B.7.4.6 Preparación de latas o envases normales

Lavar el envase con un cepillo, usando agua caliente y jabón; enjuagar y dejar secar.

Remojar con un sanitizante durante 10 a 15 min, la tapa contraria a donde está grabado el lote. Escurrir el líquido y secar con la flama de un mechero.

Destapar con un abridor de latas sanitario estéril.

En las latas de cierre de anillo o dispositivos abre fácil, abrir por la cara opuesta.

B.7.4.6.1 Frascos de vidrio

Lavar la tapa del frasco y sumergirlo durante 15 min en una solución sanitizante, de manera que quede cubierta la tapa; esta solución puede ser cloro 100 mg/kg. Colocar un algodón estéril en torno a la tapa y con un punzón estéril hacer un orificio en el centro, a fin de que se pierda el vacío y pueda abrirse con facilidad. Abrir el frasco sin contaminar los bordes del mismo.

B.7.4.7 Preparación de latas o envases alterados

Lavar el envase con un cepillo, con agua caliente y jabón; enjuagar y secar. Si la lata está muy inflada, mantener en el refrigerador antes de abrirla. Limpiar y sanitizar la tapa con una solución de cloro 100 mg/kg o yodo al 2% en alcohol al 70%; limpiar con una gasa estéril.

En latas muy infladas de pH muy ácido, es necesario hacer una prueba para hidrógeno, con objeto de conocer si el gas se debe a la acción del ácido sobre el metal.

Para ello, practicar una pequeña puntura en el centro de la tapa y recibir el gas en un tubo de ensayo invertido; inmediatamente ponerlo sobre la flama. Una pequeña explosión indica la presencia de hidrógeno. No debe flamearse directamente el orificio de la lata.

Para abrir latas infladas, colocar un embudo invertido con un algodón estéril sobre la tapa y picar con un picahielo estéril, hasta desalojar el gas antes de abrir la lata.

B.7.5 Procedimiento

Abrir la lata entre dos mecheros Bunsen o en el gabinete de flujo laminar vertical. Tomar porciones tanto del contenido sólido como del líquido; si es posible, homogeneizar. Utilizando utensilios adecuados a la naturaleza del producto (espátulas, pinzas, tubos de vidrio, pipetas, etcétera) transferir aproximadamente 2 g o 2 ml del producto a los tubos con el medio que se va a utilizar, dependiendo del pH del alimento.

Conservar una muestra en un frasco estéril, para cualquier aclaración o para efectuar pruebas biológicas. Hacer una extensión en un portaobjetos del contenido de la lata, ya que muchas veces los gérmenes causantes del deterioro mueren durante el almacenamiento y sólo el examen microscópico puede dar una idea de los microorganismos involucrados en la descomposición. Preparar las extensiones mediante un asa de platino. Si el alimento es sólido o muy espeso, agregar una pequeña cantidad de agua estéril. Si es muy grasoso, depositar sobre la extensión una pequeña cantidad de xilol con posterioridad a su fijación por calor.

Una vez tomada la muestra, anotar el estado del alimento: su olor, cambios en su color, consistencia, etcétera. No debe probarse. Determinar el pH y vaciar el contenido de la lata. Observar su interior, anotando el estado del barniz, la presencia de manchas, defectos del frasco o de la tapa, etcétera.

B.7.5.1 Examen de alimentos envasados de baja acidez (pH > 4,6)

Inocular aproximadamente 2 g o 2 ml, en cada uno de 4 tubos con caldo hígado, previamente calentado a 100°C para expulsar el oxígeno disuelto, y enfriar rápidamente.

Inocular asimismo, 4 tubos de caldo púrpura de bromocresol.

Incubar según el siguiente esquema:

MEDIO DE CULTIVO	TUBOS	TEMPERATURA	TIEMPO	INVESTIGACION
Caldo hígado o CCC	2	35°C	96 h/120 h	Mesofílicos anaerobios
Caldo hígado o CCC	2	55°C	24 h/72 h	Termofílicos anaerobios
Caldo púrpura de bromocresol	2	35°C	96 h/120 h	Mesofílicos aerobios
Caldo púrpura de bromocresol	2	55°C	24 h/48 h	Termofílicos aerobios

Transferir los alimentos líquidos por medio de una pipeta, utilizando un bulbo o propipeta. ¡Precaución! Tener cuidado al manipular el producto, incluso cuando provenga de envases aparentemente normales. ¡La Toxina botulínica puede estar presente! Observar los tubos diariamente, hasta el término del tiempo de incubación si no hay crecimiento en todos los tubos, descartar e informar como NEGATIVO.

Cuadro 1

**DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE CULTIVO PARA ALIMENTOS ENLATADOS DE
BAJA ACIDEZ (> 4,6)**

CULTIVO ORIGINAL	TEMPERATURA	SUBCULTIVO		CULTIVO PURO	IDENTIFICACIÓN
CH o CCC y CGPB	35°C 96/120 h	AN o AHT Aeróbico AN o AHT Anaeróbico	Crecimiento Crecimiento	Frotis CH o CCC Frotis CH o CCC	Tinción de Gram Anaeróbico AN o AHT Tinción de Gram Aeróbico AN o AHT
CH o CCC y CGPB	55°C 24/72 h	AN o AHT Aeróbico AN o AHT Anaeróbico	Crecimiento Crecimiento	Frotis CH o CCC Frotis CH o CCC	Tinción de Gram Anaeróbico Tinción de Gram Aeróbico AN o AHT

CH = Caldo Hígado de Ternera AN = Agar Nutritivo

CCC = Caldo Carne Cocida AHT = Agar Hígado de Ternera

CGPB = Caldo Púrpura de Bromocresol

DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE CULTIVO PARA ALIMENTOS ENLATADOS ACIDOS (> 4,6)

CULTIVO ORIGINAL	TEMPERATURA	SUBCULTIVO		CULTIVO PURO	IDENTIFICACION
CA,CEM	30°C 96/120 h	AN, ADS o ADP Aeróbico AN, ADS o ADP Anaeróbico	Crecimiento Crecimiento	Frotis CA, CEM Frotis CA, CEM	Tinción de Gram Anaeróbico AN, ADS o ADP Tinción de Gram Aeróbico AN, ADS o ADP
CA	55°C 24/72 h	AN Aeróbico AN Anaeróbico	Crecimiento Crecimiento	Frotis CA Frotis CA	Tinción de Gram Anaeróbico AN Tinción de Gram Aeróbico AN

CA = Caldo Acido AN = Agar Nutritivo

CEM = Caldo Extracto de Malta ADS = Agar Dextrosa Sabouraud

ADP = Agar Papa Dextrosa

Si hay crecimiento, hacer frotis y teñir-resembrar a placas de agar hígado de ternera (sin yema de huevo) o agar nutritivo. Incubar a 35°C y 55°C una placa en aerobiosis y anaeróbico (ver cuadro 1) continuar la incubación a 35°C de caldo de hígado (CH) o caldo carne cocida (CCC) hasta un máximo de 5 días y guardar para determinación de toxina (cuando proceda).

Observar los agares y seleccionar un número representativo de los diferentes tipos de colonias y resembrar a CH y CCC a la temperatura y las condiciones según se especifica en el cuadro 1 (a 35°C por 96 a 120 h y 55°C por 24 a 72 h).

Expulsar el oxígeno inmediatamente antes de utilizar el CH que se va a incubar en anaerobiosis. Mantener viables los cultivos puros aislados. Hacer tinción de Gram.

B.7.5.1.1 Cuando se presente crecimiento microbiano durante las pruebas para esterilidad comercial en un enlatado y no haya evidencia de descomposición del alimento, efectuar la confirmación de la siguiente forma:

B.7.5.1.1.1 Obtener cultivos puros de la cepa o cepas encontradas.

B.7.5.1.1.2 Seleccionar otro envase del mismo producto y el mismo lote que el anterior.

B.7.5.1.1.3 En condiciones asépticas, practicar una pequeña perforación en el extremo de la lata o cerca del cierre.

B.7.5.1.1.4 Inocular el producto con la cepa por abajo de la superficie.

B.7.5.1.1.5 Flamear el orificio para crear vacío y sellar asépticamente con soldadura o un material similar.

B.7.5.1.1.6 Después de inocular, incubar a 30 a 35°C durante 10 días.

B.7.5.1.1.7 Abrir el enlatado y examinar el producto.

El aspecto del producto debe ser igual al que se observó en el envase de donde se obtuvo el cultivo. Si en el primer enlatado el producto fue de apariencia normal, pero se obtuvo crecimiento y en el segundo, inoculado con la flora microbiana aislada del primero, se encuentra el producto alterado (gas, consistencia diferente, olor, etcétera), debe considerarse que el primer enlatado era comercialmente estéril y que el crecimiento fue el resultado de un procedimiento deficiente por el laboratorio. Si se encuentra flora mixta únicamente en el CGPB, hacer informe de los tipos morfológicos. Si hay flora mixta en CH/CCC entre la cual se incluyan bacilos, hacer prueba toxina. Si se observan únicamente bacilos Gram positivo o Gram variable típicos del género *Bacillus* o *Clostridium* investigar presencia de esporas. En algunos casos las células vegetativas envejecidas pueden dar la apariencia de Gram negativo y debe considerarse como si fuera Gram positivo. Determinar la presencia de toxina. Esta prueba la podrá realizar un laboratorio oficialmente acreditado por las autoridades correspondientes.

B.7.5.2 Examen microbiológico de alimentos envasados de acidez alta ($\text{pH} \leq 4,6$)

Inocular 2 g o 2 ml de alimento en 4 tubos de caldo ácido y 2 tubos de caldo extracto de malta.

Incubar según el esquema:

MEDIO DE CULTIVO	TUBOS	TEMPERATURA	TIEMPO	INVESTIGACION
Caldo ácido	2	30°C	96 h	Lactobacilos, hongos y levaduras
Caldo ácido	2	55°C	48 h	Termofílicos de descomposición ácida
Caldo extracto de malta	2	30°C	96 h	Lactobacilos, hongos y levaduras

B.7.6 Expresión de resultados

B.7.6.1 Envases normales

Conviene extremar los cuidados al efectuar los ensayos, seleccionar las muestras e interpretar los resultados de las pruebas para demostrar la esterilidad comercial, ya que cualquier error basado en fallas de manipulación o interpretación, puede originar la destrucción de un lote comercialmente estéril, como contaminado. Al incubar el enlatado o al recibirse la lata, la presencia de hinchazón, principalmente cuando es muy acentuada, indica contaminación microbiana. Estas condiciones deben ser confirmadas demostrando la presencia de un gran número de microorganismos en las extensiones preparadas directamente a partir del alimento, descubriendo cambios en el aspecto del producto (consistencia, olor, coloración anormal) o variaciones en el pH, en comparación siempre con un producto normal. Los cultivos se practican por duplicado, cuando hay contaminación, en ambos tubos se debe hallar una flora similar a la encontrada en las extensiones de la muestra original. Encontrar sólo uno de los tubos de cultivo positivo y otro negativo, puede indicar una contaminación por manipulación en el laboratorio, a menos que se compruebe que existe el mismo tipo de flora que en la extensión de la muestra original.

A veces existe alguna dificultad en diferenciar partículas del alimento de microorganismos. Otras veces las levaduras o lactobacilos participan en la producción del alimento, como sucede en algunos productos obtenidos por fermentación. En estos casos, aunque ya no sean viables, los microorganismos pueden aparecer en la extensión, y sólo la experiencia y el conocimiento de los procesos permiten interpretar correctamente los resultados.

B.7.6.2 Envases alterados, con pH > 4,6.

B.7.6.2.1 Presencia de mesofílicos aerobios

La flora presente en este caso, puede estar constituida por bacilos o ser mixta.

B.7.6.2.1.1 Presencia de bacilos esporulados

Generalmente consiste en esporas termorresistentes de diferentes especies de bacilos. Regularmente el alimento no presenta alteraciones, ya que las esporas no pueden desarrollarse en condiciones de anaerobiosis; sin embargo, se han encontrado alteraciones producidas por bacilos con esporas resistentes (*Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*), en alimentos de acidez media, con tratamiento térmico adecuado, pero con vacío incompleto. También se ha encontrado *Bacillus β nigrificans*, en conservas de betabeles con ennegrecimiento del producto.

B.7.6.2.1.2 Presencia de flora mixta

La presencia de flora mixta se debe generalmente a la penetración de gérmenes, con posterioridad al proceso térmico, actuando como vehículo el agua de enfriamiento. La flora que se observa puede ser muy variada.

La penetración de los gérmenes se debe a defectos en las cerraduras, que permiten el paso de los microorganismos. Las latas generalmente se encuentran infladas y pueden mostrar defectos o derrames.

El pH y el aspecto del producto varían.

B.7.6.2.2 Presencia de mesofílicos anaerobios

Consiste de anaerobios del género *Clostridium*, entre los que se encuentran *B. sporogenes*, *B. putrificans*, *C. histolyticum*, *C. bifermentans*, *C. perfringens* y *C. botulinum*; este último es el de mayor importancia sanitaria, por producir una toxina muy potente. Las latas pueden estar parcialmente infladas y el producto parcialmente digerido; el olor es pútrido. El pH aumenta. En este caso, es necesario practicar la prueba en animales, tanto del producto como del filtrado del cultivo, para investigar la presencia de la toxina. Esta prueba la podrá realizar un laboratorio oficialmente acreditado por las autoridades correspondientes.

B.7.6.2.3 Presencia de termofílicos aerobios

Consta de bacilos termofílicos estrictos o facultativos, que poseen esporas muy resistentes al calor (especie tipo *B. stearothermophilus*, causante de la descomposición ácida flat sour). Las latas son planas, sin alteración y con marcado aumento de la acidez del producto; puede haber olor anormal o enturbiamiento del líquido.

B.7.6.2.4 Termofílicos anaerobios

Pertenecen también al género *Clostridium*, con esporas muy resistentes al calor.

La especie tipo *C. thermosaccharolyticum*, es un anaerobio estricto no productor de sulfhídrico; las latas se encuentran infladas.

Otro tipo de descomposición poco común, puede ser causada por *C. nigrificans*, que produce sulfhídrico con ennegrecimiento del producto.

B.7.6.3 Interpretación de resultados en alimentos de acidez alta

B.7.6.3.1 Presencia de mesofílicos aerobios

B.7.6.3.1.1 Presencia de *Lactobacillus*. La descomposición por bacterias acidúricas no formadoras de esporas, puede deberse a varias especies del género *Lactobacillus*. Se han aislado *L. lycoperici*, *L. pentoaceticus*, *L. menitipolum* y *L. pleofructi*.

B.7.6.3.1.2 Presencia de levaduras. El hallazgo de levaduras indica falta de procesamiento. Las latas contaminadas generalmente se presentan muy hinchadas y el olor del producto es característico de levadura (olor ácido). Entre las levaduras se han aislado esporas del género *Torula*.

B.7.6.3.1.3 Presencia de hongos. Otro tipo de descomposición puede ser causada por hongos como *Byssoschlamys fulva*, que forma esporas muy resistentes al calor. Se han encontrado también algunas cepas de *Penicillium*; en estos casos generalmente las latas se encuentran planas, sin alteración y el hongo crece en la superficie del producto.

B.7.6.3.2 Mesófilicos anaerobios

Clostridium pasteurianum causa una descomposición poco frecuente, en que las latas se encuentran infladas y con olor butírico. Si se sospecha este tipo de contaminación, sembrar un tubo con medio o caldo ácido en anaerobiosis a 35°C.

B.7.6.3.3 Termófilicos aerobios

La descomposición por termófilicos aerobios produce el tipo flat-sour, o sea la descomposición ácida. Las latas se encuentran planas y se observan cambios en el vacío; entre los gérmenes causantes está *B. coagulans*, que es el responsable de la descomposición de productos derivados del jitomate y de la producción de grumos de leche evaporada.

B.7.6.3.4 Termófilicos anaerobios

La descomposición por termófilicos anaerobios es poco frecuente en productos ácidos. La producen anaerobios butíricos.

En productos de acidez muy alta, con pH inferior a 3,7, como col agria, encurtidos, etcétera, la descomposición puede deberse a las bacterias ya señaladas, pero generalmente la acidez inhibe el desarrollo de gérmenes. En muchos casos, la hinchazón de la lata se debe a causas químicas, por formación de hidrógeno.

B.7.6.4 Observaciones generales

Algunas veces se pueden encontrar cultivos negativos, procedentes de latas anormales, o de latas normales con productos descompuestos. Esto puede deberse a que la alteración ocurrió antes del procesamiento térmico del enlatado y han muerto los microorganismos que la originaron, o bien a que en un producto contaminado, los gérmenes murieron al agotarse el oxígeno o los nutrientes.

En estos casos, un examen microscópico del producto puede ayudar al diagnóstico.

METODOS FISICOQUIMICOS

B.8 DETERMINACION DE CADMIO, ARSENICO, PLOMO, ESTAÑO, COBRE, FIERRO, ZINC Y MERCURIO EN ALIMENTOS, AGUA POTABLE Y AGUA PURIFICADA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

B.8.1 Fundamento

El método de absorción atómica se basa en hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia tal que puede ser absorbido por el analito que se encuentra presente en forma de vapor atómico. La medida de la intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico permite determinar el porcentaje de absorción. La cantidad de absorción aumenta con la concentración de los átomos en el medio absorbente, es decir, la medida de la absorción aumenta con la concentración del elemento en la muestra, ya sea que esté en su condición original o sujeta a pretratamiento.

B.8.2 Reactivos y materiales

B.8.2.1 Reactivos

- Soluciones estándares de referencia certificadas de cada uno de los metales.
- Agua, debe ser destilada deionizada, con un grado máximo de conductividad de 1 µmho/cm a 25°C.
- Acido nítrico (densidad específica 1,41), grado suprapuro.
- Acido nítrico (densidad específica 1,41), contenido de mercurio muy bajo.
- Acido perclórico (densidad específica 1,67), grado suprapuro.
- Acido clorhídrico (densidad específica 1,19), grado suprapuro.
- Acido sulfúrico (densidad específica 1,84), grado suprapuro.
- Acido sulfúrico 1 N a partir de la solución grado suprapuro.
- Acido nítrico 65% v/v grado RA.

- Peróxido de hidrógeno (densidad específica 1,12).
- Hidróxido de sodio granalla reactivo RA.
- Aire comprimido seco y limpio.
- Gases: acetileno, óxido nitroso, argón y nitrógeno, grado absorción atómica.
- Solución de nitrato de magnesio hexahidratado al 7% p/v. Disolver 70 g de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ en 1000 ml de HCl 1 N.
- Acido clorhídrico 1 N. Diluir 8,3 ml de HCl y llevar a 100 ml de agua.
- Acido nítrico al 50% v/v. Diluir 50 ml de HNO_3 al 65% v/v grado suprapuro en 50 ml de agua.
- Acido clorhídrico 8 M. Diluir 66,0 ml de HCl y llevar a 100 ml con agua.
- Acido clorhídrico 0,5 N. Diluir 4,15 ml de HCl y llevar a 100 ml con agua.
- Solución de yoduro de potasio al 15% p/v. Disolver 15 g de KI en 100 ml de agua (esta solución debe prepararse en el momento de usarse).
- Solución de yoduro de potasio al 20% p/v. Disolver 20 g de KI en 100 ml de agua (esta solución debe prepararse en el momento de usarse).
- Solución de cloruro de potasio (10 mg/ml de K). Disolver 1,91 g de KCl en agua y diluir a 100 ml con agua.
- Solución de nitrato de magnesio al 50% p/v. Disolver 50 g de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ en 100 ml de agua.
- Solución de ácido clorhídrico al 1,5% p/v. Diluir 1,5 ml de HCl en 100 ml de agua destilada deionizada.
- Solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 1 g de hidróxido de sodio y diluir a 100 ml con agua destilada deionizada.
- Solución de borohidruro de sodio al 4% p/v en solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 4 g de borohidruro de sodio en 100 ml de una solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Filtrar al vacío.
- Solución reductora para mercurio. Mezclar 50 ml de ácido sulfúrico concentrado con aproximadamente 300 ml de agua. Enfriar a temperatura ambiente y disolver 15 g de cloruro de sodio, 15 g de sulfato o cloruro de hidroxilamina y 25 g de cloruro o sulfato estano en solución. Diluir a 500 ml.
- Solución de dilución para mercurio. En un matraz de 1 l, conteniendo de 300 a 500 ml de agua destilada deionizada, agregar 58 ml de ácido nítrico concentrado de muy baja concentración de mercurio y 67 ml de ácido sulfúrico concentrado. Diluir al volumen con agua.
- Solución de trabajo de As de 1 $\mu g/ml$. Diluir 1 ml de la solución patrón de 1000 $\mu g/ml$ a 1 l con ácido sulfúrico 1 N preparada a partir de la solución grado suprapuro. Preparar fresca cada día.

B.8.2.2 Materiales

- Matraces Kjeldahl de 500 ml y 800 ml.
- Sistema de reflujo con refrigerante.
- Crisoles Vycor de 40 a 50 ml de capacidad.
- Crisoles de platino de 40 a 50 ml de capacidad.
- Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades.
- Matraces volumétricos de diferentes capacidades.
- Matraces redondos de fondo plano de 50 ml.
- Bombas Parr.
- Micropipetas o pipetas de Eppendorf de diferentes capacidades.
- Puntas de plástico para micropipetas.
- Papel filtro Whatman No. 2.
- Perlas de ebullición.

- Varillas de plástico.
- Tubos de ensayo graduados de propilen o propileno de 15 ml.
- Recipientes de propilen o propileno.
- Embudos de filtración de diferentes capacidades.
- Material común de laboratorio.

Todo el material utilizado debe someterse a lavado de acuerdo con las siguientes instrucciones:

- El jabón que se use debe ser de preferencia neutro.
- Enjuagar perfectamente con agua corriente.
- Sumergir el material de vidrio o plástico en un recipiente (de preferencia plástico) que contenga una solución de ácido nítrico grado RA al 30%.
- Dejarlo tapado y reposando por un lapso de 24 h.
- Quitar el exceso de ácido nítrico con varios enjuagues (5 o 6 veces) con agua deionizada.
- Dejar escurrir y secar.
- Guardar en cuanto esté seco para evitar contaminación por partículas en el aire.

B.8.3 Aparatos e instrumentos

B.8.3.1 Aparatos

- Lámparas de cátodo hueco o de descarga sin electrodos para determinar arsénico, cadmio, cobre, estaño, fierro, mercurio, plomo y zinc.
- Fuente de radiofrecuencia en caso de usar lámparas de descarga.
- Automuestreador y recirculador de agua.
- Placa de calentamiento con regulador que alcance una temperatura de 400 a 450°C.
- Horno de microondas.
- Autoclave que alcance $121 \pm 5^\circ\text{C}$ o 15 lb de presión.
- Centrífuga de laboratorio capaz de mantener 1600 rpm.

B.8.3.2 Instrumentos

Los instrumentos que a continuación se indican deben estar calibrados y ajustados antes de su operación.

- Espectrómetro de absorción atómica equipado con los accesorios para flama, horno de grafito, generador de hidruros o vapor frío, dependiendo del método a seguir.
- Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.
- Mufla capaz de mantener una temperatura de $550 \pm 10^\circ\text{C}$.
- Horno de calentamiento (estufa) con intervalo de temperatura de $120 \pm 5^\circ\text{C}$.

B.8.4 Preparación de la muestra

B.8.4.1 Digestión para la determinación de Cadmio, Cobre, Hierro, Plomo y Zinc.

B.8.4.1.1 Digestión por vía húmeda.

B.8.4.1.1.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, una cantidad apropiada de muestra.

Para la determinación por el método de absorción por flama pesar como máximo 40 g de jugo o bebida, 20 g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos o semisólidos. Limite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5 g.

B.8.4.1.1.2 Añadir 10 ml de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión.

B.8.4.1.1.3 Usar matraz de Kjeldhal o matraz conectado al sistema de refrigerantes.

B.8.4.1.1.4 Calentar suavemente.

B.8.4.1.1.5 Digerir la muestra 3 h o más tiempo si es necesario (algunas muestras requieren la adición de mayor cantidad de ácido nítrico) hasta la aparición del color traslúcido, si queda ámbar, adicionar peróxido de hidrógeno gota a gota con agitación continua (reacción exotérmica).

B.8.4.1.1.6 Enfriar.

B.8.4.1.1.7 Recuperar, filtrar y llevar a un volumen conocido en matraz volumétrico.

B.8.4.1.1.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.8.4.1.1.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica por flama u horno de grafito).

B.8.4.1.2 Digestión por vía seca.

B.8.4.1.2.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, una cantidad apropiada de muestra.

Para la determinación por el método de absorción por flama pesar como máximo 40 g de jugo o bebida, 20 g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos y semisólidos. Limite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5 g.

B.8.4.1.2.2 Añadir 10 ml de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión. En productos con alta concentración de proteínas adicionar una solución de nitrato de magnesio al 7,0% p/v y mezclar completamente, llevar a sequedad aproximadamente durante 6 h en estufa a una temperatura de 90 a 95°C.

B.8.4.1.2.3 Colocar la muestra en una mufla y elevar la temperatura lentamente de 2 a 4°C por minuto hasta 350°C. Mantener la temperatura hasta que cesen los humos.

B.8.4.1.2.4 Elevar gradualmente la temperatura de 500 a 550°C para evitar que la muestra se incinere y mantener esa temperatura durante 16 h o toda la noche.

B.8.4.1.2.5 Apagar la mufla y dejar enfriar.

B.8.4.1.2.6 Un segundo paso de calcinación puede ser requerido para remover algunos residuos de carbón, mediante el siguiente procedimiento:

Lavar las paredes del crisol con 2 ml de ácido nítrico al 50%. Colocar la muestra en una placa de calentamiento puesta a 120°C para remover el exceso de ácido. Colocar la muestra en una mufla fría y elevar la temperatura gradualmente de 500 a 550°C, manteniéndola por el tiempo necesario. Repetir este procedimiento cuantas veces sea necesario hasta que quede libre de carbón remanente.

B.8.4.1.2.7 Disolver las cenizas completamente en 5 ml de ácido clorhídrico 1 N, transferir la muestra disuelta a un tubo de propileno o a un matraz de volumen conocido, enjuagar el crisol con dos alícuotas de 5 ml de ácido clorhídrico 1 N y transferir al mismo tubo o matraz para obtener un volumen de 15 ml en el primero y llevar al aforo en el segundo, tapar y mezclar, si existe presencia de partículas o materia insoluble, filtrar en papel Whatman No. 2, antes de la determinación.

B.8.4.1.2.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.8.4.1.2.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

B.8.4.2 Digestión por vía húmeda para la determinación de Estaño.

B.8.4.2.1 Proceder igual que en el punto (B.8.4.1.1.1).

B.8.4.2.2 No adicionar ácido nítrico si no se lleva a cabo la digestión total en el mismo día.

B.8.4.2.3 Adicionar 30 ml de ácido nítrico concentrado al matraz y calentar suavemente por 15 min en campana para iniciar la digestión, evitando una excesiva producción de espuma.

B.8.4.2.4 Hervir suavemente hasta tener un remanente de 3 a 6 ml o hasta que la muestra empiece a secarse en el fondo. No dejar que la muestra se calcine.

B.8.4.2.5 Retirar la muestra del calor.

B.8.4.2.6 Al mismo tiempo correr dos blancos de reactivos.

B.8.4.2.7 Adicionar 25 ml de ácido clorhídrico concentrado, calentar suavemente durante aproximadamente 15 min, hasta que todo el cloro sea liberado. Aumentar la temperatura gradualmente hasta ebullición.

B.8.4.2.8 Evaporar hasta obtener de 10 a 15 ml, usando un matraz similar con 15 ml de agua como patrón de volumen.

B.8.4.2.9 Adicionar aproximadamente 40 ml de agua.

B.8.4.2.10 Agitar y pasar a un matraz de 100 ml y enjuagar con 10 ml de agua.

B.8.4.2.11 Cuando el ácido clorhídrico está presente en la digestión, las muestras se pueden quedar toda la noche o por más tiempo.

B.8.4.2.12 Agregar 1 ml de solución de cloruro de potasio en cada matraz.

B.8.4.2.13 Enfriar a temperatura ambiente.

B.8.4.2.14 Diluir con agua y agregar más agua para compensar el volumen de grasa en el matraz.

B.8.4.2.15 Mezclar perfectamente y filtrar de 30 a 50 ml a través de un papel filtro Whatman No. 2 y recoger el filtrado en un recipiente de propileno, polipropileno o polietileno.

B.8.4.2.16 No filtrar los blancos. Tapar las botellas durante el análisis. Las soluciones son estables por varios meses.

B.8.4.2.17 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.8.4.2.18 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

B.8.4.3 Digestión por vía húmeda para la determinación de Hg.

B.8.4.3.1 Sistema de reflujo.

B.8.4.3.1.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en un matraz de digestión y adicionar perlas de ebullición.

B.8.4.3.1.2 Conectar el matraz al sistema de reflujo y agregar poco a poco la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado y calentar durante media hora o hasta que no se observen cambios en la digestión.

B.8.4.3.1.3 Dejar enfriar y agregar una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados (1 + 1).

B.8.4.3.1.4 Calentar y agregar más ácido nítrico gota a gota sobre las paredes del recipiente, hasta que el color oscuro de la solución desaparezca.

B.8.4.3.1.5 Enfriar.

B.8.4.3.1.6 Si existe grasa o cera filtrar la solución.

B.8.4.3.1.7 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.8.4.3.1.8 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).

B.8.4.3.2 Sistema cerrado.

B.8.4.3.2.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en el recipiente de digestión.

B.8.4.3.2.2 Agregar la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado.

B.8.4.3.2.3 Tapar y sellar perfectamente el recipiente de digestión.

B.8.4.3.2.4 Si el recipiente de digestión es un matraz Erlenmeyer, colocar éste en una autoclave a 15 lb por 30 min. Si se utiliza bomba Parr, calentar en parrilla controlando la temperatura a un máximo de 300°C por 30 min.

B.8.4.3.2.5 Enfriar a temperatura ambiente.

B.8.4.3.2.6 En caso de que la digestión no sea completa adicionar peróxido de hidrógeno y repetir la digestión.

B.8.4.3.2.7 Filtrar en caso de que exista grasa o cera y analizar el contenido de Hg.

B.8.4.3.2.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.8.4.3.2.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).

B.8.4.4 Digestión para la determinación de As.

B.8.4.4.1 Digestión por vía húmeda-seca.

B.8.4.4.1.1 Proceder como en el punto (B.8.4.3.2) hasta que la digestión sea completa y posteriormente continuar con los siguientes pasos.

B.8.4.4.1.2 Con una pipeta tomar una alícuota de la solución de muestra digerida y colocarla en un crisol Vycor o vaso de precipitados.

B.8.4.4.1.3 Añadir 1 ml de solución de nitrato de magnesio al 7% p/v y calentar en una parrilla a temperatura baja, hasta sequedad.

B.8.4.4.1.4 Incrementar el calor de la placa a un máximo de 375°C.

B.8.4.4.1.5 Colocar el matraz en la mufla a 450°C para oxidar cualquier residuo de carbón y descomponer el exceso de nitrato de magnesio, por un tiempo mayor o igual a 30 min.

B.8.4.4.1.6 Enfriar y disolver el residuo en 2 ml de ácido clorhídrico 8 M.

B.8.4.4.1.7 Añadir 0,1 ml de yoduro de potasio al 20% p/v para reducir el As(V) a As(III).

B.8.4.4.1.8 Dejar reposar por un tiempo mayor a 2 min y transferir a un matraz y llevar al aforo con agua.

B.8.4.4.1.9 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.8.4.4.1.10 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

B.8.4.4.2 Digestión por vía seca.

B.8.4.4.2.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, la cantidad necesaria de muestra en un crisol Vycor o de platino.

B.8.4.4.2.2 Añadir el volumen necesario de nitrato de magnesio al 50% p/v.

B.8.4.4.2.3 Homogeneizar con una varilla limpia de plástico extendiendo la mezcla en el crisol.

B.8.4.4.2.4 Colocar la muestra en una mufla subiendo gradualmente la temperatura hasta 300°C por 2 h. Posteriormente subir gradualmente la temperatura hasta 500°C por 16 h o durante toda la noche.

B.8.4.4.2.5 Enfriar a temperatura ambiente y humedecer las cenizas con ácido nítrico al 50% v/v.

B.8.4.4.2.6 Calentar en parrilla hasta la eliminación del ácido.

B.8.4.4.2.7 Llevar los crisoles a una mufla elevando gradualmente la temperatura de 23 a 500°C, manteniendo ésta 30 min hasta evaporación total.

B.8.4.4.2.8 Transferir las cenizas del crisol a un matraz aforado usando una porción de 10 ml de ácido clorhídrico 0,5 N.

B.8.4.4.2.9 Enjuagar los crisoles con 5 ml de agua destilada y transferir al matraz, añadir 1 ml de solución de yoduro de potasio al 15% y mezclar.

B.8.4.4.2.10 Dejar reposar durante 15 min y llevar al aforo.

B.8.4.4.2.11 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.8.4.4.2.12 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

B.8.4.5 Digestión para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, hierro, zinc y plata por horno de microondas.

Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, 0,5 g como máximo de muestra, añadir 6 ml de ácido nítrico concentrado y 2 ml de agua oxigenada al 30%, cerrar perfectamente el envase de reacción y proceder según el manual del fabricante.

B.8.5 Procedimiento

B.8.5.1 Espectrometría de absorción atómica por flama.

B.8.5.1.1 Calibración. Es necesario comprobar que se tiene una calibración inicial y periódica aceptable.

B.8.5.1.1.1 Se inicia la configuración operacional del instrumento y en el sistema de adquisición de datos. Permitir un periodo no menor a 30 min para el calentamiento de las lámparas de descarga sin electrodos.

B.8.5.1.1.2 Se debe verificar la estabilidad del instrumento mediante el análisis de una solución estándar 20 veces más concentrada que el límite de detección del instrumento (LDI) para el analito, leída un mínimo de cinco veces y calculando la desviación estándar resultante, la cual debe ser menor al 5%.

B.8.5.1.1.3 El instrumento debe calibrarse para el analito a determinar usando el blanco de calibración y los estándares de calibración preparados a 3 o 4 niveles de concentración dentro del intervalo dinámico de concentración del analito.

B.8.5.1.1.4 Ajustar el instrumento a 0 con el blanco de calibración. Introducir los estándares de calibración del analito de menor a mayor concentración y registrar al menos tres réplicas de la absorbancia de cada uno.

B.8.5.1.1.5 Elaborar una curva de calibración graficando absorbancia en función de la concentración.

Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

B.8.5.1.2 Operación del instrumento.

El desempeño del instrumento se verifica mediante el empleo de blancos de calibración, estándares de calibración y una muestra de control de calidad (MCC).

B.8.5.1.2.1 Después de que se ha realizado la calibración, se debe verificar que el instrumento trabaje adecuadamente para el analito. Para ello se analiza una muestra de control de calidad. Si las mediciones varían en $\pm 10\%$ o más, al valor establecido para la MCC, el análisis debe interrumpirse y buscar la posible causa de error, el instrumento se debe recalibrar y verificar la nueva calibración.

B.8.5.1.2.2 Para verificar que el instrumento no presenta variación, por cada 10 análisis se debe analizar el blanco de calibración y un punto intermedio de la curva de calibración. Si el valor verdadero del analito difiere $\pm 10\%$ o más, el instrumento debe recalibrarse. Si el error persiste debe identificarse el problema y corregirse.

Si la matriz de la muestra es responsable de la variación o afecta la respuesta del analito puede ser necesario trabajar por adiciones estándar.

B.8.5.1.2.3 La demostración de la operatividad inicial del instrumento se hace estableciendo los límites de detección del método (LDM) para el analito y el intervalo de calibración lineal. Para determinar el LDM se usa un blanco de reactivos fortificado con una concentración del analito equivalente de 2 a 5 veces el límite de detección estimado. Se hacen al menos 4 réplicas de lectura de absorbancia del blanco de reactivos fortificado procesado a través de todo el método analítico. Los LDM se calculan de acuerdo con:

$$\text{LDM} = t \times s$$

En donde:

t = valor de la "t" de Student a un intervalo de confianza de 95% y una desviación estándar estimada para n-1 grados de libertad. t = 3,14 para 7 réplicas.

s = desviación estándar de las réplicas del análisis.

El intervalo lineal de calibración se establece a partir de por lo menos 4 estándares de diferente concentración, uno de los cuales debe estar próximo al límite superior del intervalo lineal.

B.8.5.1.3 Determinación

B.8.5.1.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito de acuerdo con las indicaciones del manual del instrumento.

B.8.5.1.3.2 Introducir el blanco de reactivos y la muestra a analizar y registrar los valores de absorbancia. Se debe analizar al menos un blanco de reactivos con cada grupo de muestras. Los valores obtenidos ponen de manifiesto la calidad de los reactivos usados y el grado de contaminación del laboratorio.

B.8.5.1.3.3 En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en las unidades de concentración utilizadas.

B.8.5.1.3.4 Se debe analizar al menos un blanco de reactivos fortificado para cada grupo de muestras. Se calcula la exactitud como el porcentaje de recuperación (de acuerdo con el apartado B.8.5.1.3.6).

B.8.5.1.3.5 Se debe fortificar al menos una muestra por grupo o el 10% de ellas lo que resulte mayor. La concentración añadida debe ser de aproximadamente 0,1 unidades de absorbancia.

B.8.5.1.3.6 Se debe calcular el porcentaje de recuperación para el analito, de acuerdo con:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{CM - C}{CA} \times 100$$

En donde:

CM = Concentración de la muestra fortificada

C = Concentración de la muestra

CA = Concentración equivalente de analito añadido a la muestra.

Si la recuperación del analito en la muestra fortificada está fuera del intervalo previamente establecido y el blanco de reactivos fortificado está correcto, puede existir un problema relacionado con la matriz de la muestra. Los datos se deben verificar por el método de las adiciones estándar.

B.8.5.2 Espectrometría de absorción atómica por horno de grafito.

B.8.5.2.1 Calibración

B.8.5.2.1.1 Proceder de acuerdo con los puntos (B.8.5.1.1.1 a B.8.5.1.1.4).

B.8.5.2.1.2 Elaborar una curva de calibración graficando área de pico o altura máxima contra concentración del analito.

La calibración mediante el uso de una computadora o una calculadora basada en el ajuste sobre los datos de concentración respuesta es aceptada.

Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

B.8.5.2.2 Operación del instrumento.

B.8.5.2.2.1 Proceder de acuerdo con (B.8.5.1.2.1 a B.8.5.1.2.3).

B.8.5.2.3 Determinación

B.8.5.2.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito, de acuerdo con las recomendaciones del manual del instrumento.

El programa de temperaturas para el horno de grafito puede variar dependiendo de la matriz de la muestra. En el caso de existir interferencias no específicas (absorción molecular o dispersión de la luz), se recomienda consultar la bibliografía existente en cuanto a los métodos disponibles para eliminarlas, así como en el caso de interferencias de matriz.

B.8.5.3 Espectrometría de absorción atómica por generador de hidruros.

B.8.5.3.1 Calibración

B.8.5.3.1.1 Proceder de acuerdo con los puntos (B.8.5.1.1.1 a B.8.5.1.1.4).

B.8.5.3.1.2 A partir de la solución estándar de As de 1000 mg/l, preparar una solución de As de 1 mg/l en ácido clorhídrico de concentración apropiada al método. Trazar una curva de calibración de absorbancia (máximo de la altura de pico) en función de la concentración del analito para un intervalo de concentración de 0 a 10 µg/l de As bajo las mismas condiciones de la matriz de la muestra.

B.8.5.3.2 Operación del instrumento.

B.8.5.3.2.1 Proceder de acuerdo con los puntos (B.8.5.1.2.1 a B.8.5.1.2.3).

B.8.5.3.3 Determinación

B.8.5.3.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación de As: longitud de onda de 193,7 nm y lámpara de descarga sin electrodos. Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo con el manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).

B.8.5.3.3.2 Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración de ácido clorhídrico al 1,5% siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

B.8.5.3.3.3 Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito (por lo general, 10 ml de una solución de 5 µg/l de As da una absorbancia de 0,2), ajustando el tiempo de purga I, el tiempo de reacción y el tiempo de purga II.

B.8.5.3.3.4 Tomar un volumen conocido de la muestra dirigida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

B.8.5.4 Espectrometría de absorción atómica por vapor frío.

B.8.5.4.1 Calibración

B.8.5.4.1.1 Proceder igual que en los puntos (B.8.5.1.1.1 a B.8.5.1.1.4.).

B.8.5.4.1.2 A partir de la solución de trabajo de 1 µg/ml preparar estándares de calibración que contengan 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 µg de Hg a frascos de reacción. A cada frasco agregar 100 ml de la solución de dilución y 20 ml de la solución de reducción. Trazar la curva de calibración de absorbancia (altura máxima de pico) en función de la concentración del analito.

B.8.5.4.2 Operación del instrumento.**B.8.5.4.2.1** Proceder de acuerdo con los puntos (B.8.5.1.2.1 a B.8.5.1.2.3).**B.8.5.4.3** Determinación**B.8.5.4.3.1** Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación de Hg: longitud de onda de 253,6 nm, slit 0,7 nm y lámpara de cátodo hueco. Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo con el manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).**B.8.5.4.3.2** Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración (solución de dilución y de reducción) siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.**B.8.5.4.3.3** Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito.**B.8.5.4.3.4** Tomar 25 ml de la muestra digerida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.**B.8.6 Expresión de resultados****B.8.6.1** Método de cálculo

Interpolar los valores de absorbancia o altura de pico de la muestra analizada en la curva de calibración y obtener los mg/kg del elemento en la muestra y realizar los cálculos empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Metal}_{\text{mg/kg}} = \frac{A \times B}{C}$$

En donde:

A = Concentración en mg/kg de la muestra a interpolar en la curva de calibración.

B = Volumen final al que se llevó la muestra (ml).

C = Peso de la muestra (g) o volumen de la muestra (ml) en el caso de agua.

En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en mg/kg o µg/kg.

B.8.7 Informe de la prueba

Los resultados se informarán en mg/kg o µg/kg del elemento a determinar.

B.9 DETERMINACION DE MATERIA EXTRAÑA EN LECHE, FORMULA LACTEA O PRODUCTO LACTEO COMBINADO**B.9.1 Principio del método**

Los insectos enteros, fragmentos de los mismos, pelos de roedor o alguna materia extraña se separan de la muestra por filtración para su identificación al microscopio.

B.9.2. Equipo**B.9.2.1** Balanza analítica con 0,1 mg de sensibilidad**B.9.2.2** Equipo de filtración al vacío.**B.9.2.3** Microscopio binocular estereoscopio con objetivos que pueden ser de 3, 6, 7 y 10 X, oculares apareados de amplio campo visual de 10, 30 y 100 X, respectivamente.**B.9.2.4** Lámpara para el microscopio o luz natural equivalente.**B.9.3 Materiales****B.9.3.1** Embudo Büchner.**B.9.3.2** Matraz Kitazato.**B.9.3.3** Vasos de precipitados de 1000 ml.**B.9.3.4** Caja Petri.**B.9.3.5** Papel de filtración rápida para conteo con líneas paralelas de aproximadamente 5 mm de separación.**B.9.3.6** Material común de laboratorio.

B.9.4. Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

B.9.4.1 Solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2%.

Disolver 2 g de carbonato de sodio en agua y llevar al volumen de 100 ml.

B.9.4.2 Solución de oxalato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) al 3%.

Disolver 3 g de oxalato de sodio $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ en agua y llevar al volumen de 100 ml.

B.9.4.3 Mezcla de glicerina:etanol 1:3 (v/v) (opcional).**B.9.5 Procedimiento****B.9.5.1** Preparación de la muestra**B.9.5.1.1** Productos líquidos

Mezclar bien todo el contenido de la muestra.

B.9.5.1.2 Productos deshidratados

Pesar por duplicado 50 g de leche descremada o 65 g de leche entera y reconstituir ajustando el volumen a 500 ml con agua a 40°C.

B.9.5.2 Determinación

B.9.5.2.1 Filtrar toda la muestra sobre un embudo de succión preparado con papel filtro para conteo, tratando de verterlo uniformemente.

B.9.5.2.2 Durante la filtración lavar continuamente el papel filtro con agua a 80°C aproximadamente, para evitar la acumulación de partículas que tapen los poros del papel.

B.9.5.2.3 Pasar el papel filtro a una caja Petri y humedecerla con la mezcla glicerina-etanol (opcional). Examinar al microscopio utilizando una luz suficientemente fuerte que muestre los detalles en el papel filtro.

B.9.5.2.4 Contar con una aguja de disección sobre toda la superficie del papel, línea por línea y explorar cada pieza del material dado que algunos fragmentos son irreconocibles a menos que se muevan.

B.9.6 Expresión de resultados**B.9.6.1** Productos deshidratados

Presencia o ausencia de insectos enteros, fragmentos de insectos, pelos de roedor y cualquier materia extraña que se encuentre en 50 g o 65 g de muestra

B.9.6.2 Productos líquidos

Presencia o ausencia de insectos enteros, fragmentos de insectos, pelos de roedor y cualquier materia extraña que se encuentre en la cantidad de ml que contenga el envase analizado

METODOS PARA LA DETERMINACION DE NUTRIMENTOS**B.10 DETERMINACION DE VITAMINA A POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC EN FASE REVERSA)****B.10.1 Principio del método**

Los lípidos son ésteres que en presencia de un álcali cáustico se hidrolizan liberando el material insaponificable, el cual es extraído con un disolvente orgánico. Posteriormente la vitamina A contenida en este material, es cuantificada por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

B.10.2 Equipo**B.10.2.1.** Sistema de HPLC que incluye:**B.10.2.1.1** Bomba HPLC.**B.10.2.1.2** Inyector automático o manual de muestras.**B.10.2.1.3** Detector espectrofotométrico de longitud de onda variable UV-Visible LC.**B.10.2.1.4** Integrador computarizado LC.

B.10.2.1.5 Columna Octadecil ODS (20), tamaño de partícula 5 µm, longitud 250 mm x diámetro interno 4,6 mm.

B.10.2.2 Balanza analítica, con capacidad de 160 g, lectura 0,1 mg.

B.10.2.3 Placas de agitación con calentamiento.

B.10.2.4 Cilindro para gas comprimido de nitrógeno pureza 95%.

B.10.2.5 Cilindro para gas comprimido de helio pureza 95%.

B.10.2.6 Evaporador rotatorio con elevador rápido y baño maría.

B.10.2.7 Equipo de filtración para la preparación de la fase móvil.

B.10.2.8 Cronómetro o reloj.

B.10.3 Materiales

B.10.3.1 Matraces volumétricos actínicos o de color marrón con tapón de vidrio o teflón de 50 y 100 ml.

B.10.3.2 Matraces actínicos o de color marrón de fondo plano, cuello corto de 250 ml.

B.10.3.3 Matraces, en forma de pera actínicos o de color marrón, de cuello corto y boca esmerilada de 500 ml (que embone en el rotavapor).

B.10.3.4 Matraces volumétricos actínicos o de color marrón de 10 ml.

B.10.3.5 Vasos de precipitados de 500 ml.

B.10.3.6 Embudo de separación cónico, actínicos o de color marrón, con llave de teflón 500 ml.

B.10.3.7 Embudo tallo corto diámetro 12 cm.

B.10.3.8 Tapones de teflón huecos hexagonales o actínicos o de color marrón.

B.10.3.9 Refrigerante con macho y hembra, manguito 300 ml, de 50 cm de longitud aproximadamente.

B.10.3.10 Manguera de látex.

B.10.3.11 Papel filtro mediano No. 1 con diámetro de 18,5 cm.

B.10.3.12 Pipetas volumétricas con marca de 5 y 4 ml.

B.10.3.13 Jeringa de vidrio sin aguja desechable de 10 ml.

B.10.3.14 Jeringa de vidrio de 50 µl con aguja sin punta.

B.10.3.15 Filtros para jeringa (acrodiscos para HPLC) de 0,45 µm de tamaño de poro y diámetro de 25 mm, para solventes orgánicos y fase móvil.

B.10.3.16 Membranas de filtración de fluoruro de polivinilideno, utilizada para fases móviles (solventes orgánicos y acuosos), cuyos extractables sean de absorción en UV, u otro filtro para fines similares.

B.10.3.17 Magnetos para placa de agitación.

B.10.4 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico y por agua debe entenderse agua destilada.

B.10.4.1 Estándar de retinol (vitamina A) cristalizada (C₂₀H₃₀O) all trans RETINOL con certificado de pureza.

B.10.4.2 Hidróxido de potasio en lentejas (KOH).

B.10.4.3 Alcohol etílico absoluto (C₂H₅OH).

B.10.4.4 Eter de petróleo intervalo de ebullición 40 a 60°C.

B.10.4.5 Fenolftaleína en solución etanólica al 1%, indicador (C₂₀H₁₄O₄).

B.10.4.6 Metanol grado HPLC (CH₃OH).

B.10.4.7 Agua destilada filtrada (sólo para la preparación de fase móvil).

B.10.4.8 Agua destilada que se utilizará en los lavados del saponificado (verificar que el valor de pH no sea mayor de 6,0).

B.10.4.9 Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).

B.10.4.10 Acido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$).

B.10.4.11 Fase móvil metanol: agua (95:5) para HPLC.

Pasar agua destilada a través de una membrana de filtración para soluciones acuosas. Pasar metanol a través de una membrana de filtración para solventes orgánicos. Posteriormente mezclar 50 ml de agua destilada en 950 ml de metanol (fase móvil). Degasificar la fase móvil pasando una ligera corriente de gas helio o por ultrasonido 15 min a temperatura ambiente.

B.10.4.12 Soluciones patrón de vitamina A

B.10.4.12.1 Solución concentrada (150 μg equivalentes de retinol). Justo antes de emplearse, pesar 15 mg de retinol cristalizado (A-OH) y registrar el peso exacto. Colocar el estándar pesado en un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver con metanol y llevar al volumen.

B.10.4.12.2 Solución intermedia (15 μg equivalentes de retinol)

Diluir 5 ml de la solución concentrada a 50 ml con el mismo metanol para obtener una solución de aproximadamente 50 U.I./ml.

B.10.4.12.3 Solución de trabajo (6 μg equivalentes de retinol)

Añadir 4 ml de la solución estándar intermedia al matraz marcado como estándar y adicionar los reactivos al igual que al blanco y muestra como se indica en el apartado de saponificación. Esta solución tendrá aproximadamente 20 U.I./ml de vitamina A, al final del proceso de recuperación, en el matraz volumétrico de 10 ml.

Nota 1: Si el certificado de % de pureza en el estándar es inferior al 85% no debe prepararse la solución patrón, siendo necesario un nuevo estándar de otro lote con una pureza superior a la antes indicada.

Nota 2: La vitamina A-OH (A-alcohol) se oxida con gran rapidez y es muy sensible a la luz. Al abrir una ampollita nueva de vitamina A-cristalizada, pesar la cantidad de estándar requerida y guardar la ampollita bajo atmósfera de nitrógeno o en condiciones similares.

B.10.5 Procedimiento

Nota 3: La vitamina A es sensible a la luz. Utilizar material actínico o de color marrón o bien, proteger el material con papel aluminio. Por otra parte efectuar las evaporaciones con rotavapor a una temperatura máxima de 40°C. No evaporar a sequedad. Romper el vacío e inmediatamente introducir nitrógeno al sistema o al matraz. Evaporar los últimos mililitros mediante una corriente de nitrógeno sin llegar a la sequedad.

B.10.5.1 Toma de muestra

En el caso de productos deshidratados, reconstituir con agua, de acuerdo con las instrucciones señaladas en la etiqueta o 130 g del producto llevados a 1 l con agua. Disolver y agitar la muestra a fin de homogeneizarla por completo.

Medir de preferencia por duplicado una cantidad de muestra tal, que contenga de 30 a 90 μg equivalentes de retinol (100 a 300 U.I. de vitamina A) o la cantidad correspondiente a lo declarado en la etiqueta de la muestra. En caso de no contar con esta información no es conveniente realizar el análisis.

B.10.5.2 Saponificación

B.10.5.2.1 Marcar 4 matraces actínicos de cuello corto y esmerilado con fondo plano de 250 ml (cuando la muestra se trabaje por duplicado) de la siguiente manera: blanco, estándar y muestra.

B.10.5.2.2 Añadir los siguientes reactivos a cada uno de los matraces antes mencionados: 7 g de hidróxido de potasio y a continuación añadir 60 ml de alcohol absoluto. Mezclar para disolver. Agregar 0,5 g de ácido ascórbico así como una barra magnética. Adicionar una ligera corriente de nitrógeno a cada uno de los matraces.

B.10.5.2.3 Montar un sistema de reflujo y calentar durante 30 min en placas de calentamiento o baño de agua en ebullición con agitación constante.

Nota 4: Durante la saponificación, asegurar una buena agitación del medio de reacción.

B.10.5.3 Extracción del insaponificable

B.10.5.3.1 Una vez concluido el tiempo de saponificación, enjuagar con máximo 30 ml de agua destilada (evitar el exceso de agua para prevenir la formación de emulsiones) por las paredes internas del refrigerante sin quitar el matraz del saponificado. Enfriar el matraz aún instalado al refrigerante sumergiéndolo parcialmente en un vaso de precipitados que contenga agua fría, lo anterior con la finalidad de llevarlo a temperatura ambiente, evitando enfriarlo demasiado. Trasvasar la suspensión a un embudo de separación de 500 ml.

B.10.5.3.2 Enseguida enjuagar el matraz con 100 ml de éter de petróleo que se añaden al embudo de separación. Extraer la vitamina A agitando ligeramente. Dejar separar las fases. Vaciar la fase acuosa a otro embudo de 500 ml. Recoger la fase orgánica a un tercer embudo de separación de 500 ml. Repetir la operación dos veces más, enjuagando el matraz con dos porciones de 100 ml de éter cada una.

B.10.5.3.3 Efectuar esta extracción 3 veces en total (un lavado de 50 ml y 2 lavados de 100 ml). Hacer las agitaciones con mucho cuidado para evitar emulsiones.

B.10.5.3.4 Lavar la solución orgánica con porciones de 100 ml de agua adicionándola por las paredes del embudo, agitando suavemente, hasta que el agua del lavado ya no dé reacción colorida con la fenoltaleína. Después del último lavado, esperar de 15 a 30 min antes de vaciar la fase acuosa y volver a revisar con el indicador que no exista reacción colorida.

B.10.5.3.5 Filtrar la solución lavada en continuo a través de un filtro que contiene aproximadamente 10 g de sulfato de sodio anhidro y recoger el filtrado en un matraz de pera de 500 ml, sin dejar secar el filtro. Al final enjuagar el sulfato de sodio contenido en el filtro con 50 ml de éter de petróleo.

B.10.5.3.6 Evaporar el disolvente en un rotavapor a 40°C y dejar un remanente de aproximadamente 6 ml. Tratar de reducir esta cantidad del disolvente a un volumen de 2 ml aproximadamente mediante una corriente de nitrógeno.

B.10.5.3.7 Disolver el remanente obtenido con 3 ml de la fase móvil y recolectar cuantitativamente la solución con una jeringa de vidrio. Filtrar la solución a través de un filtro acrodisco de 0,45 µm a un matraz actínico de 10 ml. Lavar el matraz pera con porciones de 2 ml de fase móvil y repetir el mismo procedimiento hasta llegar al aforo del matraz. Hacer lo mismo para cada filtro de blanco, estándar y probar por duplicado.

Nota 5: Se recomienda acondicionar el acrodisco de 0,45 µm con metanol antes de utilizarlo en la filtración del recuperado.

B.10.5.4 Condiciones cromatográficas

B.10.5.4.1 Fijar los siguientes parámetros de acuerdo con las instrucciones de operación del cromatógrafo. Columna Octadecil ODS (20), tamaño de partícula 5 µm, longitud 250 mm x diámetro interno 4,6 mm.

Loop de inyección: 20 µl.

Fase móvil: metanol: agua 95:5.

Flujo: 1 ml/min.

Detector: Longitud de onda ajustada a 325 nm.

Registrador: 5 mm/min.

B.10.5.5 Determinación de vitamina A

Inyectar dos veces los siguientes analitos: primero 20 µl del blanco, después 20 µl de la solución estándar para HPLC (20 U.I./ml aprox.) y por último 20 µl de la muestra (del saponificado).

B.10.5.5.1 En el cromatograma, identificar el pico y tiempo de retención de la vitamina A correspondiente al estándar. Con estos datos, identificar el pico y tiempo de retención de la vitamina A contenida en la muestra.

B.10.5.5.2 Calcular la altura del pico de la solución patrón y de las muestras en los cromatogramas obtenidos.

B.10.6 Cálculos

El contenido de vitamina A, expresado en Unidades Internacionales por litro de producto es igual a:

$$\text{Vitamina A}_{U.I./l} = \frac{hP \times C \times V \times 1000}{hS \times m}$$

En donde:

m = toma de ensayo en g o ml.

hP = altura del pico de la muestra, en mm.

hS = altura del pico de la solución estándar final, en mm.

C = concentración de la solución estándar final inyectada, en U.I./ml para la vitamina A.

V = volumen de solución estándar final, en el cual ha sido diluido el remanente antes de la cromatografía.

Los resultados deben reportarse como μg equivalentes de retinol.

B.10.7 Expresión de resultados

μg equivalentes de retinol/l

1 U.I.= 0,3 μg equivalentes de retinol (todos los retinoles trans)

B.11 DETERMINACION DE LAS VITAMINAS A Y E POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC EN FASE NORMAL)

B.11.1 Fundamento

Saponificación de la muestra; extracción de los compuestos insaponificables; evaporación y redisolución en n-hexano e inyección en la columna en fase normal

B.11.2 Material y equipo

Todo el material utilizado debe estar estéril

Instalación HPLC isocrática

Uno o dos registradores

Balanza analítica con capacidad de 160 g lectura 0,1 mg

Balanza de precisión con capacidad de 1600 g lectura 0,01 g

Estufa de laboratorio (para productos con almidón)

Baño maría con agitadores magnéticos de 4 plazas

Evaporador rotatorio con elevador rápido y baño

Matraces aforados vidrio marrón con tapón de vidrio de 50 y 100 ml

Matraz de fondo plano con cuello corto de 250 ml

Matraces en forma de pera con vidrio marrón de 10 y 500 ml

Embudo de separación cónico vidrio marrón con llave de 500 ml

Embudo vidrio marrón, diámetro 12 cm

Tapones huecos hexagonales vidrio marrón

Refrigerante con macho y hembra manguito 300 mm

Alargadera para introducción de gas

Ampolleta de vidrio marrón de 5 ml

Filtro plisado mediano con diámetro de 18,5 cm

Pipetas aforadas con una marca de 3 y 5 ml

Jeringuillas de 1 y 5 ml

Aguja para jeringuillas

Cilindro para gas comprimido de nitrógeno

Monodetentor para gas comprimido, nitrógeno

Filtro de 0,45 μ de diámetro

Columna de 5 μ , 4,6 X 250

Aparato de filtración

Filtro 0,5 μ

B.11.3 Reactivos

Retinol (vitamina A) cristalizada ($C_{20}H_{30}O$)

DL-alfa-tocoferol (vitamina E) para fines bioquímicos ($C_{29}H_{50}O_2$)

Hidróxido de potasio en lentejas para análisis (KOH)

Alcohol etílico absoluto, para análisis (C_2H_5OH)

Hidroquinona ($C_6H_4(OH)_2$)

Eter de petróleo para análisis intervalo de ebullición 40 - 60°C

Fenolftaleína en solución etanólica al 1%, indicador ($(C_6H_4OH)_2COC_6H_4CO$)

diastasa (para productos de almidón)

2-propanol ($(CH_3)_2CHOH$)

n-hexano ($CH_3(CH_2)_4CH_3$)

Sulfato de sodio anhidro para análisis (Na_2SO_4)

Nitrógeno (N_2)

Acido ascórbico ($C_6H_8O_6$)

B.11.3.1 Fase móvil para HPLC, 2-propanol al 1% en n-hexano.

Degasificar el n-hexano bajo presión reducida y pasar a través de un filtro. Mezclar 10 ml de 2 propanol con 990ml de n-hexano degasificado.

B.11.3.2 Solución patrón de vitamina A**B.11.3.2.1 Solución concentrada**

Justo antes del uso, pesar en un matraz aforado de 100 ml aproximadamente 15 mg de retinol cristalizado (A - OH) y tomar el peso exacto, disolver en n-hexano y llevar a volumen con el mismo disolvente (= solución de aproximadamente 500 U.I./ml).

Esta solución permanece estable 1 semana a 4°C.

B.11.3.2.2 Solución para HPLC

Diluir 5 ml de solución (B.11.3.2.1) a 50 ml con el mismo disolvente para obtener una solución de aproximadamente 50 U.I./ml

Medir la extinción (E) a 325 nm y determinar la concentración de la vitamina A-OH, en U.I./ml, según:

1%

$E_{1\text{cm}}$ en n-hexano = 1815

Para 1 U.I. A-OH/ml $E = 0,0545$

Si el contenido es inferior a 85% del valor teórico no puede utilizarse esta solución patrón, es necesaria una nueva preparación. Si se obtiene otro valor debe considerarse en los cálculos finales.

NOTA:

La vitamina A-OH (A-alcohol) se oxida con gran rapidez y es muy sensible a la luz. Al abrir una nueva ampolla de vitamina A-alcohol cristalizada, distribuir el contenido a razón de 50 mg en pequeñas ampollas marrones. Trabajar en una cámara oscura. Las ampollas deben cerrarse inmediatamente bajo nitrógeno.

B.11.3.3 Solución patrón de vitamina E

En un matraz aforado de 100 ml, pesar exactamente 100 mg de alfa- tocoferol (E-OH), disolver en n-hexano y llevar al volumen con el mismo disolvente.

Diluir esta solución 5 veces con el mismo disolvente para obtener una solución de 0,2 mg/ml. Esta solución permanece estable una semana a 4°C.

B.11.4 Procedimiento

NOTAS:

Las vitaminas A y E son sensibles a la luz. Utilizar material de vidrio marrón, o proteger el material corriente con papel aluminio.

Efectuar todas las evaporaciones de disolventes bajo presión reducida a una temperatura máxima de 40°C. No debe evaporarse a seco. Romper el vacío introduciendo nitrógeno en el sistema. Evaporar los últimos mililitros mediante una corriente de nitrógeno.

B.11.4.1 Toma de ensayo

Mezclar o moler la muestra a fin de homogeneizarla por completo. Pesar, con una precisión de 10 mg, una toma de ensayo que contenga 100 a 300 UI de vitamina A y 0,5 a 1 mg de vitamina E, lo que corresponde en general a 10 g.

B.11.4.1.1 Productos con almidón

En un matraz redondo de fondo plano de 250 ml con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con 10% de su peso de diastasa. Añadir máximo 30 ml de agua destilada a 45 a 50°C. Mezclar bien para obtener una suspensión homogénea. Eliminar el aire del matraz mediante nitrógeno, tapar y colocar el matraz durante 30 min en una estufa a 45°C.

B.11.4.1.2 Productos sin almidón

En un matraz redondo de fondo plano de 250 ml con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con máximo 30 ml de agua destilada a 45 a 50°C.

B.11.4.2 Saponificación

Añadir 7 g de hidróxido de potasio grado analítico en el matraz B.34.3.3.1 o B.34.3.1.2, y mezclar para disolver. A continuación añadir 60 ml de alcohol absoluto y 0,5 g de ácido ascórbico o hidroquinona.

Montar sobre un sistema de reflujo, introducir una ligera corriente de gas nitrógeno y calentar durante 30 min en un baño maría ebulviendo provisto de agitadores magnéticos.

NOTA:

Durante la saponificación, asegurar una buena agitación del medio de reacción.

B.11.4.3 Extracción del insaponificable

Una vez terminada la saponificación, enfriar el matraz a temperatura ambiente y trasvasar la suspensión a un embudo de separación de 500 ml.

Enjuagar con máximo 30 ml de agua fría en 3 porciones de 10 ml que se añaden al contenido del embudo de separación. Evitar un exceso de agua, ya que favorece la formación de emulsiones.

Enseguida enjuagar el matraz con 50 ml de éter de petróleo (rango de 40 a 60 °C) en varias porciones que se añaden al embudo de separación. Extraer las vitaminas A y E agitando ligeramente. Dejar separar las fases. Vaciar la fase acuosa a otro embudo de separación de 500 ml. Recoger la fase orgánica en un tercer embudo de separación de 500 ml.

Efectuar esta extracción 5 veces en total. Haciendo las agitaciones con mucho cuidado para evitar emulsiones.

Lavar la solución orgánica con porciones de 100 ml de agua adicionándola por las paredes del embudo, sin agitar, hasta que el agua de lavado ya no dé reacción coloreada con fenolftaleína. Después del último lavado, esperar al menos 15 min antes de vaciar la fase acuosa.

Filtrar la solución lavada en continuo a través de un filtro que contiene aproximadamente 5 g de sulfato de sodio anhidro o en un papel separador de fases tipo 1 PS, y recoger el filtrado en un matraz en forma de pera de 500 ml, sin dejar secar el filtro. Y al final enjuagar el filtro con 50 ml de éter de petróleo.

Evaporar el disolvente bajo presión reducida en un rotavapor a 40°C, y eliminar los últimos mililitros mediante una corriente de nitrógeno.

Disolver el residuo en 3 ml de la fase móvil (B.11.2.1) y filtrar la solución inmediatamente a través de un filtro de 0,45 µ de tamaño de poro y adecuado para solventes orgánicos, recoger el filtrado en un matraz. El filtrado debe ser límpido.

La solución está lista para la cromatografía.

B.11.5 Cromatografía

Condiciones:

Columnna: Spherisorb Sílice, 5 µm, 4,6 X 250 mm

Loop de inyección: 20 µl

Fase móvil: 1% 2-propanol en n-hexano (34.3.1)

Caudal: 2 ml/min

Detector: ya sea: espectrofotómetro, longitud de onda variable, ajustada a 292 nm, 0,2 AUFS
ya sea: espectrofotómetro, longitud de onda variable, ajustada a 325 nm, 0,2 AUFS, para la vitamina A, en serie con espectrofluorímetro para vitamina E.

Ex: 294 nm, Em: 236 nm.

Registrador: 10 mm/min

Inyectar primero 20 µl de solución patrón de vitamina E (B.11.3.3) y determinar el tiempo de retención: debe ser aproximadamente 8 min. En seguida inyectar 20 µl de extracto obtenido bajo B.11.3.

B.11.6 Cálculo, expresión e interpretación de los resultados

B.11.6.1 Evaluación

Identificar los picos de las vitaminas A y E en el cromatograma de la muestra mediante el tiempo de retención definido por cromatografía de la solución de la muestra y de la solución patrón correspondiente.

El contenido en vitamina A, expresado en Unidades Internacionales por 100 g de producto, y el contenido en vitamina E, expresado en mg por 100 g de producto, es igual a:

$$\text{Vitamina A}_{U.I./100g} = \frac{hP \times C \times V \times 100}{hS \times m}$$

$$\text{Vitamina E}_{mg/100g} = \frac{hP \times C \times V \times 100}{hS \times m}$$

En donde:

m = toma de ensayo, en g.

hP = altura del pico de la muestra, en mm

hS = altura del pico de la solución patrón, en mm

C = concentración de la solución patrón inyectada, en U.I./ml para la vitamina A, y en mg/ml para la vitamina E

V = volumen, en ml, en el cual ha sido diluido el residuo antes de la cromatografía (3.3)

B.11.6.2 Límite de detección de acuerdo con la sensibilidad del equipo.

1 mg de D- á - tocoferil acetato es = 1 U.I. de vit. E

1 mg de DL- á - tocoferol = 1,1 U.I. de vit. E

Vitamina A: aproximadamente 50 U.I./ 100 g

Vitamina E: espectrofotometría: aprox. 0,5 mg/100 g

fluorimetría: aprox. 0,2 mg/100 g

B.11.6.3 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio) en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder 10% de la media entre ambos resultados.

Cuando las vitaminas han sido añadidas por mezcla en seco, la repetibilidad está fuertemente influida por el grado de homogeneidad del producto.

NOTA: Para la determinación de vitamina A, en leche seguir la metodología anterior leyendo con el detector de UV a 325 nm.

La determinación de vitamina A y vitamina E puede hacerse de manera conjunta contando con un detector de UV programable o con detector de UV y un fluorómetro. Si no se cuenta con detector de UV programable o fluorómetro, inyectar dos veces la muestra para determinar las vitaminas por separado.

B.11.6.4 El contenido de tiamina en los productos objeto de esta Norma no debe ser inferior a 100 µg/100 g del producto listo para ser consumido.

Debe decir:

B.11.6.5 El contenido de tiamina en los productos objeto de esta Norma no debe ser inferior a 100 µg/100 kcal.

B.12 DETERMINACION DE VITAMINA D₃ POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)**B.12.1 Preparación de la muestra**

En el caso de productos deshidratados reconstituir con agua, de acuerdo con las instrucciones señaladas en la etiqueta o 130 g de producto llevado a 1 l con agua. Disolver y agitar la muestra a fin de homogeneizarla por completo. Medir de preferencia por duplicado una cantidad de muestra que contenga de 0,5 a 1 µg de vitamina D₃ (20 a 40 U.I.).

B.12.2 Fundamento

Saponificación alcalina de la muestra; extracción con éter de compuestos insaponificables; evaporación del éter; solución del residuo seco en hexano e inyección de una alícuota en columna preparativa de HPLC (fase normal, Sílice). Colección del eluato que contiene la fracción de vitamina D; evaporación de esta fracción a sequedad, disolución en la fase móvil de HPLC (Analítica, Acetonitrilo: Cloruro de metileno: Isopropanol), inyección en HPLC (fase reversa C₁₈) y determinación de la vitamina D con el pico máximo a 264 nm por calibración del estándar externo.

B.12.3 Material

Instalación de bomba HPLC

Uno o dos registradores

Balanza analítica, con capacidad de 160 g, lectura 0,1 mg

Balanza de precisión, con capacidad de 1600 g, lectura 0,01 g

Estufa de laboratorio (para productos con almidón)

Baño de agua con agitadores magnéticos, 4 plazas

Evaporador rotatorio con elevador rápido y baño

Matraces aforados, vidrio marrón, tapón de vidrio de 5, 50 y 100 ml

Matraz de fondo plano, cuello corto, vidrio marrón de 250 ml

Matraces, en forma de pera, vidrio marrón de 10 y 500 ml

Embudo de separación cónico, vidrio marrón, con llave de 500 ml

Embudo, vidrio marrón, diámetro 12 cm

Tapones huecos hexagonales, vidrio marrón

Refrigerante con macho y hembra, manguito 300 mm

Alargadera para introducción de gas

Filtro plisado mediano con diámetro de 18,5 cm

Pipeta aforada, con una marca de 2 ml

Jeringuillas de 1 y 5 ml

Aguja para jeringuillas

Cilindro para gas comprimido, nitrógeno

Monodetentor para gas comprimido, N₂

Filtro de 0,45 µ de diámetro

2 Columnas de 5 µ, 4,6 X 250

Aparato de filtración

Filtro 0,5 µ

B.12.4 Reactivos

Colecalciferol, vitamina D₃, cristalizada para fines bioquímicos (C₂₇H₄₄O)

Hidróxido de potasio en lentejas para análisis (KOH)

Alcohol etílico absoluto, para análisis (C₂H₅OH)

Hidroquinona (C₆H₄(OH)₂)

Eter de petróleo para análisis intervalo de ebullición 40 -60°C

Fenolftaleína en solución etanólica al 1%, indicador ((C₆H₄OH)₂C₆H₄COOC)

Diastasa (para productos de almidón)

2-propanol (CH₃)₂CHOH

n-hexano CH₃(CH₂)₄CH₃

Acetonitrilo (CH₃CN)

Diclorometano (CH₂Cl₂)

Sulfato de sodio anhidro para análisis (Na₂SO₄)

Nitrógeno (N₂)

Acido ascórbico (C₆H₈O₆)

B.12.4.1 Fase móvil para HPLC preparativa, 2-propanol al 1% en n-hexano

Degasificar el n-hexano bajo presión reducida y pasar sobre un filtro. Mezclar 100 ml de diclorometano con 900 ml de acetonitrilo degasificado.

B.12.4.2 Fase móvil para HPLC analítica

Degasificar 1 l de acetonitrilo bajo presión reducida y pasar a través de un filtro. Mezclar 100 ml de diclorometano con 890 ml de acetonitrilo degasificado y 10 ml de 2-propanol.

Nota: La proporción diclorometano/acetonitrilo debe adaptarse de modo que la vitamina D₃ dé un tiempo de retención de aproximadamente 8-9 min. Sin embargo, no debería rebasar 20:100.

B.12.4.3 Fase móvil para lavar la columna preparativa, 2-propanol al 10% en n-hexano

Mezclar 100 ml de 2-propanol con 900 ml de n-hexano degasificado.

B.12.4.4 Solución patrón de vitamina D₃ para HPLC preparativa

En un matraz aforado de 100 ml, pesar exactamente 50 mg de colecalciferol (D₃) cristalizado, disolver en n-hexano y llevar al volumen con el mismo disolvente (= solución de 20,000 U.I./ml).

Diluir esta solución 1000 veces con el mismo disolvente para obtener una solución de 20 U.I./ml. Esta solución permanece estable de 3 a 4 semanas a + 4°C.

B.12.4.5 Solución patrón de vitamina D₃ para HPLC analítica

Evaporar 2 ml de solución patrón de 20 U.I./ml (B.12.4.4) y tomar el residuo en 2 ml de fase móvil (B.12.4.2).

B.12.5 Procedimiento

Notas: La vitamina D₃ es sensible a la luz. Utilizar material de vidrio marrón o proteger el material corriente con papel aluminio.

Efectuar todas las evaporaciones de disolventes bajo presión reducida a una temperatura máxima de 40°C. No se debe evaporar a sequedad. Romper el vacío introduciendo nitrógeno en el sistema. Evaporar los últimos ml mediante una corriente de nitrógeno.

Al final de la jornada, lavar la columna preparativa durante 15 min con 2-propanol al 10% en n-hexano (B.12.4.3) con un caudal de 2 ml/min.

B.12.5.1 Toma de ensayo

Mezclar o moler la muestra a fin de homogeneizarla por completo. Pesar, con una precisión de 10 mg, una toma de ensayo que contenga 20 a 40 U.I. de vitamina D₃, lo que corresponde en general a 10 g.

B.12.5.1.1 Productos con almidón

En un matraz redondo de fondo plano de 250 ml con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con 10% de su peso de diastasa. Añadir máximo 30 ml de agua destilada a 45-50°C. Mezclar bien para obtener una suspensión homogénea. Eliminar el aire del matraz mediante nitrógeno, tapar y colocar el matraz durante 30 min en una estufa a 45°C.

B.12.5.1.2 Productos sin almidón

En un matraz redondo de fondo plano de 250 ml con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con máximo 30 ml de agua destilada a 45-50°C.

B.12.5.2 Saponificación

Añadir 7 g de hidróxido de potasio grado analítico en el matraz (B.12.5.1.1 o B.12.5.1.2), y mezclar para disolver.

A continuación añadir 60 ml de alcohol absoluto y 0,5 g de ácido ascórbico o hidroquinona.

Montar sobre el matraz una alargadera para introducción de un gas refrigerante. Introducir una ligera corriente de gas nitrógeno, y calentar durante 30 min a 70°C en un baño de agua en ebullición provisto de agitadores magnéticos.

Nota: Durante la saponificación, asegurar una buena agitación del medio de reacción.

B.12.5.3 Extracción del insaponificable

Una vez terminada la saponificación, enfriar el matraz a temperatura ambiente y transferir la suspensión a un embudo de separación de 500 ml.

Enjuagar con máximo 30 ml de agua fría en 3 porciones de 10 ml que se añaden al contenido del embudo de separación. Evitar un exceso de agua, ya que favorece la formación de emulsiones.

En seguida enjuagar el matraz con 50 ml de éter de petróleo (rango de 40 a 60°C) en varias porciones que se añaden al embudo de separación.

Extraer la vitamina D₃ agitando ligeramente.

Dejar separar las fases.

Vaciar la fase acuosa a otro embudo de separación de 500 ml. Recoger la fase orgánica en un tercer embudo de separación de 500 ml.

Efectuar esta extracción 5 veces en total. Haciendo las agitaciones con mucho cuidado para evitar emulsiones.

Lavar la solución orgánica con porciones de 100 ml de agua adicionándola por las paredes del embudo, sin agitar, hasta que el agua de lavado ya no dé reacción coloreada con fenolftaleína. Después del último lavado, esperar al menos 15 min antes de vaciar la fase acuosa.

Filtrar la solución lavada en continuo a través de un filtro que contiene aproximadamente 5 g de sulfato de sodio anhidro o en un papel separador de fases tipo 1 PS, y recoger el filtrado en un matraz en forma de pera de 500 ml, sin dejar secar el filtro. Y al final enjuagar el filtro con 50 ml de éter de petróleo.

Evaporar el disolvente bajo presión reducida en un rotavapor a 40°C, y eliminar los últimos mililitros mediante una corriente de nitrógeno.

Transferir el residuo cuantitativamente a un matraz aforado de 5 ml, mediante pequeñas porciones de fase móvil (B.12.4.1) llevar al volumen y filtrar la solución inmediatamente a través de un filtro de 0,45 µ de tamaño de poro y adecuado para solventes orgánicos, por ejemplo Acrodisc-CR o equivalente; recoger el filtrado en un matraz en forma de pera. El filtrado debe ser límpido.

La solución está lista para la cromatografía.

B.12.5.4 Cromatografía preparativa

Condiciones:

Columna: Spherisorb Si, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Loop de inyección: 500 µl

Fase móvil: 1% 2-propanol en n-hexano (B.12.4.1)

Caudal: 1-3 ml/min (el tiempo de retención de la vitamina D₃ debe ser de aproximadamente 5 min).

Detector: espectrofotómetro, longitud de onda variable, ajustada a 264 nm (o eventualmente espectrofotómetro de longitud de onda fija a 254 nm, únicamente utilizable para la etapa preparativa), 0,05 AUFS para el patrón y 0,5 AUFS para el extracto de muestra

Registrador: 10 mm/min.

Injectar primero 500 µl de solución patrón de vitamina D₃ (B.12.4.4) y determinar el tiempo de retención:

Debe ser aproximadamente 5 min. Injectar a continuación la solución de la muestra obtenida bajo el numeral (B.12.5.3) y recoger la fracción que contiene la vitamina D₃ en un matraz en forma de pera de 10 ml.

Comenzando a recoger aproximadamente 1 min antes de la elución de la vitamina D₃ y parar aproximadamente 1 min después de la elución de la vitamina D₃.

B.12.5.5 Cromatografía analítica

Evaporar a seco la fracción recogida bajo (B.12.5.4), mediante una ligera corriente de nitrógeno.

Enfriar el matraz a fin de evitar errores de volumen a una evaporación eventual de disolvente; luego tomar el residuo en 300 µl de fase móvil (B.12.4.2), agitar ligeramente para disolver bien el residuo. Condiciones:

Columna: Spherisorb ODS, 5 mcm, 4,6 x 250 mm

Loop de inyección: 100 µl

Fase móvil: 10% diclorometano, 89% acetonitrilo y 1% de 2-propanol

Caudal: 2 ml/min

Detector: espectrofotómetro, longitud de onda variable, ajustada a 264 nm; 0,01 AUFS

Registrador: 10 mm/min

Inyectar primero 100 µl de solución patrón (B.12.4.5) y determinar el tiempo de retención: debe ser aproximadamente 8-9 min (adaptar la proporción de diclorometano/acetonitrilo si es necesario). Luego inyectar 100 µl de la fracción obtenida bajo B.12.5.4.

B.12.6 Cálculo, expresión e interpretación de los resultados**B.12.6.1** Evaluación

Identificar el pico de la vitamina D₃ en el cromatograma de la muestra mediante el tiempo de retención definido por cromatografía de la solución patrón. Medir la altura de los picos obtenidos durante la cromatografía de la solución patrón y de la solución muestra.

El contenido en vitamina D₃, expresado en Unidades Internacionales por 100 g de producto, es igual a:

$$\text{Vitamina D}_3 \text{ U.I./100g} = \frac{hP \times C \times V_0 \times V_2 \times 100}{hS \times m \times V_1}$$

En donde:

m = toma de ensayo, en g

hP = altura del pico de la muestra, en mm

hS = altura del pico de la solución patrón, en mm

C = concentración de la solución patrón inyectada, en U.I./ml

V₀ = volumen en el cual ha sido diluido el residuo antes de la cromatografía preparativa (B.12.5.3) (en general 5 ml = matraz aforado)

V₁ = volumen del extracto inyectado en la columna preparativa (en general 0,500 ml=volumen del loop de inyección)

V₂ = volumen en el cual ha sido diluida la fracción después de la cromatografía preparativa (en general 0,300 ml)

Nota: es superfluo un factor de corrección para la isomerización de la vitamina D₃, en previtamina D₃, ya que este fenómeno es despreciable en las condiciones de saponificación aplicadas.

B.12.6.2 Límite de detección de acuerdo con la sensibilidad del equipo.

Aproximadamente: 20 U.I./100 g

B.12.6.3 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio) en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder 10% de la media entre ambos resultados.

Cuando las vitaminas han sido añadidas por mezcla en seco, la repetibilidad está fuertemente influida por el grado de homogeneidad del producto

B.13 DETERMINACION DE VITAMINA C (ACIDO ASCORBICO)

B.13.1 Determinación visual

B.13.1.1 Fundamento

Extracción del ácido ascórbico mediante ácido metafosfórico. Valoración visual oxidométrica del ácido ascórbico en el extracto con una solución de 2,6-diclorofenol-indofenol.

B.13.1.2 Reactivos y materiales

B.13.1.2.1 Reactivos

Acido ascórbico

Acido sulfúrico

Acido metafosfórico

Yodo

Sal sódica de 2,6-diclorofenol-indofenol

B.13.1.2.2 Materiales

Pipetas

Matraces aforados

Material común de laboratorio

B.13.1.3 Aparatos e instrumentos

Parrilla de calentamiento

Estufa

B.13.1.4 Preparación de soluciones

B.13.1.4.1 Solución estándar de ácido ascórbico 0,5 mg/ml

Pesar exactamente 50,0 mg de ácido ascórbico, introducirlos en un matraz aforado de 100 ml, si es posible, de vidrio pardo. Disolver con ácido metafosfórico al 2% y llevar a volumen con el mismo ácido. Esta solución debe prepararse inmediatamente antes del empleo.

B.13.1.4.1.1 Verificación de la pureza del ácido ascórbico

En caso de duda sobre la pureza del ácido ascórbico, pesar aproximadamente 400 mg con una precisión de 1 mg, disolver en una mezcla de 100 ml de agua destilada hervida y enfriada, y 25 ml de ácido sulfúrico al 10%. Valorar rápidamente bajo luz difusa con una solución de yodo, 0,1 N en presencia de una solución de almidón como indicador.

1 ml de yodo 0,1 N corresponde a 8,806 mg de ácido ascórbico.

B.13.1.4.2 Solución de ácido meta-fosfórico al 2%

B.13.1.4.2.1 Preparación de la solución base al 10%

Pesar 60-70 g de ácido meta-fosfórico. Eliminar la capa blanca que se forma generalmente en la superficie, lavando las barritas con agua destilada. Secarlas, con papel filtro y triturarlas en un mortero. Pesar 50 g de este ácido limpio y triturado, y disolverlo sin calentar en 500 ml de agua destilada en un frasco pardo, agitando este último mecánicamente hasta disolución.

Filtrar, si es necesario, sobre un filtro plegado en un frasco de vidrio pardo.

El ácido meta-fosfórico se transforma gradualmente en ácido orto-fosfórico, pero esta solución al 10% puede conservarse en un refrigerador durante tres semanas.

B.13.1.4.2.2 Preparación de la solución al 2%

Preparar la cantidad necesaria en el día de empleo, diluyendo cinco veces con agua destilada un volumen dado de la solución al 10%.

B.13.1.4.3 Solución de la sal sódica de 2,6-diclorofenol-indofenol (D.I.) al 0,05%

Disolver 100 mg de D.I. en un vaso de 50 ml que contenga 20 ml de agua destilada. Llevar rápidamente a ebullición, removiendo con una varilla de vidrio. Enfriar y transferir a un matraz aforado de 200 ml. Llevar a volumen con agua destilada. Filtrar en un frasco pardo. Esta solución se conserva en un refrigerador durante 8 días.

Verificar la concentración antes de cada serie de determinaciones.

La solución es azul en un medio alcalino (sal de Na+) y rosa en un medio ácido.

B.13.1.4.4 Acido acético al 10%

Diluir 100 ml de ácido acético glacial a 1 l con agua destilada.

B.13.1.4.5 Eventualmente: solución de yodo 0,1 N con factor conocido (determinado con tiosulfato).

B.13.1.4.6 Eventualmente: solución de ácido sulfúrico al 10%

Añadir cuidadosamente 57 ml de ácido sulfúrico concentrado a 500 ml de agua destilada. Enfriar a la temperatura ambiente y diluir a 1 l con agua destilada.

B.13.1.4.7 Eventualmente: solución de almidón estabilizada al 1%

Disolver 140 g de cloruro de sodio grado purísimo en 375 ml de agua destilada, añadir 5 g de almidón soluble disuelto en 5 ml de agua destilada, calentar a ebullición durante 2 o 3 min, enfriar y filtrar.

B.13.1.5 Procedimiento

B.13.1.5.1 Determinación del título de la solución de 2,6-diclorofenol-indofenol (D.I.)

Pipetear 3 ml de solución estándar de ácido ascórbico (B.13.1.4.2) en un vaso de 100 ml, añadir aproximadamente 30 ml de ácido meta-fosfórico al 2% y 5 ml de ácido acético al 10%. Valorar con la solución D.I. utilizando un agitador mecánico hasta la aparición de una coloración rosa que persista durante 15 seg.

Ejemplo:

Para 2 ml de solución estándar (= 1,5 mg de ácido ascórbico), volumen empleado 5,84 ml de reactivo:

$$\text{Título } T = \frac{1,5}{5,84} = 0,257$$

es decir, 1 ml de solución D.I. corresponde a 0,257 mg de ácido ascórbico.

B.13.1.5.2 Preparación de la porción para ensayo

B.13.1.5.2.1 Producto sin o con poco almidón. Por ejemplo leche en polvo.

Pesar con una precisión de 0,1 g una cantidad del producto a analizar que contenga aproximadamente 5 a 10 mg de ácido ascórbico; en la mayoría de los casos se pesan 10 g en un matraz aforado de 100 ml.

Añadir 20 ml de ácido meta-fosfórico al 10% y 50 ml de agua destilada a 55°C. Sacudir vigorosamente durante 10 min. Enfriar y llevar a volumen con agua destilada.

Filtrar rápidamente sobre un filtro plegado, al abrigo de la luz. Las soluciones que filtran demasiado lento deben centrifugarse a 3000 rpm durante 10 min, decantarse y filtrarse por un filtro plegado o sobre lana de vidrio.

B.13.1.5.2.2 Productos con almidón, por ejemplo cereales

En un vaso de 100 ml pesar exactamente una porción para ensayo de 10 a 20 g. Añadir 5% (0,5 a 1 g) de diastasa y 20 ml de agua destilada. Mezclar mediante una varilla de vidrio de modo que se obtenga una papilla homogénea e incubar 15 min en una estufa a 40°C. Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml con 20 ml de solución de ácido meta-fosfórico al 10%; llevar a volumen con agua destilada y agitar vigorosamente. Filtrar sobre un filtro plegado con una velocidad de filtración media.

B.13.1.5.2.3 Productos heterogéneos, por ejemplo verdura, fruta

Homogeneizar una muestra de 50 a 100 g con un volumen de ácido meta-fosfórico de 10% representando 1/5 del volumen total al que será ajustada la mezcla.

Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 250 ml y llevar a volumen con agua destilada.

Centrifugar o filtrar la solución obtenida sobre un filtro plegado.

B.13.1.6 Determinación

Tomar una parte alícuota del filtrado correspondiente, de 1-2 mg de ácido ascórbico. Añadir 5 ml de ácido acético al 10% (10 ml para un volumen de filtrado de 30 a 50 ml), valorar luego con D.I. hasta que se obtenga una coloración rosa que persista durante 15 seg.

Generalmente, deben utilizarse 5 a 10 ml de reactivo para la valoración. Un volumen de reactivo que excede 10 ml no es aconsejable, ya que la solución tiene tendencia a volverse grisácea en estas condiciones.

Nota:

Preparar las muestras a medida que se valoran.

B.13.1.7 Cálculo y expresión de los resultados

B.13.1.7.1 Cálculo y fórmula

El contenido de ácido ascórbico expresado en mg por 100 g de producto es igual a:

$$\text{Ácido ascórbico}_{\text{mg}/100\text{g}} = \frac{a \times T}{v} \times \frac{V}{m} \times 100$$

En donde:

a = ml de reactivo empleados

T = título del reactivo

v = ml de filtrado empleados

V = ml de solución de la toma de ensayo

m = toma de ensayo

Expresar el valor obtenido con una precisión de 0,1 mg.

B.13.2 Valoración con un potenciómetro (medidor de pH)

B.13.2.1 Preparación de la toma de ensayo

La solución se prepara según las indicaciones dadas para la valoración visual.

Tomar una parte alícuota de la solución a valorar que contenga 1 a 2 mg de ácido ascórbico. Añadir 5 ml de ácido acético al 10%.

B.13.2.2 Determinación

Colocar el recipiente de valoración, que contiene la solución a valorar y una barra magnética, sobre un agitador magnético.

Sumergir un electrodo de platino combinado en la solución.

Ajustar el potenciómetro a una alta sensibilidad y llevar la aguja hacia el punto 0, o a un valor que corresponda a aproximadamente 1/6 de la escala, si el punto 0 se encuentra al comienzo de la misma.

Añadir, mediante una bureta motorizada, porciones de reactivo de 0,1 ml a intervalos de 5 seg. La aguja del potenciómetro sube ligeramente con cada adición de reactivo, pero baja de nuevo inmediatamente.

El punto alcanzado por la aguja, 5 seg después de cada adición de reactivo comienza por ser cada vez más bajo para subir de nuevo progresivamente.

Cuando la amplitud de oscilación de la aguja aumente y el punto alcanzado 5 seg después de la adición del reactivo es netamente más alto, añadir el reactivo en porciones de 0,05 ml y esperar antes de cada nueva adición hasta que la aguja baje de nuevo ligeramente.

Proseguir de esta manera hasta que la aguja baje de nuevo muy poco, añadir luego muy pequeñas porciones de reactivo hasta que la aguja no baje más, sino que permanezca en el punto alcanzado después de la última adición de reactivo.

Este punto será considerado como el punto de equivalencia. Anotar el número de ml de reactivo utilizados para alcanzar dicho punto.

B.13.2.3 Cálculo y expresión de los resultados

B.13.2.3.1 Cálculo

El contenido en ácido ascórbico expresado en mg/100 g de producto es igual a:

$$\text{Ácido ascórbico}_{\text{mg}/100\text{g}} = \frac{a \times T}{v} \times \frac{V}{m} \times 100$$

En donde:

a = ml de reactivo correspondiente al punto de equivalencia

T = concentración del reactivo

v = ml de filtrado empleados

V = volumen en ml de la solución de la toma de ensayo

m = toma de ensayo en g

B.13.2.3.2 Expresar el valor obtenido con una precisión de 0,1 mg.

B.13.2.4 Repetibilidad

$$s = 0,24 \text{ mg } (0 = 10)$$

$$\text{Coeficiente de variación } \frac{s}{x} = 0,5\%$$

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones, simultáneamente o rápidamente una después de otra por el mismo analista, no debe exceder 0,8 mg para un producto que contenga aproximadamente 50 mg de ácido ascórbico por 100 g.

B.14 DETERMINACION DE TIAMINA (VITAMINA B₁) Y RIBOFLAVINA (VITAMINA B₂) POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

B.14.1 Fundamento

La vitamina B₁, es extraída de la muestra por hidrólisis ácida y oxidada a tiocromo, su contenido es determinado por HPLC en fase inversa con detección fluorométrica.

B.14.2 Reactivos y materiales

B.14.2.1 Reactivos

Acido clorhídrico fumante, 37% para análisis (HCl)

Acetato de sodio trihidratado, para análisis

(CH₃ x CO₂Na x 3H₂O)

Acido orto-fosfórico PO₄H₃ (P₂O₅ x 3H₂O)

Ferricianuro de potasio, para análisis Fe(CN)₆K₄ x 3H₂O

Hidróxido de sodio en lentejas, para análisis.

Monohidrato de tiamina (nitrate de tiamina, Vitamina B₁ monohidratada), calidad alimentaria (C₁₂H₁₇N₅O₄S)

Papaína soluble.

Amilasa

Diastasa

N,N - Dimetilformamida $\text{HCON}(\text{CH}_3)_3$

fosfato, ácido de-potasio, para análisis ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$)

B.14.2.2 Materiales

Matraces en forma de pera, 100 ml

Tapones huecos hexagonales

Matraces aforados, de vidrio de 1000, 100, 50 y 10 ml

Embudos de vidrio de 100 mm de diámetro

Matraces Erlenmeyer, de cuello estrecho, 250 ml

Refrigerante, Allihn, manguito 300 mm

Filtros plisados medianos 185 mm de diámetro

Pipetas aforadas con una marca de 2, 3, 5 y 40 ml

Pipetas graduadas hasta la punta de 1 ml: 0,005

Probetas graduadas, en forma alta, de 50 ml: 0,5; 100 ml: 1,0

1000 ml: 10

Todo el material de vidrio debe ser actínico o forrado con papel aluminio.

B.14.2.3 Aparatos e instrumentos

Balanza analítica, 162 g, lectura 0,1 mg

Balanza de precisión electrónica, 2100 g, lectura 0,01 g

Baño de agua en línea con soportes, 6 plazas.

Estufa de laboratorio

Jeringuilla para HPLC, de un 1 ml

Aguja para jeringuilla

Columna ODS o C 18, 5 μm , 250 x 4,6 mm; o equivalente

Dispositivo de filtración sobre membrana

Membrana para filtro

B.14.4 Preparación de soluciones

B.14.4.1 Solución de ácido clorhídrico

En un matraz aforado de 1000 ml que contenga aproximadamente 500 ml de agua destilada, añadir con cuidado 82 ml de ácido clorhídrico al 37% y llevar a volumen con agua destilada. Trabajar en campana de extracción.

B.14.4.2 Solución de acetato de sodio 2,5 M.

En un matraz aforado de 1000 ml disolver 340 g de acetato de sodio trihidratado en agua destilada y llevar a volumen.

B.14.4.3 Hidróxido de sodio, solución de 150 g/l

En un matraz aforado de 1000 ml, disolver 160 g de hidróxido de sodio en lentejas en agua destilada, llevar a volumen.

Conservar en un matraz provisto de un tapón de polietileno.

B.14.4.4 Solución de oxidación

B.14.4.4.1 Solución de ferricianuro de potasio 1g/100 ml

En un matraz aforado de 100 ml disolver, 1 g de ferricianuro de potasio en agua destilada y llevar a volumen.

B.14.4.4.2 Solución a preparar justo antes del uso

En un matraz aforado de 50 ml, llevar a volumen 2 ml de solución (B.14.4.4.1) con solución (B.14.4.3).

B.14.5 Fase móvil para HPLC**B.14.5.1** Solución de fosfato ácido de-potasio, 10 mM pH 7,2.

En un vaso de 1000 ml pesar exactamente 2,28 g de fosfato de-potasio, disolver en aproximadamente 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,2 con ácido clorhídrico 1 N (B.14.4.1). Transferir a un matraz aforado de 1000 ml y llevar a volumen con agua destilada. Degasificar bajo presión reducida y filtrar.

B.14.5.2 Solución de dimetilformamida al 15% en fosfato ácido de potasio.

En un matraz aforado de 1000 ml agregar 150 ml de dimetilformamida y llevar a volumen con solución (B.14.5.1).

B.14.6 Solución patrón de vitamina B₁**B.14.6.1** Solución concentrada

En un matraz aforado de 50 ml de vidrio, pesar exactamente 50,0 mg de monohidrato de tiamina y disolver en agua destilada. Añadir 5 ml de ácido clorhídrico 1 N (B.14.4.1) y llevar a volumen con agua destilada. Esta solución contiene 1 mg/ml.

B.14.6.2 Soluciones diluidas

En un matraz aforado de 50 ml, agregar mediante una pipeta, 5 ml de solución (B.14.6.1) y llevar a volumen con agua destilada. Luego verter mediante una pipeta, 5 ml de esta solución (100 µg/ml) en un matraz aforado de 50 ml y llevar a volumen con agua destilada. Esta solución contiene 10 µg/ml.

Verter, mediante una pipeta, 5 ml de esta solución en un matraz aforado de 50 ml y llevar a volumen con agua destilada. Esta solución contiene 1 µg/ml.

B.14.6.3 Preparar de la misma manera solución concentrada de riboflavina y de manera subsecuente las soluciones diluidas. No es necesario utilizar matraces de vidrio.

B.14.6.4 Solución patrón oxidada para HPLC

Mediante una pipeta, verter 5 ml de solución (B.14.6.2) en un matraz aforado de 10 ml de vidrio. Añadir 3 ml de solución de ferricianuro de potasio básico (B.14.4.4.2). Agitar durante 2 min, añadir 0,45 ml de ácido fosfórico concentrado, mezclar, enfriar y llevar a volumen con agua destilada. Cromatografiar esta solución inmediatamente.

B.14.7 Procedimiento

La vitamina B₁ no es sensible a la luz; en cambio el producto oxidado, el tiocromo, sí lo es. Durante la etapa de oxidación, utilizar material de vidrio actínico, o material de vidrio corriente protegido con papel aluminio.

B.14.7.1 Toma de ensayo

Homogeneizar toda la muestra, mezclando o moliendo y pesar con una aproximación de 10 mg, una toma de ensayo de 5 g.

Para la determinación de vitamina B₂ adicionar 0,5 g de amilasa y 0,25 g de papaína, independientemente de si el producto contiene almidón o no.

B.14.7.1.1 Productos con almidón

En un matraz en forma de pera de 100 ml de vidrio con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con 0,5 g de diastasa y 0,25 g de papaína. Añadir máximo 15 ml de agua destilada de 45 a 50°C. Mezclar bien, a fin de obtener una suspensión homogénea. Tapar el matraz y colocarlo durante 30 min en una estufa a 40°C. Añadir a continuación 30 ml de agua destilada de 45 a 50°C.

B.14.7.1.2 Productos sin almidón, inclusive polvos para bebidas que contengan cacao

En un matraz en forma de pera de 100 ml de vidrio con cuello esmerilado mezclar la toma de ensayo con 45 ml de agua destilada de 45 a 50°C. Mezclar bien, a fin de obtener una suspensión homogénea.

B.14.7.2 Hidrólisis**B.14.7.2.1** Productos con o sin almidón, excepto polvos para bebidas que contengan cacao

Añadir 5 ml de ácido clorhídrico 1 N al matraz (B.14.7.1.1 o B.14.7.1.2). Mezclar bien, calentar durante 30 min bajo el reflujo en un baño de agua en ebullición. Al cabo de 15 min, agitar el matraz para deshacer los aglomerados.

Enfriar y añadir 5 ml de acetato de sodio 2,5 M (B.14.4.2). Mezclar bien. Transferir cuantitativamente el contenido del matraz a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada.

Filtrar a través de un filtro plisado. La solución está lista para la oxidación.

B.14.7.2.2 Polvos para bebidas que contengan cacao

Proceder según (B.14.7.2.1) hasta el enfriamiento después de la hidrólisis. Transferir cuantitativamente el contenido del matraz a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada.

Filtrar a través de un filtro plisado. Luego verter, mediante una pipeta, 40 ml de filtrado en un matraz aforado de 50 ml (procedimiento especial para bebidas que contienen cacao por tener polifenoles que interfieren en la reacción de B₁). Añadir 5 ml de acetato de sodio 2,5 M (B.14.4.2) y llevar a volumen con agua destilada.

La solución está lista para la oxidación

B.14.7.3 Oxidación

En un matraz aforado de 10 ml de vidrio verter, mediante una pipeta, 5 ml de solución (B.14.7.2.1 o B.14.7.2.2). Añadir 3 ml de solución de ferricianuro de potasio básico (B.14.4.4.2). Agitar durante 2 min. Añadir 0,45 ml de ácido fosfórico concentrado, mezclar, enfriar y llevar a volumen con agua destilada. Cromatografiar esta solución inmediatamente.

B.14.7.4 HPLC

Condiciones

Columna:	ODS o C 18, 5 µm; 250 X 4,6 mm o equivalente
Loop de inyección:	50 µl
Fase móvil:	ver punto 15.5.2
Caudal:	1,5 ml/min
*Detector:	espectrofluorímetro, excitación: 368 nm emisión: 440 nm
Registrador:	10 mm/min

*Para la determinación de vitamina B2 se inyecta directamente del filtrado y se modifica la siguiente condición:

Detector:	espectrofluorímetro; excitación: 450 nm
	emisión: 530 nm

Inyectar primero 50 µl de solución patrón oxidada B.14.6.4 y determinar el tiempo de retención: debe ser de aproximadamente 5-6 min. A continuación inyectar 50 µl de la solución obtenida B.14.7.3.

B.14.8 Cálculo, expresión e interpretación de los resultados

B.14.8.1 Evaluación

Identificar el pico del tiocromo o de la riboflavina en el cromatograma de la toma de ensayo mediante el tiempo de retención definido por cromatografía de la solución patrón. Medir la altura de los picos obtenidos al cromatografía la toma de ensayo y la solución patrón.

El contenido de vitamina B₁, expresado en mg por 100 g de producto, es igual a:

$$\text{Vitamina B}_{1 \text{ mg}/100 \text{ g}} = \frac{hP \times C \times V \times 100}{hS \times m \times 1000}$$

En donde:

m = masa de la toma de ensayo, en g

hP = altura del pico del extracto, en mm

hS = altura del pico de la solución patrón, en mm

C = concentración de la solución patrón, en µg/ml

V = volumen, en mililitros, en el cual se ha diluido el extracto antes del análisis por HPLC (250 para polvos para bebidas que contengan aromas, 200 para los demás productos)

B.14.8.2 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio) en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder 10% de la media entre ambos resultados.

B.15 DETERMINACION DE NIACINA (VITAMINA B₃) POR METODO MICROBIOLOGICO

B.15.1 Fundamento

Este método permite cuantificar concentraciones desconocidas de niacina utilizando *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, microorganismo que no puede sintetizar esta vitamina, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de niacina. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio libre de niacina y el crecimiento celular se cuantifica turbidimétricamente. Por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra.

B.15.2 Reactivos y materiales

B.15.2.1 Reactivos

Acido nicotínico para fines bioquímicos

Acido clorhídrico fumante 37% para análisis

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

B.15.2.2 Materiales

Micropipeta

Vasos de precipitados

Pipetas volumétricas

Matraces Erlenmeyer

Matraces volumétricos

Tubos de ensaye

B.15.3 Aparatos e instrumentos

Autoclave

Incubadora a $35 \pm 1^\circ\text{C}$

Espectrofotómetro

Centrífuga

B.15.4 Cepa y medios de cultivo

Lactobacillus plantarum ATCC 8014

Leche descremada en polvo grado reactivo

Caldo micro inoculum

Agar bacteriológico

Caldo Bacto Lactobacilli

Medio de prueba para niacina

B.15.4.1 Medio de mantenimiento de la cepa

Bacto Lactobacilli MRS-agar (MRS-agar)

Preparar 1 l de medio con 55 g de caldo Bacto Lactobacilli MRS + 15 g de agar bacteriológico según las indicaciones de la etiqueta del caldo MRS + 1,5% de leche descremada (reconstituida al 10% en agua destilada). Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición vertical.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

B.15.4.2 Mantenimiento de la cepa

Inocular por punción *Lactobacillus plantarum* en profundidad en el medio (B.15.4.1) cada cuatro semanas, efectuar un cultivo intermedio de 18 h en el medio líquido (B.15.4.3). Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 18 h a 35°C.

B.15.4.3 Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo

Caldo Micro Inoculum

Preparar 1 l de solución según las indicaciones de la etiqueta y repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

B.15.5 Preparación de soluciones**B.15.5.1 Solución fisiológica**

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

B.15.5.2 Solución de ácido clorhídrico aproximadamente 1 N

Bajo una campana de extracción diluir 82 ml de ácido clorhídrico al 37% llevándolos a un volumen de 1000 ml con agua destilada. Para ello verter el ácido en el matraz aforado que ya contiene agua.

B.15.5.3 Solución de hidróxido de sodio 15 N.

Disolver 300 g de hidróxido de sodio en agua destilada, enfriando bajo agua del grifo. Completar a 500 ml en una probeta graduada. Conservar en un frasco con tapón de polietileno o de goma.

B.15.5.4 Solución de Hidróxido de sodio aproximadamente 1 N

Disolver 20 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno.

B.15.5.5 Solución patrón

Justo antes del uso, pesar exactamente 50,0 mg de ácido nicotínico; disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml.

B.15.6 Procedimiento**B.15.6.1 Desarrollo del microorganismo**

Un día antes subcultivar en 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 18 h a 35°C.

Seis horas antes de la inoculación del ensayo, inocular 2 gotas (aproximadamente 0,1 ml) del último cultivo de 18 h en otro tubo de 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 6 h a 35°C.

B.15.6.2 Preparación de la toma de ensayo

En un matraz Erlenmeyer de 150 ml, pesar de 1 a 3 g de muestra homogénea, que contenga aproximadamente 200 µg de vitamina, añadir 50 ml de solución de ácido clorhídrico 1N en pequeñas cantidades pasando el matraz Erlenmeyer bajo el grifo de agua corriente después de cada adición.

Cubrir el matraz con papel de aluminio y colocarlo en el autoclave durante 15 min a 120°C. Enfriar.

Ajustar el pH a 4,6 añadiendo primero aproximadamente 3 ml de hidróxido de sodio de 60 g/100 ml mientras se enfría el matraz Erlenmeyer, y luego hidróxido de sodio 1 N. Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 0,05 µg de vitamina por ml.

B.15.6.3 Solución patrón, 0,05 µg/ml

Justo antes del uso diluir la solución 16.5.5 como sigue:

5 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml = 0,05 µg/ml

B.15.6.4 Medio de cultivo para el ensayo

Medio de prueba para niacina

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio actínico de 100 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón:	30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml
cada producto:	10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml
+ 50 a 100 ml de exceso	

B.15.6.5 Preparación del ensayo

B.15.6.5.1 Serie patrón

En un soporte metálico para tubos de ensayo, colocar tres filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados: bl, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.:	bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón: (ml)	0,00	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00	2,50	3,00
Agua: (ml)	5,00	5,00	4,75	4,50	4,25	4,00	3,50	3,00	2,50	2,00
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo										

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

B.15.6.5.2 Serie producto

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18, y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante un pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No.:	9	10	11	12	13
Solución de la muestra:	0,25	0,50	0,75	1,0	1,50 ml
Agua:	4,75	4,50	4,25	4,0	3,50 ml
Medio de cultivo:	5	ml	en	cada	tubo

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

B.15.6.6 Esterilización del ensayo

Esterilizar los tubos durante 10 min a 121°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

B.15.6.7 Inoculación

B.15.6.7.1 Preparación y estandarización del inóculo

Justo antes de inocular el ensayo, transferir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo (B.15.6.1) a un tubo de centrifuga estéril, centrifugar a 2600 rpm durante 5 min, decantar y resuspender el paquete celular en 10 ml de solución salina. Hacer dos lavados más. Transferir a una cubeta de 1 cm y efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 575 nm. Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre aproximadamente la misma extinción. No debe olvidarse sustraer de la extinción del cultivo la del medio de ensayo, que es un medio coloreado.

Según la extinción, diluir "n" gotas del cultivo (B.15.6.1) en un tubo que contenga 10 ml de medio (B.15.6.4). Este tubo es el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo (B.15.6.1) entre 0,2 y 0,4 (después de sustraer la extinción propia del medio), introducir de 4 a 8 gotas de cultivo en el tubo que contiene 10 ml de medio (B.15.6.4). Si la extinción no se encuentra en la zona arriba mencionada, adaptar la dilución como sigue:

-extinción inferior a 0,2: introducir proporcionalmente más gotas en el tubo (no más de 10 gotas).
-extinción superior a 0,4: introducir menos gotas o diluir proporcionalmente con el medio (B.15.6.4).

B.15.6.7.2 Inoculación

Mediante una micropipeta con punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

B.15.6.8 Incubación

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 18 a 24 h a 35°C. Observar los tubos con regularidad al cabo de las 16 h. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

B.15.6.9 Lecturas

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transferir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% de T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl).*

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

* **Nota:** Si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transferencia.

B.15.7 Cálculos

B.15.7.1 Curva de calibración

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico, o utilizar una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los µg de vitamina a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	µg	lecturas			media
			1	2	3	
0	0,00	0,0000	88,7	88,6	88,2	88,5
1	0,25	0,0125	73,4	72,6	71,1	72,4
2	0,50	0,0250	62,1	61,5	62,6	62,1
3	0,75	0,0375	53,3	53,2	55,5	54,0
4	1,00	0,0500	47,3	48,0	49,1	48,1
5	1,50	0,0750	36,8	37,7	40,5	38,3
6	2,00	0,1000	31,0	(45,6)	39,5	35,3
7	2,50	0,1250	30,5	27,2	27,2	28,3
8	3,00	0,1500	29,0	24,8	24,0	25,9

() = valor aberrante

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

B.15.7.2 Contenido de vitamina en el producto

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	lecturas		media	µg*	µg/ml
		1	2			
9	0,25	(88,0)	79,0	79,0	0,0070	0,028
10	0,50	59,2	58,2	58,7	0,0300	0,060
11	0,75	52,0	52,2	52,1	0,0413	0,055
12	1,00	43,8	45,8	44,8	0,0580	0,058
13	1,50	35,1	35,5	35,3	0,1000	0,067

Media 0,0503 = (C)

() = valor aberrante

* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en mg/100 g de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de vitamina, expresado en mg de ácido nicotínico por 100 g de producto es igual a:

$$\text{Ácido nicotínico}_{mg/100g} = \frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

En donde:

C = media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en µg/ml

V₁ = volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V_2 = parte alícuota de V_1 en ml

V_3 = volumen al que se ha diluido la parte alícuota V_2 , en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

272 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 100 ml (V_1). Se ha tomado una parte alícuota de 2 ml (V_2), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V_3).

La media de las concentraciones de niacina leídas en la curva de calibración es 0,0576 µg/ml (C).

El contenido de vitamina es:

$$\text{Ácido nicotínico}_{mg/100g} = \frac{0,0576 \times 100 \times 100 \times 100}{2,072 \times 2 \times 1000} = 13.9 \text{ mg} / 100 \text{ g}$$

B.16 DETERMINACION DE PIRIDOXINA (VITAMINA B₆) POR METODO MICROBIOLOGICO

B.16.1 Fundamento

Este método permite cuantificar concentraciones desconocidas de vitamina B6 utilizando *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080, microorganismo que no puede sintetizar esta vitamina, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de Piridoxina. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio libre de Piridoxina y el crecimiento celular se cuantifica turbidimétricamente. Por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra.

B.16.2 Reactivos y materiales

B.16.2.1 Reactivos

Clorhidrato de Piridoxina para fines bioquímicos

Acido clorhídrico fumante al 37% para análisis

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

Acetato de sodio trihidratado para análisis

B.16.2.2 Materiales

Micropipeta

Matraz Erlenmeyer de vidrio de 250 ml

Matraz aforado de vidrio de 100, 250 y 500 ml

Tapón de vidrio

Frascos con cápsula de polietileno a presión

Material común de laboratorio

Todo el material de vidrio debe ser actínico o forrado con aluminio.

B.16.3 Aparatos e instrumentos

Autoclave

Incubadora a $30 \pm 1^\circ\text{C}$

Espectrofotómetro

Centrífuga

B.16.4 Cepa y medios de cultivo

Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080

Agar de micro ensayo

Medio de prueba para Piridoxina

B.16.4.1 Medio de mantenimiento de la cepa

Agar de microensayo

Preparar 1 l de medio según las indicaciones de la etiqueta. Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición inclinada, a fin de obtener una pendiente lo más larga posible (agar inclinado).

Conservar en el refrigerador de 2 a 8°C.

B.16.4.2 Mantenimiento de la cepa

Inocular por estría *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 en superficie en el medio (B.16.4.1) cada dos semanas. Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 24 h a 30°C.

B.16.4.3 Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo

Piridoxina y medio para prueba, solución 1:1, enriquecida con 1 ng de vitamina B6/ml.

Diluir 1 ml de solución patrón B.16.5.7 a 100 ml. Añadir 1 ml de esta dilución a 500 ml de medio de cultivo B.16.6.4 y completar a 1 l con agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador de 2 a 8°C.

B.16.5 Preparación de soluciones**B.16.5.1 Solución fisiológica**

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador de 2 a 8°C.

B.16.5.2 Solución de ácido clorhídrico aproximadamente 0,44 N

Bajo una campana de extracción diluir 36,5 ml de ácido clorhídrico al 37% a 100 ml con agua destilada. Para ello verter el ácido en el matraz aforado que ya contiene agua.

B.16.5.3 Solución de ácido clorhídrico aproximadamente 0,055 N

Bajo una campana de extracción diluir 4,5 ml de ácido clorhídrico al 37% a 1000 ml con agua destilada. Para ello verter el ácido en el matraz aforado que ya contiene agua.

B.16.5.4 Solución de hidróxido de sodio, 60 g/100 ml

Disolver 300 g de hidróxido de sodio en agua destilada, enfriando bajo agua del grifo. Completar a 500 ml en una probeta graduada. Conservar en un frasco con tapón de polietileno o de goma.

B.16.5.5 Solución de hidróxido de sodio aproximadamente 1 N

Disolver 20 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno.

B.16.5.6 Solución de acetato de sodio aproximadamente 2,5 M

En un matraz aforado de 500 ml disolver 170 g de acetato de sodio trihidratado en agua destilada y llevar a volumen.

B.16.5.7 Solución patrón

Pesar exactamente 50,0 mg de piridoxina; disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml. Conservar esta solución congelada en fracciones de 5 ml durante máximo 6 meses.

B.16.6 Procedimiento

La vitamina B6 es fotosensible. Por lo tanto, para todas las soluciones que contienen dicha vitamina se debe utilizar material actínico o cubrir el material de vidrio corriente con papel de aluminio o paño negro.

B.16.6.1 Desarrollo del microorganismo

Tres días antes de la inoculación del ensayo, efectuar dos cultivos sucesivos de 24 h en superficies de agar. Un día antes del ensayo, subcultivar el microorganismo tomado del último cultivo sobre agar, en un tubo del medio líquido B.16.4.3.

Incubar durante 24 h a 30°C.

B.16.6.2 Preparación de la toma de ensayo

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, pesar de 1 a 2 g de muestra homogénea, que contenga por lo menos 2 µg de vitamina. Poner en suspensión en 180 ml de:

Solución de ácido clorhídrico 0,44 N si el producto contiene almidón.

Solución de ácido clorhídrico 0,055 N si el producto no contiene almidón.

Cubrir el matraz con papel de aluminio y colocarlo en el autoclave durante 1 h a 125°C. Enfriar.

Después de enfriar añadir:

3 ml de solución de hidróxido de sodio (B.16.5.4) si el producto contiene almidón.

8 ml de solución de acetato de sodio (B.16.5.6) si el producto no contiene almidón.

Ajustar el pH a 4,6 con solución de hidróxido de sodio 1 N. Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 250 ml y llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 5 ng de vitamina por ml.

B.16.6.3 Solución patrón, 5 ng/ml

Justo antes del uso diluir la solución B.10.5.7 como sigue:

5 ml a 100 ml

5 ml a 100 ml

5 ml a 250 ml = 5 ng/ml

B.16.6.4 Medio de cultivo para el ensayo

Medio Y para prueba de piridoxina

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1000 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón:	30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml
cada producto:	10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml
+ 50 a 100 ml de exceso	

B.16.6.5 Preparación del ensayo**B.16.6.5.1** Serie patrón

En un soporte metálico para tubos de ensayo, colocar tres filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0, ..., 8; el primero corresponde al blanco (bl).

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.: bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2	2,5	3,0 ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,0	2,5	2 ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo									

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

B.16.6.5.2 Serie producto

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18 y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante una pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No.: 9	10	11	12	13
Solución de la muestra: 0,25	0,50	0,75	1,0	1,50 ml
Agua: 4,75	4,50	4,25	4,0	3,50 ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo				

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

B.16.6.6 Esterilización del ensayo

Esterilizar los tubos durante 10 min a 115°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

B.16.6.7 Inoculación

B.16.6.7.1 Preparación y estandarización del inóculo

Justo antes de inocular el ensayo, transferir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo (B.16.4.1) a un tubo de centrifuga estéril, centrifugar a 1000 rpm durante 2 min. Decantar la solución y lavar el sedimento 3 veces con 10 ml de solución fisiológica estéril, centrifugando y decantando la solución después de cada lavado.

Suspender el sedimento en 5 ml de solución fisiológica. Diluir de 3 a 4 gotas de esta suspensión en un tubo que contenga 10 ml de solución fisiológica. Este tubo es el inóculo.

B.16.6.7.2 Inoculación

Mediante una micropipeta con punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

B.16.6.8 Incubación

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 19 h a 30°C. Dado que *Saccharomyces carlsbergensis* es aerobio, inclinar los tubos al máximo a fin de que la superficie de contacto entre el líquido y el aire sea la mayor posible.

Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

B.16.6.9 Lecturas

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transferir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% de T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl).*

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

* **Nota:** Si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transmitancia.

B.16.7 Cálculos

B.16.7.1 Curva de calibración

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico o utilizar una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los μg de vitamina a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	μg	lecturas			media
			1	2	3	
0	0,0	0,0	91,2	90,6	90,5	90,7
1	0,25	1,25	70,4	70,0	70,2	70,2
2	0,50	2,5	51,5	54,6	55,5	53,9
3	0,75	3,75	42,2	44,4	44,5	43,7
4	1,0	5,0	33,8	33,2	34,5	33,8
5	1,5	7,5	23,2	24,3	26,0	24,5
6	2	10	20,0	18,5	19,2	19,2
7	2,5	12,5	15,1	15,2	15,7	15,3
8	3,0	15,0	14,2	13,2	13,2	13,5

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

B.16.7.2 Contenido de vitamina en el producto

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	lecturas		media	μg^*	$\mu\text{g/ml}$
		1	2			
9	0,25	(80)	68,3	68,3	1,20	4,78
10	0,50	51,5	54,5	53,0	2,435	4,85
11	0,75	43,5	41,1	42,3	3,615	4,81
12	1	34,9	33,7	34,3	4,95	4,95
13	1,5	23,9	25,1	24,5	7,47	4,987

Media 4,87 =(C)

() = valor aberrante

* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en mg/100 g de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de vitamina, expresado en mg de clorhidrato de piridoxina por 100 g de producto es igual a:

$$\text{Clorhidrato de piridoxina}_{mg/100\ g} = \frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

En donde:

C = media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en ng/ml

V₁ = volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V₂ = parte alícuota de V₁ en ml

V₃ = volumen al que se ha diluido la parte alícuota V₂, en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

232 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 250 ml (V₁). Se ha tomado una parte alícuota de 10 ml (V₂), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V₃).

La media de las concentraciones de piridoxina leídas en la curva de calibración es 4,87 ng/ml (C).

El contenido de vitamina es:

$$\text{Clorhidrato de piridoxina}_{mg/100\ g} = \frac{4,87 \times 100 \times 250 \times 100}{2,032 \times 10 \times 1000 \times 1000} = 0,599\ mg / 100\ g$$

B.17 DETERMINACION DE ACIDO FOLICO (VITAMINA B₉) POR METODO MICROBIOLOGICO

B.17.1 Fundamento

Este método permite cuantificar ácido fólico utilizando *Lactobacillus casei* ATCC 7469, microorganismo que no puede sintetizar esta vitamina, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de folato presente. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio comercial libre de folato. El crecimiento celular se mide turbidimétricamente y por interpolación en la curva se determina la concentración en la muestra.

B.17.2 Reactivos y materiales

B.17.2.1 Reactivos

Cloruro de calcio fundido o granulado para análisis

Fosfato diácido de potasio anhidro

Fosfato ácido di-potásico anhidro

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

Alcohol etílico absoluto

α-amilasa

Lactosa

B.17.2.2 Materiales

Matraz Erlenmeyer de vidrio de 250 ml

Matraz aforado de vidrio de 100, 250 y 500 ml

Tapones de vidrio

Micropipetas

Material común de laboratorio

Todo el material de vidrio debe ser actínico o forrado con papel aluminio.

B.17.3 Aparatos e instrumentos

Autoclave

Incubadora a $35 \pm 1^\circ\text{C}$

Espectrofotómetro

Centrífuga

B.17.4 Cepa y medios de cultivo

Lactobacillus casei ATCC 7469

Leche descremada en polvo grado reactivo

Caldo Micro Inoculum

Agar bacteriológico

Caldo Bacto Lactobacilli MRS

Medio de prueba para ácido fólico

B.17.4.1 Medio de mantenimiento de la cepa

Bacto Lactobacilli MRS-agar (MRS-agar)

Preparar 1 l de medio con 55 g de caldo Bacto Lactobacilli MRS + 15 g de agar bacteriológico, según las indicaciones de la etiqueta del caldo MRS + 1,5% de leche descremada (reconstituida al 10% en agua destilada). Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición vertical.

Conservar en el refrigerador a 4°C .

B.17.4.2 Mantenimiento de la cepa

Inocular por punción *Lactobacillus casei* en profundidad en el medio (B.17.4.1) cada cuatro semanas, efectuando un cultivo intermedio de 18 h en el medio líquido (B.17.4.3). Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 18 h a 35°C .

B.17.4.3 Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo

Caldo Micro Inoculum

Preparar 1 l de solución según las indicaciones de la etiqueta y repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador a 4°C .

B.17.5 Preparación de soluciones

B.17.5.1 Solución fisiológica

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1 000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C .

Conservar en el refrigerador de 2 a 8°C .

B.17.5.2 Solución tampón pH 6,1

Disolver 2 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno.

B.17.5.3 Solución de cloruro de calcio, CaCl_2 , al 2%

Disolver 2 g de cloruro de calcio en agua destilada y completar a 100 ml en un matraz aforado.

B.17.5.4 Solución patrón

Pesar exactamente 50,0 mg de ácido fólico (ácido pteroilglutámico), disolver en agua destilada en un matraz aforado de vidrio de 500 ml, añadir 50 ml de NaOH 0,1 N, 100 ml de alcohol y llevar a volumen con agua destilada.

Conservar esta solución a 4°C durante máximo 6 meses.

B.17.6 Procedimiento

El ácido fólico es fotosensible. Por lo tanto, para todas las soluciones que contienen dicha vitamina se debe utilizar material de vidrio actínico o cubrir el material de vidrio corriente con papel de aluminio o un paño negro.

B.17.6.1 Desarrollo del microorganismo

Un día antes, subcultivar en 10 ml de caldo Micro Inoculum (B.17.4.3).

Incubar durante 18 h a 35°C.

Seis horas antes de la inoculación del ensayo, inocular 2 gotas (aproximadamente 0,1 ml) del último cultivo de 18 h en otro tubo de 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 6 h a 35°C.

B.17.6.2 Preparación de la toma de ensayo

B.17.6.2.1 Productos sin almidón

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, pesar de 1 a 3 g de muestra homogénea, que contenga aproximadamente 1 µg de ácido fólico. Disolver en 30 ml de solución tampón pH 6,1 (B.17.5.2). A fin de evitar la formación de grumos, añadir la solución tampón en pequeñas cantidades pasando el matraz Erlenmeyer bajo el grifo de agua caliente.

Cubrir el matraz con papel de aluminio y colocar en el autoclave durante 20 min a 102°C. Enfriar.

Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de vidrio de 100 ml. Añadir al contenido del matraz 0,8 ml de solución de cloruro de calcio al 2% y agitar. Dejar reposar durante 15 min, luego llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 0,2 ng de ácido fólico por ml.

B.17.6.2.2 Productos con almidón

Proceder según el primer apartado bajo (B.17.6.2.1).

Antes de colocar la solución en el autoclave, añadir una cantidad de mezcla al 6% de α -amilasa pancreática en lactosa, correspondiente a 1% de la toma de ensayo.

Incubar durante 30 min a 42°C. Cubrir el matraz con papel de aluminio y colocar en el autoclave durante 20 min a 102°C. Enfriar. A continuación transferir cuantitativamente a un matraz aforado de vidrio de 100 ml y proseguir como se describe en (B.17.6.2.1)

Nota: Con cada nuevo lote de diastasa efectuar un ensayo en blanco.

Mediante una pipeta tomar 10 ml de solución patrón (B.17.6.3) dilución d. Añadir 30 ml de agua. Añadir 100 mg de mezcla al 6% de α -amilasa pancreática en lactosa. Incubar durante 30 min a 42°C. Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml. Llevar a volumen y filtrar.

La curva de calibración obtenida con esta solución debe ser comparable a aquella obtenida con la solución patrón no tratada.

B.17.6.3 Solución patrón 0,2 ng/ml

Justo antes del uso diluir la solución 18.5.4 como sigue:

10 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml

2 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml = 0,2 ng/ml

B.17.6.4 Medio de cultivo para el ensayo

Medio para prueba de ácido fólico.

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1000 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón:	30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml
cada producto:	10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml
+ 50 ml a 100 ml de exceso	

B.17.6.5 Preparación del ensayo**B.17.6.5.1 Serie patrón**

En un soporte metálico para tubos de ensaye, colocar 3 filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0, ..., 8; el primero corresponde al blanco.

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.: bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2	2,5	3,0 ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,0	2,5	2 ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo									

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

B.17.6.5.2 Serie producto

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18 y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante una pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No.: 9	10	11	12	13
Solución de la muestra: 0,25	0,50	0,75	1,0	1,50 ml
Agua: 4,75	4,50	4,25	4,0	3,50 ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo				

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

B.17.6.6 Esterilización del ensayo

Esterilizar los tubos durante 10 min a 121°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

B.17.6.7 Inoculación

B.17.6.7.1 Preparación y estandarización del inóculo

Justo antes de inocular el ensayo, transferir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo (B.17.6.1) a un tubo de centrifuga estéril, centrifugar a 2600 rpm durante 5 min, decantar y resuspender el paquete celular en 10 ml de solución salina. Hacer dos lavados más. Transferir a una cubeta de 1 cm y efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 575 nm. Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre aproximadamente la misma extinción. No debe olvidarse sustraer de la extinción del cultivo la del medio de ensayo, que es un medio coloreado.

Según la extinción, diluir "n" gotas del cultivo (B.17.6.1) en un tubo que contenga 10 ml de medio (B.17.6.4). Este tubo es el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo (B.17.6.1) entre 0,40 y 0,60 (después de sustraer la extinción propia del medio), introducir 5 gotas de cultivo en el tubo que contiene 10 ml de medio (B.17.6.4). Si la extinción no se encuentra en la zona arriba mencionada, adaptar la dilución como sigue:

- extinción inferior a 0,40: introducir proporcionalmente más gotas en el tubo (no más de 10 gotas)
- extinción superior a 0,60: introducir menos gotas o diluir proporcionalmente con el medio (B.17.6.4).

B.17.6.7.2 Inoculación

Mediante una micropipeta de punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

B.17.6.8 Incubación

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 19 h a 35°C. Observar los tubos con regularidad al cabo de las 19 h. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

B.17.6.9 Lecturas

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transferir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% de T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl).

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

B.17.7 Cálculos

B.17.7.1 Curva de calibración

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico o mediante una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los µg de ácido fólico a la abscisa.

***Nota:** Si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transmitancia.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	µg	lecturas			media
			1	2	3	
0	0,0	0,0	88,1	87,6	87,5	87,7

1	0,25	0,05	78,4	78,5	79,5	78,8
2	0,50	0,1	70,5	70,4	71,3	70,7
3	0,75	0,15	64,1	64,6	64,6	64,4
4	1,0	0,20	58,9	59,6	59,3	59,3
5	1,5	0,30	50,8	51,3	51,4	51,2
6	2	0,40	44,7	44,1	45,5	44,8
7	2,5	0,50	39,7	39,7	38,2	39,2
8	3,0	0,60	35,6	36,1	35,2	35,6

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es tanto mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

B.17.7.2 Contenido de vitamina en el producto

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	lecturas		media	µg*	µg/ml
		1	2			
9	0,25	80,2	79,4	79,8	0,045	0,18
10	0,50	71,6	73,7	72,6	0,095	0,19
11	0,75	66,1	67,7	66,9	0,135	0,18
12	1	61,4	(56,5)	61,4	0,185	0,185
13	1,5	53,7	52,1	52,9	0,280	0,187

Media 0,184 (=C)

() = valor aberrante

* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en µg/100 g de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de ácido fólico, expresado en µg/100 g de producto es igual a:

$$\text{Ácido fólico } \mu\text{g}/100\text{g} = \frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

En donde:

C = media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en ng/ml

V₁ = volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V₂ = parte alícuota de V₁, en ml

V₃ = volumen al que se ha diluido la parte alícuota V₂, en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

1 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 100 ml (V_1). Se ha tomado una parte alícuota de 10 ml (V_2), que se ha diluido en un matraz aforado de 250 ml (V_3).

La media de las concentraciones en ácido fólico leídas en la curva de calibración es 0,184 ng/ml (C).

El contenido en ácido fólico es:

$$\text{Ácido fólico } \mu\text{g}/100\text{g} = \frac{0,184 \times 250 \times 100 \times 100}{1 \times 10 \times 1000} = 46,0 \mu\text{g} / 100 \text{g}$$

B.18 DETERMINACION DE PANTOTENATO DE CALCIO POR METODO MICROBIOLOGICO

B.18.1 Fundamento

Este método permite cuantificar pantotenato de calcio utilizando un microorganismo que no es capaz de sintetizarlo (*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014); el crecimiento celular se relaciona directamente con la concentración de pantotenato presente.

Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio basal libre de pantotenato. El crecimiento celular se mide turbidimétricamente y por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra.

B.18.2 Reactivos y materiales

B.18.2.1 Reactivos

Leche descremada en polvo grado reactivo

Calcio D(+) pantotenato para fines bioquímicos

Acido acético glacial 100% para análisis

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

Papaína

Diastasa

B.18.2.2 Materiales

Mortero de porcelana, interior esmaltado, diámetro 80 mm.

Pistilo de porcelana, cabeza esmaltada, longitud 75-80 mm (serruchado, si es demasiado largo)

Probeta graduada de 100 ml

Material común de laboratorio

B.18.3 Aparatos e instrumentos

Autoclave

Incubadora a $35 \pm 1^\circ\text{C}$

Espectrofotómetro

Micropipeta

Centrífuga

B.18.4 Ceba y medios de cultivo

Lactobacillus plantarum, ATCC 8014

Caldo Micro Inoculum

Agar bacteriológico

Caldo Bacto Lactobacilli MRS

Medio de prueba para pantotenato

B.18.4.1 Medio de mantenimiento de la cepa

Bacto Lactobacilli MRS-agar (MRS-agar)

Preparar 1 l de medio de agar bacteriológico con 55 g de caldo Bacto Lactobacilli MRS + 15 g agar bacteriológico, según las indicaciones de la etiqueta del caldo MRS+1,5% de leche descremada (reconstituida al 10% en agua destilada). Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición vertical.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

B.18.4.2 Mantenimiento de la cepa

Inocular por punción *Lactobacillus plantarum* en profundidad en el medio (B.18.4.1) cada cuatro semanas, efectuando un cultivo intermedio de 18 h en el medio líquido B.18.4.3. Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 18 h a 35°C.

B.18.4.3 Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo

Caldo micro Inoculum

Preparar 1 l de solución según las indicaciones de la etiqueta y repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

B.18.5 Preparación de soluciones**B.18.5.1 Solución fisiológica**

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador a 4°C.

B.18.5.2 Solución de ácido acético aproximadamente 1 N

Diluir 29 ml de ácido acético glacial en 500 ml con agua destilada.

B.18.5.3 Solución de hidróxido de sodio, aproximadamente 1 N

Disolver 20 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno.

B.18.5.4 Solución tampón pH 4,6

En un matraz aforado de 500 ml, mezclar 100 ml de ácido acético 1 N con 50 ml de hidróxido de sodio (B.17.5.3) y llevar a volumen con agua destilada.

B.18.5.5 Solución patrón

Justo antes del uso, pesar exactamente 50,0 mg de pantotenato de calcio; disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml.

B.18.6 Procedimiento**B.18.6.1 Desarrollo del microorganismo**

Un día antes, subcultivar en 10 ml de caldo Micro Inoculum (B.18.4.3).

Incubar durante 18 a 24 h a 35°C.

Seis horas antes de la inoculación del ensayo, inocular 2 gotas (aproximadamente 0,1 ml) del último cultivo de 18 h en otro tubo de 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 6 h a 35°C.

B.18.6.2 Preparación de la toma de ensayo

Próximo a la determinación, pesar en pequeños morteros de porcelana de 1-2 g de muestra homogénea, que contenga aproximadamente 50 µg de pantotenato de calcio. Añadir 100 mg de papaína y 50 mg de diastasa. Moler todo cuidadosamente mediante el pistilo.

Mojar la mezcla con 10 ml de solución tampón pH 4,6 (B.18.5.4). Cubrir los morteros y los pistilos con papel de aluminio y a continuación colocarlos en una estufa.

Incubar una noche a 42°C.

Después de la incubación, verificar el pH y ajustarlo a 4,6 si es necesario. Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 0,05 µg de pantotenato de calcio por ml.

Observación: Con cada nuevo lote de diastasa y de papaína, efectuar un ensayo en blanco:

Tratar 5 g de papaína o de diastasa como la toma de ensayo. Sin diluir, proceder según (B.18.6.5.2). El contenido de pantotenato de calcio de la enzima no debe rebasar 1 mg/100 g.

B.18.6.3 Solución patrón, 0,05 µg/ml

Justo antes del uso diluir la solución 17.5.5 como sigue:

5 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml

10 ml a 100 ml = 0,05 µg/ml

B.18.6.4 Medio de cultivo para el ensayo

Medio de prueba para pantotenato.

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1000 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón:	30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml
cada producto:	10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml
+ 50 a 100 ml de exceso	

B.18.6.5 Preparación del ensayo

B.18.6.5.1 Serie patrón

En un soporte metálico para tubos de ensayo, colocar tres filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0, ..., 8; el primero corresponde al blanco (bl).

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.: bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución Patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2	2,5	3,0 ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,0	2,5	2 ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo									

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

B.18.6.5.2 Serie producto

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18 y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante una pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No.: 9	10	11	12	13
Solución de la muestra: 0,25	0,50	4,75	1,0	1,50 ml
Agua: 4,75	4,50	4,25	4,0	3,50 ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo				

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

Esterilizar los tubos durante 15 min a 115°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

B.18.6.6 Inoculación

B.18.6.6.1 Preparación y estandarización del inóculo

Justo antes de inocular el ensayo, transferir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo (B.18.6.1) a un tubo de centrifuga estéril, centrifugar a 2600 rpm durante 5 min, decantar y resuspender el paquete celular en 10 ml de solución salina. Hacer dos lavados más. Transferir a una cubeta de 1 cm y efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 575 nm. Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre aproximadamente la misma extinción. No debe olvidarse sustraer de la extinción del cultivo la del medio de ensayo, que es un medio coloreado.

Según la extinción, diluir "n" gotas del cultivo (B.18.6.1) en un tubo que contenga 10 ml de medio (B.18.6.4). Este tubo es el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo (B.18.6.1) entre 0,2 y 0,4 (después de sustraer la extinción propia del medio), introducir de 4 a 8 gotas de cultivo en el tubo que contiene 10 ml de medio (B.18.6.4). Si la extinción no se encuentra en la zona arriba mencionada, adaptar la dilución como sigue:

- extinción inferior a 0,2: introducir proporcionalmente más gotas en el tubo (no más de 10 gotas).
- extinción superior a 0,4: introducir menos gotas o diluir proporcionalmente con el medio (B.18.6.4).

B.18.6.6.2 Inoculación

Mediante una micropipeta de punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

B.18.6.7 Incubación

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 16 h a 35°C. Observar los tubos con regularidad al cabo de las 16 h. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

B.18.6.8 Lecturas

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transferir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl). *

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

* **Nota:** Si la determinación se hace en absorbancia, buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transmitancia.

B.18.7 Cálculos

B.18.7.1 Curva de calibración

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico, o mediante una calculadora con regresión lineal llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los μg de pantotenato de calcio a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	μg	lecturas			media
			1	2	3	
0	0,0	0,0	99,0	98,9	99,7	99,2
1	0,25	0,0125	93,0	92,2	91,0	92
2	0,50	0,025	82,8	83,3	82,9	83,0
3	0,75	0,0375	72,3	70,2	73,0	71,8
4	1,0	0,050	57,4	58,9	64,2	60,1
5	1,5	0,075	39,8	36,5	39,8	38,7
6	2	0,100	26,9	27,0	27,2	27,0
7	2,5	0,125	22,4	20,2	21,0	21,2
8	3,0	0,150	18,9	17,1	18,9	18,3

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es tanto mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

B.18.7.2 Contenido de vitamina en el producto

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	lecturas		media	μg^*	$\mu\text{g/ml}$
		1	2			
9	0,25	(81)	92,1	92,1	0,0119	0,0476
10	0,50	82,7	81,7	82,2	0,0252	0,0504
11	0,75	71,4	72,2	71,8	0,038	0,0507
12	1	57,2	58,8	58,0	0,050	0,0500
13	1,5	37,9	39,1	38,5	0,076	0,0507

Media 0,0498(=C)

() = valor aberrante

* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en $\text{mg}/100\text{ g}$ de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de pantotenato de calcio expresado en $\text{mg}/100\text{ g}$ de producto es igual a:

$$\text{Pantotenato de calcio}_{mg/100g} = \frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

En donde:

C = media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en µg/ml

V₁ = volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V₂ = parte alícuota de V₁, en ml

V₃ = volumen al que se ha diluido la parte alícuota V₂, en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

1,127 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 100 ml (V₁). Se ha tomado una parte alícuota de 10 ml (V₂), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V₃).

La media de las concentraciones de pantotenato de calcio leídas en la curva de calibración es 0,0498 µg/ml (C).

El contenido de pantotenato de calcio es:

$$\text{Pantotenato de calcio}_{mg/100g} = \frac{0,0498 \times 100 \times 100 \times 100}{1,127 \times 10 \times 1000} = 4,42 \text{ mg} / 100 \text{ g}$$

B.19 DETERMINACION DE CIANOCOBALAMINA (VITAMINA B₁₂) POR METODO MICROBIOLÓGICO

B.19.1 Fundamento

Este método permite cuantificar cianocobalamina utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830, microorganismo que no puede sintetizar esta vitamina, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de cianocobalamina presente. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio comercial libre de cianocobalamina. El crecimiento celular se mide turbimétricamente y por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra. El análisis debe realizarse con baja intensidad de luz porque la vitamina B₁₂ es fotosensible.

B.19.2 Reactivos y materiales

B.19.2.1 Reactivos

Vitamina B₁₂ para fines bioquímicos

Acido clorhídrico fumante al 37% para análisis

Cianuro de sodio (CN) para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

Hipoclorito de sodio

Diastasa

B.19.2.2 Materiales

Micropipetas

Centrífuga

Matraz en forma de pera de vidrio de 100 ml

Matraz aforado de vidrio de 100 y 500 ml

Matraz Erlenmeyer de vidrio de 250 ml

Baño de agua

Refrigerante Allihn

Frascos con cápsula de polietileno a presión de 8 ml

Tapón de vidrio

Pera de goma, propipeta

Material común de laboratorio

Todo el material de vidrio debe ser actínico o forrado con papel aluminio.

B.19.3 Aparatos e instrumentos

Autoclave

Incubadora a $35 \pm 1^\circ\text{C}$

Espectrofotómetro

B.19.4 Cepa y medios de cultivo

Lactobacillus leichmannii ATCC 7830

Leche descremada en polvo grado reactivo

Caldo micro inoculum

Agar bacteriológico

Caldo Bacto Lactobacilli MRS

Medio de prueba para vitamina B₁₂

B.19.4.1 Medio de mantenimiento de la cepa

Bacto Lactobacilli MRS-agar (MRS-agar)

Preparar 1 l de medio con 55 g de caldo Bacto Lactobacilli MRS + 15 g de agar bacteriológico, según las indicaciones de la etiqueta del caldo MRS + 1,5% de leche descremada (reconstituida al 10% en agua destilada). Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición vertical.

Conservar en el refrigerador de 2 a 8°C.

B.19.4.2 Mantenimiento de la cepa

Inocular por punción *Lactobacillus leichmannii* en profundidad en el medio (B.19.4.1) cada cuatro semanas, efectuando un cultivo intermedio de 18 h en el medio líquido (B.19.4.3). Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 18 h a 35°C.

B.19.4.3 Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo

Caldo Micro Inoculum

Preparar 1 l de solución según las indicaciones de la etiqueta y repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador de 2 a 8°C.

B.19.5 Preparación de soluciones

B.19.5.1 Solución fisiológica

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador 2 a 8°C.

B.19.5.2 Solución de ácido clorhídrico aproximadamente 1 N

Bajo una campana de extracción diluir 82 ml de ácido clorhídrico al 37% llevándolos a un volumen de 1000 ml con agua destilada, para ello verter el ácido en el matraz aforado que ya contiene agua.

B.19.5.3 Solución de cianuro de sodio, 10 g /100 ml

CUIDADO: VENENO. UTILIZAR GUANTES.

En un matraz aforado de 100 ml disolver 10 g de cianuro de sodio en agua destilada y llevar a volumen.

Conservar en el refrigerador 2 a 8°C.

B.19.5.4 Solución de cianuro de sodio al 1%

Justo antes del uso, tomar mediante una pipeta y una pera de goma, 1/ml de solución de cianuro de sodio (B.19.5.3) y diluir a 10 ml con agua destilada en un matraz aforado de 10 ml.

Nota: La solución sobrante de cianuro de sodio al 1% debe destruirse mediante adición de solución de hipoclorito de sodio al 15% (aproximadamente 1 ml por 10 ml de solución de cianuro de sodio). Dejar reaccionar durante 2 días bajo una campana de extracción.

B.19.5.5 Solución patrón

Pesar exactamente 50,0 mg de vitamina B₁₂; disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de vidrio de 500 ml. Verificar la concentración de la solución como sigue:

Diluir 1 ml de solución con 3 ml de agua destilada. Medir la extinción de dicha solución en una cubeta de 1 cm a 360 nm.

$$f = \frac{100 \times E}{0,517}$$

En donde:

f = contenido de vitamina B₁₂, en %

E = extinción leída

Corregir la concentración de la solución proporcionalmente según el ejemplo:

$$0,1 \text{ ng / ml } \frac{f}{100} = 0,076 \text{ ng / ml}$$

para f = 76

Eliminar la solución si el valor de f es inferior a 70%

Conservar esta solución congelada en porciones de 5 ml en matraces actínicos durante máximo 6 meses.

B.19.6 Procedimiento

La vitamina B₁₂ es fotosensible. Por lo tanto, para todas las soluciones que contienen dicha vitamina se debe utilizar material de vidrio actínico o cubrir el material de vidrio corriente con papel de aluminio o un paño negro.

B.19.6.1 Desarrollo del microorganismo

Un día antes, subcultivar en 10 ml de caldo Micro Inoculum (B.19.4.3).

Incubar durante 18 h a 35°C.

Seis horas antes de la inoculación del ensayo, inocular 2 gotas (aproximadamente 0,1 ml) del último cultivo de 18 h en otro tubo de 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 18 a 24 h a 35°C.

B.19.6.2 Preparación de la toma de ensayo

En un matraz de 100 ml con esmerilado normalizado, pesar de 3 a 4 g de muestra homogénea, que contenga aproximadamente 100 ng de vitamina B₁₂.

Disolver la toma de ensayo en 25 ml de agua destilada a 50°C. A fin de evitar la formación de grumos, añadir el agua destilada en pequeñas cantidades agitando cada vez.

Añadir 0,2 ml de solución de cianuro de sodio (B.19.5.4) recién preparada (CUIDADO: VENENO) y agitar.

Dejar la solución durante 30 min a temperatura ambiente, al abrigo de la luz y agitar de vez en cuando. Al cabo de este tiempo, ajustar el pH de 4,8 - 5 con solución de ácido clorhídrico 1 N. A continuación calentar el matraz durante 35 min en un baño de agua en ebullición. Enfriar (*). Ajustar el pH a 4,6. Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

* Para productos con almidón se recomienda aplicar un tratamiento enzimático a fin de obtener un filtrado límpido. Añadir a la solución la cantidad de diastasa equivalente al 10% de la toma de ensayo. Incubar durante 30 min a 42°C.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 0,05 ng de vitamina B₁₂/ml.

Nota: con cada nuevo lote de diastasa efectuar un ensayo en blanco.

Tratar 3 g de diastasa como la toma de ensayo. El contenido de vitamina B₁₂ de la diastasa no debe rebasar 0,5 µg/100 g.

B.19.6.3 Solución patrón 0,05 ng/ml

Justo antes del uso diluir la solución (B.19.5.5) como sigue:

10 ml a 100 ml

5 ml a 100 ml

5 ml a 100 ml

2 ml* a 100 ml = 0,05 ng/ml

* + 0,2 ml de cianuro de sodio (CUIDADO VENENO)

B.19.6.4 Medio de cultivo para el ensayo

Medio para prueba de vitamina B₁₂

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1000 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón:	30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml
cada producto:	10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml
+ 50 ml a 100 ml de exceso	

B.19.6.5 Preparación del ensayo

B.19.6.5.1 Serie patrón

En un soporte metálico para tubos de ensayo, colocar 3 filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0, ..., 8; el primero corresponde al blanco.

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.: bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2	2,5	3,0 ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,0	2,5	2 ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo									

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

B.19.6.5.2 Serie producto

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18, y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante una pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No.: 9	10	11	12	13
Solución de la muestra: 0,25	0,50	0,75	1,0	1,50 ml
Agua: 4,75	4,50	4,25	4,0	3,50 ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo				

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

B.19.6.6 Esterilización del ensayo

Esterilizar los tubos durante 10 min a 115°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

B.19.6.7 Inoculación

B.19.6.7.1 Preparación y estandarización del inóculo

Justo antes de inocular el ensayo, transferir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo (B.19.6.1) a un tubo de centrifuga estéril, centrifugar a 2600 rpm durante 5 min, decantar y resuspender el paquete celular en 10 ml de solución salina. Hacer dos lavados más. Transferir a una cubeta de 1 cm y efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 575 nm. Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre aproximadamente la misma extinción. No debe olvidarse sustraer de la extinción del cultivo la del medio de ensayo, que es un medio coloreado.

Según la extinción, diluir "n" gotas del cultivo (B.19.6.1) en un tubo que contenga 10 ml de medio (B.19.6.4). Este tubo es el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo (B.19.6.1) entre 1,10 y 1,25 (después de sustraer la extinción propia del medio), introducir 2 gotas de cultivo en el tubo que contiene 10 ml de medio (B.19.6.4). Si la extinción no se encuentra en la zona arriba mencionada, adaptar la dilución como sigue:

-extinción inferior a 1,10: introducir proporcionalmente más gotas en el tubo (no más de 3 gotas)
-extinción superior a 1,25: diluir proporcionalmente con el medio (B.19.6.4).

B.19.6.7.2 Inoculación

Mediante una micropipeta de punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

B.19.6.8 Incubación

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 18 a 24 h a 35°C. Observar los tubos con regularidad al cabo de las 14 h. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

B.19.6.9 Lecturas

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transferir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl). *

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

* Nota: Si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transmitancia.

B.19.7 Cálculos

B.19.7.1 Curva de calibración

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico o mediante una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los ng de vitamina B₁₂ a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	µg	lecturas			media
			1	2	3	
0	0,0	0,0	95,1	95,0	95,1	95,0
1	0,25	0,0125	82,2	80,9	82,4	81,8
2	0,50	0,025	67,5	67,0	66,1	66,9
3	0,75	0,0375	55,0	56,5	57,5	56,3
4	1,0	0,050	48,5	48,9	47,2	48,2
5	1,5	0,075	37,1	37,8	36,8	37,2
6	2	0,100	30,5	30,5	30,3	30,4
7	2,5	0,125	25,4	23,2	24,4	24,3
8	3,0	0,150	20,2	21,2	20,0	20,5

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es tanto mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

B.19.7.2 Contenido de vitamina en el producto

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	lecturas		media	µg*	µg/ml
		1	2			
9	0,25	(93)	81,8	81,8	0,0131	0,0524
10	0,50	66,1	65,3	65,7	0,0263	0,0526
11	0,75	54,8	56,8	55,8	0,038	0,0507
12	1	48,5	48,1	48,3	0,049	0,0490
13	1,5	37	38	37,5	0,077	0,0513

Media 0,0512(=C)

() = valor aberrante

* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de vitamina B₁₂, expresado en $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de producto es igual a:

$$\text{Vitamina B}_{12} \mu\text{g}/100\text{ g} = \frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

En donde:

C = media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en ng/ml

V₁ = volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V₂ = parte alícuota de V₁, en ml

V₃ = volumen al que se ha diluido la parte alícuota V₂, en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

246 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 100 ml (V₁). Se ha tomado una parte alícuota de 20 ml (V₂), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V₃).

La media de las concentraciones en vitamina B₁₂ leídas en la curva de calibración es 0,0512 ng/ml (C).

El contenido en vitamina B₁₂ es:

$$\text{Vitamina B}_{12} \mu\text{g}/100\text{ g} = \frac{0,0512 \times 100 \times 100 \times 100}{2,046 \times 20 \times 1000} = 1,25 \mu\text{g} / 100\text{ g}$$

B.20 DETERMINACION DE VITAMINA K₁ POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

B.20.1 Fundamento

Se extrae la fracción liposoluble de una muestra en un tubo de centrifuga o mediante una columna de tierra de infusorios. Se separan las grasas en una columna HPLC preparativa y se recoge la fracción que contiene la vitamina K₁. Se inyecta esta fracción en una columna HPLC analítica y se determina el contenido de vitamina K₁ mediante un detector espectrofotométrico.

B.20.2 Reactivos y materiales

B.20.2.1

Dimetilsulfóxido (DNSO) para síntesis

Alcohol etílico absoluto para análisis

n-Hexano grado purísimo

Isooctano para análisis

Acetonitrilo para cromatografía

Vitamina K1

Pirogalol para análisis

Diclorometano para cromatografía

Papaína soluble

Tetrahidrofurano para análisis

20 columnas preparadas para extracción de sustancias lipófilas de soluciones acuosas

Envase de repuesto para 50 rellenos de la columna

Diastasa

B.20.2.2 Materiales

Tubos para centrífuga de vidrio de 40 ml

Tapones huecos hexagonales de diferentes medidas

Matraces en forma de pera de 10 ml

Matraces en forma de pera de vidrio de 25 y 250 ml

Pipetas graduadas hasta la punta de 1 ml: 0,005; 5 ml: 0,05; 10 ml: 0,10 y 20 ml: 0,10

Micromatraz aforado de precisión de 2 ml

Matraces aforados de vidrio de 10, 50 y 100 ml

Filtro con poro de 0,45 μm

Nota: Utilizar material de vidrio actínico cuidadosamente lavado, con el fin de evitar que sea fuente de contaminación.

B.20.3 Aparatos e instrumentos

Jeringuilla para HPLC de 1 ml y de aguja intercambiable

Aguja para jeringuilla de HPLC

Cilindro para gas comprimido, N_2

Manodentor para gas comprimido, N_2

Agitador para tubos de ensaye

Estufa de laboratorio

Instalación de HPLC que consta de:

Para cromatografía preparativa: una bomba, un inyector (loop de 500 μl), una columna preparativa, un detector de longitud de onda variable, un registrador para cromatografía analítica: una bomba, un inyector (loop de 100 μl), una columna analítica, un detector de longitud de onda variable, un registrador.

Para una determinación por día, basta con un detector de longitud de onda variable y un solo registrador para ambos sistemas.

Balanza de precisión

Balanza analítica, 162 g; 0,1 mg

Centrífuga

Placa con pinzas para tubos de centrífuga

Mesa vibrante, movimiento alternante

Baño ultrasónico

B.20.4 Preparación de soluciones**B.20.4.1 Solución de pirogalol de 1 g/100 ml**

El día de la determinación disolver en un matraz aforado de 25 ml, 250 mg de pirogalol en alcohol etílico.

B.20.4.2 Fase móvil para HPLC preparativa: 1% de acetato de etilo en isooctano.

En un matraz aforado de 1 000 ml, mezclar 10 ml de acetato de etilo con isooctano previamente degasificado bajo presión reducida y filtrado. Llevar a volumen.

B.20.4.3 Fase móvil para purificar la columna preparativa: 10% de acetato de etilo en isooctano.

En un matraz aforado de 500 ml, mezclar 50 ml de acetato de etilo con isooctano previamente degasificado bajo presión reducida y filtrado. Llevar a volumen.

B.20.4.4 Fase móvil para HPLC analítica: acetonitrilo-diclorometano-propanol-2 89:10:1 v/v/v

Degasificar 1 litro de acetonitrilo bajo presión reducida y filtrar sobre una membrana.

En un matraz aforado de 1 000 ml, mezclar 100 ml de diclorometano y 10 ml de propanol-2 con acetonitrilo y llevar a volumen.

B.20.4.5 Soluciones patrón de vitamina K₁

En un matraz aforado de 100 ml, pesar exactamente 40 mg de vitamina K₁ (fitomenadiona). Disolver y llevar a volumen con n-hexano. Esta es la solución 1 de 0,40 mg/ml. Se conserva una semana a 4°C.

Justo antes de la determinación, efectuar las diluciones siguientes con n-hexano:

Solución 2: diluir 5 ml de solución 1 en un matraz aforado de 50 ml (40 µg/ml).

Solución 3: diluir 5 ml de solución 2 en un matraz aforado de 50 ml (4 µg/ml). Determinar la concentración exacta de vitamina K₁ midiendo la extinción (E) a 248 nm.

E ¹ % en n-hexano = 435

1 cm

Solución 4: diluir 5 ml de solución 3 en un matraz aforado de 50 ml (0,4 µg/ml). Utilizar esta solución como patrón en la cromatografía preparativa para determinar el tiempo de retención.

Solución 5: Mediante una pipeta, vertir 1 ml de solución 3 en un matraz aforado de 10 ml; evaporar a sequedad el disolvente bajo una ligera corriente de nitrógeno. Disolver y llevar a volumen con la fase móvil (B.23.4.4). Utilizar esta solución (0,4 µg/ml) como patrón en la cromatografía analítica.

B.20.5 Procedimiento**B.20.5.1** Preparación de la toma de ensayo**B.20.5.1.1** Extracción en tubos de centrífuga**B.20.5.1.1.1** Productos sólidos

Pesar 20 g de producto en un matraz aforado de 100 ml. Añadir 50 ml de agua a 45°C, luego 0,1 g de diastasa; a continuación, incubar durante 20 min a 40°C. Introducir 0,1 g de papaína e incubar de nuevo durante 20 min a 40°C. Llevar a volumen con agua a temperatura ambiente. La suspensión debe ser homogénea; si no, colocar el matraz en un baño ultrasónico durante unos 5 min. Tomar 5 ml de suspensión e introducir en un tubo de centrífuga de vidrio provisto de un esmerilado. Añadir 10 ml de dimetilsulfóxido y mezclar. Introducir 5 ml de solución de pirogalol y agitar. Luego añadir 10 ml de n-hexano y agitar el tubo vigorosamente durante 10 min mediante una mesa vibrante. Centrifugar el tubo, a fin de separar las dos fases líquidas.

Transferir la fase superior a otro tubo de centrífuga.

Añadir 10 ml de n-hexano al primer tubo y agitar, luego centrifugar igual que arriba. Tomar la fase superior y añadir a la que ya se ha recuperado.

B.20.5.1.1.2 Productos líquidos

Pesar 5 g de producto homogéneo en un tubo de centrífuga de vidrio provisto de un esmerilado. Añadir 10 ml de dimetilsulfóxido y mezclar bien. Añadir 5 ml de solución de pirogalol y agitar. Luego añadir 10 ml de n-hexano y agitar el tubo vigorosamente durante 5 min mediante una mesa vibrante. Centrifugar el tubo, a fin de separar las dos fases líquidas.

Transferir la fase superior a otro tubo de centrífuga.

Añadir 10 ml de n-hexano al primer tubo y agitar, luego centrifugar igual que arriba. Tomar la fase superior y añadir a la que ya se ha recuperado.

B.20.5.1.1.3 Lavado del extracto

En el tubo de centrifuga que contiene la fase orgánica, añadir 10 ml de agua destilada. Agitar vigorosamente durante 5 min mediante la mesa vibrante y centrifugar.

Mediante una pipeta Pasteur tomar lo mejor posible la fase orgánica, que debe ser límpida y transferirla a un matraz en forma de pera de vidrio de 50 ml. Añadir 2 ml de n-hexano en la superficie de la fase acuosa, tomar de nuevo la fase orgánica e introducir en el matraz.

B.20.5.1.2 Extracción mediante la columna de tierra de infusorios.

B.20.5.1.2.1 Productos sólidos

En un matraz aforado de 100 ml de vidrio, pesar 2 g de producto. Añadir 0,200 g de papaína, luego 25 ml de agua a 45°C. Mezclar bien, utilizar un baño ultrasónico si es necesario para deshacer los grumos. Incubar durante 30 min en la estufa a 40°C. Añadir 10 ml de dimetilsulfóxido y agitar el matraz durante 5 min mediante una mesa vibrante. Enfriar el matraz si es necesario y añadir 40 ml de tetrahidrofurano. Agitar el matraz vigorosamente durante 10 min. Llevar a volumen con agua y mezclar bien.

B.20.5.1.2.2 Productos líquidos

En un matraz aforado de 10 ml de vidrio, pesar 10 g de producto. Añadir 0,200 g de papaína y mezclar bien. Incubar durante 30 min en la estufa a 40°C. A continuación añadir 20 ml de agua y 10 ml de dimetilsulfóxido y agitar el matraz durante 5 min mediante una mesa vibrante. Enfriar el matraz si es necesario y añadir 40 ml de tetrahidrofurano. Agitar el matraz vigorosamente durante 10 min. Llevar a volumen con agua y mezclar bien.

B.20.5.1.2.3 Preparación de la columna de extracción

Colocar el filtro circular de 10 mm en el portafiltro inferior e introducir éste en el cuerpo de la columna. Rellenar la columna con el contenido de un sobre y agitar de 10 a 20 seg mediante un vibrador de reactivos.

Presionar el filtro circular de 24 mm en el anillo con borde reforzado del recambio y deslizar éste dentro del cuerpo de la columna hasta que el filtro se encuentre sobre la superficie del relleno.

Fijar una aguja a la conexión Luer, situada en el extremo inferior de la columna; sujetar ésta mediante una pinza.

B.20.5.1.2.4 Llenado de la columna y elución

Mediante una pipeta aforada transferir 20 ml del contenido del matraz aforado (B.20.5.1.2.1 o B.20.5.1.2.2) a la columna de extracción B.20.5.1.2.3. Evitar arrastrar sedimento durante esta operación. Al cabo de 15 min eluir lentamente con 100 ml de n-hexano. La fase acuosa debe permanecer absorbida en la columna. Recoger el eluato en un matraz en forma de pera de 250 ml de vidrio. Interrumpir la operación a más tardar 30 min después que todo el n-hexano haya penetrado en la columna.

B.20.5.2 Evaporación del extracto y preparación del extracto final de la toma de ensayo.

Evaporar la solución (B.20.5.1.1.3 o B.20.5.1.2.4) bajo presión reducida y eliminar las últimas trazas de disolvente mediante una ligera corriente de nitrógeno. Recuperar el residuo cuantitativamente con la fase móvil y transferir a un matraz aforado de 5 ml para la extracción en tubos de centrifuga o de 2 ml para la extracción en columnas. Filtrar sobre una membrana antes de inyectar en la columna HPLC.

B.20.5.3 Cromatografía preparativa

Mantener el sistema HPLC preparativo con las características siguientes:

Columna:	Lichrosorb-Si 60, 5 µm, 8 x 120 mm, o equivalente.
Loop:	500 µl
Fase móvil:	ver punto 23.4.2
Caudal:	3 ml/min
Detector:	Espectrofotómetro 254 nm, 0,05 AUFS
Registrador:	10 mm/min

Inyectar primero 0,500 ml de solución patrón 4 y determinar el tiempo de retención aproximado debe ser de 5 a 7 min. A continuación inyectar 0,500 ml de solución de extracto y recoger la fracción que contiene la vitamina K₁ en un matraz en forma de pera de 10 ml de vidrio, comenzando unos 30 seg antes de que se eluya la vitamina K₁; interrumpir la operación unos 30 seg después de que haya sido eluida la vitamina K₁.

B.20.5.4 Limpieza de la columna preparativa

A fin de eliminar rápidamente todas las impurezas retenidas por la columna durante la cromatografía preparativa, aumentar la polaridad de la fase móvil utilizando una mezcla al 10% de acetato de etilo en isooctano (B.20.4.3). Esta operación dura aproximadamente de 10 a 15 min.

Volver a introducir la fase móvil (B.20.4.2) y eluir hasta obtener una línea de base estable (aproximadamente 10 min). La columna está lista para otra inyección preparativa.

B.20.5.5 Cromatografía analítica

Evaporar a sequedad bajo una ligera corriente de nitrógeno la fracción recogida bajo (B.20.5.3). Recuperar el residuo con 250 µl de fase móvil (B.20.4.4); agitar suavemente para disolver bien el residuo.

Montar el sistema HPLC analítico con las características siguientes:

Columna:	Spherisorb ODS, 5 µm, 4,6 x 250 mm, o equivalente.
Loop:	100 µl
Fase móvil:	ver punto 23.4.4
Caudal:	2 ml/min
Detector:	espectrofotómetro 248 nm, 0,01 AUFS
Registrador:	10 mm/min

Inyectar primero 0,100 ml de solución patrón 5 y determinar el tiempo de retención aproximado: debe ser aproximadamente de 5 min. A continuación inyectar 0,100 ml de la fracción obtenida más arriba.

Medir la altura de los picos correspondientes a la vitamina K₁ en el patrón así como en el extracto.

Nota: El grado de silanización de la columna en fase inversa puede variar. Si es necesario, ajustar el porcentaje de diclorometano contenido en la fase móvil B.20.4.4 a fin de obtener un tiempo de retención de unos 5 min. Si el tiempo de retención es demasiado largo o demasiado corto, aumentar o disminuir respectivamente la cantidad de diclorometano.

B.20.6 Cálculo y expresión de resultados.

El contenido de vitamina K₁ (fitomenadiona), en µg/100 g de producto, es igual a:

Productos líquidos, con tratamiento de extracción en tubos de centrifuga:

$$\text{Vitamina K}_1 \text{ } \mu\text{g}/100 \text{ g} = \frac{h_2 \times C \times V_0 \times V_2 \times 100}{h_1 \times V_1 \times m}$$

Productos sólidos, con tratamiento de extracción en tubos de centrifuga; productos sólidos y líquidos con tratamiento de extracción en columnas:

$$\text{Vitamina K}_1 \text{ } \mu\text{g}/100 \text{ g} = \frac{h_2 \times C \times V_0 \times V_2 \times 100 \times V}{h_1 \times V_3 \times V_1 \times m}$$

En donde:

h₂ = altura del pico del extracto, en mm

C = concentración de la solución patrón, en µg/ml (en general 0,4 µg/ml)

V₀ = volumen de extracto obtenido bajo B.20.5.2 (en general 5 ó 2 ml)

V_2 = volumen en el cual ha sido diluida la fracción después de la cromatografía preparativa (en general 0,250 ml)

V = volumen en el cual ha sido disuelta la toma de ensayo, en ml (en general 100 ml)

h_1 = altura del pico del patrón, en mm

V_3 = parte alícuota de V vertida en la columna de extracción en ml (en general 20 ml), o parte alícuota de V introducida en el tubo de extracción, en ml (para productos sólidos, en general 5 ml)

V_1 = volumen del extracto (V_0) inyectado en la columna preparativa (en general 0,500 ml)

m = masa de la toma de ensayo, en g

B.20.7 Sensibilidad del método

El límite de detección es de aproximadamente 3 $\mu\text{g}/100$ g de producto; así pues, es posible medir con precisión aceptable contenidos de vitamina K_1 a partir de una concentración de 5 $\mu\text{g}/100$ g.

B.20.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder 10% de la media de los resultados.

B.21 DETERMINACION DE BIOTINA (VITAMINA H) POR METODO MICROBIOLOGICO

B.21.1 Fundamento

Este método permite cuantificar concentraciones desconocidas de biotina utilizando *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, microorganismo que no puede sintetizar esta vitamina, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de biotina presente. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio libre de biotina y el crecimiento celular se cuantifica turbidimétricamente. Por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra.

B.21.2 Reactivos y materiales

B.21.2.1 Reactivos

D (+) - Biotina para fines bioquímicos

Acido sulfúrico 95-97% para análisis

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

Alcohol etílico absoluto

B.21.2.2 Material

Micropipeta

Material común de laboratorio

B.21.3 Aparatos e instrumentos

Centrífuga

Autoclave

Incubadora a $35 \pm 1^\circ\text{C}$

Espectrofotómetro

B.21.4 Cepa y medios de cultivo

Lactobacillus plantarum ATCC 8014

Leche descremada en polvo grado reactivo

Caldo micro inoculum

Agar bacteriológico

Caldo Bacto Lactobacilli MRS (MRS-agar)

Medio de prueba para biotina

B.21.4.1 Medio de mantenimiento de la cepa

Bacto Lactobacilli MRS-agar (MRS-agar)

Preparar 1 l de medio con 55 g de caldo Bacto Lactobacilli MRS + 15 g de agar bacteriológico, según las indicaciones de la etiqueta del caldo MRS + 1,5% de leche descremada (reconstituida al 10% en agua destilada). Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición vertical.

Conservar en el refrigerador 2 a 8°C.

B.21.4.2 Mantenimiento de la cepa

Inocular por punción *Lactobacillus plantarum* en profundidad en el medio (B.21.4.1) cada cuatro semanas, efectuar un cultivo intermedio de 18 h en el medio líquido B.21.4.3. Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 18 a 24 h a 35°C.

B.21.4.3 Medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo

Caldo Micro Inoculum

Preparar 1 l de solución según las indicaciones de la etiqueta y repartir a razón de 10 ml en tubos. Tapar los tubos con capuchones y esterilizar según las indicaciones del fabricante.

Conservar en el refrigerador de 2 a 8°C.

B.21.5 Preparación de soluciones

B.21.5.1. Solución fisiológica

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador de 2 a 8°C.

B.21.5.2 Solución de ácido sulfúrico aproximadamente 3 N

Disolver 85 ml de ácido sulfúrico 95 - 97% a 1000 ml con agua destilada. Para ello verter al ácido con PRECAUCION en el matraz aforado que ya contiene agua. Enfriar el matraz durante la operación. Llevar a volumen.

B.21.5.3 Solución de Hidróxido de sodio, 60 g/100 ml

Disolver 300 g de hidróxido de sodio en agua destilada, enfriando bajo el agua del grifo. Completar a 500 ml en una probeta graduada. Conservar en un frasco con tapón de polietileno o de goma.

B.21.5.4 Solución de Hidróxido de sodio aproximadamente 1 N

Disolver 20 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno.

B.21.5.5 Solución patrón

Pesar exactamente 50,0 mg de biotina; disolver en una mezcla 1:1 agua destilada/alcohol etílico y llevar a volumen en un matraz aforado de 500 ml. Conservar esta solución en un frasco actínico a 4°C durante máximo 6 meses.

B.21.6 Procedimiento

B.21.6.1 Desarrollo del microorganismo

Un día antes, subcultivar en 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 18 a 24 h a 35°C.

Seis horas antes de la inoculación del ensayo, inocular 2 gotas (aproximadamente 0,1 ml) del último cultivo de 18 h en otro tubo de 10 ml de caldo Micro Inoculum.

Incubar durante 6 h a 35°C.

B.21.6.2 Preparación de la toma de ensayo

En un matraz Erlenmeyer de 150 ml, pesar de 1 a 2 g de muestra homogénea, que contenga aproximadamente 1 µg de vitamina, añadir 50 ml de ácido sulfúrico 3 N y dispersar bien el producto. A fin de evitar la formación de grumos, añadir el ácido en pequeñas cantidades pasando el matraz Erlenmeyer bajo el grifo de agua caliente después de cada adición.

Cubrir el matraz con papel de aluminio y colocarlo en el autoclave durante 1 h a 120°C. Enfriar.

Ajustar el pH a 4,6 añadiendo primero aproximadamente 3 ml de hidróxido de sodio de 60 g/100 ml mientras se enfría el matraz Erlenmeyer, y luego hidróxido de sodio 1 N. Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 250 o 300 ml y llevar a volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro plisado con velocidad de filtración media.

Diluir el filtrado de modo que se obtenga una solución de aproximadamente 0,2 ng de vitamina por ml.

B.21.6.3 Solución patrón, 0,2 ng/ml

Justo antes del uso diluir la solución (B.21.5.5) como sigue:

1 ml a 100 ml

1 ml a 100 ml

2 ml a 100 ml = 0,2 ng/ml

B.21.6.4 Medio de cultivo para el ensayo

Medio de prueba para biotina

Preparar el volumen necesario en un matraz Erlenmeyer de vidrio de material actínico de 1000 ml. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón:	30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml
cada producto:	10 tubos 10 x 5 ml = 50 ml
+ 50 a 100 ml de exceso	

B.21.6.5 Preparación del ensayo

B.21.6.5.1 Serie patrón

En un soporte metálico para tubos de ensayo, colocar tres filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0, ..., 8; el primero corresponde al blanco (bl).

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.: bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2	2,5	3,0 ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,5	2	2 ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo									

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

B.21.6.5.2 Serie producto

En otro soporte colocar dos filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de ambas filas van destinados a un producto, los otros cinco de ambas filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18, y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante una pipeta verter en duplicado en ambas series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución de la muestra, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo.

Tubo No.: 9	10	11	12	13
Solución de la muestra: 0,25	0,50	0,75	1,0	1,50 ml
Agua: 4,75	4,50	4,25	4,0	3,50 ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo				

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra ambas filas de tubos en el soporte.

B.21.6.6 Esterilización del ensayo

Esterilizar los tubos durante 15 min a 115°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

B.21.6.7 Inoculación

B.21.6.7.1 Preparación y estandarización del inóculo

Justo antes de inocular el ensayo, transferir una cantidad suficiente del cultivo preparado bajo (B.21.6.1) a un tubo de centrífuga estéril, centrifugar a 2600 rpm durante 5 min, decantar y resuspender el paquete celular en 10 ml de solución salina. Hacer dos lavados más. Transferir a una cubeta de 1 cm y efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 575 nm. Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre aproximadamente la misma extinción. No debe olvidarse sustraer de la extinción del cultivo la del medio de ensayo, que es un medio coloreado.

Según la extinción, diluir "n" gotas del cultivo B.21.6.1 en un tubo que contenga 10 ml de medio (B.21.6.4). Este tubo es el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo (B.21.6.1) entre 0,2 y 0,4 (después de sustraer la extinción propia del medio), introducir de 4 a 8 gotas de cultivo en el tubo que contiene 10 ml de medio (B.21.6.4). Si la extinción no se encuentra en la zona arriba mencionada, adaptar la dilución como sigue:

- extinción inferior a 0,2: introducir proporcionalmente más gotas en el tubo (no más de 10 gotas).
- extinción superior a 0,4: introducir menos gotas o diluir proporcionalmente con el medio (B.21.6.4)

B.21.6.7.2 Inoculación

Mediante una micropipeta con punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

B.21.6.8 Incubación

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 18 a 24 h a 35°C. Observar los tubos con regularidad al cabo del final del tiempo de incubación. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

B.21.6.9 Lecturas

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transferir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% de T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl).*

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

* **Nota:** Si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos, dados en transmitancia.

B.21.7 Cálculos

B.21.7.1 Curva de calibración

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico o utilizar una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los μg de vitamina a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	μg	lecturas			media
			1	2	3	
0	0,0	0,0	96,6	96,5	96,8	96,6
1	0,25	0,05	89,9	89,1	90,1	89,7
2	0,50	0,10	80,9	82	82,1	81,7
3	0,75	0,15	75,1	74,8	74,9	74,9
4	1,0	0,20	69,0	68,1	68,9	68,7
5	1,5	0,30	59,9	59,0	58,9	59,3
6	2	0,40	51,8	51,8	51,2	51,6
7	2,5	0,50	46,0	45,7	45,1	45,6
8	3,0	0,60	41,5	40,5	40,0	40,7

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina. Es mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada; esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo; que deben verificarse por separado.

B.21.7.2 Contenido de vitamina en el producto

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	lecturas		media	μg^*	$\mu\text{g/ml}$
		1	2			
9	0,25	(82)	87,5	87,5	0,065	0,26
10	0,50	80,2	78,2	79,2	0,120	0,24
11	0,75	71,8	72,6	72,2	0,175	0,23
12	1	64,7	66,1	65,4	0,235	0,24
13	1,5	54,1	53,8	53,9	0,37	0,25

Media 0,244 =(C)

() = valor aberrante

* = valores leídos en la curva de calibración

Observación:

Fluctuaciones pequeñas de los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido en vitamina, expresado en μg de biotina/100 g de producto es igual a:

$$\text{Biotina}_{\mu\text{g}/100\text{ g}} = \frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

En donde:

C= media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en ng/ml

V_1 = volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V_2 = parte alícuota de V_1 , en ml

V_3 = volumen al que se ha diluido la parte alícuota V_2 , en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

1,032 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 250 ml (V_1). Se ha tomado una parte alícuota de 20 ml (V_2), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V_3).

La media de las concentraciones de biotina leídas en la curva de calibración es 0,244 ng/ml (C).

El contenido en vitamina es:

$$\text{Biotina}_{\mu\text{g}/100\text{ g}} = \frac{0,244 \times 100 \times 250 \times 100}{1,032 \times 20 \times 1000} = 29,55 \mu\text{g} / 100\text{ g}$$

B.22 DETERMINACION DE SODIO (NA) POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA CON ADITAMENTO DE FLAMA

B.22.1 Método de espectrofotometría de absorción atómica con aditamento de flama

B.22.2.1 Fundamento

La muestra se somete a una digestión ácida con ácido nítrico concentrado para que el analito liberado sea cuantificado por espectrofotometría de absorción atómica.

B.22.2.2 Reactivos y materiales

B.22.2.2.1 Reactivos

Acido nítrico (HNO_3) concentrado grado suprapuro

Acido nítrico (HNO_3) concentrado G.R.

Estándar certificado de Na de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Agua deionizada

B.22.2.2.2 Materiales

Sistema de reflujó

Material común de laboratorio

Papel filtro No. 1

B.22.2.3 Aparatos e instrumentos

Balanza analítica con una sensibilidad de 0,1 mg

Espectrofotómetro de absorción atómica con aditamento de flama

Parrilla de calentamiento

Lámpara de cátodo hueco de sodio

B.22.2.3 Preparación de la muestra para ensayo**B.22.2.3.1 Productos sólidos**

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

B.22.2.3.2 Productos líquidos

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transferir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C). Mezclar bien antes del uso.

B.22.2.4 Descontaminación del material

En una cubeta de polietileno (volumen aproximado de 15 l) introducir 10 l de mezcla ácido nítrico/ agua (1:1).

En este baño descontaminar durante una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno o de polipropileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada.

Secar.

B.22.2.5 Procedimiento

Se pesa de 1 a 2 g de muestra en un matraz de fondo plano de 250 ml con boca esmerilada, se le añaden 10 ml de HNO₃ grado suprapuro y se digieren por calentamiento en un sistema de reflujo durante 2 h o hasta digestión completa.

La muestra se enfría y se filtra a través de papel filtro No. 1 y se recibe en un matraz aforado de 100 ml.

Se lava tres veces el matraz de la digestión con tres porciones de 10 ml de agua deionizada y los lavados se filtran y se reciben en el matraz aforado, se lleva a volumen con agua deionizada.

Ajustar el espectrofotómetro de acuerdo con las recomendaciones del fabricante usando un estándar certificado. Se leen las muestras y se anotan los resultados obtenidos en µg/ml.

Longitud de onda: 589,6 nm

Llama: aire-acetileno, oxidante

Nota: Se recomienda meter una muestra añadida para valorarla y hacer un blanco de reactivos para cada serie de digestiones.

B.22.2.6 Cálculo

$$\text{Sodio}_{\text{mg/kg}} = \frac{(A - B) \times C}{D}$$

En donde:

A = µg/ml de Na⁺ en la muestra

B = µg/ml de Na⁺ en el blanco

C = ml de aforo de la muestra

D = peso de la muestra en g tomada para el análisis

B.22.2.7 Sensibilidad del método

0,15 µg/ml para 1% de absorción

B.23 DETERMINACION DE POTASIO (K) POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA**B.23.1 Fundamento**

Hidrólisis parcial del producto con ácido clorhídrico. Filtración. Dilución y determinación por emisión de llama.

B.23.2 Reactivos y materiales**B.23.2.1 Reactivos**

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

Acido clorhídrico fumante 37%

Solución patrón de potasio mínimo para análisis

Solución patrón de potasio lista para el uso, 1000 mg/l

B.23.2.2 Materiales

Matraces aforados 50, 100 y 1000 ml

Micropipetas de 50 - 200 μ l y 200 - 1000 μ l

Pipetas ajustables 5 ml

Puntas amarillas de 50 a 200 μ l

Puntas azules de 200 a 1000 μ l

Puntas blancas

Probetas graduadas forma alta 10, 25 y 500 ml

Matraces Erlenmeyer cuello estrecho 100 ml

Embudos

Filtros redondos (< 0,007% de cenizas)

Frascos de polietileno flexible cuello estrecho de 100 y 1000 ml

Cubeta de polietileno 15 l

Descontaminación del material: En una cubeta de polietileno introducir 10 l se mezcla de ácido nítrico/agua (1:1)

En este baño descontaminar durante una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno o de polipropileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada y secar.

B.23.3 Aparatos e instrumentos

Balanza de precisión capacidad 4100/600g: 0,1/0,001

Lámpara de potasio de tipo cátodo hueco

Espectrofotómetro de absorción atómica

Destilador de agua

Baño de agua

B.23.4 Preparación de soluciones

B.23.4.1 Solución de ácido clorhídrico 1,2 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar a volumen con agua destilada.

B.23.4.2 Solución de ácido clorhídrico, 4 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 330 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

B.23.4.3 Solución de ácido clorhídrico, 6 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 300 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

B.23.4.4 Solución patrón de potasio, 1000 mg/l

En un matraz aforado de 1000 ml introducir el contenido de una ampolla de cloruro de potasio. Enjuagar la ampolla y llevar al volumen con agua destilada.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un año a temperatura ambiente.

También puede utilizarse una solución patrón de potasio de 1000 mg/l lista para el uso.

B.23.4.5 Soluciones patrón diluidas de potasio

En matraces aforados de 100 ml vertir mediante una pipeta 0 - 100 - 200, 500 y 1000 ml de solución B.23.4.4. Y llevar al volumen con solución B.23.4.1. Estas soluciones contienen respectivamente 0 - 1,0 - 2 - 5,0 y 10 μ g de potasio/ml. Transferir inmediatamente a frascos de polietileno o polipropileno descontaminados.

Estas soluciones deben prepararse cada semana. Se recomienda comparar las nuevas soluciones con otras preparadas anteriormente a fin de detectar cualquier error grave de preparación.

B.23.5 Preparación de la muestra para ensayo

B.23.5.1 Productos sólidos

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

B.23.5.2 Productos líquidos

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transferir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C). Mezclar bien antes de su uso.

B.23.6 Procedimiento

B.23.6.1 Toma de ensayo

En un matraz aforado de 50 ml pesar, con una precisión de 0,01 g; 1g de producto en polvo o 10g de producto líquido. Añadir agua destilada hasta un volumen de aproximadamente 15 ml. Añadir 10 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N (B.23.4.3). Calentar en un baño maría en ebullición durante 30 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Llevar al volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro exento de cenizas, eliminar los primeros 5 ml. Recolectar el resto del filtrado.

B.23.6.2 Dilución

En matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta un volumen de la solución de toma de ensayo (B.23.6.1), tal que la concentración final esté comprendida entre 1 y 10 µg/ml. Llevar al volumen con solución de ácido clorhídrico 1,2 N.

B.23.6.3 Determinación

Ajustar el aparato de absorción atómica según las indicaciones del fabricante. Se recomienda utilizar mejor un quemador provisto de un nebulizador de hélice, que un nebulizador con bola de impacto. Deben respetarse las siguientes condiciones:

Longitud de onda: 766,5 nm

Llama: aire-acetileno, oxidante

Encender la llama y esperar unos 15 min a que alcance el equilibrio. Colocar el quemador y ajustar el fotomultiplicador de manera óptima; para ello aspirese el patrón más concentrado.

Aspirar las soluciones patrón (B.23.4.5), luego las soluciones de la toma de ensayo (B.23.6.2). Después de cada medida, aspirar un poco de solución (B.23.4.2), luego agua destilada a fin de evitar que el capilar se obstruya. Después de aspirar diez soluciones de tomas de ensayo, verificar la calibración aspirando una solución patrón y efectuando un "reslope".

Trabajar de preferencia con la opción "integración"; la duración de las medidas debe ser de por lo menos 5 seg. Efectuar cada medida por lo menos tres veces. Ninguna solución de toma de ensayo no debe rebasar la concentración del patrón más concentrado. Efectuar una nueva dilución si es necesario (B.23.6.2).

B.23.7 Cálculo y expresión de resultados

B.23.7.1 Modo de cálculo

Calcular o trazar la curva de calibración llevando la absorbancia a la ordenada y la concentración de las soluciones patrón diluidas, en µg/ml, a la abscisa. Determinar la concentración de las soluciones de las tomas de ensayo (C). Restar el valor del blanco (B) de aquellos de los productos.

El contenido de potasio en el producto, en mg/100 g, es igual a:

$$\text{Potasio}_{\text{mg}/100\text{ g}} = \frac{(C - B) \times V \times D \times 100}{m \times 1000} = \frac{(C - B) \times V \times D}{m \times 100}$$

En donde:

C = concentración de potasio en las soluciones de las tomas de ensayo, en µg/ml

B = concentración de potasio en el blanco (solución patrón de 0 µg de potasio por ml)

V = volumen inicial en las soluciones de las tomas de ensayo, en ml

D = factor de dilución

m = masa de la toma de ensayo, en g

B.23.7.2 Expresión de los resultados

Contenidos inferiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con dos cifras significativas.

Contenidos superiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con tres cifras significativas.

B.23.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra, en las mismas condiciones, en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder el 5% de su valor medio.

B.24 DETERMINACION DE CLORURO (Cl) POR VALORACION

B.24.1 Fundamento

Haciendo una solución o suspensión del producto en ácido nítrico, se valora por potenciometría directa mediante un electrodo de vidrio y una solución valorada de nitrato de plata hasta un potencial final previamente establecido.

B.24.2 Reactivos y materiales

B.24.2.1 Reactivos

Solución de nitrato de plata de 0,1 mol o nitrato de plata para análisis

Solución de cloruro de sodio 0,1 mol o cloruro de sodio para análisis

Gelatina en polvo

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

B.24.2.2 Materiales

Vasos de forma alta de 150 ml

Pipetas automáticas de báscula de 1 ml

Material común de laboratorio

Bureta de 20 o 25 ml

Agitador magnético

B.24.3 Aparatos e instrumentos

Los aparatos de medidas descritos se refieren al método más utilizado, es decir, la determinación semiautomática.

Desecadores

Pesafiltros de forma alta con tapón esmerilado de 10 ml

Soportes para desecadores

Estufa de laboratorio

Electrodo anular de plata

La valoración potenciométrica puede efectuarse de tres maneras y el equipo para cada una de ellas es el siguiente:

B.24.3.1 Determinación manual

Medidor de pH/milivoltímetro con escala de lectura de ± 700 mV

Electrodo de plata con superficie tan grande como sea posible (para mayor estabilidad), y electrodo de referencia. O bien un solo electrodo anular de plata combinado.

B.24.3.2 Determinación semiautomática

Puesto de valoración automático, compuesto de: aparato de medida (milivoltímetro); aparato de mando programable (valorador, generador de impulsos) y bureta de pistón motorizada.

Imprimente o trazador de curvas (facultativo)

Electrodo ver (B.24.3.1)

B.24.3.3 Determinación automática

Además de los aparatos citados en (B.24.3.2):

Cambiador de muestras automático con unidad de mando y puesto de valoración

Valorador según (B.24.3.2) con bureta de pistón motorizada, pero con distribución y llenado a control remoto, así como transmisión de datos a la imprimente.

Nota: Según los instrumentos disponibles se puede optar por una solución intermedia.

B.24.4 Preparación de soluciones

B.24.4.1 Solución de nitrato de plata 0,1 N

En un matraz aforado de 1000 ml diluir el contenido de una ampolleta de solución 0,1 N lista para el uso, o bien: si no se dispone de solución valorada lista para el uso, pesar, con una aproximación de 0,5 mg; 16,9890 g de nitrato de plata previamente secado durante 2 h a $102 \pm 2^\circ\text{C}$. Disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml. Comprobar el título, por valoración según (B.24.5.3), de 20 ml de solución exactamente 0,1 N de cloruro de sodio.

B.24.4.2 Solución de cloruro de sodio 0,1 N

En un matraz aforado de 1000 ml diluir el contenido de una ampolleta de solución 0,1 N lista para uso, o bien: si no se dispone de solución valorada lista para el uso, pesar, con una aproximación de 0,5 mg; 5,8440 g de cloruro de sodio previamente secado durante 2 h a $102 \pm 2^\circ\text{C}$. Disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml.

B.24.4.3 Solución de gelatina aproximadamente 5g/100 ml (volumen aproximado de 15 ml), justo antes del uso, disolver, calentando 1 g de gelatina en 20 ml de agua destilada. Enfriar.

B.24.5 Procedimiento

La preparación de la muestra, la toma de ensayo y la disolución son idénticas para las tres variantes. No es preciso clarificar la solución a valorar, ya que ni el color del producto ni su contenido en sustancias insolubles influyen en el potencial final. En general, una adición de ácido nítrico elimina las interferencias.

B.24.5.1 Toma de ensayo y disolución

En un recipiente de valoración o en un vaso pesar con una aproximación de 0,1 mg, entre 1 y 5 g de producto, según el contenido supuesto en cloruro y la homogeneidad del producto. Para productos líquidos, añadir mediante una pipeta un volumen exacto correspondiente a los mismos criterios. La toma de ensayo debe consumir entre 1 y 15 ml de nitrato de plata. Añadir agua destilada para obtener un volumen final de unos 50 ml, así como un imán mezclador. Colocar sobre un agitador magnético y agitar hasta obtener una solución o una suspensión fina, sin grumos. La duración varía entre 1 y 30 min, según la naturaleza del producto. Mediante una pipeta automática añadir 1 ml de ácido nítrico concentrado y mezclar. El pH de la solución debe ser inferior a 1,5. En caso de duda, verificarlo mediante un medidor de pH y, si es necesario añadir más ácido nítrico.

B.24.5.2 Determinación manual

B.24.5.2.1 Preparación del aparato

Conectar los electrodos al aparato de medida y, si es necesario, precalentar el mismo según las instrucciones del fabricante. Sumergir el o los electrodos, pero nunca la punta de la bureta, en una mezcla de 50 ml de agua destilada y 1 ml de ácido nítrico concentrado (solución de calibración) y colocar sobre un agitador magnético. Ajustarlo de modo que mezcle bien sin salpicar durante las valoraciones ulteriores. Consultar el manual del aparato para ajustar la escala de los milivoltios mediante una contratensión a fin de obtener un potencial cercano al medio de la escala de lectura (ese será el potencial final). Después de esta calibración no se deben efectuar más ajustes en el milivoltímetro.

Ver notas B.24.8.

B.24.5.2.2 Valoración

Sumergir los electrodos en la solución acidificada de la toma de ensayo. Si se utiliza un agitador magnético y una bureta de pistón, sumergir asimismo la punta de la bureta a media altura del electrodo de plata, o a la altura del anillo de plata si se utiliza un electrodo combinado, a aproximadamente 1 cm delante de éste (en el sentido de rotación del líquido). Así es posible valorar con la mayor precisión, ya que el electrodo señala inmediatamente un exceso de reactivo.

Agitando continuamente, sin tocar los electrodos, valorar mediante la solución de nitrato de plata 0,1 N, primero rápidamente hasta unos 100 mV antes del potencial final, luego lentamente con porciones cada vez más pequeñas hasta el potencial final, que debe permanecer estable durante al menos 10 seg. Una ejecución minuciosa con bureta de pistón permite determinar el punto final con una precisión de 0,01 ml.

Variante: Para determinaciones aún más precisas, sobre todo para determinar contenidos muy bajos en cloruro, la valoración a "potencial final" puede reemplazarse ventajosamente por la valoración "en incrementos" o porciones. El volumen de reactivo correspondiente al punto de equivalencia puede encontrarse ya sea gráficamente, o por cálculo.

B.24.5.2.3 Enjuague de los electrodos

Enjuagar los electrodos con agua destilada inmediatamente después de cada valoración. Si se pega materia grasa a los electrodos, eliminarla sumergiéndolos brevemente en acetona.

B.24.5.2.4 Verificación del potencial de fin de reacción

Al efectuar grandes series de valoraciones hasta potencial final, debe verificarse la concordancia entre el potencial final fijado y aquel medido por los electrodos sumergidos en la mezcla agua/ácido nítrico. Para ello, después de 30 a 60 min de valoración y después de apartar la punta de la bureta, sumergir los electrodos en el vaso que contiene la mezcla agua/ácido nítrico y agitar. Si es necesario, corregir el potencial. (Una diferencia de más de 10 mV indica que los electrodos están sucios)

B.24.5.2.5 Verificación del método

Periódicamente valorar según el punto (B.24.5.2.2); 20 ml de solución 0,1 N de cloruro de sodio.

Al valorar soluciones puras de cloro, el cloruro de plata precipitado tiende a adherirse a la superficie activa del electrodo de plata o al anillo de plata del electrodo combinado, lo cual impide el buen funcionamiento. Para evitar este inconveniente, se recomienda añadir antes de comenzar la valoración unos mililitros de solución de aproximadamente 5g/100 ml de gelatina recién preparada. Corregir mediante un ensayo en blanco si la gelatina contiene cloruro.

B.24.5.3 Determinación semiautomática**B.24.5.3.1** Preparación del aparato

Montar el aparato, efectuar las manipulaciones y verificar el funcionamiento del valorador según las instrucciones del fabricante.

La disposición de los electrodos y de la punta de la bureta en el recipiente de valoración debe ser exactamente la misma como para la valoración manual.

Antes de cada valoración comprobar:

El llenado del sistema de la bureta y, si es necesario, la posición de la llave.

La puesta a cero de la bureta y, si es necesario, del registrador.

La posición de la punta de la bureta

La velocidad del motor de la bureta si es manual. La velocidad mínima ofrece mayor precisión.

La velocidad del agitador

La velocidad del papel y la escala deseada en el registrador.

B.24.5.3.2 Valoración

Dado que la valoración es automática se necesita vigilar el aparato cuando menos la primera vez después del ajuste. El valorador se para automáticamente en caso de valoración a potencial final; en cambio, si la valoración se registra gráficamente, debe interrumpirse cuando el milivoltímetro indica unos 120 mV más allá del punto final.

Al efectuar grandes series de valoraciones hasta potencial final, debe verificarse la concordancia entre el potencial final fijado y aquel medido por los electrodos sumergidos en la mezcla agua/ácido nítrico. Apartar la punta de la bureta. Ver punto (B.24.5.2.4).

Para la limpieza de los electrodos después de cada valoración, ver (B.24.5.2.3) y (B.24.8).

B.24.5.4 Determinación automática

Montar y utilizar la instalación siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante.

Normalmente ajustar el valorador como para la determinación semiautomática. Sólo pueden efectuarse valoraciones a potencial final.

Deben observarse estrictamente todos los detalles indicados más arriba: disposición de los electrodos en el recipiente de valoración, tratamiento de los electrodos, etc.; si es necesario puede adaptarse el volumen de la solución a valorar a la capacidad del recipiente de valoración. La cantidad de ácido nítrico debe ser de al menos 1 ml por 50 ml de solución a valorar.

Antes de comenzar la valoración, además de los controles indicados bajo (B.24.5.3.1), ajustar el programador del cambiador de muestras y comprobar los puntos siguientes:

Posición correcta de los recipientes de valoración en el cambiador de muestras.

Cantidad suficiente de reactivo, de agua de enjuague y de papel en el registrador.

Comprobar el buen funcionamiento del aparato durante la primera valoración. Basta con verificar de vez en cuando la reserva de reactivo, de agua de enjuague y de papel en el registrador, así como el funcionamiento correcto de la valoración y de la impresión.

B.24.6 Cálculo y expresión de resultados

B.24.6.1 Cálculo

El contenido de cloruro en el producto, expresado en porcentaje de masa, es igual a:

$$\text{Cloruro}_{g/100 g \text{ o } 100 ml} = \frac{A \times 35,45 \times N \times 100}{m \times 1000}$$

En donde:

A = número de ml de solución de nitrato de plata 0,1 N utilizados para la valoración (lectura en la bureta o determinados gráficamente o por cálculo)

35,45 = peso atómico del cloro

N = normalidad exacta de la solución de nitrato de plata (0,1)

m = masa de la toma de ensayo, en g; o volumen en ml

B.24.6.2 Expresión de resultados

Expresar los resultados en g de cloruro/100 g o 100 ml.

Para expresar el resultado en mg de cloruro/100 g, multiplicar el porcentaje por 100.

Si es necesario, también se puede dar el resultado en cloruro de sodio, reemplazando en la fórmula de cálculo, el peso atómico del cloro (35,45) por el del cloruro de sodio (58,44)

B.24.7 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder 1% de su valor medio.

La heterogeneidad de una muestra puede influir desfavorablemente en la repetibilidad y la reproducibilidad.

B.24.8 Notas

B.24.8.1 Agua destilada

Utilizar agua destilada totalmente exenta de cloruro.

B.24.8.2 Mantenimiento de los electrodos

B.24.8.2.1 Electrodo de plata

- Normalmente: enjuagar con agua destilada y secar.

- Electrodo grasiento: sumergir en acetona, enjuagar con agua destilada y secar.
- Electrodo manchado, sucio u oscuro (violeta): frotar con un paño mojado y detergente para vajilla, enjuagar con agua destilada y secar.
- Conservar en un lugar seco, en una caja u otro recipiente hermético, a fin de retrasar la oxidación de la plata.

B.24.8.2.2 Electrodo de referencia

- Enjuagar con agua destilada y secar.
- Para el mantenimiento, sírvase consultar las instrucciones del fabricante. En general debe renovarse periódicamente el electrolito.
- Conservar en un lugar seco o en agua.

B.24.8.2.3 Electrodo anular de plata combinado

- Enjuagar con agua destilada y secar.
- Tratar la parte de plata como un electrodo de plata.
- Para el mantenimiento, sírvase consultar las instrucciones del fabricante. En general debe renovarse periódicamente el electrolito.
- Conservar en un lugar seco o en agua.

B.24.8.2.4 Enjuague de los electrodos

Cuidado: Enjuagar los electrodos previamente con agua destilada y apartar la punta de la bureta, ya que incluso trazas de iones Ag^+ o C1^- pueden interferir en la calibración y acarrear errores en toda la serie de análisis. Esta observación también es válida para las calibraciones de control, que deben efectuarse aproximadamente cada 60 min durante las series de análisis. Un desvío importante en estas calibraciones indica que los electrodos están sucios.

B.24.9 Cálculos para la valoración con adiciones constantes

Después de cada adición, leer el potencial cuando se haya estabilizado. Calcular la diferencia de potencial entre las adiciones. El punto de equivalencia se sitúa entre los dos volúmenes con la mayor diferencia de potencial.

Sean V_1, V_2, V_3, V_4 los volúmenes cuyos potenciales son P_1, P_2, P_3, P_4 ; las diferencias de potencial son $P_2 - P_1, P_3 - P_2, P_4 - P_3$, y $P_3 - P_2$ es la diferencia mayor. $V_2 = V_1 + V$; $V_3 = V_2 + V$; $V_4 = V_3 + V$; $V =$ volumen de la adición.

El punto de equivalencia exacto se sitúa en:

$$\text{Punto de equivalencia exacto}_{mi} = V_2 + \frac{(P_4 - P_3) \times V}{(P_2 - P_1) + (P_4 - P_3)}$$

Ejemplo numérico:

AgNO₃ [ml]	Lectura [mV]	diferencia [mV]
9,0	58,0	
9,1	59,6	1,6 para 0,1 ml AgNO ₃
9,2	62,5	2,9
9,3	64,6	2,1
9,4	68,1	3,5
9,5	70,9	2,8
9,6	73,9	3,0
9,7	79,3	5,4

9,8	83,9	4,6
9,9	92,4	8,5
10	102,7 P ₁	10,3
10,1	114,9 P ₂	12,2
10,2	155,7 P ₃	40,8 mayor
10,3	196,0 P ₄	40,3
10,4	218,5	22,5
10,5	227,3	8,8
10,6	234,2	6,9
V ₂ = 10,1 ml		V = 0,1 ml

$$\text{Punto de equivalencia exacto}_{ml} = 10,1 + \frac{(196,0 - 155,7) \times 0,1}{(114,9 - 102,7) + (196,0 - 155,7)} = 10,177 \text{ ml}$$

B.25. DETERMINACION DE CALCIO (Ca) POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

B.25.1 Fundamento

Hidrólisis parcial del producto con ácido clorhídrico. Filtración. Dilución y determinación por espectroscopía de absorción atómica.

B.25.2 Reactivos y materiales

B.25.2.1 Reactivos

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

Oxido de lantano (III) (máximo 0,0005% Ca) para espectroscopía de absorción atómica

Acido clorhídrico fumante mínimo 37% para análisis

Solución patrón de calcio

Solución patrón de calcio lista para el uso, 1000 mg/l

B.25.2.2 Materiales

Matraces aforados 50, 100 y 1000 ml

Micropipetas de 50 - 200 µl y 200 - 1000 µl

Pipetas ajustables 5 ml

Puntas amarillas de 50 a 200 µl

Puntas azules de 200 a 1000 µl

Puntas blancas

Probetas graduadas forma alta 10, 25 y 500 ml

Matraces Erlenmeyer cuello estrecho de 100 ml

Embudos

Filtros redondos (< 0,007% de cenizas)

Frascos de polietileno flexible cuello estrecho de 100 ml y 1000 ml

Cubeta de polietileno 15 l

Descontaminación del material: En una cubeta de polietileno introducir 10 l de mezcla de ácido nítrico/agua (1:1).

En este baño descontaminar una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno o de polipropileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada y secar.

B.25.3 Aparatos e instrumentos

Balanza de precisión capacidad 4100/600g: 0,1/0,001

Lámpara de calcio de tipo cátodo hueco

Espectrofotómetro de absorción atómica

Destilador de agua

Baño de agua

B.25.4 Preparación de soluciones

B.25.4.1 Solución de lantano 5 g/100 ml

En un matraz aforado de 1000 ml pesar 58,6 g de óxido de lantano. Añadir aproximadamente 200 ml de agua destilada, agitar hasta que todo el óxido esté bien mojado. Añadir lentamente 250 ml de ácido clorhídrico concentrado (mínimo 37%). Enfriar y llevar al volumen con agua destilada.

Debe verificarse el contenido de calcio de cada nuevo lote de óxido de lantano preparando una solución de lantano de 1 g/100 ml y comparando su contenido en calcio con aquél de una solución patrón de calcio de 0 µg/ ml procedente de un lote anterior.

B.25.4.2 Solución de ácido clorhídrico 4 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 330 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

B.25.4.3 Solución de ácido clorhídrico 6 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 300 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

B.25.4.4 Solución patrón de calcio 1000 mg/l

En un matraz aforado de 1000 ml introducir el contenido de una ampolleta de cloruro de calcio. Enjuagar la ampolleta y llevar al volumen con agua destilada.

Conservar en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un año a temperatura ambiente.

También puede utilizarse una solución patrón de calcio de 1000 mg/l lista para el uso.

B.25.4.5 Soluciones patrón diluidas de calcio

En matraces aforados de 100 ml verter mediante una pipeta 0, 100, 200, 300, 500 y 1000 µl de solución patrón de calcio, 1000 mg/l. Añadir 20 ml de solución de lantano (B.25.4.1) y llevar al volumen con agua destilada. Estas soluciones contienen respectivamente 0 - 1 - 2 - 3 - 5 y 10µg de calcio/ml. Transferir inmediatamente a frascos de polietileno o polipropileno descontaminados.

Estas soluciones deben prepararse cada semana. Se recomienda comparar las nuevas soluciones con otras preparadas anteriormente a fin de detectar cualquier error grave de preparación.

B.25.5 Preparación de la muestra para ensayo

B.25.5.1 Productos sólidos

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

B.25.5.2 Productos líquidos

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transferir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C). Mezclar bien antes de su uso.

B.25.6 Procedimiento**B.25.6.1 Toma de ensayo**

En un matraz aforado de 50 ml pesar, con una precisión de 0,01 g, 1 g de producto en polvo o 10 g de producto líquido. Añadir agua destilada hasta un volumen de aproximadamente 15 ml. Añadir 10 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N. Calentar en un baño maría en ebullición durante 30 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Llevar al volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro exento de cenizas, eliminar los primeros 5 ml. Recolectar el resto del filtrado.

B.25.6.2 Dilución

En matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta un volumen de la solución de toma de ensayo, que la concentración final esté comprendida entre 1 y 10 µg/ml. Añadir 20 ml de solución de lantano. Llevar al volumen con agua destilada. Esta solución contiene 1 g de lantano/100 ml.

B.25.6.3 Determinación

Ajustar el aparato de absorción atómica según las indicaciones del fabricante. Se recomienda utilizar mejor un quemador provisto de un nebulizador de hélice, que un nebulizador con bola de impacto. Deben respetarse las siguientes condiciones:

Lámpara de calcio de tipo cátodo hueco

Longitud de onda: 422,7 nm

Llama: aire-acetileno, reductora

Dejar calentar la lámpara durante 15 - 20 min. Encender la llama y esperar unos 15 min a que alcance el equilibrio. Colocar el quemador de manera óptima.

Aspirar las soluciones patrón (B.25.4.5), luego las soluciones de la toma de ensayo (B.25.6.2). Después de cada medida, aspirar un poco de solución (B.25.4.2), luego agua destilada a fin de evitar que el capilar se obstruya. Después de aspirar diez soluciones de tomas de ensayo, verificar la calibración aspirando una solución patrón y efectuando un "reslope".

Trabajar de preferencia con la opción "integración"; la duración de las medidas debe ser de por lo menos 5 seg. Efectuar cada medida por lo menos tres veces. Ninguna solución de toma de ensayo no debe rebasar la concentración del patrón más concentrado. Efectuar una nueva dilución si es necesario (B.25.6.2)

B.25.7 Cálculo y expresión de resultados**B.25.7.1 Modo de cálculo**

Calcular o trazar la curva de calibración llevando la absorbancia a la ordenada y la concentración de las soluciones patrón diluidas, en µg/ml, a la abscisa. Determinar la concentración de las soluciones de las tomas de ensayo (C). Restar el valor del blanco (B) de aquellos de los productos.

El contenido de calcio en el producto, en mg/100 g, es igual a:

$$\text{Calcio}_{\text{mg}/100\text{ g}} = \frac{(C - B) \times V \times D \times 100}{m \times 1000} = \frac{(C - B) \times V \times D}{m \times 100}$$

En donde:

C = concentración de calcio en las soluciones de las tomas de ensayo en µg/ml

B = concentración de calcio en el blanco (solución patrón de 0 µg de calcio/ml)

V = volumen inicial en las soluciones de las tomas de ensayo en ml

D = factor de dilución (B.25.6.2)

m = masa de la toma de ensayo en g

B.25.7.2 Expresión de los resultados

Contenidos inferiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con dos cifras significativas.

Contenidos superiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con tres cifras significativas.

B.25.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra, en las mismas condiciones, en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder el 5% de su valor medio.

B.26 DETERMINACION DE FOSFORO (P) POR COLORIMETRIA CON AZUL DE MOLIBDENO**B.26.1 Fundamento**

Calcinación de la muestra. Reacción del fósforo con molibdato de sodio y sulfato de hidracinio como reductor. Medir espectrofotométricamente a 700 nm la absorbancia del complejo de azul de molibdeno que se ha formado.

B.26.2 Reactivos y materiales**B.26.2.1 Reactivos**

Acido clorhídrico fumante 37% para análisis

Acido nítrico 65% para análisis

Acido sulfúrico 95 - 97% para análisis

Sulfato de hidracinio para análisis

Fosfato diácido de potasio para análisis

Carbonato de sodio anhidro para análisis

Molibdato de sodio dihidratado para análisis

B.26.2.2 Materiales

Vasos de forma alta de 1000 ml

Varillas de vidrio de extremos redondeados de 4 mm de diámetro y 100 mm de longitud

Embudos 60° de 120 mm de diámetro

Recipiente para guardar líquidos de 20 l

Pipetas graduadas hasta la punta de 10, 20 y 25 ml

Pipetas ajustables de 5 ml

Puntas blancas de polipropileno

Filtros redondos rápidos de 125 mm de diámetro

Baño de agua redondo y su tapa

Cubeta de polietileno de 15 l

Nota: Evite utilizar detergentes a base de polifosfatos para lavar el material. Toda la vajilla debe enjuagarse abundantemente con agua destilada antes del uso.

B.26.3 Aparatos e instrumentos

Cubetas ópticas de vidrio de 10 x 10 mm

Balanza analítica electrónica

Cronómetro de mesa

Placa calefactora

Espectrofotómetro con accesorios

Cápsulas de porcelana o platino

Si es necesario, descontaminar durante una noche, en una cubeta de polietileno que contenga 15 l de mezcla de ácido nítrico/agua (1:1), todos los matraces aforados, tapones, recipientes de plástico, así como las cápsulas. Enjuagar con agua destilada. Secar en estufa a 80°C.

B.26.4 Preparación de soluciones**B.26.4.1 Solución de ácido clorhídrico 6 N**

En un matraz aforado de 1000 ml verter 400 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico. Enfriar y llevar a volumen con agua destilada.

B.26.4.2 Solución de ácido sulfúrico aproximadamente 10 N

En un vaso de 1000 ml que contenga 500 ml de agua destilada, añadir con cuidado 270 ml de ácido sulfúrico. Mezclar bien y enfriar a temperatura ambiente. Transferir a un matraz aforado de 1000 ml, enjuagar el vaso y llevar a volumen con agua destilada.

B.26.4.3 Solución de molibdato de sodio 2,5 g/100 ml

En un matraz aforado de 500 ml, disolver 12,5 g de molibdato de sodio, en 200 ml de ácido sulfúrico 10 N. Dejar enfriar a temperatura ambiente, transferir a un matraz aforado de 500 ml y llevar a volumen con (B.26.4.2).

B.26.4.4 Solución de sulfato de hidracinio, 0,15 g/100 ml

CUIDADO: El sulfato de hidracinio es tóxico.

En un matraz aforado de 200 ml introducir 0,30 g de sulfato de hidracinio. Disolver y llevar a volumen con agua destilada.

B.26.4.5 Reactivo de molibdato de sodio y sulfato de hidracinio

Justo antes del uso, mezclar 125 ml de solución (B.26.4.3) y 50 ml de solución (B.26.4.4) en un matraz aforado de 500 ml. Llevar a volumen con agua destilada.

Nota: Esta solución no se conserva.

B.26.4.6 Solución patrón de fósforo, 1000 mg/l

Secar 5 g de fosfato diácido de potasio, durante 2 h a 105°C.

En un matraz aforado 500 ml agregar 2,197 g de fosfato diácido de potasio seco. Disolver con agua destilada y añadir 15 ml de solución 25.4.1. Llevar a volumen con agua destilada y mezclar bien.

En un recipiente de polietileno o de polipropileno, esta solución se conserva durante un mes.

B.26.4.7 Solución patrón de fósforo, 10 µg/ml

El día del uso, verter mediante una pipeta, en un matraz aforado de 100 ml; 1,0 ml de solución (B.26.4.6). Llevar a volumen con agua destilada y mezclar bien.

B.26.4.8 Solución de carbonato de sodio e hidróxido de sodio

En un matraz aforado de 200 ml, introducir 10 g de carbonato de sodio y 1,2 g de hidróxido de sodio. Disolver en agua destilada. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua destilada.

B.26.5 Preparación de la muestra para ensayo

B.26.5.1 Productos sólidos

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario, moler el producto mediante un molino o mortero.

B.26.5.2 Productos semi-líquidos

Transferir el contenido del bote a un vaso de capacidad suficiente. Homogenizar mediante una batidora. Mezclar bien.

B.26.5.3 Productos líquidos

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transferir a un recipiente de vidrio o de polipropileno. Guardar en el refrigerador (4°C). Deje alcanzar la temperatura ambiente antes de pesar.

B.26.6 Procedimiento

Efectuar cada determinación por duplicado.

B.26.6.1 Calcinación

B.26.6.1.1 Productos no acidificados

Calcinar a una temperatura máxima de 550°C.

Mojar las cenizas con un poco de agua destilada, luego añadir 10 ml de ácido clorhídrico 6 N. Calentar sobre un baño maría en ebullición hasta disolución completa de las cenizas. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Filtrar la solución a través de un filtro exento de cenizas y recoger el filtrado en un matraz aforado de 100 ml. Enjuagar la cápsula y el filtro con agua destilada. Llevar a volumen con agua destilada.

B.26.6.1.2 Productos acidificados

A fin de evitar pérdida de fósforo, proceder como sigue:

En una cápsula de platino o equivalente, pesar con una aproximación de 0,1 mg de 2 a 5 g de muestra para ensayo. Añadir 10 ml de solución. Mezclar bien con una varilla de vidrio. Enjuagar la varilla con un poco de agua destilada. En una campana, evaporar a sequedad la toma de ensayo sobre una placa calefactora. Luego calcinar el producto y disolver las cenizas como se describe arriba.

B.26.6.2 Dilución

Si la concentración de fósforo en la solución de la toma de ensayo rebasa 90 µg/l, diluir con agua destilada. La solución a analizar debe contener entre 10 y 90 µg de fósforo/ml.

B.26.6.3 Determinación

En matraces aforados de 50 ml, verter mediante una pipeta, según el esquema siguiente:

Solución	Patrones (1) (ml)				Toma de ensayo (ml)	Blanco (ml)
De la toma de ensayo					1,0 (2)	
Agua destilada	24	23	20	15	24 (3)	25
B.33.4.7	1	2	5	10	20	20
B.33.4.5	20	20	20	20		

(1) Estas soluciones contienen 10 - 20 - 50 y 100 µg de fósforo.

(2) Verter más si el contenido en fósforo es muy bajo.

(3) Ajustar el volumen de agua según el volumen de solución de la toma de ensayo, a fin de obtener un volumen total de aproximadamente 25 ml.

Mezclar bien, llevar a volumen con agua destilada. Tapar los matraces. Mezclar bien y dejar reaccionar durante 15 min en un baño de agua en ebullición para el revelado del color. Enfriar a temperatura ambiente.

B.26.6.4 Medida espectrofotométrica

Medir la extinción de las soluciones arriba indicadas en cubetas de vidrio de 10 mm a la longitud de onda de 700 nm contra el blanco (B).

Notas:

Todas las medidas, tanto las soluciones patrón como las tomas de ensayo, deben efectuarse en el intervalo de una hora después del final de la reacción, debido a la inestabilidad de la coloración.

El complejo de azul de molibdeno presenta el máximo de absorción a 830 nm, no obstante, la sensibilidad aún es buena a 700 nm. Así pues, es posible utilizar una gama más amplia de espectrofotómetros.

B.26.7 Cálculo y expresión de resultados

B.26.7.1 Cálculo

Trazar la curva de calibración llevando a la abscisa el contenido en fósforo (en µg) y a la ordenada la extinción leída en el espectrofotómetro.

Leer en la curva de calibración el valor en µg de fósforo correspondiente a la extinción media (C).

El contenido de fósforo en mg/100 g de producto, es igual a:

$$\text{Fósforo}_{mg/100g} = \frac{C \times V \times C}{10 \times m \times A}$$

En donde:

C = contenido de fósforo en la solución de la toma de ensayo leído en la curva de calibración, en µg

D = factor de dilución, si es necesario

m = masa de la toma de ensayo, en g

V = total de la solución de la toma de ensayo en 100 ml

A = parte alícuota de la solución de la toma de ensayo para la determinación

B.26.7.2 Expresión de los resultados

Expresar los resultados en mg/100 g con tres cifras significativas.

B.26.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos por el mismo método con la misma materia sometida al ensayo, en las mismas condiciones y corto intervalo de tiempo, no debe exceder 2% del valor medio.

B.27 DETERMINACION DE MAGNESIO (Mg) POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

B.27.1 Fundamento

Hidrólisis parcial del producto con ácido clorhídrico. Filtración. Dilución y determinación por espectroscopía de absorción atómica.

B.27.2 Reactivos y materiales

B.27.2.1 Reactivos

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

Oxido de lantano (III) (máximo 0,0005% Ca) para espectroscopía de absorción atómica.

Acido clorhídrico fumante mínimo 37% para análisis

Solución patrón de magnesio

Solución patrón de magnesio lista para el uso 1000 mg/l

B.27.2.2 Materiales

Matraces aforados, 50, 100 y 1000 ml

Micropipetas de 50 - 200 μ l y 200 - 1000 μ l

Pipetas ajustables, 5 ml

Puntas amarillas de 50 a 200 μ l

Puntas azules de 200 a 1000 μ l

Puntas blancas

Probetas graduadas forma alta 10, 25 y 500 ml

Matraces Erlenmeyer cuello estrecho 100 ml

Embudos

Filtros redondos (< 0,007% de cenizas)

Frascos de polietileno flexible cuello estrecho de 100, 1000 ml

Cubeta de polietileno de 15 l

Descontaminación del material: En una cubeta de polietileno introducir 10 l de mezcla de ácido nítrico/agua (1:1).

En este baño descontaminar una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada y secar.

B.27.3 Aparatos e instrumentos

Balanza de precisión, capacidad 4100/600g: 0,1/0,001

Lámpara de calcio de tipo cátodo hueco

Espectrofotómetro de absorción atómica

Destilador de agua

Baño de agua

B.27.4 Preparación de soluciones**B.27.4.1 Solución de lantano 5 g/100 ml**

En un matraz aforado de 1000 ml pesar 58,6 g de óxido de lantano. Añadir aproximadamente 200 ml de agua destilada, agitar hasta que todo el óxido esté bien mojado. Añadir lentamente 250 ml de ácido clorhídrico concentrado (mínimo 37%). Enfriar y llevar al volumen con agua destilada.

Debe verificarse el contenido de magnesio de cada nuevo lote de óxido de lantano preparando una solución de lantano de 1 g/100 ml y comparando su contenido en magnesio con aquel de una solución patrón de magnesio de 0 µg/ml procedente de un lote anterior.

B.27.4.2 Solución de ácido clorhídrico 4 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 330 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

B.27.4.3 Solución de ácido clorhídrico 6 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 300 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

B.27.4.4 Solución patrón de magnesio 1000 mg/l

En un matraz aforado de 1000 ml introducir el contenido de una ampolleta de cloruro de magnesio. Enjuagar la ampolleta y llevar al volumen con agua destilada.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un año a temperatura ambiente.

También puede utilizarse una solución patrón de magnesio de 1000 mg/l lista para el uso.

B.27.4.5 Solución patrón de magnesio de 100 mg/l

En un matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta 10 ml de solución (B.27.4.4). Llevar a volumen con agua destilada.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un mes a temperatura ambiente.

B.27.4.6 Soluciones patrón diluidas de magnesio

En matraces aforados de 100 ml verter mediante una pipeta 0 - 0,2 - 0,5 - 1,0 y 1,5 ml de solución (B.27.4.5). Añadir 20 ml de solución de lantano (B.27.4.1) y llevar al volumen con agua destilada. Estas soluciones contienen respectivamente 0- 0,2 - 0,5 - 1,0 y 1,5 µg de magnesio/ml. Transferir inmediatamente a frascos de polietileno o polipropileno descontaminados.

Estas soluciones deben prepararse cada semana. Se recomienda comparar las nuevas soluciones con otras preparadas anteriormente a fin de detectar cualquier error grave de preparación.

B.27.5 Preparación de la muestra para ensayo**B.27.5.1 Productos sólidos**

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

B.27.5.2 Productos líquidos

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transferir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C). Mezclar bien antes de su uso.

B.27.6 Procedimiento

B.27.6.1 Toma de ensayo

En un matraz aforado de 50 ml pesar, con una precisión de 0,01 g, 1g de producto en polvo o 10g de producto líquido. Añadir agua destilada hasta un volumen de aproximadamente 15 ml. Añadir 10 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N (B.27.4.3). Calentar en un baño maría en ebullición durante 30 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Llevar al volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro exento de cenizas, eliminar los primeros 5 ml. Recolectar el resto del filtrado.

B.27.6.2 Dilución

En un matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta un volumen de la solución de toma de ensayo (B.27.6.1), tal que la concentración final esté comprendida entre 0,2 y 1,5 µg/ml. Añadir 20 ml de solución de lantano. Llevar al volumen con agua destilada. Esta solución contiene 1 g de lantano/100 ml.

B.27.6.3 Determinación

Ajustar el aparato de absorción atómica según las indicaciones del fabricante. Se recomienda utilizar mejor un quemador provisto de un nebulizador de hélice, que un nebulizador con bola de impacto. Deben respetarse las siguientes condiciones:

Lámpara de magnesio de tipo cátodo hueco

Longitud de onda: 282,2 nm

Llama: aire-acetileno, reductora

Dejar calentar la lámpara durante 15 a 20 min. Encender la llama y esperar unos 15 min a que alcance el equilibrio. Colocar el quemador de manera óptima.

Aspirar las soluciones patrón (B.27.4.6), luego las soluciones de la toma de ensayo (B.27.6.2). Después de cada medida, aspirar un poco de solución (B.14.4.2), luego agua destilada a fin de evitar que el capilar se obstruya. Después de aspirar diez soluciones de tomas de ensayo, verificar la calibración aspirando una solución patrón y efectuando un "reslope".

Trabajar de preferencia con la opción "integración"; la duración de las medidas debe ser de por lo menos 5 seg. Efectuar cada medida por lo menos tres veces. Ninguna solución de toma de ensayo no debe rebasar la concentración del patrón más concentrado. Efectuar una nueva dilución si es necesario (B.27.6.2).

27.7 Cálculo y expresión de resultados

B.27.7.1 Modo de cálculo

Calcular o trazar la curva de calibración llevando la absorbancia a la ordenada y la concentración de las soluciones patrón diluidas, en µg/ml, a la abscisa. Determinar la concentración de las soluciones de las tomas de ensayo (C). Restar el valor del blanco (B) de aquellos de los productos.

El contenido de magnesio en el producto, en mg/100 g, es igual a:

$$\text{Magnesio}_{\text{mg}/100 \text{ g}} = \frac{(C - B) \times V \times D \times 100}{m \times 1000} = \frac{(C - B) \times V \times D}{m \times 100}$$

En donde:

C = concentración de magnesio en las soluciones de las tomas de ensayo en $\mu\text{g/ml}$

B = concentración de magnesio en el blanco (solución patrón de 0 μg de magnesio/ml)

V = volumen inicial en las soluciones de las tomas de ensayo en ml

D = factor de dilución (B.14.6.2).

m = masa de la toma de ensayo en g

B.27.7.2 Expresión de los resultados

Contenidos inferiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con dos cifras significativas.

Contenidos superiores a 100 mg/100 g: expresar los resultados con tres cifras significativas.

B.27.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra, en las mismas condiciones, en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder el 5% de su valor medio.

B.28 DETERMINACION DE HIERRO (Fe) POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

B.28.1 Fundamento

Hidrólisis parcial del producto con ácido clorhídrico. Filtración. Dilución y determinación por espectroscopía de absorción atómica.

B.28.2 Reactivos y materiales

B.28.2.1 Reactivos

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

Acido clorhídrico fumante mínimo 37% para análisis

Solución patrón de hierro

Solución patrón de hierro lista para el uso, 1000 mg/l

28.2.2 Materiales

Matraces aforados 50, 100 y 1000 ml

Micropipetas de 50 a 200 μl y 200 a 1000 μl

Pipetas ajustables 5 ml

Puntas amarillas de 50 a 200 μl

Puntas azules de 200 a 1000 μl

Puntas blancas

Probetas graduadas forma alta 10, 25 y 500 ml

Matraces Erlenmeyer cuello estrecho 100 ml

Embudos

Filtros redondos (< 0,007% de cenizas)

Frascos de polietileno flexible cuello estrecho de 100 y 1000 ml

Cubeta de polietileno 15 l

Descontaminación del material: En una cubeta de polietileno introducir 10 l se mezcla de ácido nítrico/agua (1:1)

En este baño descontaminar durante una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno o de polipropileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada y secar.

B.28.3 Aparatos e instrumentos

Balanza de precisión, capacidad 4100/600g: 0,1/0,001

Lámpara de hierro de tipo cátodo hueco

Espectrofotómetro de absorción atómica

Destilador de agua

Baño de agua

B.28.4 Preparación de soluciones

B.28.4.1 Solución de ácido clorhídrico 1,2 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar a volumen con agua destilada.

B.28.4.2 Solución de ácido clorhídrico 4 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 330 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

B.28.4.3 Solución de ácido clorhídrico 6 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 300 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

B.28.4.4 Solución patrón de hierro 1000 mg/l

En un matraz aforado de 1000 ml introducir el contenido de una ampolleta de cloruro de hierro. Enjuagar la ampolleta y llevar al volumen con agua destilada.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un año a temperatura ambiente.

También puede utilizarse una solución patrón de hierro de 1000 mg/l lista para el uso.

B.28.4.5 Soluciones patrón diluidas de hierro

En matraces aforados de 100 ml verter mediante una pipeta 0 - 100 - 200 - 500 y 1000 μ l de solución (B.28.4.4). Añadir 20 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N y llevar al volumen con agua destilada. Estas soluciones contienen respectivamente 0 - 1,0 - 2 - 5,0 y 10 μ g de hierro/ml. Transferir inmediatamente a frascos de polietileno o polipropileno descontaminados.

Estas soluciones deben prepararse cada semana. Se recomienda comparar las nuevas soluciones con otras preparadas anteriormente a fin de detectar cualquier error grave de preparación.

B.28.5 Preparación de la muestra para ensayo

B.28.5.1 Productos sólidos

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

B.28.5.2 Productos líquidos

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transferir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C).

Mezclar bien antes de su uso.

B.28.6 Procedimiento

B.28.6.1 Toma de ensayo

En un matraz aforado de 50 ml pesar, con una precisión de 0,01 g; 1g de producto en polvo o 10g de producto líquido. Añadir agua destilada hasta un volumen de aproximadamente 15 ml. Añadir 10 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N (B.28.4.38). Calentar en un baño maría en ebullición durante 30 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Llevar al volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro exento de cenizas, eliminar los primeros 5 ml. Recolectar el resto del filtrado.

B.28.6.2 Dilución

En matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta un volumen de la solución de toma de ensayo (B.28.6.1), tal que la concentración final esté comprendida entre 1 y 8 µg/ml. Llevar al volumen con solución de ácido clorhídrico 1,2 N.

B.28.6.3 Determinación

Ajustar el aparato de absorción atómica según las indicaciones del fabricante. Se recomienda utilizar mejor un quemador provisto de un nebulizador de hélice, que un nebulizador con bola de impacto. Deben respetarse las siguientes condiciones:

Lámpara de hierro de tipo cátodo hueco

Longitud de onda: 248,3 nm

Llama: aire-acetileno, oxidante (azul, pobre en acetileno)

Dejar calentar la lámpara durante 15 - 20 min. Encender la llama y esperar unos 15 min a que alcance el equilibrio. Colocar el quemador de manera óptima.

Aspirar las soluciones patrón (B.28.4.5), luego las soluciones de la toma de ensayo (B.28.6.1 o B.28.6.2). Después de cada medida, aspirar un poco de solución (B.28.4.2), luego agua destilada a fin de evitar que el capilar se obstruya. Después de aspirar diez soluciones de tomas de ensayo, verificar la calibración aspirando una solución patrón y efectuando un "reslope".

Trabajar de preferencia con la opción "integración"; la duración de las medidas debe ser de por lo menos 5 seg. Efectuar cada medida por lo menos tres veces. Ninguna solución de toma de ensayo no debe rebasar la concentración del patrón más concentrado. Efectuar una nueva dilución si es necesario.

B.28.7 Cálculo y expresión de resultados

B.28.7.1 Modo de cálculo

Calcular o trazar la curva de calibración llevando la absorbancia a la ordenada y la concentración de las soluciones patrón diluidas, en µg/ml, a la abscisa. Determinar la concentración de las soluciones de las tomas de ensayo (C). Restar el valor del blanco (B) de aquellos de los productos.

El contenido de hierro en el producto, en mg/100 g, es igual a:

$$\text{Hierro}_{\text{mg}/100\text{ g}} = \frac{(C - B) \times V \times D \times 100}{m \times 1000} = \frac{(C - B) \times V \times D}{m \times 100}$$

En donde:

C = concentración de hierro en las soluciones de las tomas de ensayo, en µg/ml

B = concentración de hierro en el blanco (solución patrón de 0 µg de hierro por ml)

V = volumen inicial (B.28.6.1), en ml (en general 50)

D = factor de dilución (B.28.6.2).

m = masa de la toma de ensayo, en g

B.28.7.2 Expresión de los resultados

Expresar los resultados con dos cifras significativas.

B.28.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra, en las mismas condiciones, en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder el 10% de su valor medio.

B.29 DETERMINACION DE IODO (I) POR ELECTRODO DE ION SELECTIVO

B.29.1 Fundamento

La proteína es removida por precipitación con ácido. El iodo en el filtrado se mide usando el electrodo de ión selectivo, seguida de otra medición después de agregar una solución estándar de adición conocida. Las interferencias para las respuestas del electrodo son eliminadas con Nitrato de Níquel.

B.29.2 Aparatos

Balanza analítica con sensibilidad de $\pm 0,1$ mg.

Potenciómetro digital con escala de 0,1 mV.

Licuada con motor a prueba de explosión.

Electrodos: 1) Electrodo de ión-selectivo de I^-
2) Electrodo de referencia Ag/AgCl

B.29.3 Reactivos y materiales**B.29.3.1 Materiales**

Matraces volumétricos

Frascos de vidrio color ámbar

Material común de laboratorio

Agitador magnético, cubierto con una capa de estireno espumoso o material aislante para prevenir calentamiento de la muestra.

Papel filtro, de filtración rápida, doblados, con retención de partículas de 20-25 μm (sustitutable por papel filtro No. 541)

B.29.3.2 Reactivos**B.29.3.2.1 Agua destilada**

B.29.3.2.2 Solución de ácido acético glacial (C_2H_4O) al 3% v/v. Transferir 15 ml de ácido acético glacial a un matraz volumétrico de 500 ml que contenga aproximadamente 250 ml de agua. Llevar a volumen con agua y mezclar bien.

B.29.3.2.3 Yoduro de potasio (KI) o yoduro de sodio (NaI), se recomienda usar preferentemente estándares de referencia.

B.29.3.2.4 Solución estándar de Iodo

B.29.3.2.4.1 (Solución I) Solución estándar de referencia de I^- , de $0,100 \pm 0,001$ M (12,6 g de iodo/l) estandarizada. Pesar 16,998 g de KI o 14,898 de NaI y disolverlos en un matraz aforado de 1000 ml, llevar al volumen con agua, almacenar en un frasco ámbar a temperatura ambiente y protegido de la luz, descartar 12 meses después de la estandarización o 6 meses después de haberse abierto el frasco.

B.29.3.2.4.1.1 Estandarización de la solución I

Preparar los siguientes reactivos:

- Solución estándar titulante de nitrato de plata ($AgNO_3$) 0,0141 M (0,0141). Disolver 2,395 g de $AgNO_3$ en agua destilada y diluir a un litro con agua destilada, almacenar en frasco ámbar.

- Solución indicadora de cromato de potasio (K_2CrO_4). Disolver 50 g de K_2CrO_4 en un poco de agua, agregar de la solución de nitrato de plata anteriormente preparada hasta que se forme un precipitado rojo. Dejar reposar por 12 h, filtrar y diluir a un litro con agua destilada.

- Acido Sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 N o

- Hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N

Procedimiento: medir lo más exactamente posible 10 ml de la solución I de referencia de Iodo y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml y diluir a la marca con agua destilada, llevar a un pH entre 7 y 10 usando ácido sulfúrico o hidróxido de sodio 0,1 N. Tomar alícuotas de 25 ml y completar con agua destilada hasta aproximadamente 100 ml, agregar 1 ml de la solución indicadora de cromato de potasio y titular con la solución de nitrato de plata, hasta un vire color rojizo, asegurar la consistencia del punto final. Correr paralelamente un blanco de reactivos.

Cálculos:

$$\text{Estandarización solución } I_{\text{mg l}^{-1}} = \frac{(A - B) \times N \times 126\,900}{25 \text{ ml de la muestra}}$$

En donde:

A = ml gastados de nitrato de plata en la muestra

B = ml gastados de nitrato de plata en el blanco

N = Normalidad del nitrato de plata

126 900 = miliequivalentes del I- por 100 ml

B.29.3.2.4.2 Solución II. Solución stock de Iodo 101,5 mg/l. Colocar 8 ml de solución estándar de referencia de Iodo dentro de un matraz volumétrico de 1 l. Diluir a volumen con agua y mezclar bien. Guardar en frasco de color ámbar o en otro que proteja de la luz. Desechar después de dos semanas.

B.29.3.2.4.3 Solución III. Solución estándar intermedia de Iodo, 1 mg/l. Colocar con una pipeta 5 ml de la solución II (stock de Iodo), dentro de un matraz volumétrico de 500 ml. Diluir a un volumen con agua y mezclar bien. Guardar en frasco de color ámbar o en otro que proteja de la luz. Desechar después de dos semanas.

B.29.3.2.4.4 Solución IV. Solución estándar intermedia de Iodo, 0,1 mg/l. Colocar con una pipeta 10 ml de solución III (estándar intermedia de Iodo, dentro de un matraz de 100 ml. Diluir a volumen con agua y mezclar bien. Guardar en frasco de color ámbar o en otro que proteja de la luz. Desechar después de dos semanas.

B.29.3.2.4.5 Solución V. Solución estándar de adición conocida. Colocar con una pipeta 10 ml de solución II (stock de Iodo), dentro de un matraz volumétrico de 1 l. Diluir a volumen con agua y mezclar bien. Tomar una alícuota de 100 ml de esta solución y adicionar 1 ml de cada una de las siguientes soluciones: AFI, solución de nitrato de níquel y agua. Preparar solución fresca diariamente.

B.29.3.2.5 Solución para guardar el electrodo. Solución de Iodo 0,1 mg/l. Diluir 1 ml de la solución II (stock de Iodo) a 1 l con agua y mezclar bien. Guardar en frasco de color ámbar o en otro que proteja de la luz. Desechar la solución después de 3 meses. Guardar el electrodo de ión selectivo en esta solución cuando no se use, reemplazar la solución semanalmente.

B.29.3.2.6 Ajustador de fuerza iónica (AFI). Solución de nitrato de sodio 5 M. Disolver 42,5 g de nitrato de sodio, NaNO_2 , en aproximadamente 50 ml de agua en un matraz volumétrico de 100 ml, diluir al volumen con agua y mezclar bien.

B.29.3.2.7 Solución de nitrato de níquel 2 M, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Disolver 58,2 g de nitrato de níquel hexahidratado en aproximadamente 50 ml de agua en un matraz volumétrico de 100 ml. Diluir a volumen con agua y mezclar muy bien.

B.29.4 Preparación de la muestra

Si la muestra es líquida tomar directamente 100 ml. Si la muestra es sólida, pesar una cantidad de muestra tal que contenga entre 75 y 150 μl de Iodo y reconstituirla con agua hasta un volumen de 100 ml.

Colocar la muestra en un matraz volumétrico de 250 ml, adicionar 10 ml de solución de ácido acético al 3%, diluir al volumen con agua y mezclar bien. Pasar el contenido del matraz a una licuadora y mezclar a baja velocidad por 2 min. Filtrar para obtener un filtrado claro, si el filtrado es turbio descartar los primeros 10 ml.

B.29.5 Determinación

Precaución: Agitar todas las soluciones con agitador magnético antes de medir el potencial con el electrodo.

B.29.5.1 Calibración de la pendiente del electrodo. En un vaso de precipitados tomar 100 ml de la solución IV estándar intermedia de Iodo (0,1 mg/l), introducir los electrodos y agregar con agitación 1 ml de cada una

de las siguientes soluciones: solución AFI, solución de nitrato de níquel y agua, cuando la lectura del potencial sea estable aproximadamente de 2 a 5 min, registrar hasta décimas de mV como E1.

Retirar los electrodos, enjuagarlos con agua y secarlos.

En otro vaso de precipitados colocar 100 ml de la solución III estándar intermedia de iodo (1,0 mg/l), introducir los electrodos y adicionar con agitación 1 ml de las siguientes soluciones: solución AFI, solución de nitrato de níquel y agua, cuando la lectura del potencial sea estable aproximadamente de 2 a 5 min registrar la lectura hasta décimas de mV como E2.

Retirar los electrodos enjuagarlos con agua y secar.

Calcular la pendiente (S) del par de electrodos de la siguiente manera:

$$S = E2 - E1$$

Medir la pendiente cada 4 h cuando el electrodo esté en uso continuo. Usar el valor de la pendiente más reciente para calcular los resultados de las subsecuentes mediciones de iodo.

B.29.5.2 Valoración de la muestra. En un vaso de precipitados tomar 100 ml de la muestra filtrada y agitarla con un agitador magnético, adicionar 1 ml de las siguientes soluciones: solución AFI, solución de nitrato de níquel y ácido nítrico concentrado. Colocar los electrodos en la solución a analizar. Cuando la lectura del potencial sea estable aproximadamente 2 min registrar la lectura hasta décimas de mV como E3, inmediatamente con una pipeta adicionar 10 ml de la solución V estándar de adición conocida y agitar. Cuando sea estable aproximadamente 2 min registrar hasta décimas de mV como E4.

B.29.5.3 Cálculos

Calcular el contenido de iodo de la muestra como sigue:

$$\text{Iodo}_{\text{mg}/100 \text{ ml}} = Q \times 0,9854 \text{ mg/l} \times 2,5 \times 1,03$$

Usando:

$$Q = \frac{0,0885}{\text{anti log} \left[\frac{(E4 - E3)}{S} \right] - 0,912}$$

En donde:

0,9854 mg/l = concentración de iodo de la solución de estándar de adición conocida

2,50 = Factor de corrección por dilución de 100 ml de muestra a 250 ml.

1,03 = Factor de corrección de 100 ml de muestra filtrada con el volumen total de reactivos de 103 ml y

S = E2 - E1

$$0,0885 = \frac{\text{ml de estándar adicionado}}{\text{ml originales} + \text{ml de estándar adicionado}} = \frac{10}{103 + 10}$$

$$0,912 = \frac{\text{ml originales}}{\text{ml originales} + \text{ml de estándar adicionado}} = \frac{103}{103 + 10}$$

B.30 DETERMINACION DE CINC (Zn) POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

B.30.1 Fundamento

Hidrólisis parcial del producto con ácido clorhídrico. Filtración. Dilución y determinación por espectroscopía de absorción atómica.

B.30.2 Reactivos y materiales

B.30.2.1 Reactivos

Acido nítrico mínimo 65% para análisis

Acido clorhídrico fumante mínimo 37% para análisis

Solución patrón de zinc

Solución patrón de zinc lista para el uso, 1000 mg/l

B.30.2.2 Materiales

Matraces aforados 50, 100 y 1000 ml

Micropipetas de 50 a 200 μ l y 200 a 1000 μ l

Pipetas ajustables 5 ml

Puntas amarillas de 50 a 200 μ l

Puntas azules de 200 a 1000 μ l

Puntas blancas

Probetas graduadas forma alta 10, 25 y 500 ml

Matraces Erlenmeyer cuello estrecho 100 ml

Embudos

Filtros redondos (< 0,007% de cenizas)

Frascos de polietileno flexible, cuello estrecho de 100 y 1000 ml

Cubeta de polietileno 15 l

Descontaminación del material: En una cubeta de polietileno introducir 10 l se mezcla de ácido nítrico/agua (1:1).

En este baño descontaminar durante una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno o de polipropileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada y secar.

B.30.3 Aparatos e instrumentos

Balanza de precisión capacidad 4100/600g: 0,1/0,001

Lámpara de zinc de tipo cátodo hueco

Espectrofotómetro de absorción atómica

Destilador de agua

Baño de agua

B.30.4 Preparación de soluciones**B.30.4.1 Solución de ácido clorhídrico 1,2 N**

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar a volumen con agua destilada.

B.30.4.2 Solución de ácido clorhídrico 4 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 500 ml de agua destilada y 330 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

B.30.4.3 Solución de ácido clorhídrico 6 N

En un matraz aforado de 1000 ml introducir aproximadamente 300 ml de agua destilada y 500 ml de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar. Llevar al volumen con agua destilada.

B.30.4.4 Solución patrón de zinc 1000 mg/l

En un matraz aforado de 1000 ml introducir el contenido de una ampolleta de cloruro de zinc. Enjuagar la ampolleta y llevar al volumen con agua destilada.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente un año a temperatura ambiente.

También puede utilizarse una solución patrón de zinc de 1000 mg/l lista para el uso.

B.30.4.5 Solución patrón de zinc de 10 mg/l

En un matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta 1 ml de solución (B.30.4.4). Llevar a volumen con ácido clorhídrico.

Conservada en un frasco de polietileno o polipropileno descontaminado, esta solución es estable durante aproximadamente una semana a temperatura ambiente.

B.30.4.6 Soluciones patrón diluidas de zinc

En matraces aforados de 100 ml verter mediante una pipeta 0 - 1 - 2,5 - 5 - 7,5 y 10 ml de solución (B.30.4.5). Añadir 20 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N y llevar al volumen con agua destilada. Estas soluciones contienen respectivamente 0 - 0,1 - 0,25 - 0,50 - 0,75 y 1,0 µg de zinc/ml. Transferir inmediatamente a frascos de polietileno o polipropileno descontaminados.

Estas soluciones deben prepararse cada semana. Se recomienda comparar las nuevas soluciones con otras preparadas anteriormente a fin de detectar cualquier error grave de preparación.

B.30.5 Preparación de la muestra para ensayo

B.30.5.1 Productos sólidos

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

B.30.5.2 Productos líquidos

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transferir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C). Mezclar bien antes de su uso.

B.30.6 Procedimiento

B.30.6.1 Toma de ensayo

En un matraz aforado de 50 ml pesar, con una precisión de 0,01 g; 1 g de producto en polvo o 10 g de producto líquido. Añadir agua destilada hasta un volumen de aproximadamente 15 ml. Añadir 10 ml de solución de ácido clorhídrico 6 N (B.30.4.3). Calentar en un baño maría en ebullición durante 30 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Llevar al volumen con agua destilada. Filtrar a través de un filtro exento de cenizas, eliminar los primeros 5 ml. Recolectar el resto del filtrado.

B.30.6.2 Dilución

En matraz aforado de 100 ml verter mediante una pipeta un volumen de la solución de toma de ensayo (B.30.6.1), tal que la concentración final esté comprendida entre 0,1 y 0,8 µg/ml. Llevar al volumen con solución de ácido clorhídrico 1,2 N.

B.30.6.3 Determinación

Ajustar el aparato de absorción atómica según las indicaciones del fabricante. Se recomienda utilizar mejor un quemador provisto de un nebulizador de hélice, que un nebulizador con bola de impacto. Deben respetarse las siguientes condiciones:

Lámpara de zinc de tipo cátodo hueco

Longitud de onda: 213,9 nm

Llama: aire-acetileno, oxidante (azul, pobre en acetileno)

Dejar calentar la lámpara durante 15 - 20 min. Encender la llama y esperar unos 15 min a que alcance el equilibrio. Colocar el quemador de manera óptima.

Aspirar las soluciones patrón (B.30.4.6), luego las soluciones de la toma de ensayo (B.30.6.1 o B.30.6.2). Después de cada medida, aspirar un poco de solución (B.30.4.2), luego agua destilada a fin de evitar que el capilar se obstruya. Después de aspirar diez soluciones de tomas de ensayo, verificar la calibración aspirando una solución patrón y efectuando un "reslope".

Trabajar de preferencia con la opción "integración"; la duración de las medidas debe ser de por lo menos 3 seg. Efectuar cada medida por lo menos tres veces. Ninguna solución de toma de ensayo no debe rebasar la concentración del patrón más concentrado. Efectuar una nueva dilución si es necesario (B.30.6.2).

B.30.7 Cálculo y expresión de resultados

B.30.7.1 Modo de cálculo

Calcular o trazar la curva de calibración llevando la absorbancia a la ordenada y la concentración de las soluciones patrón diluidas, en µg/ml a la abscisa. Determinar la concentración de las soluciones de las tomas de ensayo (C). Restar el valor del blanco (B) de aquellos de los productos.

El contenido de zinc en el producto, en mg/100 g, es igual a:

$$\text{Zinc}_{\text{mg}/100\text{ g}} = \frac{(C - B) \times V \times D \times 100}{m \times 1000} = \frac{(C - B) \times V \times D}{m \times 100}$$

En donde:

C = concentración de zinc en las soluciones de las tomas de ensayo, en µg/ml

B = concentración de zinc en el blanco (solución patrón de 0 µg de zinc por ml)

V = volumen inicial en las soluciones de las tomas de ensayo en ml

D = factor de dilución B.30.6.2

m = masa de la toma de ensayo, en g

B.30.7.2 Expresión de los resultados

Expresar los resultados con dos cifras significativas.

B.30.8 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra, en las mismas condiciones, en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder el 4% de su valor medio.

B.31 DETERMINACION DE ARSENICO, CADMIO, COBRE, CROMO, ESTAÑO, HIERRO, MERCURIO, NIQUEL, PLATA, PLOMO, SELENIO Y ZINC POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

B.31.1 Principio del método

La propiedad que tienen los elementos en su estado atómico basal de absorber radiación electromagnética emitida por una fuente constituida por el mismo elemento de tal manera que al hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia específica pueda ser absorbido por el analito que se encuentra presente. La cantidad de radiación absorbida es proporcional a la concentración de los átomos de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer.

B.31.2 Equipo

B.31.2.1 Espectrofotómetro de absorción atómica equipado con:

B.31.2.1.1 Sistema de atomización por flama directa.

B.31.2.1.2 Horno de grafito.

B.31.2.1.3 Sistema generador de hidruros y vapor frío.

B.31.2.1.4 Sistema de corrector de fondo (Deuterio, Zeeman o Smith-Hieftje).

B.31.2.1.5 Automuestreador, aspiración o inyección manual.

B.31.2.1.6 Sistema de lectura directa, digital o analógica, registrador o sistema de datos apropiado para el control del instrumento.

B.31.2.2 Fuente de radiofrecuencia en caso de usar lámparas de descarga sin electrodos.

B.31.2.3 Horno de digestión por microondas.

B.31.2.4 Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

B.31.2.5 Mufia.

B.31.2.6 Parrilla de calentamiento con control de temperatura.

B.31.2.7 Autoclave que alcance las 15 lb de presión u horno de calentamiento.

B.31.3 Materiales

B.31.3.1 Lámparas de cátodo hueco o de descarga sin electrodos para determinar plata, arsénico, cadmio, cromo, cobre, hierro, mercurio, níquel, plomo, selenio, estaño y zinc.

B.31.3.2 Tubos de grafito pirolizados.

B.31.3.3 Vasos para digestión de teflón. Enjuagar con acetona, lavar con agua desionizada, y mantener los vasos cubiertos con una solución de ácido nítrico 1 M por al menos 30 min. Enjuagar con agua desionizada y secar.

B.31.3.4 Matracas volumétricos de 10, 25, 50, 100, 250 y 1000 ml.

B.31.3.5 Matracas apropiados para el generador de hidruros.

B.31.3.6 Recipientes y tapas de plástico.

B.31.3.7 Micropipeta o dosificador.

B.31.3.8 Matracas Kjeldahl.

B.31.3.9 Sistema de reflujo con refrigerante.

B.31.3.10 Bombas Parr (opcionales).

B.31.3.11 Crisoles o cápsulas adecuados.

B.31.3.12 Material común de laboratorio.

Lavar todo el material de vidrio y plástico primero con agua y detergente. En seguida enjuagar con agua de la llave y después con agua destilada. Sumergir en un recipiente que contenga una solución de ácido nítrico al 30%. Tapar y dejar en reposo por un lapso de 24 h. Quitar el exceso de ácido nítrico con varios enjuagues (5 o 6 veces) de agua desionizada. Dejar escurrir y secar.

B.31.4 Reactivos

Todos los reactivos deben ser grado suprapuro o su equivalente a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua desionizada o tridestilada.

B.31.4.1 Soluciones patrón de referencia certificadas de plata, arsénico, cadmio, cromo, cobre, hierro, mercurio, níquel, plomo, selenio, estaño y zinc a una concentración de 1000 mg/l.

B.31.4.2 Acido nítrico concentrado, 65% p/p (HNO_3).

B.31.4.3 Peróxido de hidrógeno al 30% p/p (H_2O_2).

B.31.4.4 Acido sulfúrico concentrado, 96% p/p (H_2SO_4).

B.31.4.5 Acido clorhídrico concentrado, 37% p/p (HCl).

B.31.4.6 Fosfato monobásico de amonio RA ($(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$).

B.31.4.7 Nitrato de magnesio hexahidratado RA ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

B.31.4.8 Borohidruro de sodio RA (NaBH_4).

B.31.4.9 Cloruro de potasio RA (KCl).

B.31.4.10 Permanganato de potasio RA (KMnO_4).

B.31.4.11 Cloruro estanoso (SnCl_2).

B.31.4.12 Yoduro de potasio (KI).

B.31.4.13 Modificador de matriz.

Pesar 10 g de fosfato monobásico de amonio y 0,5 g de nitrato de magnesio en un matraz volumétrico de 200 ml, disolver y llevar al volumen con agua.

B.31.4.14 Solución de nitrato de magnesio al 7% p/v.

Pesar 7 g de nitrato de magnesio y mezclar con 100 ml de ácido clorhídrico 1 N.

B.31.4.15 Acido clorhídrico 1 N.

Medir 8,3 ml de HCl y llevar a 100 ml con agua.

B.31.4.16. Solución de ácido nítrico al 50% v/v.

Diluir 50 ml de HNO₃ concentrado en 50 ml de agua.

B.31.4.17 Solución de nitrato de magnesio al 50% p/v.

Pesar 50 g de nitrato de magnesio y mezclar con 100 ml de ácido clorhídrico 1 N.

B.31.4.18 Solución de ácido clorhídrico 0,5 N.

Diluir 4,15 ml de HCl y llevar a 100 ml con agua.

B.31.4.19 Solución de cloruro de potasio de 10 mg de K/ml.

Pesar 1,91 g de KCl y llevar a un volumen de 100 ml con agua.

B.31.4.20 Solución de permanganato de potasio al 5% p/v.

Pesar 5 g de KMnO₄ y mezclar con 100 ml de agua.

B.31.4.21 Solución reductora.

Preparar de acuerdo con el manual de operación del equipo.

B.31.4.22 Solución de ácido nítrico al 2% v/v.

Agregar lentamente 2 ml de ácido nítrico concentrado a 100 ml de agua.

B.31.4.23 Aire comprimido seco y limpio.**B.31.4.24** Acetileno grado absorción atómica.**B.31.4.25** Oxido nitroso grado absorción atómica.**B.31.4.26** Argón grado absorción atómica.**B.31.4.27** Nitrógeno grado absorción atómica.**B.31.5 Preparación de la muestra**

B.31.5.1 Digestión por microondas para la determinación de arsénico, cadmio, cromo, cobre, hierro, mercurio, níquel, plomo, selenio, estaño y zinc.

B.31.5.1.1 Pesar en un vaso de digestión como máximo 0,5 g de muestras secas y de 5 a 10 g de muestras líquidas.

B.31.5.1.2 Adicionar 5 ml de ácido nítrico concentrado y 2 ml de peróxido de hidrógeno al 30%. Tapar los vasos y colocarlos en el horno de microondas.

B.31.5.1.3 Fijar el programa de calentamiento del horno de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

B.31.5.1.4 Sacar los vasos del horno y dejar enfriar a temperatura ambiente. Transferir la solución digerida a un matraz volumétrico adecuado y llevar al volumen con agua.

B.31.5.2 Digestión por vía húmeda para la determinación de cadmio, cromo, cobre, hierro, níquel, plomo y zinc.

B.31.5.2.1 Pesar como máximo 40 g de jugo o bebida, 20 g de alimentos que contengan de 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos o semisólidos. Limitar el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5 g.

B.31.5.2.2 Añadir 10 ml de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión, dependiendo del comportamiento de la muestra.

B.31.5.2.3 Digerir en un sistema Kjeldahl o en un sistema de reflujo refrigerante e iniciar el calentamiento gradualmente para evitar pérdidas de muestra.

B.31.5.2.4 Digerir la muestra durante 3 h o más tiempo si es necesario (algunas muestras requieren la adición de mayor cantidad de ácido nítrico) hasta que la solución sea traslúcida. Si esto no sucede, adicionar peróxido de hidrógeno gota a gota con agitación continua hasta lograr una solución traslúcida.

B.31.5.2.5 Enfriar, filtrar y llevar a un volumen conocido con agua.

B.31.5.3 Digestión por vía seca para la determinación de Cu, Fe, Cr, Ni y Zn.

B.31.5.3.1 Pesar en un crisol o cápsula como máximo 40 g de jugo o bebida, 20 g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos o semisólidos. Limitar el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5 g.

B.31.5.3.2 Añadir 10 ml de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión dependiendo del comportamiento de la muestra. En productos con alta concentración de proteínas adicionar una solución de nitrato de magnesio al 7% p/v y mezclar completamente. Llevar a sequedad aproximadamente durante 6 h en estufa a una temperatura de 90 a 95°C.

B.31.5.3.3 Colocar la muestra en mufla y elevar la temperatura lentamente de 2 a 4°C por minuto hasta 350°C. Mantener la temperatura hasta que cesen los humos.

B.31.5.3.4 Elevar gradualmente la temperatura hasta 500 a 550°C para evitar que la muestra se incinere y mantener esta temperatura durante 16 h o toda la noche.

B.31.5.3.5 Un segundo paso de calcinación puede ser requerido para remover algunos residuos, para ello lavar las paredes del crisol con 2 ml de ácido nítrico al 50%. Colocar la muestra en una parrilla de calentamiento a 120°C para remover el exceso de ácido y hasta la eliminación de vapores. Colocar la muestra en mufla fría y elevar la temperatura gradualmente hasta 500 a 550°C, manteniéndola por el tiempo necesario. Repetir este procedimiento cuantas veces sea necesario hasta que la muestra quede libre de carbón remanente.

B.31.5.3.6 Disolver las cenizas completamente en ácido clorhídrico 1 N. Transferir la muestra disuelta a un matraz volumétrico adecuado, enjuagando el crisol con dos porciones de 5 ml de ácido clorhídrico 1 N.

Adicionar los enjuagues al matraz y llevar al volumen con agua.

B.31.6 Procedimiento

B.31.6.1 Determinación de cadmio, cromo, cobre, hierro, níquel, plomo, estaño y zinc. EAA por flama directa.

B.31.6.1.1 Preparación de las curvas patrón.

Preparar un blanco y al menos 3 diluciones de la solución patrón para cada metal, en el intervalo lineal de trabajo utilizar ácido nítrico al 2% para hacer las diluciones.

Nota: Las soluciones patrón de Estaño deben contener 1 ml de solución de cloruro de potasio por cada 100 ml.

B.31.6.1.2 Determinación

B.31.6.1.2.1 Dejar estabilizar el equipo y fijar las condiciones para cada metal de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Utilizar como guía el siguiente cuadro:

Elemento	Longitud de onda (nm)	Mezcla de gases
Cadmio	228,8	Aire/acetileno
Cromo	357,9	Aire/acetileno
Cobre	324,7	Aire/acetileno
Hierro	248,3	Aire/acetileno
Níquel	232	Aire/acetileno
Plomo	217,3 o 283,3	Aire/acetileno
Estaño	235,5	Oxido nitroso/acetileno
Zinc	213,8	Aire/acetileno

B.31.6.1.2.2 Ajustar el instrumento a 0 de absorbancia con el blanco de calibración. Aspirar las soluciones patrón de calibración del analito de menor a mayor concentración y registrar al menos dos réplicas de la absorbancia de cada uno.

B.31.6.1.2.3 Elaborar una curva de calibración, graficando la absorbancia en función de la concentración de cada metal. Ajustar la curva por medio de mínimos cuadrados (regresión lineal).

B.31.6.1.2.4 Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

B.31.6.1.2.5 Aspirar las muestras preparadas en (B.31.5.1 o B.31.5.3) y registrar la absorbancia de cada una ellas. Calcular la concentración de cada metal a partir de la curva de calibración correspondiente.

Se debe analizar al menos un blanco de reactivos con cada lote de muestras.

B.31.6.1.2.6 Asegurarse de que las concentraciones de las muestras caen dentro del intervalo de calibración de la curva patrón. De no ser así, efectuar la dilución correspondiente y volver a analizar.

Nota: Esta metodología no aplica para la determinación de Cadmio y Plomo cuando las muestras son digeridas por horno de microondas.

B.31.6.2 Determinación de As y Se. EAA por generador de hidruros.**B.31.6.2.1 Preparación de la curva patrón.**

B.31.6.2.1.1 Preparar un blanco y al menos 3 soluciones patrón en el intervalo lineal de trabajo.

B.31.6.2.1.2 Antes de aforar adicionar la solución reductora de acuerdo con el manual del fabricante. Dejar reposar = 30 min y llevar al volumen con agua.

B.31.6.2.2 Determinación

B.31.6.2.2.1 Conectar el generador de hidruros al espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda, la celda, el flujo de gases y tiempos de purga de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

B.31.6.2.2.2 Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración y optimizar la respuesta del instrumento con la solución patrón establecida en el manual de operación del equipo.

B.31.6.2.2.3 Llevar a cabo la reacción para la formación de hidruros con cada una de las soluciones patrón de menor a mayor concentración y registrar al menos dos réplicas de la absorbancia de cada uno.

B.31.6.2.2.4 Elaborar una curva de calibración, graficando la absorbancia en función de la concentración de As. Ajustar la curva por medio de mínimos cuadrados (regresión lineal).

B.31.6.2.2.5 Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

B.31.6.2.2.6 Analizar la muestra digerida en (B.31.5.1), de la misma forma que las soluciones patrón. Analizar un blanco de reactivos con cada lote de muestras.

B.31.6.2.2.7 Asegurarse de que las concentraciones de las muestras caen dentro del intervalo de calibración de la curva patrón. De no ser así, repetir la determinación con una alícuota más pequeña.

B.31.7 Expresión de resultados

B.31.7.1. Cálculos

Para alimentos, bebidas alcohólicas y no alcohólicas y aditivos:

$$\text{Metal}_{\text{mg/kg}} = \frac{(A - B) \times V}{M}$$

Para agua y hielo:

$$\text{Metal}_{\mu\text{g/l}} = A - B$$

En donde:

A = concentración del metal en la muestra leído directamente del instrumento o de la curva de calibración

B = concentración del metal en el blanco de reactivos del instrumento leído directamente del instrumento o de la curva de calibración

V = volumen de la solución de la muestra digerida

M = peso de la muestra

Si la muestra ha sido diluida, el factor de dilución debe ser tomado en cuenta.

B.31.8 Informe de la prueba

mg metal/kg o l

B.32 DETERMINACION DE INOSITOL POR METODO MICROBIOLOGICO

B.32.1 Fundamento

Este método permite cuantificar Inositol utilizando *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080, microorganismo que no es capaz de sintetizar inositol, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de Inositol presente. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio comercial basal libre de Inositol. El crecimiento celular se mide turbidimétricamente y por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra.

B.32.2 Reactivos y materiales

B.32.2.1 Reactivos

myo-inositol para fines bioquímicos

Acido clorhídrico fumante al 37% para análisis

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Cristales de cloruro de sodio para análisis

Metanol para análisis

α -amilasa pancreática 25 U/mg

Fosfatasa

Lactosa monohidratada

B.32.2.2 Materiales

Micropipetas

Material común de laboratorio

C32.3 Aparatos e instrumentos

Autoclave

Incubadora a $35 \pm 1^\circ\text{C}$

Espectrofotómetro

Centrífuga

Termorreactor

B.32.4 Ceba y medios de cultivo

Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080

Medio para la prueba de Inositol modificado. Por cada 100 ml agregar (NH₄) SO₄: 1,5 g, Ascorbato de sodio: 25 g, ZnSO₄ 7H₂O: 15 mg, CuSO₄: 15 mg, NaMoO₄ x 2H₂O :15 mg, Nitrato de tiamina: 0,5 mg, Nicotinamida: 5 mg, Lactosa: 23,45 g.

Agar de microensayo

B.32.4.1 Medio de mantenimiento de la cepa

Agar de microensayo (Micro Assay)

Preparar 1 l de medio según las indicaciones de la etiqueta. Repartir a razón de 6 ml en tubos (de preferencia con tapón de rosca), esterilizar y enfriar en posición inclinada, a fin de obtener una pendiente lo más larga posible (agar inclinado).

Conservar en el refrigerador de 2 a 8°C.

B.32.4.2 Mantenimiento de la cepa

Inocular por estría *Saccharomyces carlsbergensis* en superficie en el medio B.32.4.1 cada dos semanas. Preparar el número de tubos necesarios para el análisis y guardar por lo menos dos tubos para el mantenimiento de la cepa.

Incubar durante 24 h a 30°C.

B.32.5 Preparación de soluciones**B.32.5.1 Solución fisiológica**

Disolver 9 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Repartir a razón de 10 ml en tubos, taparlos con capuchones y esterilizar durante 15 min a 121°C.

Conservar en el refrigerador de 2 a 8°C.

B.32.5.2 Solución de ácido clorhídrico aproximadamente 3 N

Bajo una campana de extracción vertir en un matraz aforado de 1000 ml que ya contenga agua destilada, 250 ml de ácido clorhídrico al 37% y llevar a volumen.

B.32.5.3 Solución de ácido clorhídrico - metanol 1:1

En una probeta graduada de 500 ml, mezclar 250 ml de metanol con 250 ml de ácido clorhídrico 3 N

B.32.5.4 Solución de hidróxido de sodio, 60 g/100 ml

En una probeta graduada de 500 ml, disolver 300 g de hidróxido de sodio en agua destilada, enfriando bajo el agua del grifo. Completar a 500 ml. Conservar en un matraz con tapón de polietileno o de goma.

B.32.5.5 Solución de hidróxido de sodio aproximadamente 1 N

En un matraz aforado de 500 ml con tapón de polietileno, disolver 20 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a volumen.

B.32.5.6 Solución patrón

Justo antes del uso, pesar exactamente 25,0 mg de Inositol. Disolver en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 250 ml.

B.32.5.7 Mezcla de enzimas para hidrólisis

En un mortero, mezclar 0,50 g de α-amilasa pancreática de aproximadamente 25 unidades/mg y 0,10 g de fosfatasa con 9,4 g de lactosa monohidratada.

B.32.6 Procedimiento**B.32.6.1 Desarrollo del microorganismo**

Tres días antes de la inoculación del ensayo, efectuar tres cultivos sucesivos de 24 h en superficie de agar.

Incubar durante 24 h a 30°C.

B.32.6.2 Preparación de la toma de ensayo e hidrólisis

En un matraz aforado de 50 ml, pesar 5 g de muestra para ensayo. Añadir aproximadamente 40 ml de agua destilada a 50°C, luego agitar hasta obtención de una suspensión homogénea. Enfriar y llevar a volumen con agua.

De cada muestra tomar una parte alícuota de 10 ml que contenga aproximadamente 0,2 a 0,3 mg de inositol e introducir en un tubo de hidrólisis. En cada tubo añadir 100 mg de mezcla de enzimas (B.32.5.7), cubrir con papel de aluminio e incubar durante 15 min a 42°C. A continuación añadir 20 mg de papaína e incubar otros 15 min a la misma temperatura.

Luego introducir en cada tubo 15 ml de solución de hidrólisis B.32.5.3 y tres perlas de vidrio.

Conectar los refrigerantes, luego calentar a reflujo a 110°C durante 6 h. Dejar enfriar.

Nota:

Los hidrolizados pueden conservarse una noche.

Transferir cuantitativamente el contenido de los tubos a matraces Erlenmeyer de 250 ml. Llevar el pH a 5,2 con solución de hidróxido de sodio de 60 g/100 ml, luego con solución de NaOH 1 N. A continuación transferir cuantitativamente a matraces aforados de 100 o 150 ml. Llevar a volumen con agua destilada.

Filtrar sobre papel filtro plisado con velocidad de filtración media. La solución final debe contener de 3 a 4 µg de inositol/ml.

B.32.6.3 Solución patrón de 4/µg de Inositol por ml.

Justo antes del uso diluir la solución B.32.5.6 como sigue:

10 ml a 250 ml = 4 µg/ml

B.32.6.4 Medio de cultivo para el ensayo

Medio para prueba de Inositol

En un matraz Erlenmeyer de vidrio actínico de 1000 ml, preparar el volumen necesario para los tubos utilizados en el ensayo. Proceder según las indicaciones de la etiqueta, calentando la solución en una parrilla con agitación magnética.

Cálculo del volumen necesario:

patrón:	30 tubos 30 x 5 ml = 150 ml
cada producto:	15 tubos 15 x 5 ml = 75 ml
+ 50 ml a 100 ml de exceso	

B.32.6.5 Preparación del ensayo**B.32.6.5.1** Serie patrón

En un soporte metálico para tubos de ensayo, colocar 3 filas de 10 tubos (180 x 18 mm), numerados bl, 0, ..., 8; el primero corresponde al blanco.

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la solución patrón, completar a 5 ml con agua destilada y mediante una bureta o una jeringa automática, añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo según la tabla siguiente:

Tubo No.: bl	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón: 0,0	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0	1,5	2	2,5	3,0 ml
Agua: 5	5	4,75	4,5	4,25	4,0	3,5	3,0	2,5	2 ml
Medio de cultivo: 5 ml en cada tubo									

Los tubos del ensayo en blanco (bl) no se inoculan.

B.32.6.5.2 Serie producto

En otro soporte colocar tres filas de 10 tubos (180 x 18 mm). Los primeros cinco tubos de las tres filas van destinados a un producto, los otros cinco tubos de las tres filas, a otro producto. Numerar de 9 a 13 y de 14 a 18 y así sucesivamente para todos los productos analizados.

Mediante una pipeta verter en triplicado en las tres series de cinco tubos, volúmenes crecientes de la última dilución de la toma de ensayo, completar a 5 ml con agua destilada y añadir 5 ml de medio de cultivo para el ensayo, según la tabla siguiente:

Tubo No.: 9	10	11	12	13
Solución de la muestra: 0,75	1,0	1,50	2	2,50 ml
Agua: 4,25	4,0	3,50	3,0	2,50 ml
Medio de Cultivo: 5 ml en cada tubo				

Tapar los tubos con capuchones o mediante una tapa adecuada que cubra las tres filas de tubos en el soporte.

B.32.6.6 Esterilización del ensayo

Esterilizar los tubos durante 10 min a 115°C, luego enfriarlos en un baño de agua fría.

B.32.6.7 Inoculación**B.32.6.7.1 Lavado del cultivo**

Unos instantes antes de la inoculación del ensayo, poner en suspensión el microorganismo del último cultivo sobre agar (B.32.6.1), adicionando 10 ml de solución fisiológica en el tubo que contiene el cultivo. Transferir a un tubo de centrifuga estéril y centrifugar durante 2 min a 1000 rpm (aproximadamente 100 g).

Decantar la solución fisiológica. Tomar aproximadamente 2 ml de esta suspensión e introducirla en una cubeta óptica de 1 cm. Medir la absorbancia a 575 nm.

B.32.6.7.2 Preparación del inóculo.

Estandarizar el cultivo a fin de obtener siempre más o menos la misma extinción.

Según la extinción obtenida, diluir en un tubo que contenga 10 ml de solución fisiológica "n" gotas del cultivo (B.32.6.7.1); este tubo constituye el inóculo.

Así pues, para una extinción del cultivo (B.32.6.7.1) superior o igual a 1,5 (después de sustraer la extinción propia del medio), es necesario introducir 1 gota del mismo en el tubo que contiene 10 ml del medio (B.32.6.4). Si la extinción no se encuentra dentro de los valores arriba citados, adaptar la dilución como sigue:

- extinción inferior a 1,5: introducir dos gotas en el tubo
- extinción inferior a 1,2: introducir tres gotas

B.32.6.7.3 Inoculación

Mediante una micropipeta con punta estéril, inocular 0,1 ml del inóculo en cada tubo de las series patrón y producto. Los tubos del blanco (bl) no se inoculan.

Después de inocular, agitar los tubos ligeramente a fin de repartir el microorganismo uniformemente en el medio.

B.32.6.8 Incubación

Incubar los tubos inoculados durante aproximadamente 21 h a 30°C. Dado que *Saccharomyces carlsbergensis* es aerobio, inclinar los tubos al máximo a fin de que la superficie de contacto entre el líquido y el aire sea lo mayor posible. Verificar si la diferencia de desarrollo del microorganismo es suficiente entre la primera y la última dilución de la solución patrón.

Si es necesario, prolongar la incubación hasta que se obtenga un crecimiento óptimo del microorganismo.

Después de la incubación se recomienda interrumpir el crecimiento del microorganismo simultáneamente en todos los tubos, colocándolos en un baño de agua fría.

B.32.6.9 Lecturas

Mediante un agitador para tubos de ensaye, poner en suspensión el depósito formado por el desarrollo del microorganismo. Transferir la suspensión a un tubo o una cubeta óptica, según el fotómetro. Medir la transmitancia o absorbancia a 575 nm ajustando el 100% T o a 0% de A del aparato con el blanco (bl).

NOTA: si la determinación se hace en absorbancia buscar el equivalente de los valores de los ejemplos dados en transmitancia.

Agitar y leer un tubo después de otro, a fin de evitar la sedimentación del microorganismo.

B.32.7 Cálculos**B.32.7.1** Curva de calibración

Trazar la curva de calibración en papel milimétrico o utilizar una calculadora con regresión lineal, llevando la lectura media de cada grupo de tres tubos a la ordenada y los μg de inositol a la abscisa.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	μg	lecturas			media
			1	2	3	
0	0,0	0,0	95,7	95,9	96,0	95,8
1	0,25	1,0	91,2	90,5	91,2	91,0
2	0,50	2	85,6	85,9	85,1	85,5
3	0,75	3,0	79,5	79,5	80,9	80,0
4	1,0	4,0	73,5	72,6	72,5	72,9
5	1,5	6,0	58,4	57,6	55,8	57,3
6	2	8,0	50,4	50,4	50,1	50,3
7	2,5	10	48,5	45,4	48,5	47,5
8	3,0	12	4,0	41,6	44,3	42,6

Observaciones:

La curva de calibración es característica de cada vitamina.

Es tanto mejor cuanto mayor sea la parte que ocupa de la escala de transmisión.

Repetir el ensayo cuando la curva de crecimiento esté mal desarrollada, esto puede deberse a la cepa o al medio de cultivo para el ensayo, que deben verificarse por separado.

B.32.7.2 Contenido de vitamina en el producto

La media de las lecturas de cada par de tubos permite leer en la curva de calibración la cantidad de vitamina y calcular su concentración en la última dilución de la muestra.

Ejemplo:

Tubo No.	ml	lecturas			media	μg^*	$\mu\text{g/ml}$
		1	2	3			
9	0,75	78,7	80,4	80,2	79,8	2,9	3,87
10	1,0	73,7	74,6	74,2	74,2	3,7	3,70
11	1,5	61,9	62,3	62,8	62,3	5,5	3,67
12	2	49,0	49,6	49,8	49,5	8,3	4,15
13	2,5	40,8	40,8	40,3	40,3	**	**

Media 3,85 (=C)

* = valores leídos en la curva de calibración

** = punto fuera de la curva

Observación:

Fluctuaciones pequeñas en los valores de la última columna son prueba de un buen ensayo.

Calcular el contenido de vitamina en mg/100 g de producto, teniendo en cuenta las diluciones sucesivas y la concentración en la muestra diluida.

El contenido de inositol, expresado en mg/100 g de producto es igual a:

$$\text{Inositol}_{\text{mg}/100\text{ g}} = \frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

En donde:

C = media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en $\mu\text{g}/\text{ml}$

V_1 = volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en ml

V_2 = parte alícuota de V_1 , en ml

V_3 = volumen al que se ha diluido la parte alícuota V_2 , en ml

m = toma de ensayo, en g

Ejemplo:

5,025 g (m) de producto se han pesado en un matraz aforado de 50 ml (V_1). Se ha tomado una parte alícuota de 10 ml (V_2), que se ha diluido en un matraz aforado de 100 ml (V_3).

La media de las concentraciones de Inositol leídas en la curva de calibración es 3,85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (C).

El contenido de Inositol es:

$$\text{Inositol}_{\text{mg}/100\text{ g}} = \frac{3,85 \times 100 \times 50 \times 100}{5,025 \times 10 \times 1000} = 38.5 \text{ mg} / 100 \text{ g}$$

B.33. DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA POR KJELDAHL-GUNNING

B.33.1 Fundamento

Las proteínas y demás materias orgánicas son oxidadas por el ácido sulfúrico y el nitrógeno orgánico de las proteínas se fija como sulfato de amonio; esta sal se hace reaccionar con una base fuerte para desprender amoniaco que se destila y se recibe en un ácido débil, en el cual se puede titular el amoniaco con un ácido fuerte. En este método de Kjeldahl-Gunning, se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión.

B.33.2 Material

Matraz de Kjeldahl de 800 ml

Matraz Erlenmeyer de 500 ml

Bureta de 50 ml

Pipetas volumétricas de 5 ml

Probeta

Cuerpos de ebullición

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

Digestor-destilador de Kjeldahl

B.33.3 Reactivos

Acido sulfúrico (H_2SO_4)

Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

Granalla de zinc (malla 20)

Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)

Acido bórico al 4% en agua (H_3BO_3)

Solución concentrada de hidróxido de sodio 1:1 m/v (NaOH)

Acido clorhídrico 0,1 N (HCl)

B.33.3.1 Indicador de Wesslow

B.33.3.1.1 Rojo de metilo al 0,2% en una mezcla de 60 ml de alcohol etílico y 40 ml de agua ($(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}=\text{NC}_6\text{H}_4\text{COOH}$ y $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ y H_2O).

B.33.3.1.2 Azul de metileno al 0,2% en agua $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SCl}_2\text{Cl}_2\text{Zn}\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Mezclar dos partes de (B.33.3.1.1) y una parte de (B.33.3.1.2.)

B.33.4 Procedimiento

Pesar exactamente 1 g de muestra en un matraz de Kjeldahl, agregar 2 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de sodio anhidro, 25 ml de ácido sulfúrico y unos cuerpos de ebullición; colocar a baja temperatura, hasta que todo el material esté carbonizado y aumentar gradualmente la temperatura hasta que el contenido del matraz esté completamente claro, dejar por 30 min más.

Dejar enfriar y agregar 400 ml de agua destilada para disolver completamente el residuo del matraz; dejar enfriar, agregar 6-7 granallas de zinc, estratificando, y sin agitar, agregar 50 ml de solución de hidróxido de sodio. Conectar el matraz al destilador y recibir el destilado en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, que contenga 50 ml de ácido bórico y unas gotas del indicador de Wesslow (la parte terminal del tubo del destilador debe estar dentro del ácido). Destilar hasta aproximadamente 300 ml. Retirar el matraz y titular con ácido clorhídrico 0,1 N.

B.33.5 Cálculos

$$\text{Proteína}_{g/l} = \frac{V \times N \times 0,014 \times 1000}{M} \times 6,38$$

En donde:

V = ml de ácido clorhídrico 0,1 N requeridos en la titulación

N = normalidad del ácido clorhídrico

M = ml de muestra

6,38 = factor para convertir nitrógeno a proteínas de la leche

B.33.6 Según el método de Kjeldahl para determinar el contenido de nitrógeno total (N₂) de la fórmula, seguido del cálculo del contenido de proteína cruda como sigue:

N₂ x factor = proteína cruda

Factores que deben usarse

Proteína de trigo 5,70

Proteína de soya 6,25

Proteína derivada de la leche 6,38

Proteínas mixtas:

Cuando el alimento contiene más de por ejemplo el 90% (peso seco) de proteína de trigo, soya o derivada de leche, el factor proteína debe ser 5,70; 6,25 y 6,38 respectivamente.

Cuando el alimento está constituido por una cantidad importante conocida (por ejemplo 80%) de peso seco de proteína de trigo, soya o derivada de leche, el factor para dicha proteína debe ser el factor apropiado según se indica arriba. Cuando la proteína remanente está constituida por una mezcla desconocida de estas proteínas, debe aplicarse el factor 6,25 a la cantidad remanente de proteína.

Cuando se conoce la cantidad de cada una de las proteínas de trigo, de soya o derivada de leche contenida en el alimento, el factor proteína empleado deberá ser el derivado proporcionalmente usando los factores arriba citados.

B.33.7 Los resultados se expresan como g de proteína cruda por 100 g del alimento tal como se vende y por 100 kcal.

B.34 DETERMINACION DE GRASA

B.34.1 Método del Extracto etéreo. Para productos como chocolates, granos, polvos con chocolate, entre otros.

B.34.1.1 Fundamento

El método para la extracción de los lípidos libres, utiliza un agente deshidratante que absorbe la humedad de la muestra y arena de mar que provoca un medio poroso que permite que el disolvente pase con mayor facilidad a través de ésta, extrayendo la grasa presente. En la extracción de lípidos combinados se utiliza el medio ácido para disolver las proteínas y así permitir la separación de la grasa.

B.34.1.2 Reactivos y materiales**B.34.1.2.1 Reactivos**

Acido clorhídrico (HCl) diluido al 33% v/v. Diluir 100 ml de HCl concentrado con 200 ml de agua destilada.

Arena de mar tratada

Eter de petróleo G.R. (P.E. 30-60°C), libre de grasa o éter etílico G.R. libre de peróxidos.

Sulfato de sodio anhidro G.R.

Tierra de diatomáceas (celite 503)

B.34.1.2.2 Materiales

Agitador de vidrio de 20 cm

Algodón libre en grasa

Cartucho de extracción de tamaño adecuado al extractor

Cuerpo de ebullición

Embudo de vidrio de 9 cm de diámetro

Extractor de Soxhlet

Matraz de boca esmerilada 24/40 de 250 ml

Matraz Erlenmeyer de 250 ml

Papel filtro Whatman No. 1 y No. 540

Papel indicador de pH

Material común de laboratorio

Vaso de precipitado de 50 ml

Vidrio de reloj de 4 cm de diámetro

B.34.1.3 Aparatos e instrumentos

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

Baño de agua

Estufa con regulador de temperatura para mantener a $100 \pm 2^\circ\text{C}$

B.34.1.4 Procedimiento**B.34.1.4.1 Extracción de lípidos libres**

Pesar de 1 a 2 g de muestra finamente molida dentro de un cartucho de extracción, agregar igual cantidad de sulfato de sodio, mezclar con un agitador de vidrio.

Agregar de 1 a 2 g de arena de mar, mezclar nuevamente y sin retirar el agitador, colocar el cartucho en un vaso de precipitado de 50 ml. Secar en la estufa durante 6 h.

Cubrir la mezcla contenida en el cartucho, con una porción de algodón, colocar en el extractor de Soxhlet, ajustar en la parte inferior del extractor un matraz con cuerpos de ebullición a peso constante. Lavar el vaso donde fue secada la muestra con varias porciones de éter adicionando los lavados al extractor. Agregar suficiente éter hasta obtener de 2-3 descargas del extractor. Conectar el refrigerante al extractor y hacer circular el agua. Calentar el matraz hasta obtener un mínimo de condensación de 3-6 gotas por segundo.

Efectuar la extracción durante 4 a 6 h. Suspender el calentamiento, quitar el extractor del matraz y dejar caer una gota de éter del extractor sobre un papel filtro o un vidrio de reloj, si al evaporarse el éter se observa una mancha de grasa, ajustar el Soxhlet de nuevo al matraz y continuar la extracción.

Terminada la extracción, evaporar a baja temperatura el disolvente del matraz; secar en la estufa a 100°C hasta peso constante, enfriar en desecador y pesar.

B.34.1.4.2 Extracción de lípidos combinados

Pesar de 1 a 2 g de muestra finamente molida dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 ml, agregar 50 ml de HCl diluido, unos cuerpos de ebullición y tapar con un vidrio de reloj.

Calentar en baño de agua durante 1 h manteniendo el volumen constante por la adición de agua destilada.

Agregar 150 ml de agua caliente, alrededor de un gramo de tierra de diatomeas o alrededor de 100 cm² de papel filtro cortado en pequeñas piezas.

Filtrar a través de papel filtro Whatman No. 540 húmedo de 15 cm de diámetro (si se prefiere se puede usar doble), lavar el matraz Erlenmeyer y el vidrio de reloj con agua caliente agregando los lavados al papel filtro. Secar el matraz y el vidrio de reloj en la estufa.

Continuar lavando el papel filtro con agua caliente hasta que el filtrado esté libre de ácido.

Secar el papel filtro a 120°C sobre un vidrio de reloj o a 60°C por toda la noche si fue agregado de papel filtro cortado en piezas.

Con la ayuda de unas pinzas pasar el papel filtro seco al cartucho de extracción, tapar con una porción de algodón y colocar en el extractor de Soxhlet, ajustar en la parte inferior del extractor un matraz con cuerpos de ebullición a peso constante. Lavar el matraz Erlenmeyer y el vidrio de reloj secos con éter adicionando los lavados al extractor. Agregar suficiente éter hasta obtener de 2-3 descargas del extractor.

Proceder como se indica en la extracción de lípidos libres donde dice: "Conectar el refrigerante al extractor..."

B.34.1.4.3 Cálculos

$$\% \text{ Grasa} = \frac{PG - PB}{PM} \times 100$$

En donde:

PG = Peso del matraz con grasa seca en g

PB = Peso del matraz con cuerpos de ebullición a peso constante en g

PM = Peso de la muestra en g

B.34.2 METODO DE ROESE-GOTTLIEB (HIDROLISIS ALCALINA). PARA FORMULAS PARA LACTANTES, FORMULAS DE CONTINUACION, LECHES EN POLVO, ENTRE OTROS

B.34.2.1 Fundamento

El método descrito es una modificación al de Roese-Gottlieb. Se utiliza amoníaco para suavizar la caseína, alcohol etílico para romper la emulsión y la combinación grasa-proteína, así como favorecer la extracción de la grasa por el éter etílico. Se usa también éter de petróleo que disminuye la solubilidad del éter etílico en la capa acuosa. Extraída la grasa ésta se estima por diferencia de peso.

B.34.2.2 Reactivos y materiales

B.34.2.2.1 Reactivos

Hidróxido de amonio G.R.

Alcohol etílico de 96°

Eter etílico (libre de peróxidos)

Eter de petróleo (P.E. 30-60°C)

B.34.2.2.2 Materiales

Tubos de Roese-Gottlieb o de Mojonier

Vasos de precipitados de 125 ml

Pipetas de 10 ml graduadas en 0,1 ml

Perlas de vidrio

B.34.2.3 Aparatos e instrumentos

Desecador

Estufa para secar que alcance una temperatura entre 70 a 80°C

Baño de agua caliente o placa caliente

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

B.34.2.4 Procedimiento

B.34.2.4.1 Pesar de 1 a 2 g de muestra y colocarlos en el tubo, agregar 9 ml de agua hirviendo y agitar vigorosamente hasta que la muestra esté disuelta, enfriar a la temperatura ambiente. Agregar 1,5 ml de hidróxido de amonio y mezclar perfectamente. Agregar 10 ml de alcohol etílico, tapar y agitar fuertemente; agregar 25 ml de éter etílico, tapar y agitar vigorosamente por 90 seg. Agregar 25 ml de éter de petróleo, tapar y volver a agitar suavemente por 90 seg. Centrifugar a 600 rpm o dejar reposar hasta que el líquido superior esté prácticamente claro. Decantar la capa etérea en un vaso de precipitado a peso constante. Lavando el labio y el tapón del tubo con una mezcla de partes iguales de los dos éteres. Agregar estos lavados al vaso. Repetir la extracción del líquido sobrante en el tubo, dos veces más utilizando 25 ml de cada disolvente. Efectuar una tercera extracción con 20 ml de cada disolvente. Evaporar los disolventes del vaso en una placa caliente o un baño de vapor, a una temperatura apropiada que permita la eficiente evaporación, secar la grasa en estufa a 80°C, enfriar y pesar.

B.34.2.4.2 Después de introducir el producto en el tubo Mojonnier, añadir aproximadamente 0,1 g de amilasa y un agitador magnético, para facilitar la suspensión, luego adicionar de 8 a 10 ml de agua destilada a 45°C, evitando que el nivel de agua suba demasiado.

Colocar el tubo Mojonnier tapado por 2 h al baño de agua a 65°C. Remuévase ligeramente de vez en cuando.

Comprobar que el almidón se haya degradado por completo: al añadir dos gotas de solución de yodo aproximadamente 0,1 N no debe formarse coloración azul. En caso contrario, volver a colocar el tubo al baño de agua hasta que desaparezca la coloración. Enfriar el tubo Mojonnier y continúe con el procedimiento.

B.34.2.5 Cálculos

$$\% \text{ Grasa} = \frac{PG \times 100}{PM}$$

En donde:

PG = Peso de la grasa extraída

PM = Peso de la muestra

B.34.2.6 Reproducción de la prueba

En la reproducción de la prueba, la diferencia máxima permisible para la determinación efectuada por duplicado, no debe ser mayor de 0,1%, en caso contrario se recomienda repetir la determinación.

B.34.3 POR HIDROLISIS ACIDA. PARA HARINAS, PAN, CEREALES Y AQUELLOS PRODUCTOS CUYA PRESENTACION SEA EN GALLETAS, BARRAS, ENTRE OTROS**B.34.3.1 Fundamento**

Se basa en la disolución de la proteína en el ácido y la grasa que se separa, puede ser extraída utilizando como disolvente orgánico, una mezcla de éter etílico-éter de petróleo.

B.34.3.2 Reactivos y materiales**B.34.3.2.1 Reactivos**

Acido clorhídrico (25+11) v/v

Alcohol etílico, G.R.

Eter de petróleo (P.E. 40 - 60°C) G.R. libre de grasa

Eter etílico grado reactivo libre de grasa

B.34.3.2.2 Materiales

Algodón absorbente libre de grasa

Cuerpos de ebullición

Embudo de filtración, tallo corto

Probetas graduadas

Tubo de extracción de Mojonnier

Vasos de precipitados, cápsulas de vidrio, níquel o aluminio de 125 ml

Material común de laboratorio

B.34.3.3 Aparatos e instrumentos

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

Baño de agua con sistema eléctrico para mantener a 70-80° C

Estufa con regulador de temperatura para mantener a 100°C

B.34.3.4 Procedimiento

B.34.3.4.1 Pesar de 1 a 2 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitado de 50 ml (la muestra puede ser pesada directamente en el tubo de extracción de Mojonnier), agregar 2 ml de alcohol etílico y agitar adecuadamente para humedecer la muestra. Agregar 10 ml de ácido clorhídrico 25:11, dos cuerpos de ebullición, mezclar y colocar en baño de agua durante 30-40 min, agitando ocasionalmente durante este tiempo. Agregar 10 ml de alcohol etílico, mezclar y dejar enfriar.

B.34.3.4.2 Vaciar la mezcla al tubo de extracción, lavar el vaso con 3 porciones y un total de 25 ml de éter etílico (pasando cada lavado al tubo de extracción). Tapar el tubo con un tapón de hule sintético y agitar vigorosamente durante un min. Agregar 25 ml de éter de petróleo y agitar nuevamente durante un min. Dejar el tubo en posición vertical hasta que el líquido superior esté prácticamente claro o centrifugar 20 min a aproximadamente 600 rpm.

B.34.3.4.3 Decantar tanto como sea posible la solución éter-grasa, sobre un filtro de algodón empacado con firmeza en el embudo de filtración, recibiendo el éter en un vaso o cápsula de 125 ml a peso constante (puede ser llevado a peso constante con cuerpos de ebullición). Lavar la boca del tubo de extracción y el tapón con varios ml de una mezcla de disolventes en partes iguales recibiendo en el mismo vaso.

B.34.3.4.4 Reextraer el líquido sobrante del tubo dos veces más, utilizando para este propósito 15 ml de cada disolvente en cada ocasión. Agitar bien después de cada adición de éter. Decantar la solución éter-grasa en el mismo embudo utilizado anteriormente; lavar el embudo y el tallo del embudo con varios ml de una mezcla de disolventes en partes iguales.

B.34.3.4.5 Evaporar la mezcla de disolventes lentamente sobre baño de vapor (en un sistema de extracción) secar la grasa en una estufa a 100°C hasta peso constante, enfriar en desecador y pesar.

Corregir el resultado por la determinación de un blanco de reactivos.

B.34.3.5 Cálculos

$$\% \text{ Grasa} = \frac{P2 - P1}{PM} \times 100$$

En donde:

P2 = Peso del vaso o cápsula con grasa a peso constante

P1 = Peso del vaso o cápsula vacía a peso constante

PM = Peso de la muestra en g

PRECAUCION: El éter etílico es un disolvente orgánico extremadamente flammable. Se pueden formar peróxidos inestables cuando se almacenan mucho tiempo o se exponen a la luz solar. Puede reaccionar con explosión cuando está en contacto con el óxido de cloro, litio o con agentes fuertemente oxidantes. Por ello es recomendable el empleo de extractores de vapores efectivos y evitar la electricidad estática.

