

PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-186-SSA1/SCFI-2012, Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. 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 y CHRISTIAN TUREGANO ROLDAN, Director General de Normas de la Secretaría de Economía y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, con fundamento en los artículos 34 y 39, de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4, de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3, fracción XXII, 17 Bis, 17 Bis 2, 194, fracción I, 195, 197, 199, 201, 205, 210, 212, 213, 214, 215, fracción I y 216, de la Ley General de Salud; 3, fracción XI, 38, fracción II, 39, fracción V, 40, fracciones I, V, XI y XII, 41, 43, 44, 45, 47, fracción I, 51 y 52, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28, 31, 32, 33, 34 y 39, del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 1, fracción IX, 4, 8, 14, 15, 25, 40, 124, 125, fracciones I y II, 126 y 163, del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 2, apartado C, fracción X, del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 3, fracciones I, inciso c y II, 10 fracciones IV y VIII, del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, 21, fracciones I, IX, X, XV y XXI, del Reglamento Interior de la Secretaría de Economía, hemos tenido a bien ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación del Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-186-SSA1/SCFI-2012, Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones Sanitarias. Denominación Comercial. Métodos de Prueba.

El presente Proyecto se publica a efecto de que los interesados, dentro de los siguientes 60 días naturales, contados a partir de la fecha de su publicación, presenten sus comentarios por escrito en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, ubicado en Oklahoma número 14, colonia Nápoles, Delegación Benito Juárez, código postal 03810, México, Distrito Federal, teléfono 5080 5200, extensión 1333, fax 5511 1499, correo electrónico rfs@cofepris.gob.mx y/o ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, ubicado en avenida Puente de Tecamachalco número 6, colonia Lomas de Tecamachalco, Sección Fuentes, Naucalpan de Juárez, código postal 53950, Estado de México, teléfono 57 29 93 00, extensión 43222, fax 55 20 97 15, página de Internet <http://www.economia.gob.mx/?P=85>.

Durante el plazo mencionado, los documentos que sirvieron de base para la elaboración del proyecto, así como la Manifestación de Impacto Regulatorio (MIR), estarán a disposición del público para su consulta en el domicilio de los Comités.

PREFACIO

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

SECRETARIA DE SALUD.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

SECRETARIA DE ECONOMIA.

Dirección General de Normas.

ASOCIACION NACIONAL DE FABRICANTES DE CHOCOLATES, DULCES Y SIMILARES A.C, (ASCHOCO).

INDICE

1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones
4. Símbolos y abreviaturas
5. Clasificación
6. Especificaciones sanitarias
7. Muestreo
8. Métodos de prueba
9. Etiquetado
10. Envase y embalaje

11. Concordancia con normas internacionales y mexicanas
12. Bibliografía
13. Observancia de la Norma
14. Vigencia
15. Apéndice informativo A. Contaminantes
16. Apéndice normativo A. Métodos de Prueba

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma, tiene por objeto establecer las especificaciones sanitarias y comerciales que debe cumplir el cacao, el chocolate, los productos similares y los derivados del cacao. Asimismo, establece la denominación genérica y específica de dichos productos.

1.2 Esta Norma es de observancia obligatoria para las personas físicas o morales que se dedican al proceso o importación de los productos objeto de la misma, que serán comercializados en el territorio nacional.

2. Referencias

Esta Norma se complementa con las siguientes Normas Oficiales Mexicanas o las que las sustituyan:

- 2.1 Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema General de Unidades de Medida.
- 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-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano- Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- 2.5 Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- 2.6 Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.

3. Definiciones

3.1 **Aditivos para alimentos**, a 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 alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de producción, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda verse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. Esta definición no incluye "contaminantes" o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.

3.2 **Azúcares**, a los monosacáridos y disacáridos presentes en un alimento o bebida no alcohólica.

3.3 **Cacao**, a la semilla extraída de las mazorcas maduras de los árboles de la especie *Theobroma cacao*, de la familia de las esterculáceas, fermentado o no y secado.

3.4 **Cocoa (cacao en polvo)**, al producto que se obtiene a partir de la torta de cacao transformada en polvo.

3.5 **Chocolate**, al producto obtenido por la mezcla homogénea de cantidades variables de pasta de cacao, o manteca de cacao, o cocoa con azúcares u otros edulcorantes, ingredientes opcionales y aditivos para alimentos, siempre que cumpla con las especificaciones de esta norma.

3.6 **Consumidor**, a la persona física o moral que adquiere o disfruta como destinatario final productos alimenticios y bebidas no alcohólicas preenvasados.

3.7 **Derivado del cacao**, a los productos obtenidos del cacao en grano descascarillado, tales como: pasta de cacao, torta de cacao, manteca de cacao, cocoa y mezclas de estos productos con azúcares y/o ingredientes opcionales.

3.8 **Embalaje**, al material que envuelve, contiene y protege los productos preenvasados para efectos de su almacenamiento y transporte.

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

3.10 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.

3.11 Grasa butírica, a la grasa que se obtiene de la leche, la cual se caracteriza por contener ácidos grasos saturados, incluyendo el ácido butírico.

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

3.13 Ingredientes opcionales, a lo que se pueden adicionar al producto, tales como: leche o sólidos de leche, semillas, especias, licores, entre otros, permitidos por la normatividad aplicable sin rebasar el límite máximo establecido.

3.14 Límite máximo, a la cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, metales pesados y metaloides, entre otros, que no se debe exceder en un alimento, bebida o materia prima.

3.15 Manteca de cacao, al producto semisólido, de aspecto graso a temperatura ambiente, de color blanco o ligeramente amarillento, obtenido por el procesamiento de las semillas del árbol *Theobroma cacao*, que se obtiene por extracción mecánica o por solventes.

3.16 Materia extraña, a cualquier sustancia, resto, desecho o material, que se presenta en el producto pero que no forma parte de la composición normal de éste.

3.17 Metal pesado y metaloide, a los elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de las dosis en que se ingieran, así como de su acumulación en el organismo.

3.18 Métodos de prueba, al procedimiento técnico utilizado para la determinación de parámetros o características de un producto, proceso o servicio.

3.19 Pasta de cacao o licor de cacao, al producto que se obtiene de la molienda del cacao fermentado o no, tostado, descascarillado y sin eliminar o agregar ninguno de sus constituyentes, que puede tratarse químicamente.

3.20 Plaguicida, a la sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten las enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran en el proceso de los productos.

3.21 Prácticas de Higiene, a las medidas necesarias para garantizar la inocuidad de los productos.

3.22 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.

3.23 Productos similares, a los productos elaborados a partir de cacao en los que para su elaboración se ha sustituido total o parcialmente la manteca de cacao por otras grasas vegetales comestibles o sus fracciones, hidrogenadas o no y son elaborados bajo formatos o moldeados especiales y que por su presentación, aspecto, sabor o consumo son susceptibles a ser confundidos con el chocolate.

3.24 Productos lácteos, a los productos obtenidos a partir de la leche o sus componentes y otros ingredientes funcionalmente necesarios para su elaboración, incluidos los productos con grasa vegetal.

3.25 Producto preenvasado, al producto que cuando es colocado en un envase de cualquier naturaleza, no se encuentra presente el consumidor y la cantidad de producto contenido en él no puede ser alterada, a menos que el envase sea abierto o modificado perceptiblemente.

3.26 Sólidos lácteos o sólidos de la leche, a los componentes propios de la leche como: suero de mantequilla, suero de queso, suero de leche, concentrado de proteína de leche, proteína de suero o lactosa.

3.27 Sólidos Totales de Cacao, a la suma total de pasta y manteca de cacao presente en el producto terminado.

3.28 Torta de cacao, al producto que se obtiene por presión de la pasta de cacao, después de la extracción parcial de la manteca de cacao.

4. Símbolos y abreviaturas

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

BPF. buenas prácticas de fabricación.

cm. Centímetro.

°	grado.
°C.	grado Celsius.
g.	gramo.
Kg.	kilogramo.
Kcal.	kilocaloría.
kJ.	kilojoule.
L.	litro.
mL.	mililitro.
µL.	microlitro.
µg.	microgramo.
m.	masa.
mg.	miligramo.
mm.	milímetro.
min.	minuto.
	menor o igual a.
m/m.	masa en masa.
	mayor o igual a.
/	por.
%	por ciento.
POP	Triglicérido de cadena estructurada de la siguiente forma: ácido palmítico-ácido oleico-ácido palmítico.
POSt	Triglicérido de cadena estructurada de la siguiente forma: ácido palmítico-ácido oleico-ácido esteárico.
StOSt	Triglicérido de cadena estructurada de la siguiente forma: ácido esteárico-ácido oleico-ácido esteárico.
UFC	unidades formadoras de colonias.

Cuando en la presente Norma se mencione:

- **Acuerdo**, debe entenderse que se trata del Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias.

- **CICOPLAFEST**, debe entenderse que se trata de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas.

- **Secretaría**, debe entenderse que se trata de la Secretaría de Salud.

5. Clasificación

Los productos objeto de esta Norma se clasifican en:

5.1 Cacao.

5.2 Chocolate y Productos similares.

5.3 Derivados del cacao.

6. Especificaciones sanitarias

Los productos objeto de esta Norma, deben ajustarse según corresponda a las siguientes especificaciones:

6.1 El responsable de la obtención de los productos objeto de esta Norma, así como el comercializador, cada uno en el ámbito de su responsabilidad, deben observar que las sustancias empleadas para la eliminación de plagas en cualquier parte del proceso, cumplan con las especificaciones establecidas en el Catálogo Oficial de Plaguicidas vigente, emitido por CICOPLAFEST.

6.2 En el proceso de los productos objeto de esta norma, se deben aplicar las prácticas de higiene establecidas en la Norma Oficial Mexicana citada en el numeral 2.6 del apartado de Referencias.

6.3 El agua que se emplee en el proceso de los productos objeto de esta Norma, debe cumplir con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana citada en el numeral 2.4 del apartado de Referencias.

6.4 Las materias primas utilizadas para la elaboración de los productos objeto de esta norma, deben ajustarse a la normativa vigente.

6.5 Los productos objeto de esta Norma, que hayan sido modificados en su composición, deben sujetarse a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana citada en el numeral 2.3 del apartado de Referencias.

6.6 Para la elaboración de los productos objeto de esta norma, se debe asegurar un secado completo de la superficie de equipo después de la limpieza del mismo y antes de iniciar operaciones.

6.7 Los aditivos permitidos para los productos objeto de esta norma son los establecidos en el Acuerdo y sus modificaciones.

6.8 Contaminantes.

6.8.1 Los productos objeto de esta norma no deben contener más de 15 µg/kg de aflatoxinas, con excepción de los productos adicionados con semillas y/o cereales, cuyo límite máximo será de 20 µg/kg.

6.8.2 El productor o fabricante de los productos objeto de esta norma, debe establecer mecanismos de control que permitan determinar la presencia y cantidad de metales pesados y metaloides en las materias primas, en el producto en proceso de elaboración o en el producto terminado. La información generada debe estar a disposición de la Secretaría cuando ésta así lo requiera.

En el Apéndice Informativo A se señalan los metales específicos y los niveles de referencia correspondiente.

6.9 Grasas añadidas.

6.9.1 En la elaboración de chocolate se permite el uso de grasas vegetales distintas a la manteca de cacao, siempre que cumplan con los siguientes criterios:

6.9.1.1 Que sean grasas vegetales no láuricas ricas en triglicéridos monoinsaturados simétricos del tipo POP, POST y StOSt.

6.9.1.2 Que sean miscibles en cualquier proporción con manteca de cacao y que sean compatibles con sus propiedades físicas (punto de fusión, temperatura de cristalización, velocidad de fusión y necesidad de una fase de temperado).

6.9.1.3 Que se hayan obtenido mediante tratamientos de refinado o de fraccionamiento; la modificación enzimática de la estructura del triglicérido queda excluida.

6.9.2 Las grasas de origen vegetal que se pueden utilizar para la elaboración de chocolates son las que se enlistan a continuación siempre que cumplan con los criterios señalados en 6.9.1.

Denominación usual de las grasas vegetales	Denominación científica de las plantas de las que pueden obtenerse dichas grasas
1. Illipe, sebo de Borneo o Tengkawang.	<i>Shorea ssp.</i>
2. Aceite de palma.	<i>Elaeis guineensis, Elaeis olifera.</i>
3. Sal.	<i>Shorea robusta.</i>
4. Shea.	<i>Butyrospermum parkii.</i>
5. Kokum gurgi.	<i>Garcinia indica.</i>
6. Hueso de mango.	<i>Mangifera indica.</i>

6.9.3 Para los productos similares la sustitución de la manteca de cacao sólo podrá hacerse con grasas vegetales comestibles.

6.9.4 No obstante, lo establecido en los numerales anteriores, se podrá utilizar grasa proveniente de la leche, que se considerará como sólidos totales de leche para efectos de la Tabla 4.

6.9.5 El contenido de ácidos grasos trans en los productos objeto de esta norma no deberá ser mayor a 5% del total de la grasa del producto.

6.10 Los productos objeto de esta norma, debe cumplir con las siguientes especificaciones:

6.10.1 Microbiológicas.

Tabla 1. Especificaciones microbiológicas

Determinación	Cacao tostado	Chocolate sus variedades y productos similares	Derivados del cacao
Límite máximo			

Coliformes totales UFC/g	<10	<10	<10
<i>Salmonella spp</i> en 25g	Ausente	Ausente	Ausente
Mohos UFC/g	<50	-	-
Levaduras UFC/g	<50	-	-

6.10.2 Materia extraña.**Tabla 2. Especificaciones materia extraña**

Materia Extraña	Cacao tostado	Chocolate sus variedades y productos similares	Derivados del cacao
	Límite máximo		
Madera, tallos, restos de mazorca, piedras y fibras	0.5%	-	-
Insectos o sus fragmentos	-	60 fragmentos de insectos en promedio por 100g cuando se examinan 6 submuestras de 100g ó 90 fragmentos de insectos en cualquier submuestra.	75 fragmentos de insectos y exento de insectos completos.
Pelos de roedor	-	Un pelo de roedor en promedio por 100g cuando se examinan 6 submuestras de 100g ó 3 pelos de roedor en cualquier submuestra.	2
Excretas de roedor	22 mg/kg	Negativo.	Negativo.

6.11 El cacao no debe tener más de 7.5% de humedad.

6.12 En la elaboración de chocolates rellenos se permite el empleo de alcohol etílico anhidro.

6.13 Los derivados del cacao deben cumplir con las siguientes especificaciones:

Tabla 3. Especificaciones físicas y químicas

Producto	Acidez máxima (% como ácido oleico)	Humedad máxima (% m/m)
Manteca de cacao	2.0	-----
Pasta de cacao	2.0	-----
Mezclas de cocoa y azúcar, chocolate en polvo	-----	7.0

7. Muestreo

7.1 El procedimiento de muestreo para los productos, objeto de esta Norma, debe sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud y las disposiciones jurídicas aplicables.

8. Métodos de prueba

8.1 Para la verificación oficial de las especificaciones sanitarias que se establecen en esta Norma, se deben aplicar los métodos que se señalan en el Apéndice Normativo A.

9. Etiquetado

Las etiquetas de los productos objeto de esta norma, deben cumplir con las disposiciones generales de etiquetado establecidas en la Norma Oficial Mexicana citada en el numeral 2.2 del apartado de Referencias, así como las siguientes disposiciones particulares:

9.1 Información sanitaria.

Las etiquetas de los productos objeto de esta norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios, deben cumplir con lo siguiente:

9.1.1 Cuando se trate de productos con modificaciones en su composición, deben ostentar en la denominación los términos establecidos en la Norma Oficial Mexicana. Dichos términos deben figurar en la misma superficie, a renglón seguido con el mismo tipo, color y tamaño de letra.

9.1.2 Cuando se trate de productos en polvo, deshidratados, concentrados o condensados, destinados a ser reconstituídos, pueden presentar los ingredientes por orden cuantitativo decreciente (m/m) en el producto reconstituído, siempre que se incluya una indicación como la que sigue: "ingredientes del producto cuando se prepara según las instrucciones de la etiqueta."

9.1.3 Los productos objeto de esta norma que contengan alcohol etílico o bebidas alcohólicas en cantidades superiores al 0,5%, deben incluir en la superficie principal de exhibición de la etiqueta, la siguiente leyenda: "Este producto contiene _____% de alcohol. No recomendable para niños". (En el espacio en blanco citar el contenido de alcohol en %).

9.1.4 En caso de contener una cantidad mayor al 10% de polioles, se deberá ostentar la siguiente leyenda precautoria: Un consumo excesivo de _____ puede tener efectos laxantes. (En el espacio en blanco deberá citarse la denominación específica del poliol empleado).

9.1.5 En el caso de que los productos objeto de esta Norma contengan o incluyan productos alimenticios preenvasados como parte de promociones u obsequios, el envase de este último debe cumplir con las especificaciones de etiquetado correspondientes.

9.2 Información Comercial.

9.2.1 Denominación comercial y factores esenciales de composición.

9.2.1.1 Cobertura de chocolate, al producto homogéneo que cumple con las características del tipo de chocolate del que proviene de acuerdo a su formulación y características físicas, y que debe cumplir con los mínimos previstos en la Tabla 4.

9.2.1.2 Chocolate amargo y semiamargo, a los productos homogéneos elaborados a partir de la mezcla de dos o más de los siguientes ingredientes: pasta de cacao, manteca de cacao, cocoa, adicionado de azúcares u otros edulcorantes, así como de otros ingredientes opcionales, tales como productos lácteos y aditivos para alimentos, y que debe cumplir con los mínimos previstos en la Tabla 4.

9.2.1.3 Chocolate blanco, al producto homogéneo elaborado a partir de manteca de cacao, productos lácteos, azúcares u otros edulcorantes, aromatizantes e ingredientes opcionales, que cumple con los mínimos previstos en la Tabla 4.

9.2.1.4 Chocolate con leche, al producto homogéneo elaborado a partir de la mezcla de dos o más de los siguientes ingredientes: pasta de cacao, manteca de cacao, cocoa, adicionado de azúcares u otros edulcorantes, extracto seco de leche referido a la adición de ingredientes lácteos en sus proporciones naturales, salvo que la grasa de leche podrá agregarse o eliminarse, así como de otros ingredientes opcionales y aditivos para alimentos y que debe cumplir con los mínimos previstos en la Tabla 4.

9.2.1.5 Chocolate en polvo, al producto homogéneo elaborado de la mezcla de cocoa, azúcares y otros ingredientes opcionales, y que debe cumplir con los mínimos previstos en la Tabla 4.

9.2.1.6 Chocolate para mesa, al producto homogéneo elaborado a partir de la pasta de cacao, azúcar sin refinar con un tamaño de partícula mayor de 70 micras con la adición de ingredientes opcionales y que debe cumplir con los mínimos previstos en la Tabla 4.

9.2.1.7 Chocolate para mesa amargo o semiamargo, al producto homogéneo elaborado a partir de la pasta de cacao, azúcar sin refinar con un tamaño de partícula mayor de 70 micras con la adición de ingredientes opcionales y que debe cumplir con los mínimos previstos en la Tabla 4.

9.2.2 La etiqueta de los productos objeto de esta Norma, además de cumplir con lo establecido en los puntos anteriores, debe sujetarse a lo siguiente:

9.2.2.1 Deberá ostentar la denominación genérica y específica de conformidad con la Tabla 4.

Tabla 4. Composición % m/m en base seca

Producto	Manteca de cacao total	Cocoa desgrasada totalmente	Sólidos totales de cacao	Grasa butírica total	Sólidos totales de leche	Sólidos totales de cacao y leche	Grasa vegetal diferente a la manteca de cacao*
Chocolate	18.0	14.0	35.0				5.0

Chocolate amargo	22.0	18.0	40.0				5.0
Chocolate semiamargo	15.6	14.0	30.0				5.0
Chocolate con leche	20.0	2.5	25.0	2.5	14.0	40.0	5.0
Chocolate con alto contenido de leche	17.0	2.5	20.0	5.0	20.0	40.0	5.0
Chocolate con leche descremada	20.0	2.5	20.0	0.5	14.0	40.0	5.0
Chocolate blanco	20.0		20.0	3.5	14.0	34.0	5.0
Chocolate para mesa	11.0	9.0	20.0				5.0
Chocolate para mesa semiamargo	15.6	14.0	30.0				5.0
Chocolate para mesa amargo	22.0	18.0	40.0				5.0
Chocolate en polvo	1.8		18.0				5.0

*La adición de grasas vegetales distintas a la manteca de cacao, no debe exceder del 5% de la masa del producto terminado, después de deducir el peso total de cualquier otro producto alimenticio comestible añadido al chocolate y sin reducir el contenido mínimo de las materias de cacao.

9.2.2.2 Los productos similares podrán utilizar el término chocolate siempre y cuando se anteponga el texto: "Sabor a", usando la misma tipografía, tamaño y color que la de la denominación.

9.2.2.3 Cuando en la elaboración de los productos objeto de esta Norma, se utilice grasa diferente a la manteca de cacao se deberá declarar como grasa vegetal.

9.2.2.4 Los productos objeto de esta Norma, podrán ser adicionados con frutas en conserva, cereales, semillas oleaginosas, las cuales deberán estar limpias y sanas, en cantidad no menor de 8% para que dichas características puedan ostentarse en la etiqueta, sin embargo no podrán exceder el 60% del peso total del producto.

10. Envase y embalaje

10.1 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 las características físicas, químicas y sensoriales.

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

11. Concordancia con normas internacionales y mexicanas

Esta Norma es parcialmente equivalente a las siguientes normas:

11.1 Norma de Codex para el cacao en pasta (licor de cacao/chocolate) y torta de cacao. Codex Stan 141-1983 Rev. 1-2001.

11.2 Norma del Codex para el cacao en polvo (cacaos) y mezclas de cacao y azúcar. Codex Stan 105-1981 Rev. 1-2001, Enmienda 1, 2010.

11.3 Norma del Codex para el chocolate. Codex Stan 87-1981 Rev. 1-2003.

11.4 Norma del Codex para la manteca de cacao. Codex Stan 86-1981 Rev. 1-2001.

12. Bibliografía

12.1 Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

12.2 Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

12.3 Ley General de Salud.

12.4 Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.

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

12.6 AOAC International. Official Methods of Analysis. 2006. 18th Ed., 1st Rev. (Chapter 31: Cacao bean and its products).

12.7 Comisión del Codex Alimentarius. 2001. Informe de la 18a. reunión del Comité del Codex sobre productos del cacao y el chocolate.

12.8 Directiva 200/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 23 de junio de 2000.

12.9 Fernández, E.E. Microbiología sanitaria, agua y alimentos. Universidad de Guadalajara, México.

12.10 Frazier, W.C. y Westhoff, D.C. Microbiología de los alimentos. Zaragoza, España.

12.11 ICMSF. Ecología microbiana de los alimentos. Zaragoza, España.

12.12 Jay, M. J. Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza, España.

12.13 Food and Agriculture Organization of the United Nations. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization. Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).

12.14 Salvador Villalpando. Grasas, Dieta y Salud. Tablas de composición de Acidos Grasos de alimentos frecuentes en la dieta mexicana. Instituto Nacional de Salud Pública, México.

13. Observancia de la Norma

13.1 La vigilancia del cumplimiento de las especificaciones sanitarias 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.

13.2 La vigilancia en el cumplimiento de las especificaciones comerciales de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Economía, a la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) y a los organismos privados que para el efecto se establezcan.

14. Vigencia

La presente Norma entrará en vigor a los sesenta días naturales contados a partir del día siguiente de su publicación en el Diario Oficial de la Federación, a excepción del límite de 15 µg/kg de aflatoxinas establecido en el numeral 6.8.1, para el cual contarán con 365 días naturales para su cumplimiento a partir de la entrada en vigor de la misma.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 15 de febrero de 2013.- 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.- El Director General de Normas y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, **Christian Turégano Roldán**.- Rúbrica.

15. Apéndice Informativo A. Contaminantes

Tabla A.1 Límites máximos de contaminantes

Metales pesados y metaloides	Límite máximo mg/Kg					
	Cacao	Chocolate y Productos Similares	Cocoa	Pasta y/o Torta de cacao	Manteca de cacao	Mezclas de cocoa y azúcar, chocolate en polvo
Arsénico	1.0	0.5	1.0		0.5	
Plomo	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1	1.0

16. Apéndice Normativo A. Métodos de prueba

A.1. Símbolos y abreviaturas para los métodos de prueba

Los siguientes símbolos y abreviaturas se complementan con los enlistados en el cuerpo de la presente Norma:

»	aproximado
±	más, menos
1/d	inversa de la dilución
As	arsénico
Bi	bismuto

Cd	cadmio
cbp	cuanto basta para
Cu	cobre
etc.	etcétera
Fe	fierro
Ge	germanio
H	hora
Hg	mercurio
Lb	libras
LDI	límite de detección del instrumento
LDM	límite de detección del método
µm	micrómetro
µmho	micromho
N	normal
Ng	nanogramo
Nm	nanómetro
NMP.	número más probable
No.	número
M	molar
MCC	muestra de control de calidad
P	peso
Pb	plomo
p. ejem.	por ejemplo
Ph	potencial hidrógeno
RA	reactivo analítico
Rpm	revoluciones por minuto
RVBA	agar rojo-violeta-verde-brillante
Sb	antimonio
Se	selenio
Seg	segundo
Sn	estaño
Te	teluro
V	volumen
Zn	zinc

A.2. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

A.2.1 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.

A.2.2 Definiciones.

A.2.2.1 Dilución primaria, es la solución, suspensión o emulsión obtenida después de pesar o medir una cantidad del producto bajo examen y mezclarla con una cantidad de nueve veces en proporción de diluyente.

A.2.2.2 Diluciones decimales adicionales, las suspensiones o soluciones obtenidas al mezclar un determinado volumen de la dilución primaria con un volumen de nueve veces un diluyente y que por repetición de esta operación con cada dilución así preparada, se obtiene la serie de diluciones decimales adecuadas para la inoculación de medios de cultivo.

A.2.3 Reactivos y materiales**A.2.3.1 Reactivos**

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

A.2.3.1.1 Preparación de reactivos**A.2.3.1.1.1 Solución de hidróxido de sodio 1,0 N****Tabla A.2.1 Fórmula**

Ingredientes	Cantidades
Hidróxido de Sodio	4.0g
Agua	100.0ml

Preparación:

Disolver el hidróxido de sodio y llevar a 100 mL con agua.

A.2.3.1.1.2 Soluciones diluyentes.**A.2.3.1.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).****Tabla A.2.2 Fórmula**

Ingredientes	Cantidades
Fosfato de sodio monobásico	34.0g
Agua	1.0L

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N.

Llevar a un litro con agua.

Esterilizar durante 15 minutos a $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ} \text{C}$.

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 $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ} \text{C}$ durante 15 minutos.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

A.2.3.1.1.2.2 Agua peptonada**Tabla A.2.3 Fórmula**

Ingredientes	Cantidades
Peptona	1.0g
Cloruro de sodio	8.5g
Agua	1.0L

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a $7 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio 1,0 N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.

Esterilizar a $121 \pm 1,0$ °C durante 15 minutos.

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 oscuro 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.

A.2.3.2 Materiales.

A.2.3.2.1 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.

A.2.3.2.2 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

A.2.3.2.3 Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

A.2.3.2.4 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 para esterilizar o autoclave.

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.

A.2.4 Aparatos e instrumentos.

A.2.4.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170 °C. Durante 2 h a 170 a 175 °C o 1 h a 180 °C.

A.2.4.2 Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas. Durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0$ °C.

A.2.4.3 Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0,1 °C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 0,5$ °C.

A.2.4.4 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

A.2.4.5 Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

A.2.4.6 Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

A.2.5 Procedimiento

A.2.5.1 Preparación de la dilución primaria.

A.2.5.1.1 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 minutos 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).

A.2.5.1.1.1 Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos. 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.

A.2.5.1.1.2 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.

A.2.5.1.2 A partir de muestras sólidas o semisólidas.

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

A.2.5.1.2.1 Pesar una cantidad de 10 u 11 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado.

A.2.5.1.2.2 Adicionar un volumen de 90 a 99 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra.

A.2.5.1.2.3 Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 minutos 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 minutos.

A.2.5.1.2.4 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.

A.2.5.2 Preparación de las diluciones decimales adicionales.

A.2.5.2.1 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.

A.2.5.2.2 Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera que se describe en A.2.5.1.1.1

A.2.5.2.3 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.

A.2.5.2.4 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.

A.2.5.2.5 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.

A.2.5.2.6 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.

A.2.5.3 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 minutos posteriores a su preparación.

A.3. Determinación de materia extraña para chocolate, cocoas y pasta de cacao.

A.3.1 Fundamento.

Después de someter la muestra a un proceso de desengrasado, los fragmentos de insecto, pelos de roedor y otros residuos se extraen utilizando el matraz trampa de Wildman.

A.3.2 Equipo.

A.3.2.1 Balanza analítica con $\pm 0,1$ mg de sensibilidad.

A.3.2.2 Equipo de succión para filtración al vacío.

A.3.2.3 Placa de calentamiento con agitación magnética y barra magnética recubierta con teflón.

A.3.2.4 Microscopio binocular estereoscópico, con objetivos 1, 3 y 6 o 7X, respectivamente, y oculares apareados de amplio campo visual de 10, 15 y 30X, respectivamente.

A.3.2.5 Lámpara para el microscopio.

A.3.2.6 Batidora con agitador (opcional).

A.3.2.7 Rallador de cocina.

A.3.3 Materiales.

A.3.3.1 Tamiz de 0,063 mm de abertura de malla (NOM 0100M, 230 U.S.).

A.3.3.2 Regadera de hule, para llave de cocina.

A.3.3.3 Matraz trampa de Wildman: Matraz Erlenmeyer de 2 L provisto de un buzo formado por una varilla metálica con un tapón émbolo de hule en un extremo.

A.3.3.4 Embudo de Hirsch o Büchner para filtración al vacío. Colocar al final del tallo del embudo un tubo de hule de aproximadamente 10 cm de largo que pueda ser tapado con tapón de plástico o corcho.

A.3.3.5 Pinzas para ropa.

A.3.3.6 Matraz volumétrico de 100 mL.

A.3.3.7 Cajas de Petri o placas de vidrio grueso.

A.3.3.8 Papel de filtración rápida rayado para conteo o rayado a lápiz con líneas paralelas de aproximadamente 5 mm de separación.

A.3.3.9 Matraces volumétricos de diferentes capacidades.

A.3.3.10 Vasos de precipitados de 500 y de 1000 mL.

A.3.3.11 Aguja de disección.

A.3.3.12 Pinza.

A.3.3.13 Lápiz graso.

A.3.4 Reactivos

Los reactivos deben ser grado analítico, a menos que se indique otra especificación, cuando se mencione agua, debe entenderse agua destilada.

A.3.4.1 Lauril sulfato de sodio $C_{12}H_{25}O_4SNa$ al 2% (solución detergente).

En un matraz volumétrico de 100 mL disolver 2,0 g de lauril sulfato de sodio con agua y llevar al volumen.

A.3.4.2 Heptano C_7H_{16} , puede emplearse n-heptano comercial con un contenido máximo de 8% de tolueno.

A.3.4.3 Solución de hipoclorito de sodio $NaOCl$, aproximadamente 0,25%.

Diluir con agua 5 mL de solución comercial de hipoclorito de sodio al 5,25% en masa y llevar al volumen de 100 mL, debe prepararse fresca diariamente y guardarse en recipiente cerrado y protegido de la luz.

A.3.4.4 Mezcla glicerina $C_3H_8O_3$ - Etanol C_2H_6O (1:3) (v/v).

A.3.5 Procedimiento.

A.3.5.1 Preparación de la muestra.

A.3.5.1.1 Para cocoas y chocolates en polvo, mezclar bien y tomar 50 g de muestra.

A.3.5.1.2 Para chocolate, rallar finamente la muestra y tomar 100 g para el análisis.

A.3.5.1.3 En el caso de cocoas y otros productos prensados duramente, calentarlos en estufa durante 2 o 3 horas a una temperatura entre 60 y 70 °C. Desmoronar las pastillas prensadas en pedazos de aproximadamente 1 cm; tomar 50 g de muestra para el análisis.

A.3.5.2 Determinación.

A.3.5.2.1 Mezclar en el vaso de precipitados la muestra para analizar con 500 mL de la solución detergente al 2% a una temperatura entre 55 y 70 °C. En el caso de los productos duramente prensados; dejarlos en remojo durante toda la noche o bien agitarlos con la batidora a baja velocidad o agitación magnética durante 2 o 3 horas, hasta que se dispersen completamente.

A.3.5.2.2 Remover muy bien, verter en porciones en un tamiz con malla número 230 y lavar con fuerte chorro de agua caliente entre 55 y 70 °C. La llave debe estar provista de regadera de hule que proporcione el chorro en forma de lluvia.

A.3.5.2.3 Eliminar la grasa del producto inclinando el tamiz a 20° aproximadamente y dejar correr una suave corriente de agua a través del líquido que se junta a un lado del tamiz.

A.3.5.2.4 Cuando se ha eliminado la grasa y los materiales finos, y se ha desprendido la espuma que al principio se forma, transferir el residuo completamente a un matraz trampa de Wildman de 2 L usando agua.

A.3.5.2.5 Añadir aproximadamente 500 mL de agua y hervir por unos 10 min.

A.3.5.2.6 Enfriar hasta la temperatura ambiente y añadir agua para completar 1 L de líquido en el matraz.

A.3.5.2.7 Añadir 50 mL de heptano utilizando la varilla de metal del matraz.

A.3.5.2.8 Introducir la barra magnética en el matraz colocándola sobre el tapón émbolo de hule. Levantar la varilla hasta que el tapón de hule quede por encima del nivel del líquido y fijarla con unas pinzas.

A.3.5.2.9 Agitar la mezcla utilizando el agitador magnético. Aumentar la agitación y evitando incorporarle aire, mantenerla durante 5 min.

A.3.5.2.10 Después de agitar, bajar la varilla de metal y el tapón émbolo de hule y añadir el agua necesaria, para que la capa de heptano suba al cuello del matraz.

A.3.5.2.11 Dejar reposar durante 30 min, agitando suavemente la capa del fondo cada 4-5 min con la barra magnética, durante los primeros 20 min de reposo.

A.3.5.2.12 Girando la varilla de metal, para remover el sedimento fino que se acumuló en la superficie del tapón émbolo, atrapar la capa de heptano levantándolo e introduciéndolo lo más que se pueda en el cuello del matraz.

A.3.5.2.13 Asegurar que la capa de heptano y por lo menos 1 cm de agua que está abajo de la interfase queden sobre el émbolo.

A.3.5.2.14 Mantener el émbolo en su lugar y decantar los líquidos que estén sobre él en un vaso de precipitados. Enjuagar el material que quede en la varilla y en el cuello del matraz con heptano y reincorporarlo al vaso de precipitados.

A.3.5.2.15 Introducir el émbolo al cuerpo del matraz aproximadamente a la mitad de éste y fijar nuevamente la varilla con las pinzas.

A.3.5.2.16 Añadir 35 mL de heptano al matraz trampa, para hacer una segunda extracción, agitar suavemente a mano durante 1 min, dejar reposar durante 15 min y se lava con heptano. Los líquidos de la segunda extracción y el heptano de lavado se juntan con los de la primera extracción, recibiendo los en el mismo vaso de precipitados.

A.3.5.2.17 Colocar el papel filtro rayado para conteo dentro del embudo de succión y verter uniformemente en él, el contenido del vaso de precipitados utilizando un agitador. Enjuagar abundantemente el vaso con heptano y verterlo en el embudo.

A.3.5.2.18 Pasar el filtro con el residuo a una caja de Petri, es opcional humedecerla con la mezcla glicerina: etanol. Contar al microscopio los pelos utilizando una luz suficientemente fuerte para que muestre los detalles en el papel filtro a través del microscopio. Cuente explorando con una aguja de disección sobre toda la superficie del papel, línea por línea. Voltar y explorar cada pieza del material, pues algunos fragmentos son irreconocibles a menos que se muevan. No contar el material dudoso.

A.3.5.2.19 En caso de que existan en el papel demasiados residuos, proceder con la técnica de blanqueo después de haber examinado el papel para conteo de pelos.

A.3.6 Técnica de blanqueo.

A.3.6.1 Regresar el papel filtro al embudo de filtración, en caso de haber adicionado la mezcla de glicerol-etanol, lavarlo con etanol al 95%, seguido de agua. Aplicar vacío hasta que el papel parezca seco y suspender el vacío.

A.3.6.2 Poner un tapón de plástico o corcho en el extremo del tubo de hule colocado en el embudo.

A.3.6.3 Cubrir el papel filtro con 5-7 mL (alcance un nivel de 3 a 4 mm) de solución de hipoclorito sin permitir que fluya para la orilla del papel. Mantener en reposo el nivel de la solución hasta que esté completo el blanqueo de la muestra (30 min máximo).

A.3.6.4 Quitar del tubo de hule el tapón de plástico o corcho, aplicar vacío y lavar con agua.

A.3.6.5 Pasar el papel filtro a una caja Petri y contar al microscopio los fragmentos de insectos.

A.3.7 Expresión de resultados.

Número promedio de insectos enteros o sus fragmentos, así como pelos de roedor contenidos en la cantidad de muestra tomada
--

A.4. Determinación de aflatoxinas totales por método de columna de inmunoafinidad.**A.4.1 Fundamento.**

La porción de prueba es extraída con metanol. La muestra extraída es filtrada, diluida con agua, y aplicada a la columna de afinidad la cual contiene un anticuerpo monoclonal específico para aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. Las aflatoxinas son aisladas, purificadas y concentradas en la columna y removidas de los anticuerpos con metanol. Las aflatoxinas totales son cuantificadas por medición fluorométrica después de reaccionar con solución de bromo (método SFB). Las aflatoxinas individuales son cuantificadas por cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia y derivatización con yodo postcolumna (método PCD).

A.4.2 Equipo.

A.4.2.1 Licuadora a alta velocidad, con vaso de 500 mL y tapa.

A.4.2.2 Balanza granataria con una sensibilidad de 0,1 g.

A.4.2.3 Fluorómetro con lámpara pulsada de xenón o cuarzo-halógeno y con filtros de excitación a 360 nm y emisión a 450 nm.

A.4.2.4 Agitador tipo vortex.

A.4.2.5 Bomba manual. Jeringa de 20 mL y émbolo con tubo de polietileno unida a un tapón a la salida.

A.4.2.6 Bomba para cromatógrafo de líquidos. Adecuada para una tasa de flujo de 1 mL/min.

A.4.2.7 Sistema de inyección. Jeringa con válvula de inyección de cargado con loop de 50 µL o equivalente.

A.4.2.8 Sistema de derivatización postcolumna. Una segunda bomba sin pulso, pieza tipo T con cero volumen muerto, tubería de teflón de 610 cm x 0,5 mm de diámetro interno, y baño de calentamiento o reactor postcolumna.

A.4.2.9 Detector de fluorescencia con filtros de excitación a 360 nm y emisión > 420 nm.

A.4.3 Materiales

A.4.3.1 Papel filtro aflautado de 24 cm (Whatman 2V o equivalente).

A.4.3.2 Papel filtro de fibra de vidrio (Whatman 934AH o equivalente).

A.4.3.3 Jeringa de 20 mL, tipo Luer para depósito de la muestra.

A.4.3.4 Celda de borosilicato de 12 x 75 mm.

A.4.3.5 Dispensador automático. Botella de 2 onzas de color ámbar con dispensador automático de 1,0 mL

A.4.3.6 Matraz volumétrico de 2 mL.

A.4.3.7 Columna de afinidad Aflatest-P. La columna puede ser almacenada durante 1 año a temperatura ambiente sin pérdida de su eficiencia. Recuperaciones para una solución patrón de aflatoxinas de 15 mL de metanol-agua (3+1) que contiene 25 ng B1, 5 ng de B2, 15 ng de G1 y 5 ng de G2 deben ser al menos de 90, 80, 90 y 60%, respectivamente.

A.4.4 Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

A.4.4.1 Metanol (CH₄O).

A.4.4.2 Metanol grado HPLC.

A.4.4.3 Acetonitrilo (C₂H₃N) grado HPLC.

A.4.4.4 Agua (H₂O) grado HPLC.

A.4.4.5 Cloruro de sodio (NaCl).

A.4.4.6 Yodo (I₂).

A.4.4.7 Benceno grado espectroscópico (C₆H₆).

A.4.4.8 Sulfato de quinina dihidratada.

A.4.4.9 Acetato de zinc (C₄H₆O₄Zn. 2H₂O).

A.4.4.10 Cloruro de aluminio (AlCl₃).

A.4.4.11 Soluciones acuosas de metanol.**Tabla A.4.1 Fórmulas**

Solución de metanol	mL de metanol	mL de agua destilada	Vol. total de solución (mL)
20%	200	800	1000
60%	600	400	1000
70%	700	300	1000

A.4.4.12 Solución de acetato de zinc/cloruro de aluminio. Pesar 200 g de acetato de zinc y 5 g de cloruro de aluminio. Llevar a un volumen de 1 L con agua.

A.4.4.13 Solución reveladora de bromo al 0,01%.

A.4.4.14 Solución reveladora de bromo al 0,002%. Mezclar 10 mL de solución al 0.01% con 40 mL de agua. Preparar diariamente y almacenar en frasco ámbar.

A.4.4.15 Estándares de calibración para el fluorómetro. Utilizar una solución de 34 mg de sulfato de quinina en 1 mL de ácido sulfúrico 0,1N como solución patrón de 20 ng aflatoxina/g. Emplear ácido sulfúrico 0,1N como blanco. Alternativamente se dispone de estándares comerciales en ampollitas selladas (ampolleta verde = 0 ng/g, ampolleta roja = 20 ng/g y ampolleta amarilla = 10 ± 2 ng/g).

A.4.4.16 Fase móvil para cromatografía de líquidos. Agua-acetonitrilo-metanol (3+1+1), degasificada.

A.4.4.17 Reactivo postcolumna. Disolver 100 mg de yodo en 2 mL de metanol. Adicionar 200 mL de agua, agitar 1 hora, y filtrar a través de poro de 0,45 mm. Preparar diariamente.

A.4.4.18 Soluciones patrón de aflatoxinas para cromatografía de líquidos.

A.4.4.18.1 Solución madre de mezcla de aflatoxinas. Preparar una solución que contenga 500 ng B1, 125 ng de B2, 250 ng G1 y 125 ng G2/mL en benceno:acetonitrilo (98+2).

A.4.4.18.2 Soluciones patrón de trabajo.

Transferir cada cantidad indicada en la Tabla A.4.2, de solución madre en series de tres matraces volumétricos de 2 mL. Evaporar las soluciones casi a sequedad bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. Adicionar a cada matraz, 1 mL de metanol, mezclar, diluir con agua y mezclar. Preparar diariamente.

Tabla A.4.2 Fórmulas de soluciones estándar de trabajo

Solución patrón de trabajo	μ L tomados de solución madre	ng aflatoxina/50 m L			
		B1	B2	G1	G2
1	60	0.750	0.188	0.375	0.188
2	40	0.500	0.125	0.250	0.125
3	20	0.250	0.063	0.125	0.063

A.4.5 Procedimiento.

A.4.5.1 Preparación de la muestra.

A.4.5.1.1 Grano entero de cacao.

Eliminar la cáscara del grano y moler la muestra completa hasta pasar por un tamiz de malla número 20. Para el caso de muestras con alto contenido de grasa, moler con un cortador de carne hasta la obtención de una pasta. Homogeneizar la muestra, de preferencia con la ayuda de una mezcladora.

A.4.5.1.2 Productos de chocolate.

Enfriar aproximadamente 200 g de la muestra hasta que se endurezca, y rallar o raspar hasta la obtención de un producto granular fino. Mezclar completamente y guardar en recipiente con cierre hermético. Colocar en un lugar frío.

A.4.5.1.3 Chocolate en polvo.

Mezclar completamente y guardar en recipientes con cierre hermético.

A.4.5.2 Extracción de las muestras.

A.4.5.2.1 Muestras de grano de cacao.

Pesar 25 g de muestra en un vaso de licuadora. Adicionar 5 g de cloruro de sodio y 125 mL de metanol al 70%. Licuar durante 2 minutos a alta velocidad.

Filtrar a través de papel aflautado. Medir 15 mL de este filtrado y colocar en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Añadir 30 mL de agua y mezclar. Filtrar a través de filtro de fibra de vidrio \leq 30 minutos antes de pasar a la columna de afinidad. El filtrado debe ser claro, de no ser así, refiltrar.

A.4.5.2.2 Muestras a base de chocolate.

Pesar 25 g de muestra en un vaso de licuadora. Adicionar 5 g de cloruro de sodio y 100 mL de metanol al 100%. Licuar durante 2 minutos a alta velocidad.

Filtrar a través de papel aflautado. Medir 10 mL de este filtrado y diluir con 40 mL de solución de acetato de zinc/cloruro de aluminio. Mezclar. Filtrar a través de filtro de fibra de vidrio \leq 30 minutos antes de pasar a la columna de afinidad. El filtrado debe ser claro. De no ser así, refiltrar.

A.4.5.3 Cromatografía en columna de afinidad.

A.4.5.3.1 Asegurar el depósito de la jeringa a un soporte. Quitar la tapa superior de la columna. Cortar la tapa y usarla como un conector entre la columna y la jeringa.

A.4.5.3.2 Adicionar 15 mL del filtrado obtenido en la extracción del grano de cacao (equivalente a 1 g de porción de prueba) o 10 mL del filtrado obtenido de la extracción de productos a base de chocolate (equivalente a 0,5 g de porción de prueba) dentro del depósito de la jeringa. Conectar a la bomba manual previamente llenada de aire. Quitar la tapa inferior de la columna.

A.4.5.3.3 Pasar el extracto a través de la columna a un flujo de 2 gotas/seg (6mL/min). Desconectar la bomba manual del depósito de la jeringa y llenar la bomba con aire.

A.4.5.3.4 Conectar nuevamente la bomba a la jeringa, y pasar de 2-3 mL de aire a través de la columna. Desconectar la bomba y adicionar 10 mL de agua al depósito. Para el caso de productos a base de chocolate sustituir por 10 mL de metanol al 20%. Llenar la bomba con aire y conectar a la jeringa.

A.4.5.3.5 Empujar el líquido a través de la columna a un flujo de 6 mL/min. Repetir con otros 10 mL de agua o 10 mL de metanol al 20% según sea el caso. Descartar estos lavados.

A.4.5.3.6 Desconectar la bomba, llenarla con aire, conectarla nuevamente a la jeringa y pasar de 2-3 mL de aire a través de la columna.

A.4.5.3.7 Desconectar la bomba y adicionar 1 mL de metanol grado HPLC al depósito de la jeringa.

A.4.5.3.8 Llenar la bomba con aire, conectar la jeringa y pasar el metanol a través de la columna.

A.4.5.3.9 Para cuantificación por método SFB, coleccionar el eluido en una celda para fluorómetro. Inmediatamente proceder con la determinación fluorométrica.

A.4.5.3.10 Para cuantificación por método PCD, coleccionar el eluido en un matraz volumétrico de 2 mL. Diluir al volumen con agua grado HPLC, mezclar y proceder con la cuantificación por cromatografía de líquidos.

A.4.5.4 Determinación fluorométrica (SFB).

A.4.5.4.1 Calibración del fluorómetro.

Calentar el fluorómetro por espacio de 20 minutos. Insertar la celda o ampolla que contiene el blanco y, usar la perilla ZERO, para ajustar el instrumento a una lectura de 0. Insertar la celda o ampolla que contiene el estándar de 20 ng de aflatoxina/g, y con la perilla SPAN, ajustar a una lectura de 20. Para los productos a base de chocolate ajustar a una lectura de 40. Utilizar una ganancia fija (empezar en 50) para asegurar que el blanco dé una lectura de 0 y el estándar una de 20 o 40. Calibrar el fluorómetro justo antes de la lectura del eluido de la columna, para evitar cualquier posible desviación del instrumento.

A.4.5.4.2 Cuantificación.

Adicionar 1 mL de solución reveladora de bromo al 0,002% al eluido obtenido en 3.5.3.9. Mezclar en vortex durante 5 segundos. Si existe adherencia de burbujas en las paredes de la celda, golpearla ligeramente para dispersarlas. Insertar la celda en el fluorómetro y esperar 60 segundos. Al cabo de este tiempo, registrar la lectura obtenida, la cual es equivalente a μg de aflatoxinas totales/kg porción de prueba.

A.4.5.5 Determinación por cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia y derivatización postcolumna.

A.4.5.5.1 Conectar la salida de una columna HPLC a un brazo de una pieza T de acero inoxidable, de bajo volumen muerto, usando una pieza de tubería corta de 0,01 pulgadas (0,25 mm) de diámetro interno.

A.4.5.5.2 Conectar la salida de una segunda bomba, la cual distribuye los reactivos postcolumna, al segundo brazo de la pieza T. Conectar una terminal de tubería de teflón en espiral (tubo de reacción) de 610 x 0,5 mm de diámetro interno a un tercer brazo de la pieza T. La otra terminal del espiral, conectarla a la entrada del detector de fluorescencia.

A.4.5.5.3 Mantener el tubo de reacción a una temperatura de 70 °C, utilizando un horno o un baño a temperatura constante.

A.4.5.5.4 Fijar las siguientes tasas de flujo:

Fase móvil (columna): 1,0 mL/min.

Reactivo postcolumna: 0,3 mL/min.

Tasa total a través del tubo de reacción: 1,3 mL/min.

A.4.5.5.5 El volumen del tubo de reacción es de aproximadamente 1,2 cm³ y dado que la tasa de flujo total es de 1,3 mL/min, el tiempo de reacción postcolumna es de aproximadamente 55 segundos. Dejar estabilizar el sistema durante 10-20 min.

A.4.5.5.6 Si se utiliza un integrador de datos, ajustar los controles de sensibilidad del detector de fluorescencia o del integrador, para dar una respuesta razonable (señal: ruido = 5:1) para 0,125 ng de aflatoxina G2/50 µL.

A.4.5.5.7 Si se emplea un graficador, ajustar el control del detector de fluorescencia para dar una deflexión de 30-40% de la escala con 0,125 ng de aflatoxina G2/50 µL.

A.4.5.5.8 Inyectar 50 µL de la mezcla patrón de trabajo dentro del inyector, usando un exceso de 20-30 µL, para garantizar que el loop esté completamente lleno. Las aflatoxinas eluyen en el siguiente orden: G2, G1, B2 y B1, con tiempos de retención aproximados de 6, 8, 9 y 11 minutos, respectivamente. Además los picos en el cromatograma deben estar bien resueltos.

A.4.5.5.9 Si es necesario ajustar los tiempos de retención, cambiar la concentración del metanol de la fase móvil. Inyectar 50 µL de cada una de las soluciones de trabajo y preparar curvas de calibración para cada una de las aflatoxinas.

A.4.5.5.10 Inyectar 50 µL del extracto de la muestra dentro del inyector. Identificar cada pico de las aflatoxinas, en el cromatograma de análisis de la porción de prueba, comparando los tiempos de retención con los correspondientes a los patrones de referencia.

A.4.5.5.11 Determinar la cantidad de cada aflatoxina en el eluido inyectado, comparando con la curva de calibración correspondiente.

A.4.5.5.12 Calcular la concentración de cada aflatoxina en la muestra de prueba, usando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/kg aflatoxina} = A \times \frac{(T_v)}{I_v} \times (1) = A \times 40$$

donde:

W = peso representado por el eluido (1 g)

A = ng aflatoxina en el eluido, obtenido de la curva de calibración

Tv = Volumen final del eluido (2000 mL)

Iv = Volumen inyectado del eluido (50 mL)

Sumar las concentraciones de las cuatro aflatoxinas para obtener la concentración total de las mismas.

A.4.6 Informe de la prueba.

mg aflatoxinas totales/kg

A.5. Determinación de mohos y levaduras en alimentos.

A.5.1 Fundamento.

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3,5 e incubado a una temperatura de 25 ± 1 °C, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

A.5.2 Definiciones.

A.5.2.1 Colonias, agrupamiento de células en forma de masas visibles, sobre el agar de cultivo.

A.5.2.2 Levaduras, son microorganismos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular. Poseen un núcleo y se multiplican por reproducción sexual o asexual, por gemación o por fisión transversal. La reproducción sexual cuando ocurre, es por medio de ascosporas contenidas en un saco o asca.

A.5.2.3 Mohos, grupo de hongos microscópicos; organismos pertenecientes al reino Fungi, que se caracterizan por tener un cuerpo formado por estructura filamentosa con ramificaciones, que se conocen con el nombre de hifas, el conjunto de hifas constituye el micelio, carecen de clorofila, se alimentan por absorción pudiendo propagarse por esporas flageladas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa o manana. Crecen formando colonias en un medio selectivo a 25 °C.

A.5.3 Reactivos y materiales.

A.5.3.1 Reactivos.

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

A.5.3.1.1 Medios de cultivo.

Agar papa - dextrosa, comercialmente disponible en forma deshidratada.

Preparación del medio de cultivo.

Seguir instrucciones del fabricante y después de esterilizar, enfriar en baño de agua a 45 ± 1 °C, acidificar a un pH de $3,5 \pm 0,1$ con ácido tartárico estéril al 10% (aproximadamente 1,4 mL de ácido tartárico por 100 mL de medio). Después de adicionar la solución, mezclar y medir el pH con potenciómetro. Dejar solidificar una porción del medio. Hacer esto en cada lote de medio preparado.

A fin de preservar las propiedades gelificantes del medio, no calentar después de agregar el ácido tartárico.

A.5.3.1.2 Soluciones.

A.5.3.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).

Tabla A.5.1 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Fosfato de potasio monobásico	34.0g
Agua	1.0L

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con hidróxido de sodio 1 N.

Llevar a 1,0 L de agua.

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 mL de la solución concentrada y llevar a 1,0 L con agua (solución de trabajo).

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL según se requiera.

Esterilizar a 121 ± 1 °C durante 15 minutos.

A.5.3.1.2.2 Solución estéril de ácido tartárico al 10%.

Tabla A.5.2 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Acido tartárico	10.0g
Agua destilada	100.0mL

Preparación:

Disolver el ácido en el agua y esterilizar a $121 \pm 1,0$ °C por 15 minutos o por filtración a través de membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

A.5.3.2 Materiales.

A.5.3.2.1 Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 mL (o si es necesario de 1 mL y 2 mL), con tapón de algodón. Pueden utilizarse pipetas graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

A.5.3.2.2 Cajas Petri.

A.5.3.2.3 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

A.5.3.2.4 Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

A.5.3.2.5 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, deben esterilizarse mediante: horno o autoclave.

A.5.4 Aparatos e instrumentos.

A.5.4.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170 °C. Durante 2 h de 170 a 175 °C o por 1h a 180 °C.

A.5.4.2 Incubadora con termostato que pueda ser mantenido a $25 \pm 1,0$ °C provista con termómetro calibrado.

A.5.4.3 Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1,0$ °C. Durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0$ °C.

A.5.4.4 Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de $0,1$ °C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0$ °C.

A.5.4.5 Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

A.5.4.6 Registrador mecánico o electrónico.

A.5.4.7 Microscopio óptico.

A.5.4.8 Potenciómetro con una escala mínima de $0,1$ unidades de pH a 25 °C.

A.5.5 Preparación de la muestra.

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en el método A.2 del presente documento "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

A.5.6 Procedimiento.

A.5.6.1 Colocar por duplicado en cajas Petri 1 mL de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

A.5.6.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

A.5.6.3 Verter de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado, fundido y mantenido a 45 ± 1 °C en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que es vertido el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.

A.5.6.4 Mezclar cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido contrario y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa. Permitir que la mezcla se solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

A.5.6.5 Preparar una caja control con 15 mL de medio, para verificar la esterilidad.

A.5.6.6 Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a 25 ± 1 °C.

A.5.6.7 Contar las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación y aun de 3 días. En este caso, informar el periodo de incubación de 3 o 4 días en los resultados del análisis.

A.5.6.8 Si es necesario, cuando la morfología colonial no sea suficiente, examinar microscópicamente para distinguir las colonias de levaduras y mohos de las bacterias.

A.5.7 Expresión de resultados.

Cálculo del Método

Considerar las cuentas de placas con 10 a 150 colonias como las adecuadas para el informe. Multiplicar por el inverso de la dilución, tomando en consideración los siguientes criterios, para la expresión de resultados:

A.5.7.1 Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 10 a 150 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Las placas de al menos una de las diluciones deben estar en el intervalo de 10 a 150. Cuando sólo una dilución está en el intervalo apropiado, calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.

A.5.7.2 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.

A.5.7.3 Placas con menos de 10 colonias: cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 10 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".

A.5.7.4 Placas con más de 150 colonias: cuando el número de colonias por placa exceda de 150, 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 o 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 su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado".

A.5.7.5 Calcular las UFC/g o mL de producto utilizando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{c}{[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2) \times (d)]}$$

donde:

N: número de UFC por mL o g de producto.

c: Suma de todas las colonias en todas las placas.

n_1 : número de placas contadas de la primera dilución.

n_2 : número de placas contadas en la segunda dilución.

d: dilución de la que se obtuvieron las primeras cuentas.

Ejemplo:

Dilución	1:100	1:1000
# colonias	132, 144	33, 28

$$N = \frac{(132 + 144 + 33 + 28)}{[(1 \times 2) + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}}$$

$$N = 337 / 0.022$$

$$N = 15,318.18$$

$$N \quad 15,300 \text{ UFC/g o mL}$$

A.5.8 Informe de la prueba.

Informar:

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL) de mohos en agar papa - dextrosa acidificado, incubadas a 25 ± 1 °C durante 5 días.

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL) de levaduras en agar papa-dextrosa acidificado, incubadas a 25 ± 1 °C durante 5 días.

A.6. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.**A.6.1 Fundamento.**

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a 35 ± 1 °C durante 24 a 48 horas, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

A.6.2 Definiciones.

A.6.2.1 Coliformes, bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos, que a 35 °C fermentan la lactosa con la producción de gas bajo las condiciones especificadas en esta norma.

A.6.3 Reactivos y materiales.**A.6.3.1 Reactivos.**

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.

A.6.3.1.1 Soluciones diluyentes.**A.6.3.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).****Tabla A.6.1 Fórmula**

Ingredientes	Cantidades
Fosfato monopotásico	34.0g
Agua	1.0L

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 minutos a $121 \pm 1,0$ °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 minutos a 121 ± 1 °C.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

A.6.3.1.1.2 Agua peptonada.**Tabla A.6.2 Fórmula**

Ingredientes	Cantidades
Peptona	1.0g
Cloruro de Sodio	8.5g
Agua	1.0L

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 minutos a $121 \pm 1,0$ °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 oscuro 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.

A.6.3.1.2 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.

A.6.3.1.2.1 Caldo lactosado.

Tabla A.6.3 Fórmula

Ingrediente	Medio de Concentración 1.5	Medio de Concentración sencilla
Extracto de carne	4.5g	3.0g
Peptona de gelatina	7.5g	5.0g
Lactosa	7.5g	5.0g
Agua destilada	1000.0mL	1000.0mL

Preparación:

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 minutos a $121 \pm 1,0$ °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.

A.6.3.1.2.2 Caldo lauril sulfato triptosa

Tabla A.6.4 Fórmula

Ingrediente	Medio de Concentración 1.5	Medio de Concentración sencilla
Triptosa	30.0g	20.0g
Lactosa	7.5g	5.0g
Fosfato dipotásico	4.125g	2.75g
Fosfato monopotásico	4.125g	2.75g
Cloruro de sodio	7.5g	5.0g
Lauril sulfato de sodio	0.15g	0.1g
Agua destilada	1000.0mL	1000.0mL

Preparación:

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 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 minutos a $121 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se recomienda almacenar el medio una vez preparado.

Las campanas de fermentación no deben de 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.

A.6.3.1.2.3 Caldo lactosa bilis verde brillante.**Tabla A.6.5 Fórmula**

Ingrediente	Cantidades
Peptona	10.0g
Lactosa	10.0g
Sales biliares	20.0g
Verde brillante	0.0133g
Agua	1.0L

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 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Distribuir el medio en cantidades de 10 mL en tubos de 16 X 160 mm conteniendo campana de fermentación.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

A.6.3.2 Materiales.

A.6.3.2.1 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.

A.6.3.2.2 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

A.6.3.2.3 Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

A.6.3.2.4 Tubos de cultivo 20 x 200 mm y de 16 x 160 mm con tapones metálicos o de rosca.

A.6.3.2.5 Campanas de fermentación (tubos de Durham).

A.6.3.2.6 Pipetas bacteriológicas graduadas de 10 y 1 mL.

A.6.3.2.7 Gradillas.

A.6.3.2.8 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 o autoclave.

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.

A.6.4 Aparatos e instrumentos.

A.6.4.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170 °C. Durante 2 horas a 170 a 175 °C o 1 h a 180 °C.

A.6.4.2 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0$ °C, provista con termómetro calibrado.

A.6.4.3 Termómetro de máximas y mínimas.

A.6.4.4 Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1,0$ °C. Durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0$ °C.

A.6.4.5 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25 °C.

A.6.5 Preparación de la muestra.

Las muestras deben prepararse y diluirse, siempre que sea posible, de acuerdo al método A.2 del presente documento "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

A.6.6 Procedimiento.

A.6.6.1 Para alimentos.

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

A.6.6.1.1 Prueba presuntiva.

A.6.6.1.1.1 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.

A.6.6.1.1.1.1 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.

A.6.6.1.1.1.2 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.

A.6.6.1.1.2 Incubación. Incubar los tubos a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 2 horas.

A.6.6.1.2 Prueba confirmativa.

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

En esta Norma 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.

A.6.7 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 las tablas correspondientes.

La Tabla A.6.5 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 g), 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 las Tablas A.6.7 a la A.6.10, 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 las Tablas A.6.7 a la A.6.10. 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 de la Tabla A.6.6) 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 de la Tabla A.6.6).

Tabla A.6.6 Ejemplos de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP

Número de tubos positivos obtenidos de tres tubos incubados, para las siguientes cantidades de muestra inoculada por tubo						NMP			
Productos líquidos (mL)	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	Producto líquido	Otros productos		
	Otros productos (g)	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³				
	mayor dilución = menor concentración					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>	<u>0</u>	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]

Tabla A.6.7 Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 10, 1,0 y 0,1g)

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	2,10	0,11	0,02	0,25
3-1-1	0,75	0,14	2,30	0,14	0,04	0,34
3-1-2	1,20	0,30	3,80	---	---	---
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	24,0	---	---	---
3-3-2	11,0	1,50	48,0	---	---	---
3-3-3	>11,0	>1,50	>48,0	---	---	---
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	1,20
5-1-2	---			0,63	0,21	1,15
5-2-0	---			0,49	0,17	1,30
5-2-1	---			0,70	0,23	1,70
5-2-2	---			0,94	0,28	2,20
5-3-0	---			0,79	0,25	1,90
5-3-1	---			1,10	0,31	2,50
5-3-2	---			1,40	0,37	3,40

5-3-3	---			1,80	0,44	5,00
5-4-0	---			1,30	0,35	3,00
5-4-1	---			1,70	0,43	4,90
5-4-2	---			2,20	0,57	7,00
5-4-3	---			2,80	0,90	8,50
5-4-4	---			3,50	1,20	10,0
5-5-0	---			2,40	0,68	7,50
5-5-1	---			3,50	1,60	10,0
5-5-2	---			5,40	1,80	14,0
5-5-3	---			8,20	3,00	32,0
5-5-4	---			16,09	6,40	58,0
5-5-5	---			---	---	---

Tabla A.6.8 Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 1,0, 0,1 y 0,01 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	<0,30	<0,05	<0,90	<0,20	<0,05	<0,70
0-0-1	0,30	<0,05	<0,90	0,20	<0,05	0,70
0-1-0	0,30	<0,05	1,30	0,20	<0,05	0,70
0-2-0	---	---	---	0,40	<0,05	0,11
1-0-0	0,40	<0,05	2,0	0,20	<0,05	0,70
1-0-1	0,70	0,10	2,0	0,40	<0,05	1,10
1-1-0	0,70	0,10	2,30	0,40	<0,05	1,10
1-1-1	1,10	0,30	3,60	0,60	<0,05	1,50
1-2-0	1,10	0,30	3,60	0,60	<0,05	1,50
2-0-0	0,90	0,10	3,60	0,50	<0,05	1,30
2-0-1	1,40	0,30	3,70	0,70	0,10	1,70
2-1-0	1,50	0,30	4,40	0,70	0,10	1,70
2-1-1	2,00	0,70	8,90	0,90	0,20	2,10
2-2-0	2,10	0,40	4,70	0,90	0,20	2,10
2-2-1	2,80	1,00	15,0	---	---	---
2-3-0	---	---	---	1,20	0,30	2,80
3-0-0	2,30	0,40	12,0	0,80	0,10	1,90
3-0-1	3,90	0,70	13,0	1,10	0,20	2,50
3-0-2	6,40	1,50	38,0	---	---	---
3-1-0	4,30	0,70	21,0	1,10	0,20	2,50
3-1-1	7,50	1,40	23,0	1,40	0,40	3,40
3-1-2	12,0	3,00	38,0	---	---	---
3-2-0	9,30	1,50	38,0	1,40	0,40	3,40
3-2-1	15,0	3,00	44,0	1,70	0,50	4,60
3-2-2	21,0	3,50	47,0	---	---	---

3-3-0	24,0	3,60	130,0	---	---	---
3-3-1	46,0	7,10	240,0	---	---	---
3-3-2	110,0	15,0	480,0	---	---	---
3-3-3	>110,0	>15,0	>480,0	---	---	---
4-0-0	---			1,30	0,30	3,10
4-0-1	---			1,70	0,50	4,60
4-1-0	---			1,70	0,50	4,60
4-1-1	---			2,10	0,70	6,30
4-1-2	---			2,60	0,90	7,80
4-2-0	---			2,20	0,70	6,70
4-2-1	---			2,60	0,90	7,80
4-3-0	---			2,70	0,90	8,00
4-3-1	---			3,30	1,10	9,30
4-4-0	---			3,40	1,20	9,30
5-0-0	---			2,30	0,70	7,00
5-0-1	---			3,10	1,10	8,90
5-0-2	---			4,30	1,50	11,4
5-1-0	---			3,30	1,10	9,30
5-1-1	---			4,60	1,60	12,0
5-1-2	---			6,30	2,10	15,0
5-2-0	---			4,90	1,70	13,0
5-2-1	---			7,00	2,30	17,0
5-2-2	---			9,40	2,80	22,0
5-3-0	---			7,90	2,50	19,0
5-3-1	---			11,0	3,10	25,0
5-3-2	---			14,0	3,70	34,0
5-3-3	---			18,0	4,40	50,0
5-4-0	---			13,0	3,50	30,0
5-4-1	---			17,0	4,30	49,0
5-4-2	---			22,0	5,70	70,0
5-4-3	---			28,0	9,00	85,0
5-4-4	---			35,0	12,0	100,0
5-5-0	---			24,0	6,80	75,0
5-5-1	---			35,0	12,0	100,0
5-5-2	---			54,0	18,0	140,0
5-5-3	---			92,0	30,0	320,0
5-5-4	---			161,0	64,0	580,0
5-5-5	---			>161,0	>64,0	>580,0

Tabla A.6.9 Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,1, 0,01 y 0,001 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	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto

				g		
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	2,0	21
2-2-0	21	4	47	9	2,0	21
2-2-1	28	10	150	---	---	---
2-3-0	---	---	---	12	3,0	28
3-0-0	23	4	120	8	1,0	19
3-0-1	39	7	13	11	2,0	25
3-0-2	64	15	380	---	---	---
3-1-0	43	7	210	11	2,0	25
3-1-1	75	14	230	14	4,0	34
3-1-2	120	30	380	---	---	---
3-2-0	93	15	380	14	4,0	34
3-2-1	150	30	440	17	5,0	46
3-2-2	210	35	470	---	---	---
3-3-0	240	36	130	---	---	---
3-3-1	460	71	240	---	---	---
3-3-2	1100	150	480	---	---	---
3-3-3	>1100	>150	>480	---	---	---
4-0-0	---			13	3,0	31
4-0-1	---			17	5,0	46
4-1-0	---			17	5,0	46
4-1-1	---			21	7,0	63
4-1-2	---			26	9,0	78
4-2-0	---			22	7,0	67
4-2-1	---			26	9,0	78
4-3-0	---			27	9,0	80
4-3-1	---			33	11,0	93
4-4-0	---			34	12,0	93
5-0-0	---			23	7,0	70
5-0-1	---			31	11,0	89
5-0-2	---			43	15,0	114
5-1-0	---			33	11,0	93
5-1-1	---			46	16,0	120
5-1-2	---			63	21,0	150
5-2-0	---			49	17,0	130
5-2-1	---			70	23,0	170
5-2-2	---			94	28,0	220

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

Tabla A.6.10 Índice 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)

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	<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

A.6.8 Informe de la prueba.

Informar "Número más probable (NMP) de coliformes por gramo o mililitro de muestra". En caso de muestras de agua informar NMP/100 ml.

A.7. Determinación de microorganismos coliformes totales en placa.**A.7.1 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.

A.7.2 Definiciones.

A.7.2.1 Coliformes, bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que a 35 °C fermentan la lactosa con formación de ácido, ocasionando en las colonias desarrolladas el vire del indicador rojo neutro presente en el medio y la precipitación de las sales biliares.

A.7.3 Reactivos y materiales.**A.7.3.1 Reactivos.**

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

A.7.3.1.1 Soluciones diluyentes.**A.7.3.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).****Tabla A.7.1 Fórmula**

Ingredientes	Cantidades
Fosfato monopotásico	34.0g
Agua	1.0L

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N.

Llevar con agua a un litro.

Esterilizar a $121 \pm 1,0$ °C durante 15 minutos. 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 minutos a $121 \pm 1,0$ °C.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

A.7.3.1.1.2 Agua peptonada.**Tabla A.7.2 Fórmula**

Ingredientes	Cantidades
Peptona	1.0g
Cloruro de sodio	8.5g
Agua	1.0L

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1,0 N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.

Esterilizar durante 15 minutos a $121 \pm 1,0$ °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 oscuro 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.

A.7.3.1.2 Medio de cultivo: Agar-rojo- violeta-bilis-lactosa (RVBA).

Tabla A.7.3 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Peptona	7.0g
Extracto de levadura	3.0g
Lactosa	10.0g
Sales biliares	1.5g
Cloruro de sodio	5.0g
Rojo neutro	0.03g
Cristal violeta	0.002g
Agar	15.0g
Agua	1.0L

Preparación:

Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos.

Mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7,4 con ácido clorhídrico 0,1N o con hidróxido de sodio 0,1N a 25 °C, de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor.

Calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos.

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.

A.7.3.2 Materiales.

A.7.3.2.1 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.

A.7.3.2.2 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

A.7.3.2.3 Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

A.7.3.2.4 Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

A.7.3.2.5 Cajas Petri.

Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante horno o autoclave.

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.

A.7.4 Aparatos e instrumentos.

A.7.4.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170 °C. Durante 2 h a 170 - 175 °C, o 1 h a 180 °C.

A.7.4.2 Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas. Durante 15 minutos como mínimo a 121 ± 1,0 °C.

A.7.4.3 Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0,1 °C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0$ °C.

A.7.4.4 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

A.7.4.5 Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

A.7.4.6 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0$ °C, provista con termómetro calibrado.

A.7.4.7 Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

A.7.4.8 Registrador mecánico o electrónico.

A.7.4.9 Microscopio óptico.

A.7.4.10 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25 °C.

A.7.5 Preparación de la muestra.

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en el método A.2 del presente documento "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

A.7.6 Procedimiento.

A.7.6.1 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.

A.7.6.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

A.7.6.3 Verter de 15 a 20 mL del medio RVBA fundido y mantenido a $45 \pm 1,0$ °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 minutos.

A.7.6.4 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.

A.7.6.5 Preparar una caja control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad.

A.7.6.6 Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 mL del medio RVBA a $45 \pm 1,0$ °C en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

A.7.6.7 Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35 °C, durante 24 ± 2 horas.

A.7.6.8 Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.

A.7.6.9 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 2,0 mm.

A.7.7 Expresión de los resultados.

A.7.7.1 Cálculo del método.

A.7.7.1.1 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 citados en el método A.5. Determinación de mohos y levaduras en alimentos.

A.7.7.1.2 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.

A.7.7.1.3 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.

A.7.8 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".

A.8. Determinación de *Salmonella* en alimentos.

A.8.1 Fundamento.

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

A.8.1.1 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.

A.8.1.2 Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

A.8.1.3 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.

A.8.1.4 Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

A.8.1.5 Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

A.8.2 Definiciones.

A.8.2.1 Detección de *Salmonella*, determinación de la presencia o ausencia de estos microorganismos en una masa determinada de producto, cuando las pruebas se llevan a cabo de acuerdo con esta Norma.

A.8.2.2 *Salmonella*, microorganismo patógeno perteneciente al grupo de Enterobacterias. Bacilo gram negativo, aerobio, no esporulado que forman colonias típicas en medios selectivos sólidos y que presentan además las características bioquímicas y serológicas descritas cuando los procedimientos se efectúan de acuerdo con esta Norma.

A.8.3 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.

A.8.3.1 Reactivos.

A.8.3.1.1 Medios de pre-enriquecimiento.

A.8.3.1.1.1 Agua de peptona tamponada.

Tabla A.8.1 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10.0g
Cloruro sódico	5.0g
Fosfato sódico dibásico	3.5g
Fosfato potásico monobásico	1.5g
Agua	1.0L

Preparación

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario.

Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización a 7,0.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables con la capacidad necesaria para obtener las porciones necesarias para la prueba.

Esterilizar por 20 min a 121 ± 1 °C.

A.8.3.1.1.2 Caldo lactosado.**Tabla A.8.2 Fórmula**

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3.0g
Peptona	5.0g
Lactosa	5.0g
Agua destilada	1.0L

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 °C ± 1 °C.

A.8.3.1.2 Caldo de enriquecimiento**A.8.3.1.2.1 Caldo selenito-cistina****Tabla A.8.3 Fórmula**

Ingredientes	Cantidades
Triptona o polipeptona	5.0g
Lactosa	4.0g
Fosfato disódico	10.0g
Selenito ácido de sodio	4.0g
L-cistina	0.01g
Agua destilada	1.0L

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 °C ± 1 °C, tomando entonces un color salmón.

A.8.3.1.2.2 Caldo tetratonato.**Tabla A.8.4 Fórmula**

Ingredientes	Cantidades
Proteosa peptona o triptona	5.0g
Sales biliares	1.0g

Carbonato de calcio	10.0g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	30.0g
Agua destilada	1.0L

pH final: 7,0 ±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.

A.8.3.1.2.3 Vassiliadis-Rappaport.

Tabla A.8.5 Fórmula Solución A

Ingredientes	Cantidades
Triptona	5.0g
Cloruro de sodio	8.0g
Fosfato de potasio dihidrogenado	1.6g
Agua destilada	1.0L

Preparación:

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

Tabla A.8.6 Fórmula Solución B

Ingredientes	Cantidades
Cloruro de magnesio hexahidratado	400.0g
Agua destilada	1.0L

Preparación:

Disolver el cloruro de magnesio en 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.

Tabla A.8.7 Fórmula Solución C

Ingredientes	Cantidades
Oxalato de verde de malaquita	0.4g
Agua destilada	100.0mL

Preparación:

Disolver el oxalato de verde de malaquita en agua.

Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Tabla A.8.8 Fórmula Medio Completo

Ingredientes	Cantidades
Solución A	100mL

Solución B	100mL
Solución C	10mL

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.

Distribuir antes de usar dentro de tubos en cantidades de 10 mL.

Almacenar en refrigeración.

A.8.3.1.2.4 Caldo de soya tripticasa.

Tabla A.8.9 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Tripticasa o triptosa	17.0g
Fitona	3.0g
Glucosa	2.5g
Cloruro de sodio	2.5g
Agua destilada	1.0L

pH final: 7,3 ±0,2.

Preparación:

Disolver los ingredientes en 1 litro 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 °C ±1 °C.

A.8.3.1.2.5 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 °C ±1 °C por 15 min. El volumen final debe corregirse para mantener 225 mL.

A.8.3.1.2.6 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.

A.8.3.1.3 Medios de aislamiento.

A.8.3.1.3.1 Agar verde brillante (VB).

Tabla A.8.10 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Extracto de levadura	3,0g
Polipeptona (Proteosa peptona No. 3)	10.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Lactosa	10.0g
Sacarosa	10.0g
Rojo de fenol	0.08g
Agar	20.0g
Verde brillante	0.0125g
Agua destilada	1.0L

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 $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad.

Enfriar el medio a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y distribuirlo en cajas de Petri estériles. El aspecto del medio es oscuro, de color marrón.

A.8.3.1.3.2 Agar con sulfito de bismuto.

Tabla A.8.11 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne de res	5.0g
Mezcla de peptonas	10.0g
Glucosa	5.0g
Fosfato disódico (anhidro)	5.0g
Sulfato ferroso (anhidro)	0.3g
Sulfito de bismuto	8.0g
Verde brillante	0.025g
Agar	20.0g
Agua destilada	1.0L

Preparación:

Suspender los ingredientes en un litro de agua. Calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente. Ajustar el pH.

Enfriar a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

A.8.3.1.3.3 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD).

Tabla A.8.12 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Xilosa	3.75g
L-lisina	5.0g
Lactosa	7.50g
Sacarosa	7.50g
Cloruro de sodio	5.0g
Extracto de levadura	3.0g
Rojo de fenol	0.08g
Agar	15.0g
Desoxicolato de sodio	2.50g
Citrato férrico-amónico	0.80g
Tiosulfato de sodio	6.80g
Agua destilada	1.0L

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

Preparación:

Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada, y calentar en baño de agua a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitando frecuentemente, hasta disolución completa. Ajustar el pH.

Enfriar a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

A.8.3.1.3.4 Agar para *Salmonella* y *Shigella* (SS)

Tabla A.8.13 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	5.0g
Polipeptona *	5.0g
Lactosa	10.0g
Sales biliares	8.50g
Citrato de sodio dihidratado	8.50g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	8.50g
Citrato férrico	1.0g
Agar	13.50g
Rojo neutro	0.025g
Verde brillante	0.33g
Agua destilada	1.0L

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

Preparación:

Suspender los ingredientes en un litro 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.

A.8.3.1.3.5 Agar entérico Hektoen.

Tabla A.8.14 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Proteosa peptona	12.0g
Extracto de levadura	3.0g
Lactosa	12.0g
Sacarosa	12.0g
Salicina	2.0g
Sales biliares	9.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Tiosulfato de sodio	5.0g
Citrato amónico férrico	1.5g
Azul de bromotimol	0.064g
Fuscina ácida	0.10g
Agar	13.5g
Agua	1.0L

pH final: $7,5 \pm 0,2$.

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.

A.8.3.1.4 Medios para pruebas bioquímicas.

A.8.3.1.4.1 Agar de tres azúcares y hierro (TSI).

Tabla A.8.15 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Peptona de carne *	1.0g
Peptona de caseína *	1.0g
Cloruro de sodio	0.5g
Lactosa	1.0g
Sacarosa	1.0g
Glucosa	0.1g
Agar	1.3g
Rojo de fenol	2.5 mg
Sulfato ferroso amónico pentahidratado	20.0 mg
Tiosulfato de sodio	20.0 mg
Agua destilada	100.0 mL

pH final: 7,3 ± 0,2.

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 °C ± 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.

A.8.3.1.4.2 Agar de hierro y lisina (LIA).

Tabla A.8.16 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Peptona de gelatina	0.5g
Extracto de levadura	0.3g
Glucosa	0.1g
L-lisina	1.0g
Citrato férrico-amónico	50.0mg
Tiosulfato de sodio anhidro	4.0mg
Púrpura de bromocresol	2.0mg
Agar	1.5g
Agua destilada	100.0mL

pH final: 6,7 ± 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 $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

A.8.3.1.4.3 Agar nutritivo.

Tabla A.8.17 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3.0g
Peptona	5.0g
Agar	15.0g
Agua destilada	1.0L

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 $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Inclinan los tubos antes que el agar solidifique.

A.8.3.1.4.4 Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad).

Tabla A.8.18 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3.0g
Peptona	30.0g
Hierro peptonizado	0.2g
Tiosulfato de sodio	0.025g
Agua destilada	1.0L

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.

Enfriar a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y ajustar el pH.

Distribuir el medio en volúmenes de 3 mL en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Se dejan enfriar los tubos en posición vertical.

A.8.3.1.4.5 Agar citrato de Simmons.

Tabla A.8.19 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Fosfato de amonio	1.0g
Fosfato dipotásico	1.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Citrato de sodio	2.0g
Sulfato de magnesio	0.2g
Azul de bromotimol	0.08g
Agar	15.0g
Agua destilada	1.0L

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

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 $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min.

Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

A.8.3.1.4.6 Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer).

Tabla A.8.20 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Peptona	7.0g
Dextrosa	5.0g
Difosfato de potasio	5.0g
Agua destilada	1.0L

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 $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min.

A.8.3.1.4.7 Caldo manitol.

Tabla A.8.21 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	1.0g
Proteosa peptona	10.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Rojo de fenol	0.018g
Manitol	10.0g
Agua	1.0L

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

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 $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min.

A.8.3.1.4.8 Caldo malonato.

Tabla A.8.22 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
--------------	------------

Extracto de levadura	1.0g
Sulfato de amonio	2.0g
Fosfato dipotásico	0.6g
Fosfato monopotásico	0.4g
Cloruro de sodio	2.0g
Malonato	3.0g
Glucosa	0.25g
Azul de bromotimol	0.025g
Agua	1.0L

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

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 $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min.

A.8.3.1.4.9 Caldo urea.

Tabla A.8.23 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Urea	20.0g
Extracto de levadura	0.10g
Fosfato monopotásico	9.10g
Fosfato disódico	9.50g
Rojo de fenol	0.01g
Agua	1.0L

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

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua destilada.

NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ 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.

A.8.3.1.4.10 Caldo de urea rápido.

Tabla A.8.24 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Urea	20.0g
Extracto de levadura	0.10g
Fosfato monopotásico	0.091g
Fosfato disódico	0.095g
Rojo de fenol	0.01g
Agua	1.0L

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

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.

A.8.3.1.4.11 Caldo infusión cerebro corazón.

Tabla A.8.25 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Infusión cerebro corazón	200.0g
Infusión de corazón de res	250.0g
Proteosa peptona	10.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato disódico dodecahidratado	2.5g
Dextrosa	2.0g
Agua destilada	1.0L

pH final: 7,4 ± 0,2.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua destilada, calentar suavemente.

Distribuir y esterilizar a 121 °C ± 1 °C durante 15 min.

A.8.3.1.5 Soluciones.

A.8.3.1.5.1 Solución verde brillante al 0,1% (1:1000).

Tabla A.8.26 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Verde brillante	0.1g
Agua destilada estéril	100.0mL

Preparación:

Disolver 0,1 g de verde brillante en agua destilada estéril hasta completar 100 mL.

A.8.3.1.5.2 Solución de yodo-yoduro.

Tabla A.8.27 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Cristales de yodo	6.0g
Yoduro de potasio	6.0g
Agua destilada	100.0mL

Preparación:

Disolver los cristales y el yoduro de potasio en agua destilada hasta completar 100 mL.

Conservar en frasco ámbar.

A.8.3.1.5.3 Solución salina al 0,85%.

Tabla A.8.28 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Cloruro de sodio	0.85g
Agua destilada	100.0mL

Preparación:

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

A.8.3.1.5.4 Solución salina formalizada.

Tabla A.8.29 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Solución de formaldehído (36-38%)	6.0ml
Cloruro de sodio	8.5g
Agua destilada	1.0L

Preparación:

Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada. Esterilizar a $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 6 mL de la solución de formaldehído. No esterilizar después de la adición de formaldehído.

A.8.3.1.5.5 Reactivo de Kovac.

Tabla A.8.30 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
p-dimetil-aminobenzaldehído	5.0g
Alcohol amílico	75.0mL
Acido clorhídrico concentrado	25.0mL

Preparación:

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

A.8.3.1.5.6 Solución de alfa-naftol al 5%.

Tabla A.8.31 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Alfa-naftol	5.0g
Alcohol	100.0mL

Preparación:

Disolver 5 g de alfa-naftol en alcohol hasta completar 100 mL.

A.8.3.1.5.7 Solución de rojo de metilo.

Tabla A.8.32 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Rojo de metilo	0.10g
Alcohol etílico	300.0g
Agua destilada c.b.p.	500.0mL

Preparación:

Disolver el rojo de metilo en el alcohol etílico y adicionar agua hasta completar 500 mL.

A.8.3.1.5.8 Solución de hidróxido de potasio al 40%.

Tabla A.8.33 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Hidróxido de potasio	40.0g
Agua destilada	100.0mL

Preparación:

Disolver 40 g de hidróxido de potasio en agua hasta completar 100 mL.

A.8.3.1.5.9 Solución de gelatinasa al 5%.

Tabla A.8.34 Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Gelatinasa	5.0g
Agua	100.0mL

Preparación:

Disolver 5 g de gelatinasa en 100 mL de agua destilada. NO CALENTAR.

A.8.3.1.6 Antisueros

Antisuero polivalente somático (O)

Antisuero polivalente flagelar (H)

Antisuero Vi

A.8.4.2 Materiales.

A.8.4.2.1 Matraces Erlenmeyer de 500 mL.

A.8.4.2.2 Recipientes de boca ancha, de capacidad apropiada para contener las muestras simples y compuestas.

A.8.4.2.3 Angulos de vidrio.

A.8.4.2.4 Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas.

A.8.4.2.5 Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm.

A.8.4.2.6 Tubos para serología de 10 x 75 mm o de 13 x 100 mm.

A.8.4.2.7 Pipetas bacteriológicas de 10,0 y 5,0 mL, graduadas en 0,1 mL y protegidas con tapón de algodón.

A.8.4.2.8 Pipetas de 1 mL, con graduaciones de 0,01 mL.

A.8.4.2.9 Cajas de Petri estériles de vidrio o desechables.

A.8.4.2.10 Rejillas para tubos de ensaye.

A.8.4.2.11 Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro.

A.8.4.2.12 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 o autoclave.

A.8.5 Equipo.

A.8.5.1 Horno para esterilizar que alcance los 180 °C. Durante 2 horas a 170-175 °C.

A.8.5.2 Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de $\pm 0,1$ °C y termómetro.

A.8.5.3 Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas. Durante 15 min como mínimo a 121 °C ± 1 °C.

A.8.5.4 Baño maría con termostato y termómetro.

A.8.5.5 Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

A.8.5.6 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio).

A.8.5.7 Mecheros Bunsen o Fisher.

A.8.5.8 Potenciómetro.

A.8.6 Procedimiento.

A.8.6.1 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.

A.8.6.1.1 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 1N o ácido clorhídrico 1N estériles. Mezclar y cubrir el recipiente enroscando suavemente la tapa.

Incubar 24 ± 2 h a 35 °C. Continuar como se indica en A.8.6.2.1.

A.8.6.1.2 Procedimiento específico para la preparación de muestra según el producto.

A.8.6.1.2.1 Dulces y dulces cubiertos (incluyendo chocolate).

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso para licuadora agregando 225 ml de leche descremada reconstituida. Licuar por dos min. Manejar igual que en 8.6.1.1 hasta después de ajustar el pH. Adicionar 0,45 ml de la solución verde brillante al 0,1% y mezclar bien. Incubar como se indica en 8.6.1.1.

A.8.6.2 Aislamiento de *Salmonella*.

A.8.6.2.1 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 tetratonato y a otro con 10 mL de caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetratonato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport.

A.8.6.2.2 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.

A.8.6.2.3 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 tetratonato.

Incubar las placas 24 ± 2 h a 35 °C.

A.8.6.2.4 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 azul verdes 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.

A.8.6.3 Identificación bioquímica

A.8.6.3.1 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 si es necesario retomar más colonias.

A.8.6.3.2 Observar el crecimiento en los tubos y considerar presuntivamente positivas para *Salmonella* las colonias que den las siguientes reacciones:

A.8.6.3.2.1 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.

A.8.6.3.2.2 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.

A.8.6.3.2.3 Retener todos los cultivos que muestren las reacciones características de *Salmonella* en los medios TSI y LIA para las pruebas adicionales, indicadas en A.8.6.3.3.

A.8.6.3.3 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.

A.8.6.3.4 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.

A.8.6.3.5 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.

A.8.6.3.6 Prueba de ureasa.

A.8.6.3.6.1 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.

A.8.6.3.6.2 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 $37 \pm 0,5$ °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).

A.8.6.4 Identificación serológica.

A.8.6.4.1 Ensayo de los antígenos somáticos de *Salmonella* (Antisuero polivalente O).

A.8.6.4.1.1 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.

A.8.6.4.1.2 Agregar a una de ellas una gota del antisuero polivalente somático (O) y mezclar con el canto del asa o empleando aplicadores de madera.

A.8.6.4.1.3 Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente un min. Observar bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro.

A.8.6.4.1.4 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.

A.8.6.4.2 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).

A.8.6.4.2.1 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.

A.8.6.4.2.2 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 al Laboratorio Nacional de Salud Pública.

A.8.6.4.3 Si se requiere, practicar el ensayo de los antígenos flagelares de *Salmonella* (Antisuero polivalente H).

A.8.6.4.3.1 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).

A.8.6.4.3.2 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 una 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.

A.8.6.5 Pruebas bioquímicas complementarias.k

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

A.8.6.5.1 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*.

A.8.6.5.2 Interpretar los cambios en los medios inoculados conforme lo siguiente:

A.8.6.5.2.1 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.

A.8.6.5.2.2 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.

A.8.6.5.2.3 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.

A.8.6.5.2.3.1 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 ± 2 °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 ± 2 °C.

A.8.6.5.2.3.2 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.

A.8.6.5.2.4 Caldo malonato

Inocular un tubo conteniendo el medio.

Incubar 40 ± 2 h a 35 ± 2 °C.

Prueba positiva: desarrollo de color azul.

Prueba negativa: sin cambio de color.

A.8.6.5.2.5 Caldo manitol

Inocular un tubo conteniendo el medio.

Incubar 24 ± 2 h a 35 ± 2 °C.

Prueba positiva: desarrollo de color amarillo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

A.8.6.5.3 Consultar los resultados obtenidos en la Tabla A.8.36 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.

A.8.7 Cálculo y expresión de resultados.

A.8.7.1 Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas.

Reacciones bioquímicas	Reacciones serológicas	Interpretación
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>

Nota: Ver apéndice informativo A.

A.8.7.2 Reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella*.

Tabla A.8.36

Prueba o Sustrato	Positivo	Negativo	Reacción
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	amarillo o gas	no hay cambio de color ni gas	+ b
Caldo KCN	crecimiento	no hay crecimiento	-
Caldo malonato	azul	no hay cambio de color	- c
Prueba de indol	superficie de 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	- c
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 o 2 días; -, 90% o más negativas en 1 o 2 días; v, variable.

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

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

A.8.8 Informe de resultados.

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

A.9. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método de arena o gasa.

A.9.1 Fundamento.

Este método se basa en que al añadir arena o gasa, se incrementa la superficie de contacto y la circulación del aire en la muestra, favoreciéndose así la evaporación durante el tratamiento térmico.

A.9.2 Definiciones.

A.9.2.1 Humedad, es la pérdida en peso por evaporación que sufre el producto al someterlo a las condiciones prescritas, expresada en por ciento.

A.9.2.2 Precisión, es una medida del grado de reproducibilidad o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

A.9.2.3 Producto heterogéneo, es aquel cuya consistencia o diferentes fases hacen que la distribución de sus componentes no sea homogénea, tales como sopas de lata, frijoles refritos, moles, etc.

A.9.2.4 Repetibilidad, es la precisión de un método analítico, expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos datos y técnicas.

A.9.3 Reactivos y Materiales.

A.9.3.1 Reactivos.

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

A.9.3.1.1 Sílica gel con indicador de humedad.

A.9.3.1.2 Arena de mar purificada con ácido y calcinada (tamaño de partícula, 0,1 a 0,3 mm) o gasa.

A.9.3.1.3 Agua.

A.9.3.2 Materiales.

A.9.3.2.1 Desecadores con placa.

A.9.3.2.2 Cápsulas de níquel, aluminio o vidrio de 20 mm de altura y 50 mm de diámetro, con tapa de 52 mm de diámetro por 6 mm de altura y base cóncava o plana según se requiera.

A.9.3.2.3 Varillas de vidrio de 4 mm de diámetro.

A.9.3.2.4 Pinzas para crisol.

A.9.3.2.5 Material común de laboratorio.

A.9.4 Aparatos e Instrumentos

Los aparatos que a continuación se indican deben estar calibrados y ser ajustados antes de su operación:

A.9.4.1 Baño maría, o bien, placa calefactora eléctrica termostatzada.

A.9.4.2 Balanza analítica con $\pm 0,1$ mg de sensibilidad.

A.9.4.3 Estufa con termostato para mantener una temperatura de 100 ± 2 °C.

A.9.5 Preparación de la muestra.

A.9.5.1 Preparación de las cápsulas. Para cada muestra preparar dos cápsulas y las tapas respectivas con las siguientes características:

Cápsulas de níquel, aluminio o vidrio, con 30 g de arena como máximo, o gasa recortada al tamaño del fondo de la cápsula y una varilla de vidrio de longitud apropiada para reposar oblicuamente en la cápsula sin que se impida el tapado de ésta. Secar previamente las cápsulas entreabiertas (con arena o gasa, varilla y tapas), durante un mínimo de 2 horas a 100 ± 2 °C, taparlas e introducir en un desecador y dejar enfriar a temperatura ambiente y pesar con precisión de 0,1 mg (masa M1)

A.9.5.2 Preparación de la muestra.

Justo antes de tomar la muestra, homogeneizarla bien, si es necesario, colocar el envase original en baño maría a 40 °C para poner en suspensión los componentes que hayan podido separarse. (Por ejemplo grasa y fibras).

A.9.6 Procedimiento.

A.9.6.1 Colocar en la cápsula preparada una cantidad de producto inferior a 10 g, volver a tapar la cápsula y pesar con precisión de 0,1 mg (masa M2).

Para que se cumpla el grado de precisión, se recomienda utilizar una cantidad de muestra superior a 1 g y en los productos heterogéneos utilizar de 3 a 5 veces más de la cantidad mínima propuesta.

A.9.6.2 Después de pesar, mezclar bien la muestra con arena o colocarla sobre la gasa. Si es necesario, añadir unos centímetros cúbicos de agua destilada, lo cual facilita una mezcla uniforme.

A.9.6.3 Si la muestra lo requiere, evaporar a sequedad, sin tapa, por medio de un baño maría o placa calefactora a un máximo de 100 °C. Durante la evaporación, el contenido de la cápsula debe removerse de vez en cuando al principio y más a menudo al final. Evitar las pérdidas de sustancia y arena.

A.9.6.4 Introducir en la estufa las cápsulas con la muestra previamente evaporada, colocar las tapas de manera que al final del tiempo de secado puedan taparse rápidamente, cerrar la estufa y secar durante 4 horas a 100 ± 2 °C. Abrir la estufa, tapar las cápsulas y colocarlas en los desecadores, dejar enfriar hasta temperatura ambiente y pesar inmediatamente con precisión de 0,1 mg (masa M3).

A.9.7 Expresión de resultados.

A.9.7.1 Método de cálculo.

El contenido de humedad en la muestra se calcula con la siguiente fórmula expresada en por ciento:

$$\text{Humedad en \%} = \frac{M2 - M3}{M2 - M1} \times 100$$

En donde:

M1 = Peso de la cápsula con arena o gasa (g).

M2 = Peso de la cápsula con arena o gasa más muestra húmeda (g).

M3 = Peso de la cápsula con arena o gasa más muestra seca (g).

Nota: Indicar el valor medio de la determinación por duplicado con un decimal.

A.9.7.2 Grado de precisión

Repetibilidad: no debe exceder de 0,1 g por 100 g de muestra.

Si el producto es homogéneo y la diferencia excede 0,1 g/100 g, debe repetirse la determinación. Sin embargo para ciertas materias heterogéneas las diferencias admisibles pueden alcanzar de 0,3 a 0,5 g/100 g.

A.9.8 Informe de la prueba.

Informar: humedad en %.

A.10. Determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.

A.10.1 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.

A.10.2 Definiciones.

A.10.2.1 Blanco de calibración del instrumento, es la solución del ácido usado como diluyente.

A.10.2.2 Blanco de reactivos, a la solución que contiene todos los reactivos usados en los mismos volúmenes y concentraciones en el procesamiento de la muestra. Este blanco debe seguir los pasos de digestión y preparación de la muestra.

A.10.2.3 Blanco de reactivos fortificado, a la solución que se prepara a partir de una alícuota del blanco de reactivos, añadiendo una alícuota de la solución estándar concentrada "solución madre", para dar una concentración final que produzca una absorbancia aceptable (aproximadamente 0,1) para el analito. El blanco de reactivos fortificado debe seguir el mismo esquema de digestión y preparación de la muestra.

A.10.2.4 Espectrometría, a la rama de la espectroscopia relacionada con la medición de espectros.

A.10.2.5 Espectrometría de absorción atómica, a la rama del análisis instrumental en el cual un elemento es atomizado en forma tal que permite la observación, selección y medida de su espectro de absorción.

A.10.2.5.1 Espectrometría de absorción atómica por flama, al método por el cual el elemento se determina mediante un espectrómetro de absorción atómica, usado en conjunto con un sistema de nebulización y una fuente de atomización.

La fuente de atomización es un quemador que utiliza diferentes mezclas de gases, las más frecuentes son aire-acetileno y óxido nitroso-acetileno.

A.10.2.5.2 Espectrometría de absorción atómica por horno de grafito, al método mediante el cual el elemento se determina por un espectrómetro de absorción atómica, usado en conjunto con un horno de grafito. El principio es esencialmente el mismo que en absorción atómica de aspiración directa en flama, excepto que se usa un horno en lugar de la flama para atomizar la muestra.

A.10.2.5.3 Espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros, al método similar al del vapor frío. Las muestras reaccionan en un dispositivo externo con un agente reductor, generalmente borohidruro. Los productos gaseosos de reacción se llevan a una celda de muestreo que se encuentra en el paso óptico del espectrómetro de absorción atómica, en este caso, los productos de reacción son hidruros volátiles. Estos compuestos moleculares no son capaces de dar una señal de absorción atómica, por lo tanto la celda se calienta para disociar el hidruro gaseoso en átomos libres. Cuando el hidruro gaseoso se disocia en la celda calentada en átomos libres, la absorción atómica crece y cae a medida que se crean los átomos y escapan de la celda de absorción. Se mide el máximo de absorción o altura de pico, como señal analítica. Los elementos que se pueden determinar con esta técnica son: As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Te y Sn.

A.10.2.5.4 Espectrometría de absorción atómica por vapor frío, al método que es otra aproximación para mejorar la sensibilidad de la absorción atómica, optimizando la eficiencia de muestreo en el quemador de pre-mezcla, en donde el mercurio se reduce químicamente al estado atómico libre haciendo reaccionar la muestra con un reductor fuerte (cloruro estanoso o borohidruro de sodio) en un recipiente de reacción cerrado. El mercurio volátil libre se arrastra del matraz de reacción burbujeando aire o nitrógeno a través de la solución. Los átomos del mercurio que se arrastran son transportados a una celda de absorción que se coloca en el paso de luz del espectrómetro de absorción atómica. A medida que los átomos de mercurio pasan por la celda de muestreo, la absorbancia medida se incrementa indicando el aumento de concentración en el paso de luz.

A.10.2.6 Espectroscopia, al área de la física y la química dedicada al estudio de la generación, medición e interpretación de los espectros de energía (electromagnético o partícula) que resulta ya sea de la emisión o absorción de energía radiante o partículas de una sustancia cuando se le bombardea con radiación electromagnética, electrones, neutrones, protones, iones o bien por calentamiento, excitación con un campo eléctrico magnético, usada para investigar estructura nuclear y atómica.

A.10.2.7 Método de adiciones estándar, al que implica la preparación de estándares en la matriz de la muestra, añadiendo cantidades conocidas de un estándar a una o más alícuotas de la muestra y que compensa los efectos de exaltación o depresión de la señal del analito, pero no corrige interferencias aditivas que causan una desviación de la línea de base y en la cual los resultados obtenidos son válidos si:

La curva analítica es lineal.

La forma química del analito es la misma que en la muestra.

El efecto de interferencia es constante en el intervalo de trabajo.

La señal se corrige por interferencia aditiva.

A.10.2.8 Muestra de control de calidad, es una muestra externa al laboratorio, que contiene una alícuota de concentración conocida del analito, cuyos valores de absorbancia deben estar comprendidos en el rango lineal del método.

A.10.2.9 Muestra fortificada, a la muestra a la cual se le adiciona una alícuota de concentración conocida del analito, diluida en el ácido apropiado de tal forma que la solución resultante tenga una absorbancia de 0,1 aproximadamente.

A.10.3 Reactivos y materiales

A.10.3.1 Reactivos

A.10.3.1.1 Soluciones estándares de referencia certificadas de cada uno de los metales.

A.10.3.1.2 Agua, debe ser destilada deionizada, con un grado máximo de conductividad de 1 $\mu\text{mho/cm}$ a 25°C.

A.10.3.1.3 Acido nítrico (densidad específica 1,41), grado suprapuro.

A.10.3.1.4 Acido nítrico (densidad específica 1,41), contenido de mercurio muy bajo.

A.10.3.1.5 Acido perclórico (densidad específica 1,67), grado suprapuro.

A.10.3.1.6 Acido clorhídrico (densidad específica 1,19), grado suprapuro.

A.10.3.1.7 Acido sulfúrico (densidad específica 1,84), grado suprapuro.

A.10.3.1.8 Acido sulfúrico 1 N a partir de la solución grado suprapuro.

A.10.3.1.9 Acido nítrico 65% v/v grado RA.

A.10.3.1.10 Peróxido de hidrógeno (densidad específica 1,12).

A.10.3.1.11 Hidróxido de sodio granalla reactivo RA.

A.10.3.1.12 Aire comprimido seco y limpio.

A.10.3.1.13 Gases: acetileno, óxido nitroso, argón y nitrógeno, grado absorción atómica.

A.10.3.1.14 Solución de Nitrato de Magnesio hexahidratado al 7% p/v. Disolver 70 g de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 1000 mL de HCl 1 N.

A.10.3.1.15 Acido clorhídrico 1 N. Diluir 8,3 mL de HCl y llevar a 100 mL de agua.

A.10.3.1.16 Acido nítrico al 50% v/v. Diluir 50 mL de HNO_3 al 65% v/v grado suprapuro en 50 mL de agua.

A.10.3.1.17 Acido clorhídrico 8 M. Diluir 66,0 mL de HCl y llevar a 100 mL con agua.

A.10.3.1.18 Acido clorhídrico 0,5 N. Diluir 4,15 mL de HCl y llevar a 100 mL con agua.

A.10.3.1.19 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).

A.10.3.1.20 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).

A.10.3.1.21 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.

A.10.3.1.22 Solución de Nitrato de Magnesio al 50% p/v. Disolver 50 g de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua.

A.10.3.1.23 Solución de ácido clorhídrico al 1,5% p/v. Diluir 1,5 mL de HCl en 100 mL de agua destilada deionizada.

A.10.3.1.24 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.

A.10.3.1.25 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.

A.10.3.1.26 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 estanoso en solución. Diluir a 500 mL.

A.10.3.1.27 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 $\mu\text{g/mL}$. Diluir 1 mL de la solución patrón de 1000 $\mu\text{g/mL}$ a 1 L con ácido sulfúrico 1N preparada a partir de la solución grado suprapuro. Preparar fresca cada día.

A.10.3.2 Materiales

A.10.3.2.1 Matraces Kjeldahl de 500 mL y 800 mL.

A.10.3.2.2 Sistema de reflujo con refrigerante.

A.10.3.2.3 Crisoles Vycor de 40 a 50 mL de capacidad.

A.10.3.2.4 Crisoles de platino de 40 a 50 mL de capacidad.

A.10.3.2.5 Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades.

A.10.3.2.6 Matraces volumétricos de diferentes capacidades.

A.10.3.2.7 Matraces redondos de fondo plano de 50 mL.

A.10.3.2.8 Bombas Parr.

A.10.3.2.9 Micropipetas o pipetas de Eppendorf de diferentes capacidades.

A.10.3.2.10 Puntas de plástico para micropipetas.

A.10.3.2.11 Papel filtro Whatman No. 2.

A.10.3.2.12 Perlas de ebullición.

A.10.3.2.13 Varillas de plástico.

A.10.3.2.14 Tubos de ensayo graduados de propilen o propileno de 15 mL.

A.10.3.2.15 Recipientes de propilen o propileno.

A.10.3.2.16 Embudos de filtración de diferentes capacidades.

A.10.3.2.17 Material común de laboratorio.

A.10.3.2.17.1 Todo el material utilizado debe someterse a lavado de acuerdo con las siguientes instrucciones:

A.10.3.2.17.1.1 El jabón que se use debe ser de preferencia neutro.

A.10.3.2.17.1.2 Enjuagar perfectamente con agua corriente.

A.10.3.2.17.1.3 Sumergir el material de vidrio o plástico en un recipiente (de preferencia plástico) que contenga una solución de ácido nítrico grado RA al 30%.

A.10.3.2.17.1.4 Dejarlo tapado y reposando por un lapso de 24 horas.

A.10.3.2.17.1.5 Quitar el exceso de ácido nítrico con varios enjuagues (5 o 6 veces) con agua deionizada.

A.10.3.2.17.1.6 Dejar escurrir y secar.

A.10.3.2.17.1.7 Guardar en cuanto esté seco para evitar contaminación por partículas en el aire.

A.10.4 Aparatos e instrumentos.

A.10.4.1 Aparatos.

A.10.4.1.1 Lámparas de cátodo hueco o de descarga sin electrodos para determinar arsénico, cadmio, cobre, estaño, fierro, mercurio, plomo y zinc.

A.10.4.1.2 Fuente de radiofrecuencia en caso de usar lámparas de descarga.

A.10.4.1.3 Automuestreador y recirculador de agua.

A.10.4.1.4 Placa de calentamiento con regulador que alcance una temperatura de 400 a 450 °C.

A.10.4.1.5 Horno de microondas.

A.10.4.1.6 Autoclave que alcance $121 \pm 5^\circ\text{C}$ o 15 lb de presión.

A.10.4.1.7 Centrífuga de laboratorio capaz de mantener 1600 rpm.

A.10.4.2 Instrumentos

A.10.4.2.1 Los instrumentos que a continuación se indican deben estar calibrados y ajustados antes de su operación.

A.10.4.2.2 Espectrómetro de absorción atómica equipado con los accesorios para flama, horno de grafito, generador de hidruros o vapor frío, dependiendo del método a seguir.

A.10.4.2.3 Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

A.10.4.2.4 Mufla capaz de mantener una temperatura de $550 \pm 10^\circ\text{C}$.

A.10.4.2.5 Horno de calentamiento (estufa) con intervalo de temperatura de $120 \pm 5^\circ\text{C}$.

A.10.5 Preparación de la muestra.

A.10.5.1 Digestión para la determinación de Cd, Cu, Fe, Pb y Zn.

A.10.5.1.1 Digestión por vía húmeda.

A.10.5.1.1.1 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.

A.10.5.1.1.2 Añadir 10 mL de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión.

A.10.5.1.1.3 Usar matraz de Kjeldhal o matraz conectado al sistema de refrigerantes.

A.10.5.1.1.4 Calentar suavemente.

A.10.5.1.1.5 Digerir la muestra 3 horas 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).

A.10.5.1.1.6 Enfriar.

A.10.5.1.1.7 Recuperar, filtrar y llevar a un volumen conocido en matraz volumétrico.

A.10.5.1.1.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

A.10.5.1.1.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica por flama u horno de grafito).

A.10.5.1.2 Digestión por vía seca.

A.10.5.1.2.1 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.

A.10.5.1.2.2 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 horas en estufa a una temperatura de 90 a 95°C .

A.10.5.1.2.3 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.

A.10.5.1.2.4 Elevar gradualmente la temperatura de 500 a 550°C para evitar que la muestra se incinere y mantener esa temperatura durante 16 horas o toda la noche.

A.10.5.1.2.5 Apagar la mufla y dejar enfriar.

A.10.5.1.2.6 Un segundo paso de calcinación puede ser requerido para remover algunos residuos de carbón, mediante el siguiente procedimiento:

A.10.5.1.2.6 .1 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.

A.10.5.1.2.7 Disolver las cenizas completamente en 5 mL de ácido clorhídrico 1N, 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.

A.10.5.1.2.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

A.10.5.1.2.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

A.10.5.2 Digestión por vía húmeda para la determinación de Sn.

A.10.5.2.1 Proceder igual que en el punto A.10.5.1.1.1.

A.10.5.2.2 No adicionar ácido nítrico si no se lleva cabo la digestión total en el mismo día.

A.10.5.2.3 Adicionar 30 mL de ácido nítrico concentrado al matraz y calentar suavemente por 15 minutos en campana para iniciar la digestión, evitando una excesiva producción de espuma.

A.10.5.2.4 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.

A.10.5.2.5 Retirar la muestra del calor.

A.10.5.2.6 Al mismo tiempo correr dos blancos de reactivos.

A.10.5.2.7 Adicionar 25 mL de ácido clorhídrico concentrado, calentar suavemente durante aproximadamente 15 minutos, hasta que todo el cloro sea liberado. Aumentar la temperatura gradualmente hasta ebullición.

A.10.5.2.8 Evaporar hasta obtener de 10 a 15 mL, usando un matraz similar con 15 mL de agua como patrón de volumen.

A.10.5.2.9 Adicionar aproximadamente 40 mL de agua.

A.10.5.2.10 Agitar y pasar a un matraz de 100 mL y enjuagar con 10 mL de agua.

A.10.5.2.11 Cuando el ácido clorhídrico está presente en la digestión, las muestras se pueden quedar toda la noche o por más tiempo.

A.10.5.2.12 Agregar 1 mL de solución de cloruro de potasio en cada matraz.

A.10.5.2.13 Enfriar a temperatura ambiente.

A.10.5.2.14 Diluir con agua y agregar más agua para compensar el volumen de grasa en el matraz.

A.10.5.2.15 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.

A.10.5.2.16 No filtrar los blancos. Tapar las botellas durante el análisis. Las soluciones son estables por varios meses.

A.10.5.2.17 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

A.10.5.2.18 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

A.10.5.3 Digestión por vía húmeda para la determinación de Hg.

A.10.5.3.1 Sistema de reflujo.

A.10.5.3.1.1 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.

A.10.5.3.1.2 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.

A.10.5.3.1.3 Dejar enfriar y agregar una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados (1 + 1).

A.10.5.3.1.4 Calentar y agregar más ácido nítrico gota a gota sobre las paredes del recipiente, hasta que el color obscuro de la solución desaparezca.

A.10.5.3.1.5 Enfriar.

A.10.5.3.1.6 Si existe grasa o cera filtrar la solución.

A.10.5.3.1.7 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

A.10.5.3.1.8 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).

A.10.5.3.2 Sistema cerrado.

A.10.5.3.2.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en el recipiente de digestión.

A.10.5.3.2.2 Agregar la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado.

A.10.5.3.2.3 Tapar y sellar perfectamente el recipiente de digestión.

A.10.5.3.2.4 Si el recipiente de digestión es un matraz Erlenmeyer, colocar éste en una autoclave a 15 lb por 30 minutos. Si se utiliza bomba Parr, calentar en parrilla controlando la temperatura a un máximo de 300 °C por 30 minutos.

A.10.5.3.2.5 Enfriar a temperatura ambiente.

A.10.5.3.2.6 En caso de que la digestión no sea completa adicionar peróxido de hidrógeno y repetir la digestión.

A.10.5.3.2.7 Filtrar en caso de que exista grasa o cera y analizar el contenido de Hg.

A.10.5.3.2.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

A.10.5.3.2.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).

A.10.5.4 Digestión para la determinación de As.

A.10.5.4.1 Digestión por vía húmeda-seca.

A.10.5.4.1.1 Proceder como en el punto A.10.5.3.2 hasta que la digestión sea completa y posteriormente continuar con los siguientes pasos.

A.10.5.4.1.2 Con una pipeta tomar una alícuota de la solución de muestra digerida y colocarla en un crisol Vycor o vaso de precipitados.

A.10.5.4.1.3 Añadir 1 mL de solución de nitrato de magnesio al 7% p/v y calentar en una parrilla a temperatura baja, hasta sequedad.

A.10.5.4.1.4 Incrementar el calor de la placa a un máximo de 375 °C.

A.10.5.4.1.5 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 minutos.

A.10.5.4.1.6 Enfriar y disolver el residuo en 2,0 mL de ácido clorhídrico 8 M.

A.10.5.4.1.7 Añadir 0,1 mL de yoduro de potasio al 20% p/v para reducir el As(V) a As(III).

A.10.5.4.1.8 Dejar reposar por un tiempo mayor a 2 minutos y transferir a un matraz y llevar al aforo con agua.

A.10.5.4.1.9 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

A.10.5.4.1.10 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

A.10.5.4.2 Digestión por vía seca.

A.10.5.4.2.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, la cantidad necesaria de muestra en un crisol Vycor o de platino.

A.10.5.4.2.2 Añadir el volumen necesario de nitrato de magnesio al 50% p/v.

A.10.5.4.2.3 Homogeneizar con una varilla limpia de plástico extendiendo la mezcla en el crisol.

A.10.5.4.2.4 Colocar la muestra en una mufla subiendo gradualmente la temperatura hasta 300 °C por 2 horas. Posteriormente subir gradualmente la temperatura hasta 500 °C por 16 horas o durante toda la noche.

A.10.5.4.2.5 Enfriar a temperatura ambiente y humedecer las cenizas con ácido nítrico al 50% v/v.

A.10.5.4.2.6 Calentar en parrilla hasta la eliminación del ácido.

A.10.5.4.2.7 Llevar los crisoles a una mufla elevando gradualmente la temperatura de 23 a 500 °C, manteniendo ésta 30 min hasta evaporación total.

A.10.5.4.2.8 Transferir las cenizas del crisol a un matraz aforado usando una porción de 10 mL de ácido clorhídrico 0,5 N.

A.10.5.4.2.9 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.

A.10.5.4.2.10 Dejar reposar durante 15 minutos y llevar al aforo.

A.10.5.2.11 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

A.10.5.4.2.12 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

A.10.5.5 Digestión para la determinación de Cd, As, Pb, Sn, Cu, Fe, Zn y Hg por horno de microondas.

Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, 0,500 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.

A.10.6 Procedimiento.**A.10.6.1 Espectrometría de absorción atómica por flama.****A.10.6.1.1 Calibración.** Es necesario comprobar que se tiene una calibración inicial y periódica aceptable.

A.10.6.1.1.1 Se inicia la configuración operacional del instrumento y en el sistema de adquisición de datos. Permitir un periodo no menor a 30 minutos para el calentamiento de las lámparas de descarga sin electrodos.

A.10.6.1.1.2 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%.

A.10.6.1.1.3 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.

A.10.6.1.1.4 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.

A.10.6.1.1.5 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.

A.10.6.1.2 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).

A.10.6.1.2.1 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.

A.10.6.1.2.2 Para verificar que el instrumento no presenta deriva, por cada 10 análisis se debe analizar el blanco 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 deriva o afecta la respuesta del analito puede ser necesario trabajar por adiciones estándar.

A.10.6.1.2.3 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 a:

$$\text{LDM} = t \times s$$

t = valor de la "T" de Student a un intervalo de confianza de 99% 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.

A.10.6.1.3 Determinación

A.10.6.1.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito de acuerdo a las indicaciones del manual del instrumento.

A.10.6.1.3.2 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.

A.10.6.1.3.3 En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en las unidades de concentración utilizadas.

A.10.6.1.3.4 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 al apartado A.10.6.1.3.6).

A.10.6.1.3.5 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.

A.10.6.1.3.6 Se debe calcular el porcentaje de recuperación para el analito, de acuerdo a:

$$R = \frac{CM - C}{CA} \times 100$$

R = % recuperación.

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.

A.10.6.2 Espectrometría de absorción atómica por horno de grafito.

A.10.6.2.1 Calibración.

A.10.6.2.1.1 Proceder de acuerdo a los puntos A.10.6.1.1.1 al A.10.6.1.1.4.

A.10.6.2.1.2 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.

A.10.6.2.2 Operación del instrumento.

A.10.6.2.2.1 Proceder de acuerdo al A.10.6.1.2.1 al A.10.6.1.2.3.

A.10.6.2.3 Determinación.

A.10.6.2.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito, de acuerdo a 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.

A.10.6.3 Espectrometría de absorción atómica por generador de hidruros.

A.10.6.3.1 Calibración.

A.10.6.3.1.1 Proceder de acuerdo a los puntos A.10.6.1.1.1 al A.10.6.1.1.4.

A.10.6.3.1.2 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.

A.10.6.3.2 Operación del instrumento.

A.10.6.3.2.1 Proceder de acuerdo a los puntos A.10.6.1.2.1 al A.10.6.1.2.3.

A.10.6.3.3 Determinación.

A.10.6.3.3.1 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 al manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).

A.10.6.3.3.2 Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración de ácido clorhídrico al 1,5% siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

A.10.6.3.3.3 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.

A.10.6.3.3.4 Tomar un volumen conocido de la muestra dirigida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

A.10.6.4 Espectrometría de absorción atómica por vapor frío.

A.10.6.4.1 Calibración.

A.10.6.4.1.1 Proceder igual que en los puntos A.10.6.1.1.1 al A.10.6.1.1.4.

A.10.6.4.1.2 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.

A.10.6.4.2 Operación del instrumento.

A.10.6.4.2.1 Proceder de acuerdo a los puntos A.10.6.1.2.1 al A.10.6.1.2.3.

A.10.6.4.3 Determinación.

A.10.6.4.3.1 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 al manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).

A.10.6.4.3.2 Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración (solución de dilución y de reducción) siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

A.10.6.4.3.3 Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito.

A.10.6.4.3.4 Tomar 25 mL de la muestra digerida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

A.10.7 Expresión de resultados.

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:

$$\text{mg/ kg} = \frac{A \times B}{C}$$

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.

A.10.8 Informe de la prueba.

Los resultados se informarán en mg/kg o µg/kg del elemento a determinar.
