

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**EVALUACIÓN DE EFICIENCIA DE DOS MARCAS DIFERENTES DE
BENZOATO DE SODIO EN ZUMO DE NARANJA SOBRE PRUEBAS
MICROBIOLÓGICAS**

Mirtha Elizabeth León Moreno

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Lima, Perú

2017

DEDICATORIA

A mi mami, por su apoyo y amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la finalización de este trabajo y en particular a las siguientes personas:

A mi mamita, por su incondicional e incomparable apoyo y amor, por ser un gran pilar a lo largo de todo este camino, a ella quien me enseñó el valor de la educación y la que siempre me sostuvo en mis caídas y disfrutó conmigo mis logros; a mi papá y hermanos que nunca dejaron de alentar mis sueños en este caminar.

A los ayudantes de Laboratorio de Microbiología, Pavel Pastrana, Sergio Cruz y Luis Pabón, por brindarme su apoyo y desinteresada colaboración con la realización experimental de la investigación. Así mismo al Jefe de Laboratorio de Microbiología, Alcides Guerra, por el apoyo de los permisos al ingreso del laboratorio de Microbiología.

A mi asesor, Mg. Yuri Kam, por sus enseñanzas y asesoramiento durante la elaboración de la presente investigación.

Al profesor y quien fue un gran amigo, Dr. Victor Morales, quien siempre me impulsó a la investigación y a perseguir mis sueños.

Y finalmente a mi familia en general y amigos, que siempre estuvieron apoyándome moralmente para que siga adelante y no me detenga hasta lograr mis objetivos.

RESUMEN

La presente investigación tuvo por objetivo evaluar la eficiencia de dos marcas de benzoato de sodio de diferente procedencia (americana y china) en zumo de naranja sobre pruebas microbiológicas a condiciones de temperatura de ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y pH de 3 a 3.5; puesto que, el benzoato de sodio es uno de los conservantes más usados en la industria alimentaria y según experiencias en el rubro, se percibe que el benzoato de procedencia china no es tan eficiente a comparación del americano.

El estudio fue realizado en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas- URP, siendo el experimento diseñado en una matriz que contenga al benzoato de sodio de las dos procedencias (china y americana) y se pueda comparar por cada grupo de muestras con inóculo puro de levadura (*Saccharomyces sp.*), extraído del lavado de naranja; y con inóculo puro de bacteria (*Escherichia coli*).

De los resultados, se observa que las muestras con benzoato de sodio de ambas procedencias no tuvieron crecimiento microbiano alguno, sólo desarrollaron las que no tenían la sustancia conservadora.

De ello se concluye que no hay diferencias entre el benzoato de procedencia china con el de procedencia americana.

Palabras clave: Benzoato de sodio, sustancia conservadora, *Escherichia coli*, *Saccharomyces sp.*

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to evaluate the efficiency of two brands of sodium benzoate of different origin (American and Chinese) in orange juice on microbiological tests at ambient temperature ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) and pH of 3 to 3.5; Since sodium benzoate is one of the most used preservatives in the food industry and according to experiences in the field, it is perceived that benzoate of Chinese origin is not as efficient in comparison to the American.

The study was carried out in the laboratory of Microbiology of the Faculty of Biological Sciences - URP. The experiment was designed in a matrix containing sodium benzoate from both sources (Chinese and American) and can be compared for each group of samples Pure yeast inoculum (*Saccharomyces sp.*), extracted from the orange wash; And with pure inoculum of bacteria (*Escherichia coli*).

From the results, it was observed that the samples with sodium benzoate of both origins did not have any microbial growth, only developed those that did not have the conservative substance.

From this it is concluded that there is no difference between benzoate of Chinese origin and that of American origin.

Key words: Sodium benzoate, preservative, *Escherichia coli*, *Saccharomyces sp.*

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	7
1.1 Planteamiento del problema	8
1.2 Justificación de la investigación	9
1.3 Objetivo General	9
1.4 Objetivos Específicos	9
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	10
2.1 Benzoato de sodio.....	10
2.2 Mecanismo de acción del benzoato de sodio.....	11
2.3 Actividad antimicrobiana del benzoato de sodio	11
2.4 Curva de Supervivencia.....	11
2.5 Sustancia conservadora (según CODEX)	12
2.6 pH.....	12
2.7 Escala de MC FARLAND	13
2.8 Agar nutritivo	13
2.9 Agar EMB.....	14
2.10 Agar OGY	14
2.11 Escherichia coli.....	15
2.12 Saccharomyces sp.	15
CAPÍTULO III: ANTECEDENTES	17
CAPÍTULO V: MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1 Lugar de ejecución	23
5.2 Tipo y Diseño de investigación.....	23
5.3 Variables.....	23
5.4 Operacionalización de las variables	24
5.5 Muestreo.....	24
5.6 Procedimiento y análisis de datos	24
CAPÍTULO VI: RESULTADOS	28
CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	42

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria, existen un conjunto de factores causantes de alteraciones en los alimentos; crecimiento y actividad de los microorganismos (bacterias, levaduras mohos), actividad enzimática y otras reacciones químicas del propio alimento, infestación por insectos, parásitos y roedores, almacenamiento a temperaturas inadecuadas, ganancia o pérdida de humedad, reacciones con el oxígeno y la luz (Potter y Hotchkiss, 1995).

De todas las mencionadas la causada por microorganismos, es una de las más preocupantes, porque además de echar a perder los nutrientes pueden dar lugar a intoxicaciones graves incluso mortal (Southgate, 1992). Es por esto que los conservantes químicos con propiedades antimicrobianas juegan un importante papel para prevenir las alteraciones.

El ácido benzoico es una de las sustancias conservadoras químicas más antiguos utilizados en las industrias de cosméticos, fármacos y alimentos. El benzoato de sodio fue el primer conservante químico aprobado para su uso en los alimentos por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA) (Barbosa, *et al.* 1999). Su acción conservante parece haber sido descrita por primera vez en 1875, cuando se estableció una relación entre la acción de benzoico y la de fenol. Debido a que el ácido benzoico no podía inicialmente producir sintéticamente en grandes cantidades, no se introdujo para la conservación de alimentos hasta alrededor de 1900. Las ventajas fueron el bajo costo, facilidad de incorporación en los productos, falta de color, y relativamente baja toxicidad para que el ácido benzoico se convierta en uno de los conservantes más utilizados en el mundo (Davidson, 2001).

El benzoato de sodio, también conocido como benzoato de sosa, es un inhibidor de la actividad de los microorganismos tales como levaduras, bacterias y mohos. Ésta sal del ácido benzoico, es blanca, cristalina o granulada, de fórmula $\text{NaC}_6\text{H}_5\text{CO}_2$; soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol. La sal es antiséptica y en cantidades elevadas es tóxica. Puede ser producido por reacción de hidróxido sódico con ácido benzoico (Lück y Jager, 1995).

La acción antimicrobiana del benzoato de sodio se basa en diversas intervenciones sobre el sistema enzimático de la célula de los microorganismos. El grado de acción antimicrobiana es marcadamente afectado por el pH del medio; tiene su acción óptima entre pH 2,5 y 4 y disminuye en valores de pH arriba de 5 (Kirk et al., 2004).

En el sector de la industria alimentaria, existen experiencias reincidentes que afirman que el benzoato de sodio de procedencia americana es más efectivo como conservante a comparación del de procedencia china, pero hasta la actualidad no se ha comprobado científicamente lo descrito.

1.1 Planteamiento del problema

La principal causa de deterioro de los alimentos es el ataque por diferentes tipos de microorganismos, o sea, bacterias, levaduras y mohos.

El problema del deterioro microbiano de los alimentos tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etcétera) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo), además que los alimentos alterados pueden resultar perjudiciales para la salud del consumidor.

Las sustancias conservadoras son aquellas que se añaden a los alimentos para prevenir su deterioro, evitando de esta manera el desarrollo de microorganismos, principalmente hongos y levaduras. Las sustancias conservantes químicas más usadas son el sorbato de potasio y el benzoato de sodio.

El benzoato de sodio actúa sobre bacterias, hongos y levaduras, además es el más utilizado en la industria alimentaria por su menor costo, pero tiene un mayor grado de toxicidad sobre las personas; además en ciertas concentraciones produce cambios en el sabor del producto.

Según experiencias reincidentes, entrevistas a trabajadores y conocimientos empíricos del rubro, afirman que el benzoato de sodio de procedencia

“americana” tiene una mejor eficiencia de sustancia conservante a comparación del de procedencia “china”.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la eficiencia de dos marcas de benzoato de sodio de diferente procedencia en zumo de naranja sobre pruebas microbiológicas a condiciones de temperatura de ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y pH de 3 a 3.5.

1.2 Justificación de la investigación

Una de las sustancias conservadoras químicas más usada en el mundo de industrias de alimentos es el benzoato de sodio. Del cual por experiencias se distingue que el benzoato de procedencia china a comparación de el de procedencia americana es menos eficiente, pero aún no se ha demostrado científicamente el por qué. Por lo tanto, en la presente investigación se realiza análisis microbiológico a diferentes tratamientos con benzoato de sodio de las dos procedencias diferentes para determinar la eficiencia de las marcas de procedencia china y americana; y con esto contribuir con una mejora en la calidad de los procesos en industrias de alimentos peruanas.

1.3 Objetivo General

Determinar la eficiencia de dos marcas de diferente procedencia de benzoato de sodio en zumo de naranja sobre pruebas microbiológicas a condiciones de temperatura de ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y pH de 3 a 3.5.

1.4 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar análisis microbiológico a los 10 tratamientos (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 , T_8 , T_9) durante 7 días consecutivos.
- ✓ Ejecutar la técnica de recuento en superficie de las UFC/ml en placas Petri.
- ✓ Evaluar crecimiento de microorganismos en los diferentes tratamientos.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Benzoato de sodio

También conocido como benzoato de sosa, es un polvo o granulo de color blanco, inodoros o con olor ligero, su sabor es astringente y dulce. Soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol. La sal es antiséptica y en cantidades elevadas es tóxica. Puede ser producido por reacción de hidróxido sódico con ácido benzoico. Usado ampliamente en la conservación de alimentos ácidos. Estos conservadores son generalmente más efectivos contra levaduras y mohos que contra bacterias en concentraciones menores de 0.1% (Lück y Jager, 1995)

El benzoato de sodio es más efectivo en condiciones ácidas ($\text{pH} < 3.6$) lo que hace que su uso más frecuente sea en conservas, en aliño de ensaladas (vinagre), en bebidas carbonatadas (ácido carbónico), en mermeladas, en zumo de frutas (ácido cítrico) y en salsa de comida china (soja, mostaza) (Casp. Y Requena 2003).

Se ha comprobado que tanto el ácido benzoico como sus sales no tienen efectos nocivos para las personas cuando se utiliza en pequeñas cantidades, se elimina rápidamente del organismo después de conjugarse con la glicina para formar ácido hipúrico (benzoiglicina) evitando su acumulación (Fennema, 2000).

Acción frente a los microorganismos:

El ácido benzoico y sus sales basan su acción antimicrobiana en diversas intervenciones sobre el sistema enzimático de los microorganismos.

Acción a nivel de membrana: Interfiriendo la permeabilidad de la pared celular, y dando lugar a una acidificación del contenido celular.

Esta acción contra los microorganismos se obtiene gracias a la forma no disociada de la molécula y a la facilidad que tiene en este estado de penetrar a través de la membrana celular (Eklund, 1985).

2.2 Mecanismo de acción del benzoato de sodio

Es la molécula no disociada del ácido benzoico la responsable de la actividad antimicrobiana. Gabel en 1921 fue uno de los primeros en demostrar que el ácido benzoico fue eficaz contra las bacterias en medio ácido a un nivel de 0,1 % y en medios neutros a 0,2 %, pero inactivo en medios alcalinos. Puesto que, el mecanismo comienza con la absorción del ácido benzoico por la célula. Si el pH intracelular cambia a 5 o más bajo, la fermentación anaerobia de la glucosa con fosfofructocinasa es disminuido un 100%. Se reportaron resultados similares para los hongos y levaduras (Cruess y Richert, 1929).

2.3 Actividad antimicrobiana del benzoato de sodio

Debido a que la cantidad de ácido no disociado disminuye al aumentar el pH, el uso de ácido benzoico o benzoato de sodio como conservante de alimentos se ha limitado a aquellos productos que son de naturaleza ácida. Actualmente, estos compuestos se utilizan principalmente como agentes antimicóticos, y la mayoría de las levaduras y los hongos son inhibidas por 0,05% a 0,1% del ácido no disociado. La intoxicación por alimentos y las bacterias formadoras de esporas son generalmente inhibidas por ácido no disociado de 0.01% a 0,02%, pero muchas bacterias de descomposición son mucho más resistentes (Chichester and Tanner, 1972; Baird Parker, 1980). (**Anexo- Fig. Nº 2**).

2.4 Curva de Supervivencia

Pérdida irreversible de la capacidad de reproducción en un medio adecuado. Para poder determinar la eficacia antimicrobiana (la muerte de los microorganismos) se utilizan técnicas que descubran a los sobrevivientes, es decir, a los capaces de reproducirse; ya que los incapaces de reproducirse están muertos. Esto se determina generalmente mediante métodos cuantitativos de siembra en placa en los que los supervivientes se detectan porque forman colonias.

Cuando una población microbiana se expone a un agente letal, la cinética de la muerte es casi siempre exponencial ya que el número de supervivientes disminuye de forma geométrica con el tiempo. Si representamos gráficamente el

logaritmo del número de supervivientes frente al tiempo se obtiene una línea recta cuya pendiente negativa define la tasa de mortalidad. Esta tasa de mortalidad nos dice solamente que fracción de la población inicial sobrevive a un determinado período de tratamiento. Para determinar el número real de supervivientes es necesario conocer además el tamaño inicial de la población. De acuerdo con esto, para establecer los procedimientos de esterilización hay que tener en consideración dos factores: la tasa de mortalidad y el tamaño de la población inicial. En la práctica de la esterilización la población microbiana que ha de ser destruida es mixta. Como los microorganismos difieren ampliamente en su resistencia a los agentes letales, los factores que se hacen significativos son el tamaño de la población inicial y la tasa de mortalidad de los miembros más resistentes de la población mixta (Mateos, P. 2014).

2.5 Sustancia conservadora (según CODEX)

Ingredientes agregados intencionalmente, sin el propósito de nutrir, con el objeto de modificar las características físicas, químicas, biológicas o sensoriales, durante el proceso de elaboración y/o envasado y/o acondicionado, almacenado, transporte o manipulación de un alimento. Es decir, en general se utilizan para aumentar la estabilidad o capacidad de conservación, incrementar la aceptabilidad de alimentos genuinos, pero faltos de atractivo, permitir la elaboración más económica y en gran escala de alimentos de composición y calidad constante en función del tiempo.

2.6 pH

Es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución. El pH indica la concentración de iones hidrógeno $[H]^+$ presentes en determinadas disoluciones. El pH de una disolución se puede medir también de manera aproximada empleando indicadores: ácidos o bases débiles que presentan diferente color según el pH. Generalmente se emplea un papel indicador, que consiste en papel impregnado con una mezcla de indicadores cualitativos para la determinación del pH. El indicador más conocido es el papel de litmus o papel tornasol. Otros indicadores usuales son la fenolftaleína y el naranja de metilo (López, R. *et al.* 2013).

2.7 Escala de MC FARLAND

La escala de Mc Farland, es utilizada como estándar de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. Los estándares de turbidez son preparados por la mezcla de químicos que se precipitan para formar una solución de turbidez reproducible. Son realizados adicionando ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario, del cual resulta la formación de un precipitado de sulfato de bario (Zimbardo y Power 2003). Esta escala de turbidez es elaborada con una mezcla de BaCl₂ de 0.048 M y H₂SO₄ 0.6 M, la turbidez la da el BaCl₂, el cual va en cantidad creciente mientras al ácido sulfúrico va disminuyendo la proporción. (Escobar, 2002).

Cada uno de los tubos del patrón de acuerdo con la turbidez, representa un número de bacterias, para suspensiones de igual turbidez, que ha sido determinado por recuento de colonias. De esta forma, al comparar una emulsión de bacterias con el tubo del patrón de Mc Farland que más se asemeje se puede saber aproximadamente el número de bacterias en la emulsión (Escobar 2002)

(Anexo- Fig. N° 2).

2.8 Agar nutritivo

Medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el aislamiento de microorganismos poco exigentes en lo que se refiere a requerimientos nutritivos. Su uso está descrito en muchos procedimientos para el análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria.

Fundamento: Es un medio usado para el cultivo de microorganismos poco exigentes en sus requerimientos nutricionales. No contiene inhibidores del desarrollo bacteriano. La pluripectona es la fuente de carbono y nitrógeno para el desarrollo bacteriano. El agregado de cloruro de sodio permite el enriquecimiento con sangre de carnero u otras sustancias para facilitar el cultivo de microorganismos exigentes.

Puede ser suplementado con sangre ovina desfibrinada estéril para favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales y permite una clara visualización de las reacciones de hemólisis. Características del medio: ámbar claro a medio ligeramente opalescente. *Xanthomonas campestris*.

(Anexo- N° 3).

2.9 Agar EMB

(Agar Eosina y Azul de Metileno)

Este medio es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae.

Fundamento: Este medio combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp.* presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras. **(Anexo- Nº 4).**

2.10 Agar OGY

(Agar-Oxitetraciclina-glucosa-extracto de levadura)

Fundamento: Es un agar selectivo para la demostración y numeración de mohos y levaduras en todo tipo de material de investigación (alimentos, material clínico, etc.) El agar-oxitetraciclina-glucosa-extracto de levadura ha sido recomendado como medio de rutina para la investigación de alimentos. Está compuesto por extracto de levadura, D-glucosa, Agar-agar, Oxitetraciclina 0,1 o Gentamicina 0,05.

(Anexo- Nº5).

2.11 *Escherichia coli*

Originalmente llamada *Bacterium comune*, fue aislada por primera vez en 1985 a partir de heces de niño; son bacilos estrechos de 1,1 a 1,5 μm de diámetro y de 2 a 6 μm de longitud, se encuentran solos o en parejas, GRAM negativos, móviles por flagelos peritricos o inmóviles, anoxigénicos facultativos, poseen metabolismo respiratorio y fermentativo. (Le Minor, 1994).

E. coli es la bacteria más constantemente encontrada en las materias fecales del hombre y de muchas especies de animales. Su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra de calidad de saprobio sin causar daño. Por el contrario, muchas cepas de *E.coli* producen sustancias que son útiles al hospedero, como son las colicinas, que tienen efecto inhibitorio sobre otras cepas potencialmente patógenas, por lo que la colonización de intestino es benéfica para el hospedero.

E. coli es un bacilo gram negativo procariótico, con una sola cadena espiral de ADN, móvil, aerobio y aerobio facultativo, con flagelos peritricos. La mayoría forma fimbrias y pilis, muchas cepas producen una pequeña microcapsula, y muy pocas elaboran macrocápsula, y no fabrican esporas. En las pruebas bioquímicas es positiva al indol, fermentación de manitol y gas a partir de glucosa; además es lactosa positiva al 90% de las cepas con citrato negativo. Tienen información genética en los plásmidos, que son responsables por la producción de toxinas y la resistencia a los antimicrobianos (Romero, R. 2007).

2.12 *Saccharomyces sp.*

El género *Saccharomyces* incluye muchos tipos diferentes de levaduras y forma parte del reino de los hongos. La incapacidad para utilizar nitratos y la capacidad de fermentar varios carbohidratos son las características típicas de los *Saccharomyces*. Sus colonias pueden crecer y madurar en 3 días y muestran un color amarillo oscuro. Muchos miembros de este género se consideran muy importantes en la producción de alimentos.

Las levaduras pueden ser definidas como organismos unicelulares eucarióticos que hacen parte de los hongos; a pesar de ser reconocidas como unitarios algunas veces pueden ser encontradas en forma de cadena e incluso formando diverso tipo de filamentos (Halasz, y Lasztity, 2000).

Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se hallan sobre hojas, flores, frutos, piel, cuero, plumas y tracto digestivo de animales herbívoros y omnívoros. Algunas están asociadas con insectos pero el suelo es el mayor reservorio. La gran mayoría de la levadura son mesófilas, con una temperatura máxima de crecimiento de 24°C a 48°C, solo unas pocas 2% son psicrófilas con una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 24°C, pero mayor es el número de levaduras que tienen la temperatura óptima de crecimiento por debajo de 20°C. No hay reporte de levadura que puedan crecer a 50°C y solo unas pocas pueden desarrollar cerca de 0°C (Carrillo L. 2003).

CAPÍTULO III: ANTECEDENTES

Bellitz y Grosh (1995) afirman que el ácido benzoico y sus sales basan su acción microbiana en diversas intervenciones sobre el sistema enzimático de los microorganismos: “agente micoestático”, se refiere a la acción sobre diversas enzimas de la célula microbiana, como las que regulan el metabolismo del ácido acético y las fosforilación oxidativa, parece intervenir en varios puntos del ácido cítrico; y “acción a nivel de la membrana”, interfiriendo la permeabilidad de la pared celular, y dando lugar a una acidificación del contenido celular.

Fennema (2000) señala que se ha comprobado que tanto el ácido benzoico como sus sales no tienen efectos nocivos para las personas, cuando se utiliza en pequeñas cantidades, se elimina rápidamente del organismo después de conjugarse con la glicina para formar ácido hipúrico (benzoilglicina) evitando su acumulación.

Fuentes, A. *et al.* (2000) señalaron que el ácido benzoico se encuentra de forma natural en plantas y frutas, pero para su uso industrial se obtiene habitualmente mediante síntesis química. El ácido benzoico y sus sales se emplean como aditivos en productos grasos como margarina, mayonesa y productos elaborados a base de huevo y también en frutas, verduras y bebidas. El ácido benzoico es muy eficaz en alimentos ácidos (pH entre 2,5 y 4,0) y es más barato que otros conservantes. Sin embargo, su uso puede producir algunos efectos adversos sobre la salud. Hay personas sensibles a estas sustancias que por simple contacto con la piel manifiestan síntomas típicos de una alergia, principalmente en forma de urticaria. Este aditivo también se ha asociado a la irritación de la mucosa gástrica y a la aparición de otras reacciones alérgicas. El Comité Mixto FAO/OMS estima como límite una ingesta diaria (IDA) de ácido benzoico y benzoato de sodio de 5 mg/kg de peso y día por persona.

Cubero *et al.* (2002) asegura que el ácido benzoico presenta una solubilidad de 0.34% en agua a temperatura de ambiente, en ambiente esta sobre el 1-2% según el tipo de aceite y es alcohol duro. Por otro lado, debido a su baja solubilidad en agua en temperatura ambiente, se suelen utilizar más las sales derivadas de este ácido como benzoato sódico (solubilidad alrededor 63% en agua a temperatura de ambiente), benzoato potásico y benzoato cálcico, todos ellos tienen una mayor solubilidad que el ácido. Es una de las razones por la cual las sustancias conservadoras mencionadas son las más usadas.

Casp y Requena (2003), mencionaron que el benzoato sódico solo es efectivo en condiciones ácidas ($\text{pH} < 3.6$) lo que hace que su uso más frecuente sea en conservas, en aliño de ensaladas (vinagre), en bebidas carbonatadas (ácido carbónico), en mermeladas (ácido cítrico), en zumo de frutas (ácido cítrico) y en salsas de comida china (soja, mostaza y pato).

Trejo *et al.* (2007) indica que para prolongar el tiempo de vida útil de las frutas frescas cortadas se han desarrollado tecnologías como los recubrimientos comestibles, que se comportan principalmente como barreras que reducen la difusión de gases (O_2 , CO_2 , vapor de agua), evitando las pérdidas de humedad y de aromas, el cambio de color, entre otros. Así mismo, según Raybaudi *et al.* (2008), la incorporación de benzoato de sodio y/o sorbato de potasio en los recubrimientos comestibles se inició debido a la asociación de *E. coli* O157:H7 y de diferentes serotipos de Salmonella, con el brote de enfermedades por el consumo de alimentos de origen vegetal, estos hechos sumados a brotes de enfermedades causadas por el consumo de carne contaminada contribuyeron con el inicio de la modelación del crecimiento microbiano en los frutos con recubrimiento comestible.

Alzamora, *et al.* (2008) señala que en la industria alimentos, la introducción de cualquier tecnología alternativa o la combinación de varias tecnologías tradicionales, así como la optimización de métodos tradicionales para el procesamiento de alimentos, requieren de datos científicos acerca de la respuesta microbiana. No hay duda de que la microbiología cuantitativa es uno de los enfoques más útiles, no solo en la determinación del impacto microbiológico de diferentes pasos asociados con la producción, distribución y la

venta de un alimento, sino también en la determinación de condiciones óptimas para muchos procesos de conservación. La microbiología predictiva proporciona herramientas para comparar el impacto de diferentes factores y dosis aplicada sobre la reducción de una población microbiana, siendo una ayuda para entender el comportamiento de sistemas biológicos.

Camacho, A.; Giles, A. *et al.* (2009) afirman que los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, pueden encontrarse como flora normal de un alimento, o como contaminantes en equipos mal sanitizados. Ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en la elaboración de algunos alimentos; sin embargo, también pueden ser causantes de la descomposición de otros alimentos. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos y levaduras se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable. Estas condiciones pueden ser bajos niveles de pH, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, la presencia de antibióticos, o la exposición del alimento a la irradiación. Por lo tanto pueden ser un problema potencial en alimentos lácteos fermentados, frutas, bebidas de frutas, especias, oleaginosas, granos, cereales y sus derivados y alimentos de humedad intermedia como las mermeladas, cajetas, especias, etc.

Abud M.; Ventura *et al.*, (2009) asegura que las enfermedades diarreicas son responsables de millones de muertes anuales, por lo que todavía existe la necesidad de nuevos métodos para reducir o eliminar los microorganismos patógenos. Además, la demanda del consumidor está dirigida al consumo de alimentos mínimamente procesados sin conservadores o con conservadores naturales.

Villada (2010) señala que el ácido benzoico presenta mayor actividad antimicrobiana en el margen de un pH 2.5 a 4.0, por lo tanto son ineficaces en productos cuyo pH tiene un valor superior a 5 (ligeramente ácido o neutro). Como todo presenta ciertas desventajas, las altas concentraciones resultan en un sabor agrio, lo cual limita su aplicación, además de su toxicidad, que aunque es relativamente baja, es mayor que la de otros conservantes.

Mhao J.; *et al.* (2011) sostienen que se modeló el crecimiento de los mohos y levaduras en función del tiempo, en los melones con recubrimiento comestible con diferentes concentraciones de sorbato de potasio y benzoato de sodio, almacenados a $3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, usando el modelo de Baranyi y Roberts. Posteriormente se modeló la tasa de crecimiento de los mohos y levaduras en función de la concentración de los conservantes mediante la metodología de superficie de respuesta. Para evaluar la bondad de ajuste de los modelos se usó el coeficiente de correlación (R²), la raíz del cuadrado medio del error (RCME), el factor de sesgo (Bf) y el factor de Exactitud (Af). Los resultados mostraron un ajuste significativo de los datos de crecimiento microbiano a un modelo cuadrático ($p = 0,0005$). El mayor tiempo de vida útil de los melones (9,57 d con $N_0 = 3 \text{ Log UFC/g}$) se obtuvo con el tratamiento que contenía 340 ppm de sorbato de potasio y 340 ppm de benzoato de sodio. El modelo de superficie de respuesta mostró un efecto antagónico de la concentración de conservantes en la velocidad de crecimiento de los mohos y levaduras.

Rubio y Pozo (2012) aseguran que el benzoato de sodio es un polvo o gránulos de color blanco, inodoros o con olor ligero; su sabor es astringente y dulce, soluble en agua, es un conservador que inhibe la actividad de los microorganismos tales como levaduras, bacterias y mohos. Funciona a un pH menor o igual a 4.5. Es importante que se adicione al producto que va a preservar desde los primeros pasos de la fabricación, con una homogeneización adecuada a fin de garantizar la correcta distribución del conservador, su almacenamiento es en recipientes bien cerrados, en lugar fresco y seco

Álvarez y Báez (2012) sostienen que con el objeto de determinar el tiempo de conservación de las pulpas de pitahaya elaboradas artesanalmente, envasadas en fundas de polietileno, polipropileno y para presentaciones al vacío añadiendo conservantes permitidos como benzoato de sodio, sorbato de potasio y combinación almacenadas en congeladores a temperaturas $(2, -3, -7) \pm 1^{\circ}\text{C}$, el mejor tratamiento determinó que la adición de sorbato de potasio y benzoato de sodio, envasadas en fundas para vacío pueden ser conservadas a temperaturas de congelación de $(-7) \pm 1^{\circ}\text{C}$ sin influir en su tiempo de vida útil, siempre que se mantenga el control y la manipulación adecuada en la elaboración, como en la conservación llegando a tener un período de

preservación de 4 a 6 meses sin problemas microbiológicos ni organolépticos de acuerdo a los análisis y cataciones efectuadas respectivamente, teniendo un costo bajo establecido por el análisis económico del mismo.

Álvarez y Báez, en el 2012, además señalan que los conservantes más empleados en el mercado interno para derivados como las pulpas son las sales de benzoatos y sorbatos en cantidades máximas de 0.5 g/kg de pulpa. Combinando el uso de conservantes con la refrigeración, es decir bajar la temperatura del sitio de almacenamiento hasta valores que no alcance a congelarse el producto, se logra mantener en estado semilíquido las pulpas.

La duración de estas pulpas se reduce a pocos días a medida que la temperatura de refrigeración no sea tan baja o la contaminación inicial sea más elevada.

Álvarez y Báez, en el 2012, recomiendan el uso de benzoato de sodio para alimentos que tienen un contenido bajo de humedad, por lo que su uso en confitería está muy difundido, sin embargo, también se usa en jugos, pulpas y purés de frutas.

4. CAPÍTULO IV: HIPÓTESIS

Hipótesis General

H1: Las dos marcas de diferente procedencia de benzoato de sodio tienen diferencias significativas en su eficiencia como conservante sobre pruebas microbiológicas a condiciones de temperatura de ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y pH de 3 a 3.5.

H0: Las dos marcas de diferente procedencia de benzoato de sodio no tienen diferencias significativas en su eficiencia como conservante sobre pruebas microbiológicas a condiciones de temperatura de ambiente $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y pH de 3 a 3.5.

Hipótesis Específicas

H1: Los análisis microbiológicos durante siete días a cada tratamiento influyen para una buena recopilación de datos y lograr determinar si hay

diferencia significativa en la eficiencia de las dos marcas de diferente procedencia.

H1: La ejecución de recuento de UFC/mL influye significativamente para la interpretación de datos.

H1: La evaluación de crecimiento de microorganismos influye para la conclusión de si existe diferencia significativa en los benzoatos de procedencia china y americana.

CAPÍTULO V: MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de ejecución

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, ubicado en Av. Benavides 5440- Santiago de Surco (Lima, Perú), coordenadas 12°07'59"S 76°58'50"O. (Anexo- **Fig.6**)

5.2 Tipo y Diseño de investigación

Investigación experimental

Se realizó una metodología experimental porque se provocó una situación para introducir determinadas variables de estudio manipuladas, para controlar el aumento o disminución de nuestra variable, y su efecto en las conductas observadas. Manejando intencionadamente la variable experimental y luego observando lo que sucede en situaciones controladas.

Esta investigación se utilizó en la evaluación de dos marcas de benzoato de sodio de diferentes procedencias y en el resultado de la experimentación.

5.3 Variables

Independiente:

- Benzoato de Sodio de procedencia americana
- Benzoato de Sodio de procedencia china

Dependiente:

- Crecimiento de bacteria *Escherichia coli*
- Crecimiento de *Saccharomyces sp.*

5.4 Operacionalización de las variables

La variable independiente de esta investigación fue el benzoato de sodio de procedencia china y el benzoato de sodio de procedencia americana, los cuales tienen como instrumento de medición el crecimiento de microorganismos (*Escherichi coli* y *Saccharomyces sp.*). Las variables dependientes son el crecimiento de bacteria *Escherichia coli* y *Saccharomyces sp.*, los cuales fueron medidos por recuento de colonias (UFC/mL) por análisis microbiológico.

5.5 Muestreo

Se emplearon 150 naranjas *citrus x sinensis* procedentes del Mercado de Frutas ubicado en Av. Nicolás Arriola 4046- Distrito de Lima, los cuales serán previamente seleccionadas, tomándose como criterios la apariencia externa, tamaño, color, estado de maduración, ausencia de daños en la piel, textura uniforme, deterioro, suciedad. Posteriormente las naranjas seleccionadas por criterios de homogeneidad, libres de daños mecánicos y fitosanitarios, se trasladaron al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma. Se procedió con la higienización, según recomendaciones de Cordeiro *et al.* 2007.

5.6 Procedimiento y análisis de datos

5.6.1 Obtención de la muestra

Después de la higienización de las naranjas y previa limpieza de área de trabajo y materiales, se procedió con su cortado por la mitad, eliminación de semillas usando cuchillo de acero inoxidable.

- Exprimido: Las naranjas pasaron por un proceso donde se apretaron con fuerza para extraer el zumo.
- Tamizado: Si el zumo bruto contenía excesiva pulpa en suspensión o partículas grandes se realizaba un tamizado adicional con un colador metálico o tamiz.
- Envasado: El zumo fue envasado a razón de 200 ml en matraces.

Una vez listo el zumo de naranja, se procedió a la adición del conservante (según tratamiento, ver **5.6.3**) y seguidamente la pasteurización.

5.6.2 Preparación de inóculos

Se realiza la reactivación de los microorganismos, sembrando de un cepario a un caldo nutritivo en el caso de *Escherichia coli*; y caldo OGY en el caso de *Saccharomyces sp.* Se incubó en estufa por 24 horas a una temperatura de 37°C.

Con la cepa activada se realiza una dilución con caldo nutritivo u OGY, ya sea el caso, de cada microorganismo de acuerdo al Tubo N°1 de la escala de Mc Farland. A partir de cada dilución se realizan diluciones seriadas hasta 10^{-4} para el inóculo, con el objetivo de llegar a 10^{-2} en la muestra. **(Anexo- Fig.7)**

5.6.3 Preparación de tratamientos

En ambos casos la concentración de microorganismos en el zumo de naranja fue de 10^2 ufc/mL.

A continuación se detalla los tratamientos. **(Anexo- Fig.8)**

Tratamiento	Sustancia conservadora	Inóculo	N°
Zumo de naranja			
Pasteurizado	Sin Benzoato de sodio	Sin inóculo	T0
Sin Pasteurizar	Sin Benzoato de sodio	Sin inóculo	T1
	Benzoato Americano	Sin inóculo	T2
	Benzoato Chino	Sin inóculo	T3
Pasteurizado	Sin Benzoato de sodio	<i>Escherichia coli</i>	T4
	Benzoato Americano	<i>Escherichia coli</i>	T5
	Benzoato Chino	<i>Escherichia coli</i>	T6
Pasteurizado	Sin Benzoato de sodio	<i>Saccharomyces sp.</i>	T7
	Benzoato Americano	<i>Saccharomyces sp.</i>	T8
	Benzoato Chino	<i>Saccharomyces sp.</i>	T9

Dónde:

Tener en cuenta que todos los tratamientos fueron pasteurizados a 70° por 30 minutos en autoclave automática; excepto los tratamientos T1, T2 y T3.

De cada tratamiento se tomó 20ml y se vertió en 7 tubos cónicos estériles, para así utilizar 1 tubo cónico por día y evitar contaminación al abrir y cerrar el matraz por 7 días, y también con el objetivo de poder diferenciar en el matraz la apariencia conforme van pasando los días.

Se conservaron los tratamientos en matraces para la apariencia y en tubos cónicos de plásticos estériles a temperatura ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

5.6.4 Prueba de esterilidad de los medios de cultivo

Se realizó la prueba de esterilidad a cada medio de cultivo preparado para desarrollo de la prueba. Tomando las placas preparadas con agar y llevándolo a la estufa por 24 horas a una temperatura de 37°C y de esta manera evidenciar

que no existe crecimiento alguno y que efectivamente el medio se encuentra en óptimas condiciones para su uso.

5.6.5 Análisis microbiológico

Se realizaron análisis microbiológicos durante todos los días durante una semana para cada tratamiento.

Cada 24 horas se tomaba 100 uL del tratamiento con ayuda de micropipeta y tips estéril y se sembraba en medio Agar Nutritivo, EMB u OGY, respecto al tratamiento a utilizar. Luego se esparcía con ayuda de asa Drigalsky por la superficie y se dejaba reposar 30 minutos para ser envueltos en papel craft y guardarlo en la estufa por 24 horas a 37°C.

Los análisis microbiológicos se analizaron por recuento de UFC/mL por placa

Medio Nutritivo a 37°C (T0, T1, T2, T3)

Medio EMB para *Escherichia coli* a 37°C (T4, T5, T6)

Medio OGY para *Saccharomyces sp.* a 37°C (T7, T8, T9)

Las poblaciones enumeradas se expresaron como log UFC/mL.

5.6.6 Coloración Gram

Se procedió a coloración GRAM para corroborar que el crecimiento de microorganismos en EMB era *Escherichia coli* y en OGY se trataba de *Saccharomyces sp.*

Se siguieron los siguientes pasos:

1. Muestreo de las placas Petri con asa de siembra.
2. Se hizo el extendido sobre una lámina porta objetos
3. Se dejó secar a temperatura ambiente
4. Se fijó la muestra con metanol durante 1 minuto.
5. Se agregó azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y se esperó 1 minuto.
6. Se enjuagó con agua no directamente sobre la muestra
7. Se agregó lugol y se esperó un minuto aproximadamente.
8. Se agregó alcohol acetona y se esperó entre 5 y 30 segundos según la concentración del reactivo (parte crítica de la coloración). (Las gram – se decoloran, las gram + no)
9. Se enjuagó con agua.
10. Tinción de contraste agregando safranina o fucsina básica y se esperó un minuto. Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias gram negativas.
11. Lavar levemente con agua.

Finalmente se observó al microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión y se pueden distinguir las bacterias (*Escherichia coli*) (**Anexo- Fig. N° 9**) y Levadura (*Saccharomyces sp.*) (**Anexo Fig. N°10**); puesto que, las levaduras son más grandes que las bacterias.

CAPÍTULO VI: RESULTADOS

Tabla N°1: Recuento de bacterias aerobias mesófilas (UFC/mL) de tres repeticiones de tratamiento sin conservante (T1)

DÍAS/ REPETICIONES	0	1	2	3	4	5	6	7
REPETICIÓN N°1	1.40E+02	1.80E+02	1.40E+03	1.50E+04	1.50E+05	1.50E+05	1.00E+05	4.00E+05
REPETICIÓN N°2	1.40E+02	1.90E+02	2.10E+03	2.90E+03	1.00E+05	4.60E+04	3.30E+04	2.20E+04
REPETICIÓN N°3	1.40E+02	1.70E+02	1.50E+03	2.00E+04	3.40E+04	5.50E+04	1.00E+04	3.60E+04
PROMEDIO	1.40E+02	1.80E+02	1.67E+03	1.26E+04	9.47E+04	8.37E+04	4.77E+04	1.53E+05

TRATAMIENTO N° 1

De la Tabla N°1, se observan los resultados durante los siete días del **Tratamiento N°1 (T1)**, el cual consiste en zumo de naranja sin pasteurizar, sin adición de benzoato de sodio y sin inóculo. **(Anexo- Gráfica N°1)**

Tabla N°2: Recuento de bacterias *Escherichia coli* (UFC/mL) de tres repeticiones de tratamiento sin conservante (T4)

TRATAMIENTO N° 4								
DÍAS/ REPETICIONES	0	1	2	3	4	5	6	7
REPETICIÓN N°1	1.20E+02	2.00E+02	8.00E+02	6.00E+02	8.00E+03	6.00E+03	1.00E+04	6.00E+04
REPETICIÓN N°2	1.20E+02	1.60E+02	1.60E+02	2.80E+02	2.80E+03	1.50E+03	5.70E+03	3.40E+03
REPETICIÓN N°3	1.20E+02	1.80E+02	1.80E+02	1.20E+02	7.10E+02	2.00E+03	1.60E+04	1.80E+04
PROMEDIO	1.20E+02	1.80E+02	3.80E+02	3.33E+02	3.84E+03	3.17E+03	1.06E+04	2.71E+04

De la **Tabla N°2**, se observan los resultados durante los siete días del **Tratamiento 4 (T4)**, el cual consiste en zumo de naranja pasteurizado, sin adición de benzoato de sodio e inoculado con *Escherichia coli*. (**Anexo- Gráfica N°1**)

Tabla N°3: Recuento levaduras *Saccharomyces sp.* (UFC/mL) de tres repeticiones de tratamiento sin conservante (T7)

TRATAMIENTO N° 7								
DÍAS/ REPETICIONES	0	1	2	3	4	5	6	7
REPETICIÓN N°1	1.50E+02	1.70E+02	1.20E+03	1.50E+03	1.10E+03	7.00E+03	9.00E+03	9.00E+04
REPETICIÓN N°2	1.50E+02	1.50E+02	3.00E+03	2.70E+03	8.00E+03	7.10E+03	6.10E+04	3.30E+04
REPETICIÓN N°3	1.50E+02	2.00E+02	1.30E+03	8.40E+02	6.90E+03	5.30E+04	1.00E+04	8.00E+04
PROMEDIO	1.50E+02	1.73E+02	1.83E+03	1.68E+03	5.33E+03	2.24E+04	2.67E+04	6.77E+04

De la **Tabla N°3**, se observan los resultados durante los siete días del **Tratamiento 7 (T7)**, el cual consiste en zumo de naranja pasteurizado, sin adición de benzoato de sodio e inoculado con *Saccharomyces sp.* (**Anexo- Gráfica N°1**)

Tabla N°4: Promedio del Recuento de microorganismos (UFC/mL) de las 3 replicaciones

TRATAMIENTOS		DÍAS CRECIMIENTO (UFC/mL)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
0	Pasteurizado	1	1	1	1	1	1	1	1
1	Sin Pasteurizar	140	180	1,667	12,633	94,667	83,667	47,667	152,667
2		140	1	1	1	1	1	1	1
3		140	1	1	1	1	1	1	1
4	Pasteurizado + <i>E. coli</i>	120	180	380	333	3,837	3,167	10,567	27,133
5		120	1	1	1	1	1	1	1
6		120	1	1	1	1	1	1	1
7	Pasteurizado + <i>Saccharomyces</i>	150	173	1,833	1,680	5,333	22,367	26,667	67,667
8		150	1	1	1	1	1	1	1

De la Tabla N°4, muestra el promedio del recuento de microorganismos (UFC/mL) de las tres repeticiones de los tratamientos que se realizaron en un periodo de tiempo de 7 días cada uno. Los datos de los tratamientos con benzoato de sodio salieron negativos; es decir, no se detectó en el recuento, y por cálculo en los datos se asignan como 1. Sólo se observa crecimiento en los T1, T4 y T7, los cuales corresponden al grupo de los que no se le adicionó benzoato de sodio.

Tabla N°5: Logaritmo del Promedio del Recuento de microorganismos (UFC/mL) de las 3 repeticiones

TRATAMIENTOS		DÍAS CRECIMIENTO (UFC/mL)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
0	Pasteurizado	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	Sin Pasteurizar	2.15	2.26	3.22	4.10	4.98	4.92	4.68	5.18
2		2.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3		2.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	Pasteurizado + <i>E. coli</i>	2.08	2.26	2.58	2.52	3.58	3.50	4.02	4.43
5		2.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6		2.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	Pasteurizado + <i>Saccharomyces</i>	2.18	2.24	3.26	3.23	3.73	4.35	4.43	4.83

8	sp.	2.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9		2.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

De la Tabla N°5, los datos de los recuentos microbiológicos de la tabla anterior, se transforman a logaritmo decimal para poder realizar los gráficos correctamente.

(Anexo- Gráfica N°1)

CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN

La evaluación de la eficiencia del benzoato de sodio de origen americano y de origen chino, se realizó por la técnica de supervivencia con recuento microbiológico para evidenciar la viabilidad de los microorganismos sobre la acción de la sustancia conservadora, descartando otras técnicas como la de difusión en placa o las de concentración mínima inhibitoria utilizadas generalmente para evaluar antibióticos o desinfectantes. (Rodriguez, E. 2011).

Cubero *et al.* 2002, sostiene que las concentraciones útiles de acción del ácido benzoico varían según el pH del medio donde se utilicen de manera que conforme aumenta el pH también se ha de aumentar la concentración de ácido para obtener el mismo resultado. Además, Villada, J. 2010; afirma que las sustancias conservadoras que nos ocupan, todos se disocian en solución acuosa los cuales deben su acción antimicrobiana a la parte no disociada que es la que puede atravesar la membrana celular y desarrollar su actividad a nivel enzimático y a los hidrógenos liberados en la solución o alimento que provocan la bajada de pH del medio y por tanto disminuye la viabilidad de muchos microorganismos. Este tipo de conservadores son más activos cuando menor sea el pH del medio. **(Anexo- Gráfica N°2).**

Así mismo, en la investigación realizada corroboramos que la acción antimicrobiana en un medio ácido es más efectiva; puesto que, el medio que

se utilizó en los tratamientos evaluados fue el zumo de naranja, el cual tiene un pH de 3 a 3.5, y esto dio como resultado sólo crecimiento en los tratamientos que no presentaban benzoato de sodio, pero en los que si lo presentaban se observó la inhibición de esa sustancia conservadora sobre la bacteria que se utilizó, es decir *Escherichia coli*.

De los resultados de la **Tabla N°1, Tratamiento N°1 (T1)**, que consistía en no pasteurizar el jugo de naranja, se observa un crecimiento lento de las bacterias mesófilas, al igual que la bacteria *Escherichia coli* en la **Tabla N°2, Tratamiento N°4 (T4)**. Estos resultados tienen similitud con lo presentado por Villada (2010), donde se observa el efecto inhibitorio que tiene el jugo de

naranja especialmente si el medio está debajo de pH 4. La bacteria *Escherichia coli* se desarrolla de manera óptima a pH neutro.

Según **Tabla N°3**, muestra que el recuento de levaduras *Saccharomyces sp.* (UFC/mL) del **Tratamiento N°7 (T7)**, el que corresponde al inoculado con *Saccharomyces sp* y sin conservante se obtuvo un crecimiento lento; mientras que, la investigación de Gerónimo en el 2009, evaluó el efecto antimicrobiano del benzoato de sodio en mermelada de mango. Se procedió a realizar el análisis microbiológico al inocular en los tratamientos hongo *Aspergillus*, lo que dio como resultado que no hubo crecimiento del hongo en los tratamientos que contenían benzoato de sodio. Los tratamientos presentaron los mismos conteos de antes de ser inoculados; para demostrar que no hubo diferencia antes y después de ser inoculados se realizó una T Student en el programa estadístico SAS, donde se obtuvo una probabilidad de 0.08. Esta probabilidad nos dice que no hubo diferencia estadística antes y después de ser inoculados. Las posibles causas que impidieron el desarrollo y crecimiento del *Aspergillus* fueron las características de este tipo de producto: baja A_w , alto pH y la alta concentración de sólidos. Aunque la investigación de Gerónimo (2009) es en mermelada de mango, afirma que el benzoato es eficiente sobre levadura.

Los datos de los recuentos microbiológicos que se muestran en la **Tabla N°4** en UFC/mL, se observa que el **Tratamiento N°0 (T0)**, que consistió en jugo de naranja pasteurizado y sin inóculo, no presenta recuento de microorganismos; es

decir <1 UFC/mL, garantizando que los tratamientos siguientes no sean influenciados por la flora microbiana inicial.

Para su mejor ilustración, en la **Tabla N°5** muestro los resultados de la **Tabla N°4** en \log_{10} UFC/mL y puede visualizarse en la **Gráfica N°1**. En todos los tratamientos con 0.05% de benzoato de sodio no hubo recuento ni de bacterias mesófilas ni de levadura en el jugo de naranja, que se puede sustentar por que el jugo presenta pH entre 2.5 y 4 (Fuentes et al, 2,000) y en el trabajo realizado por Abud *et al*, (2,009), Alvarez (2,012), Bautista (2013), Eklund (1985).

CONCLUSIONES

- ✓ Se determinó que el benzoato de sodio al 0.05% aplicado sobre zumo de naranja a temperatura de ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y pH 3-3.5, no dejó desarrollar bacteria o levadura alguna durante 7 días.
- ✓ Se concluye que el resultado del análisis microbiológico fue el mismo para benzoato de sodio de procedencia americana como para el benzoato de sodio de procedencia china; es decir, no hay diferencia significativa en su eficiencia.

RECOMENDACIONES

- ✓ Llevar a cabo el análisis microbiológico en cámara de siembra para evitar contaminación o posibles falsos positivos.
- ✓ Realizar la comparación de eficiencia de benzoato de sodio de diferente procedencia (americana y china) con diferentes temperaturas.
- ✓ Realizar la comparación de eficiencia de benzoato de sodio de diferente procedencia (americana y china) con alimentos de diferentes pH, ya que en pH básico el benzoato no es tan eficiente como en ácido y da la posibilidad que se pueda ver una diferencia.
- ✓ Considerar un mayor tiempo de seguimiento para cada tratamiento; por ejemplo, si es a refrigeración (0 a 4°C) realizar un seguimiento de 4 meses para los dos benzoatos de diferente procedencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abud M.; Ventura L.; *et al.* .2009. Sobrevivencia de *Escherichia coli* en jugo de naranja adicionado con aceite esencial de zacate limón y conservadores artificiales. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, División de Estudios de Posgrado e Investigación. [Consulta: 27-08-16]. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/AREA_I/II/OIII-23.pdf
2. Alzamora E., Guerrero S., Nieto A., López-Malo, A. Palou, E. Cha, Rafellini S. 2008. Models for microorganism inactivation: application in food preservation design. En "Processing Effects on Safety and Quality of Foods". E. Ortega (ed.). Taylor and Francis. Estados Unidos.
3. Álvarez, L.; Báez, A. 2012. "Determinación del tiempo de conservación de la pulpa de pitahaya oriental (*Hylocereus undatus*) utilizando tres temperaturas, tres empaques y tres tipos de conservantes". [Consulta: 03-08-16]. Disponible <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/722> PDF.
4. Davidson, P.M. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En: Food Microbiology: and Fundamentals and frontiers, 2 Ed. Doyle MP, LR Beuchat, TJ Montville (Eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA. Chap. 29: 593-627pp.
5. Barbosa, G.; Pothakamury, U.; Paulo, E. y Swason, B. 1999. Conservación no Térmica de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 280 p..
6. Baustista, K. 2013. Elaboración de una bebida nutritiva utilizando: spirulina (*Spirulina platensis*), y mora (*Morus nigra*), con tres concentraciones y dos tipos de conservantes (Benzoato de sodio y Sorbato de potasio). [Consulta: 03-08-16]. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2669/1/T-UTC-00205.pdf>

7. Bellitz H.; Grosh W. 1995. Química de los alimentos. Segunda Edición. Editorial Acribia SA. Zaragoza, España.
8. Bitanialab. 2008. [Consulta: 03-08-16]. Disponible en:
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/nutritivoagar.htm>
9. Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM.
10. Carillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Ed. Universidad Nacional del Salta. 128 p.
11. Casp V.; Requena J. 2003. Procesos de conservación de México. [Consulta: 04-09-16]. Disponible en
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-mohos-levaduras_6530.pdf.
12. Casp V.; Requena J. 2003. Procesos de conservación de alimentos. Ediciones mundi- prensa. Colección tecnológica de alimentos.
13. Chichester, D.F., Tanner, F. W. 1972. Antimicrobial Food Additives. In: Furia, T. E. (Ed.), Handbook of Food Additives, second Ed., CRS Press, Cleveland, 155 p.
14. Cordeiro A., Wilane R., Arraes M., Elesbáo A., Moreira M., Machado P.. 2007. Efeito do tipo de corte nas características físico-químicas e microbiológicas do melão “Cantaloupe” (Cucumis melo L. Híbrido hy-Mark) minimamente processado. Ciénc. Agrotec. 31 (4): 132 – 136pp.
15. Cruess, W. V. and Richter, P. M. 1929. Effect of hydrogen-ion concentration on the toxicity of sodium benzoate to micro-organisms. J. Bacterial., 17,363-371pp.

16. Cubero N.; A. Monferrer; y J. Villalta. 2002. Aditivos alimentarios. Ediciones mundi- prensa. Colección tecnológica. [Consulta: 08-09-16]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/456/61581s.pdf?sequence=1>.
17. Eklund T. 1985. Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p- hydroxybenzoic acid Int. J. Food Microbiol 2.
18. Escobar, M. 2002. Fundamentos de Microbiología. Tercera Edición. CEJA. Bogotá. Colombia. 202- 204 pp.
19. Fennema Owen. 2000. Química de los alimentos. Editorial Acribia SA. Segunda Edición. Zaragoza, España.
20. Fuentes, A.; García, E.; Fernández I. 2000. Determinación de sorbato potásico y benzoato sódico en alimentos por HPLC. Tecnología de alimentos. Universidad de Valencia.
21. Gerónimo, A. 2009. Comparación del efecto antimicrobiano del propóleo y el benzoato de sodio en mermelada de mango de la Escuela Agrícola Panamericana. [Consulta: 08-12-16]. Disponible en <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/275/1/AGI-2009-T013.pdf>
22. Halasz, A. y Lasztity, R. 2000. Use of Yeast biomass in food production. CRC. Press 352 p..
23. Kirk, R., Sawyer, R., & Egan, H. 2004. Composición y análisis de alimentos de Pearson. México: Compañía Editorial Continental.
24. Le Minor, L. 1994. The genus Salmonella. 2760–2774 pp. en: BALLOWS, A., TRÜPER, H.G., DWORKIN, M., HARBER, W., SCHEIFFER, K. H (eds). The Prokaryotes. Editorial Springer-Verlag. New York.

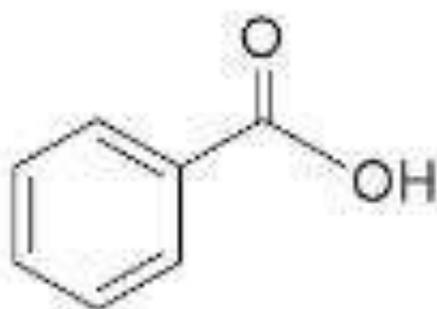
25. López, Raymond Chang, Kenneth A. Goldsby; revisión técnica, Rodolfo Álvarez Manzo, Silvia Ponce. 2013. *Química* (11a. ed. edición). México; Madrid [etc.]: MacGraw-Hill.
26. Lück, E. y Jager, M. 1995. Conservación química de los alimentos. Características, usos y efectos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.
27. Lück, E., & Jager, M. 2000. Conservación química de los alimentos: Características, usos y efectos. Zaragoza: Editorial Acribia.
28. Mateos, P. 2014. Control de las poblaciones microbianas: esterilización y desinfección. Universidad de Salamanca. [Consulta: 25-11-16].
Disponible en: <http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema08.html>.
29. Mhao J.; *et al.* 2011. Cálculo del tiempo de vida útil de melones (*Cucumis melo*.) variedad Cantaloupe, cortados, con recubrimiento comestible a base de gelatina, mediante un modelo de superficie de respuesta saber. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Vol. 23, 127-133 pp..
30. Potter, N. y Hotchkiss, J. 1995. Food Science. 5ta Edición. Chapman and Hall. New York, N. Y. Estados Unidos de América.
31. Raybaudi R., Mosqueda J., Martín B. 2008. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. *Int. J. Food Sci.* 121(1): 313 – 327.pp.
32. Romero, R. 2007. Microbiología y Parasitología Humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana, 753-754 pp.

33. Rubio, S.; Pozo M. 2012. "Elaboración de leche chocolatada con la utilización de tres edulcorantes (stevia, azúcar y aspartame) en tres formulaciones y con dos conservantes (benzoato de sodio y sorbato de potasio) en la Pasteurizadora "TANILACT", ubicada en la Parroquia de Tanicuchi". [Consulta: 05-08-16]. [Documento en línea]. Disponible: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/1637> PDF. [Consulta: 05-08-16].
34. Southgate, D. 1992. Conservación de frutas y Hortalizas. 3era Edición Acribia. Editorial. Zaragoza. España.
35. Trejo M., Ramos K., Pérez C. 2007. Efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible a base de gelatina sobre la calidad de fresa (*Fragaria yesca L*) almacenada en refrigeración. [Consulta: 16-11-16]. Disponible en: <http://www.horticom.com/pd/imagenes/68/180/68180.pdf>.
36. Villada J. 2010. Conservadores químicos utilizados en la Industria Alimentaria. Universidad Autónoma Agraria. Buenavista, Saltillo, Coahuila-México.
37. Zimbro, M. Power, D. 2003. Manual of Microbiological cultura media. Difco y BBL Manuel Estados Unidos. Pág. 590.

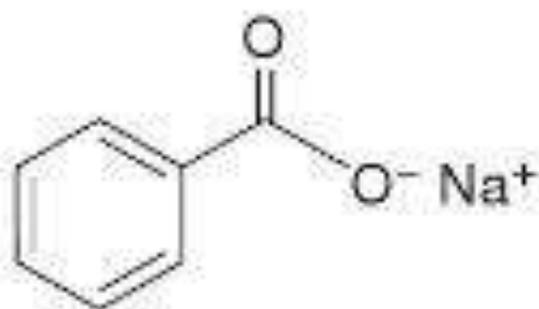
ANEXOS

FIGURAS

Fig. N°1.- Estructura del ácido benzoico y benzoato de sodio



Benzoic Acid



Sodium Benzoate

Fig. N°2.- Escala Mc Farland



Se observa la turbidez de forma creciente de izquierda a derecha.

Anexo Nº 3.- Ficha Técnica Agar Nutritivo

REF

REF

Nutritivo Agar

Uso

Medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el aislamiento y recuento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales.

Su uso está descrito en procedimientos para el análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria.

Fundamento

Medio de cultivo nutritivo no selectivo, en el cual la pluripeptona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono, nitrógeno y aportan nutrientes para el desarrollo bacteriano. El agregado de cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. Puede ser suplementado con sangre ovina desfibrinada estéril para favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales y permite una clara visualización de las reacciones de hemólisis.

Contenido y Composición Código B0212205: envase x 100 g. Código B0212206: envase x 500 g.

Fórmula (en gramos por litro)

PluriPEPTona	5.0
ExtraCto dE CarnE	3.0
Cloruro dE Sodio	8.0
agar	15.0
pH final: 7.3 ± 0.2	

Instrucciones

Suspender 31 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución total. distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Preparación de agar Sangre: agregar 5-10 % de sangre ovina desfibrinada estéril ([Britasheep](#)) al medio esterilizado, fundido y enfriado a 45-50 °C.

Homogeneizar y distribuir en placas de Petri estériles.

Características del producto

Medio de cultivo deshidratado: color beige claro, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color ámbar claro ligeramente opalescente.

Suplementado con sangre: color rojo cereza.

Almacenamiento

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C. Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

Procedimiento siembra

En superficie: inocular directamente la muestra por estría.

En profundidad: inocular una alícuota de la muestra directa o de su dilución. Verter un volumen del medio de cultivo fundido y enfriado a 40 - 45°C. Homogeneizar mediante movimientos de vaivén y rotación. dejar solidificar.

Incubación

El tiempo, la temperatura, y la atmósfera de incubación, dependerán del microorganismo que se quiera recuperar.

en general se recomienda:

Bacterias de fácil crecimiento: en aerobiosis, a 35-37° C durante 18 a 24 horas.

Bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales: en atmósfera con 5-10 % de Co₂, a 35-37 °C durante 24-48 horas.

Interpretación de Los Resultados

Observar las características de las colonias.

Para el medio de cultivo conteniendo sangre, observar las reacciones de hemólisis:

Hemólisis alfa: lisis parcial de los glóbulos rojos. Se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia en estudio. Es debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (compuesto de color verdoso) por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos.

Hemólisis beta: lisis total de los glóbulos rojos. Se observa un halo

Nutritivo Agar

claro, brillante alrededor de la colonia en estudio.

Hemólisis gamma: ausencia de lisis de los glóbulos rojos. El medio

de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia en estudio.

Control de Calidad

MiCroorganiSMoS	CrECiMiEnto
Escherichia coli	Satisfactorio
atCC 25922	
Staphylococcus aureus	Satisfactorio
atCC 25923	
Enterococcus faecalis	Satisfactorio
atCC 29212	
Pseudomonas aeruginosa	
atCC 27853	

nutritivo agar suplementado con 5% de sangre ovina:

MiCroorganiSMoS	CrECiMiEnt	HEMÓLISIS
Streptococcus pyogenes	o	Beta
atCC 19615	Satisfactorio	
Streptococcus pneumoniae		alfa
atCC 6305	Satisfactorio	
Streptococcus pneumoniae	Satisfactorio	alfa
atCC 49619		

calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

Precauciones

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. uso profesional exclusivo.
- no utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- no utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.

- descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

Referencias

- Macfaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- downes and ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. american Public Health association, Washington, d.

SÍMBOLOS UTILIZADOS



DIAGNÓSTICO
IN VITRO

CÓDIGO Nº

ELABORADOR

ESTÉRIL

Nº DE
DETERMINACIONES

LOTE Nº

FECHA DE
VENCIMIENTO

LÍMITE DE
TEMPERATURA

INSTRUCCIONES
DE USO



www.britania|lab.com info@
britania|lab.com

E.M.B. Agar (con Eosina y Azul de Metileno)

Uso

Este medio (también denominado E.A.M.) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae.

Fundamento

El medio de cultivo combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos.

Es nutritivo por la presencia de peptona que favorece el desarrollo microbiano. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas. El agar es el agente solidificante.

Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter* spp. presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras.

También, pueden crecer especies de *Candida* y se observan como colonias rosadas y puntiformes; la siembra en profundidad permite el desarrollo de clamidosporas en *C. albicans*. *Enterococcus* spp. crece en este medio como colonias puntiformes y transparentes, mientras que *Acinetobacter* spp. y otras bacterias oxidativas se observan como colonias de color azul lavanda; esto puede ocurrir aunque las cepas no sean capaces de acidificar a partir de lactosa al 0.5% y ello se debe a la incorporación de azul de metileno a sus membranas. En este medio se obtiene además, un buen desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella*.

Contenido y composición

Código B0410184: 6 frascos x 50 ml.

Código B2310131: envase x 10 placas.

FÓRMULA

Peptona	10.0 g
Lactosa	5.0 g
Sacarosa	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.0 g
Eosina	0.4 g
Azul de metileno	0.065 g
Agar	13.5 g
Agua purificada	1000 ml

pH final: 7.2 ± 0.2

Instrucciones

Medio de cultivo listo para usar en frascos
Colocar los frascos cerrados en baño maría y llevar a ebullición para fundir el medio de cultivo sólido contenido en los mismos. Una vez que se ha fundido el medio de cultivo, retirar cuidadosamente los frascos del baño maría y dejar enfriar. Cuando alcanzan temperatura 45-50 °C, abrirlos y distribuir aproximadamente 15 ml en placas de Petri estériles.

Placas listas para usar.

Características del producto

Medio de cultivo color púrpura vinoso.

Nota: en el caso del medio de cultivo listo para usar en frascos, durante la esterilización se reduce el azul de metileno al color naranja. El color púrpura se restaura por agitación. La presencia de un precipitado en el medio esterilizado es normal y no debe ser removido, ya que es parte esencial del mismo.

Almacenamiento

Medio de cultivo listo para usar en frascos a 10-35 °C

Medio de cultivo listo para usar en placas a 2-8 °C

Procedimiento

Siembra

En superficie, por estriado directo a partir de la muestra.

En profundidad, para favorecer el desarrollo de clamidosporas.

Incubación

En aerobiosis, a 35-37 °C durante 18-24 horas.

Interpretación de los resultados

Microorganismos fermentadores de lactosa y / o sacarosa: colonias de color negro azulado o amarronado. Pueden tener centro oscuro y brillo metálico.

Microorganismos no fermentadores de lactosa y sacarosa: colonias del color del medio, incoloras.

E.M.B. Agar (con Eosina y Azul de Metileno)

Control de Calidad

Microorganismos	CRECIMIENTO	Características de las colonias
Escherichia coli ATCC 25922	Satisfactorio	Negro azuladas con brillo Metálico
Escherichia coli ATCC 8739	Satisfactorio	Negro azuladas con brillo Metálico
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Satisfactorio	Mucosas confluentes, con centro oscuro
Proteus mirabilis ATCC 43071	Satisfactorio	Incoloras
Salmonella typhimurium ATCC 14028	Satisfactorio	Incoloras
Shigella flexneri ATCC 12022	Satisfactorio	Incoloras
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Satisfactorio	Incoloras
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Inhibición parcial	Incoloras puntiformes
Candida albicans ATCC 10231	Inhibición parcial	Rosadas puntiformes
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Inhibido	---
CONTROL DE ESTERILIDAD		RESULTADO
Medio sin inocular		Sin cambios

- Durante la esterilización el azul de metileno puede precipitar. Es importante resuspender el precipitado mientras se distribuye en placas de Petri estériles el medio preparado.
- Conservar el medio preparado en placas a 2-8 °C y protegido de la luz ya que los indicadores presentes son fotosensibles y pueden inhibir el desarrollo de algunas especies de Proteus si no se conservan apropiadamente.

Materiales necesarios no provistos

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

Precauciones

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

Referencias

- Holt-Harris and Teague. 1916. J. Infect. Dis. 18:596.
- Levine. 1918. J. Infect. Dis. 23:43.
- MacFaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Indicaciones al consumidor

Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento. Conservar el producto según las indicaciones del rótulo

Limitaciones

- En el caso de los microorganismos fermentadores, no se puede diferenciar el carbohidrato metabolizado.
- Este medio de cultivo es moderadamente inhibitorio ya que las cepas de enterococo y candida pueden desarrollar en el mismo, observándose como colonias de tamaño puntiforme.
- Para la identificación de género o especie microbiana se deben realizar pruebas bioquímicas adicionales.
- Algunas cepas de Salmonella y Shigella no crecerán en EMB Agar.

SÍMBOLOS UTILIZADOS



O

H
J
A
2
DDIAGNÓSTICO
IN VITRO

CÓDIGO N°

ELABORADOR

ESTÉRIL

N° DE
DETERMINACIONES

LOTE N°

FECHA DE
VENCIMIENTOLÍMITE DE
TEMPERATURAINSTRUCCIONES
DE USOLABORATORIOS BRITANIA S.A.
LOS PATOS 2175 (C-1283AB)[www.
britania|lab.com](http://www.britania|lab.com)[info@
britania|lab.co](mailto:info@
britania|lab.co)

2

Anexo N°5.- Ficha Técnica Agar OGY



OXYTETRACYCLINE 50 MG SELECTIVE SUPPLEMENT

USE

Oxytetracycline 50 mg Selective Supplement is used with OGA base for the detection and enumeration of yeasts and molds. The selective supplement is composed of the antibiotic oxytetracycline. Supplied as a freeze-dried preparation, it inhibits most bacteria in order to favor the development of yeasts and molds. More information can be found by consulting the technical sheets for Oxytetracycline Glucose Agar.

RECONSTITUTION

- Using aseptic techniques, fill the vial of lyophilisate with 5 mL of sterile distilled water.
- Turn end-over-end to dissolve. Avoid frothing the solution.

COMPOSITION

Per vial :

Oxytetracycline hydrochloride 50.0 mg

QUALITY CONTROL

- Appearance : yellow lyophilisate, giving a yellow, limpid solution after reconstitution.
- Bacteriological efficacy in Oxytetracycline Glucose Agar after 72 hours of incubation at 25°C :

Microorganisms		Growth (Productivity ratio : <i>PR</i>)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC [®] 9763	<i>PR</i> ≥ 50%
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	<i>PR</i> ≥ 50%
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	DSM 1988	<i>PR</i> ≥ 50%
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	inhibited
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	inhibited

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France Tél
: + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.com

STORAGE / SHELF LIFE

- Store between 2 and 8°C, shielded from light.
- The expiration date is indicated on the vial.
- Once reconstituted, the product can be stored for a maximum duration of 30 days at 2-8°C, shielded from light. During this period, the solution may become opalescent to opaque. This has no influence on the bacterial activity of the reagent.

PACKAGING

Code

- 10 vial pack (qs. 550 mL each)

BS00808

The information provided on the package take precedence over the formulations or instructions described in this document. The information and specifications contained in this technical data sheet date from 2010-01-15.

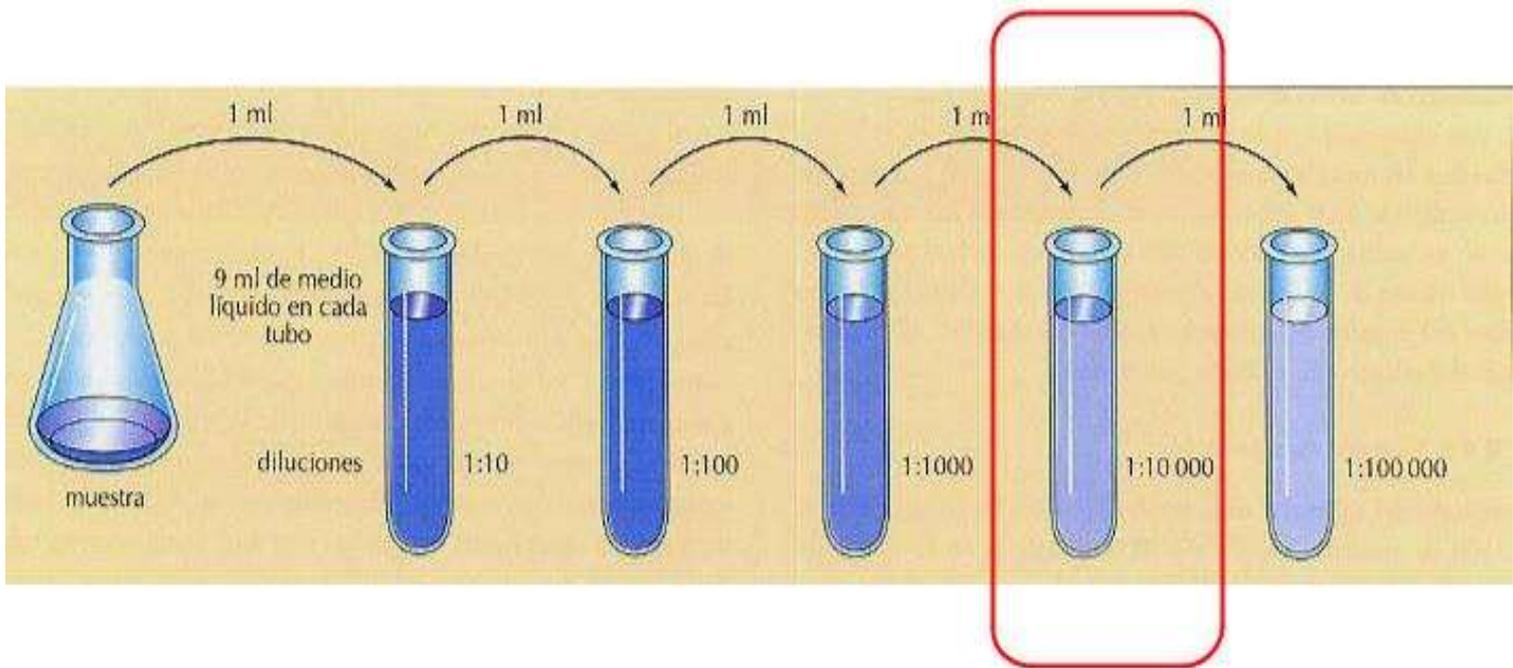
They are susceptible to modification at any time, without warning. Code document :
BS008/A/2000-09 : 6.

Fig. N° 6.- Lugar de Ejecución



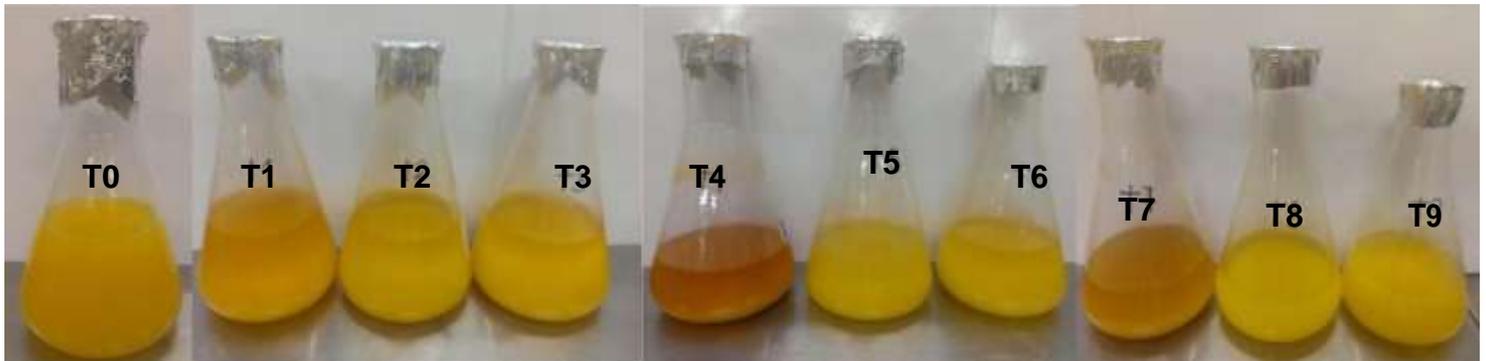
Campus de la Universidad Ricardo Palma donde se realizó la presente investigación.

Fig. N° 7.- Preparación de inóculo



Ejemplo de “Preparación de Inóculo” por diluciones sucesivas, en esta investigación se utilizó la dilución 10^{-4} en el inóculo para llegar hasta 10^{-2} en la muestra.

Fig. N°8.- Tratamientos



De la Fig. N°8, se observa todos los tratamientos en último día de evaluación, es decir, el día 7, en el cual se percibe diferente apariencia por tratamiento.

Donde:

T0: Pasteurizado, sin benzoato de sodio, sin inóculo.

T1: Sin pasteurizar, sin benzoato de sodio, sin inóculo.

T2: Sin pasteurizar, con benzoato de sodio americano, sin inóculo.

T3: Sin pasteurizar, con benzoato de sodio chino, sin inóculo.

T4: Pasteurizado, sin benzoato de sodio, inoculado con *Escherichia coli*

T5: Pasteurizado, benzoato de sodio americano, inoculado con *Escherichia coli*

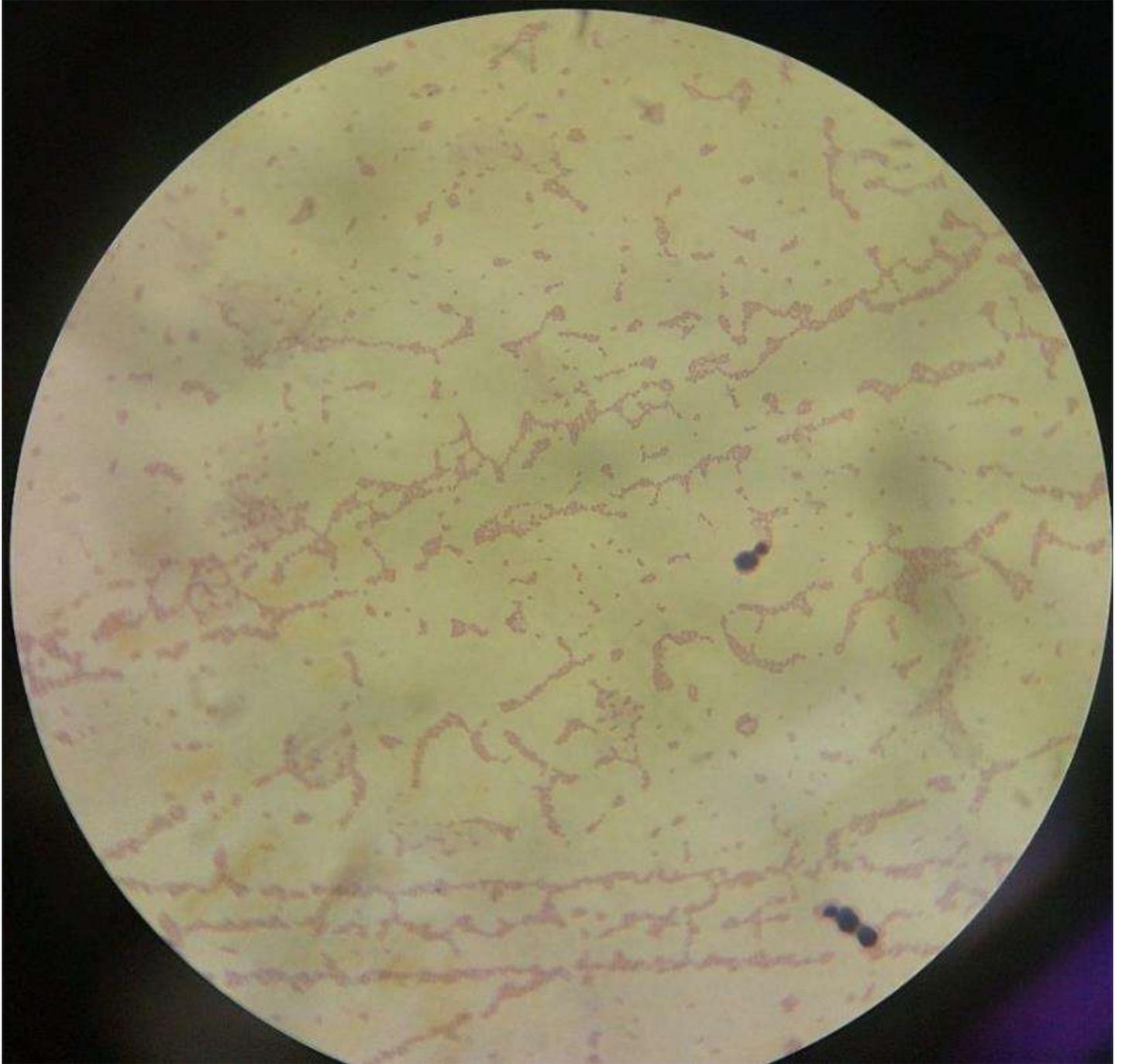
T6: Pasteurizado, benzoato de sodio chino, inoculado con *Escherichia coli*

T7: Pasteurizado, sin benzoato de sodio, inoculado con *Saccharomyces sp*

T8: Pasteurizado, benzoato de sodio americano, inoculado con *Saccharomyces sp*

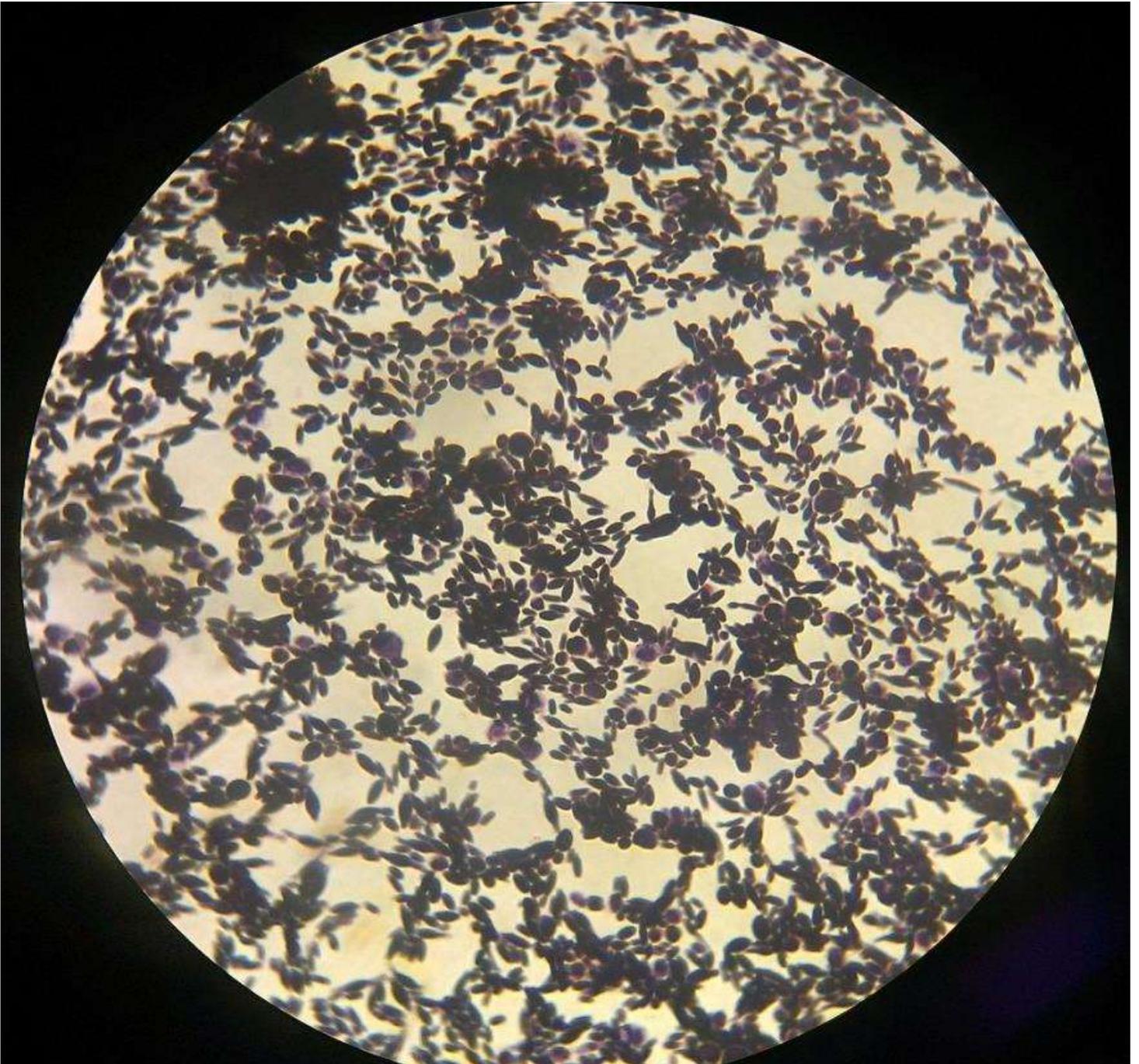
T9: Pasteurizado, benzoato de sodio chino, inoculado con *Saccharomyces sp*

Fig. Nº 9.- *Escherichia coli* vista 100X de Microscopio óptico



Observación microscópica a un aumento de 100X con aceite de inmersión. Se puede observar bacterias dispersas por todo el campo con coloración GRAM.

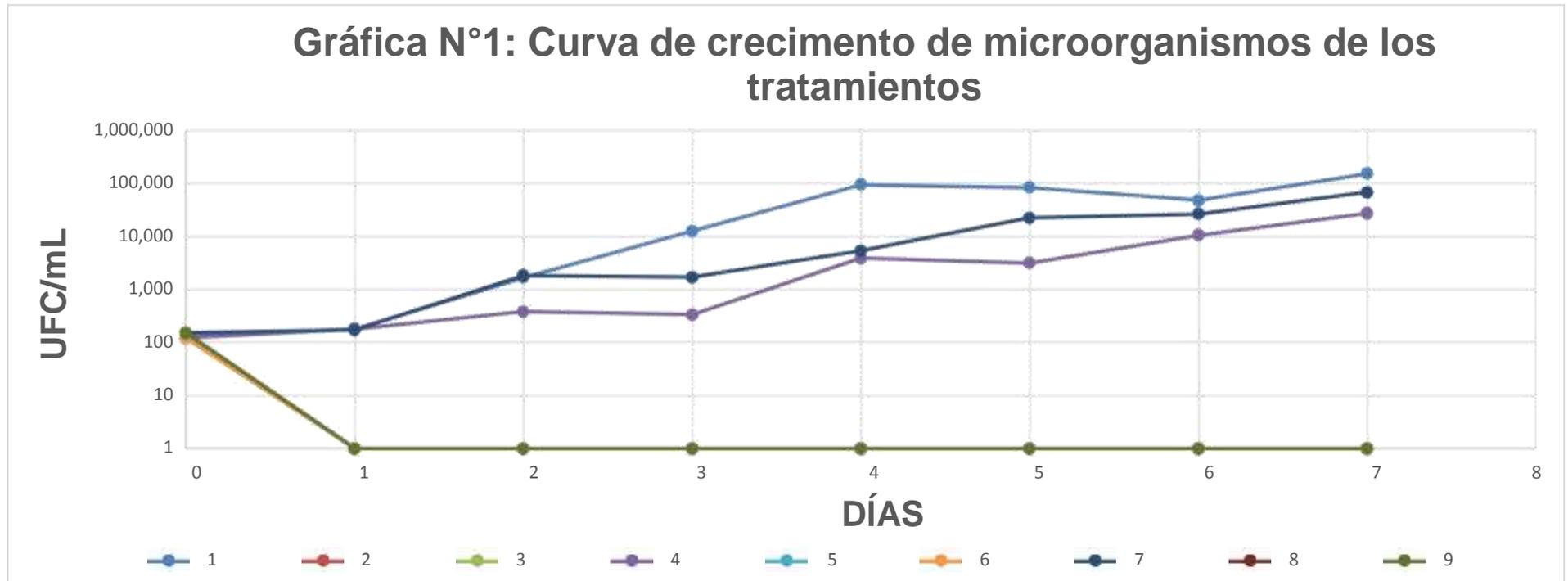
Fig. N° 10.- *Saccharomyces sp.* vista 100X de Microscopio óptico



Observación microscópica a un aumento de 100X con aceite de inmersión. Se puede observar *Saccharomyces sp.* dispersas por todo el campo con coloración GRAM.

11.2 GRÁFICA

GRÁFICA N°1.- Curva de crecimiento de microorganismos de los tratamientos

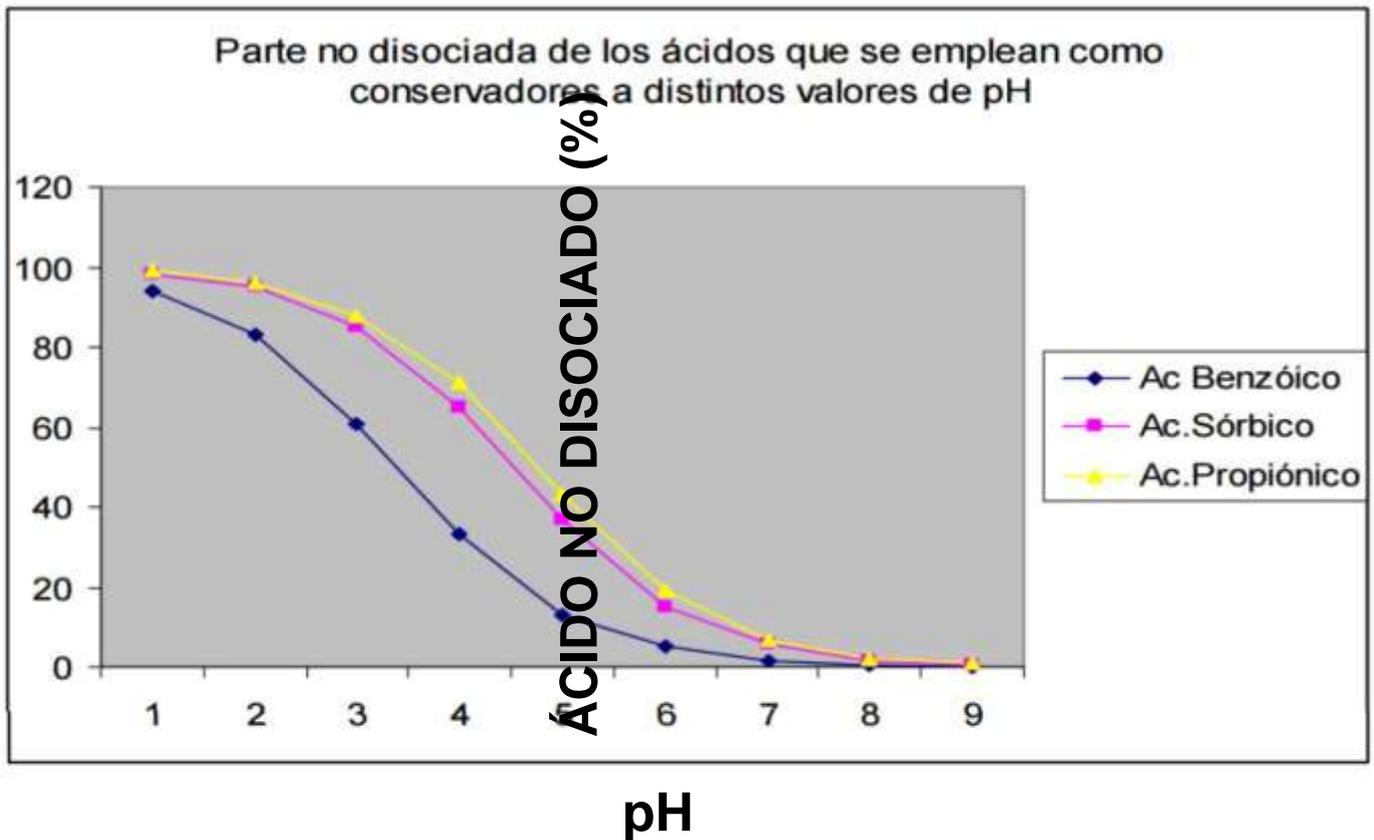


De la Gráfica N°1, se muestra el crecimiento de microorganismos con respecto al tiempo (Días) de todos los tratamientos, se ilustra el comportamiento de las bacterias, en el cual se evidencia crecimiento de microorganismos en los tratamientos 1, 4 y 7; puesto que, son los que no presentan adición de benzoato de sodio. Mientras que en los demás tratamientos no hubo crecimiento de microorganismo significativo.

De lo anterior, se detallan los tratamientos.

	SUSTANCIA CONSERVADORA	INÓCULO	N°
PASTEURIZADO	Sin Benzoato de sodio	Sin inóculo	T0
SIN PASTEURIZAR	Sin Benzoato de sodio	Sin inóculo	T1
	0.05% Benzoato Americano	Sin inóculo	T2
	0.05% Benzoato Chino	Sin inóculo	T3
PASTEURIZADO	Sin Benzoato de sodio	<i>Escherichia coli</i>	T4
	0.05% Benzoato Americano	<i>Escherichia coli</i>	T5
	0.05% Benzoato Chino	<i>Escherichia coli</i>	T6
PASTEURIZADO	Sin Benzoato de sodio	<i>Saccharomyces sp.</i>	T7
	0.05% Benzoato Americano	<i>Saccharomyces sp.</i>	T8
	0.05% Benzoato Chino	<i>Saccharomyces sp.</i>	T9

GRÁFICA Nº2.- Influencia del pH con la acción de ácido no disociado



Fuente: Cubero N.; A. Monferrer; y J. Villalta. 2002. Aditivos alimentarios. Ediciones mundi- prensa. Colección tecnológica.

De la GRÁFICA Nº 2, ilustra los valores de pH versus el porcentaje del ácido que no se disocia (parte conservante que actuará sobre los microorganismos.).

Donde se demuestra que mientras más altos sean los valores de pH, menor será el porcentaje del ácido no disociado; es decir, menor será la sustancia conservante que actúe sobre los microorganismos.