



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

CONTROL Y ANALISIS QUIMICOS
DE MEDIOS DE CULTIVOS
UTILIZADOS EN ANALISIS
BACTERIOLOGICOS

TRABAJO MONOGRAFICO

ROSARIO MARIA HERNANDEZ ABREGO
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
CLASIFICACION DE MEDIOS DE CULTIVO.....	6
REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES	10
LISTA DE MATERIAS PRIMAS	13
COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	15
CLASIFICACION DE LOS INGREDIENTES	18
PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO	20
CONTROL DE CALIDAD	22
ANALISIS QUIMICO	27
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFIA	68

I N T R O D U C C I O N

La Bacteriología surgió como una rama determinada de la ciencia a partir de Koch y Pasteur. Koch por primera vez aisló una bacteria patógena en un cultivo puro, y no solo estableció al Bacilo anthracis como la causa de una enfermedad específica del ganado vacuno, sino que estableció un método de investigación de enfermedades.

Los principios elaborados en aquel tiempo, el más importante de los cuales fué la introducción del método de la "placa fundida" para el aislamiento de cultivos puros, todavía constituye la base de la investigación en la Bacteriología. (10).

Los medios de cultivo se fabrican con el fin de promover el crecimiento y la reproducción de microorganismos. Junto con este requisito, los sustratos están formulados con el propósito de permitir el crecimiento selectivo de ciertos organismos y demostrar algunas características biológicas como: hemólisis, producción de pigmentos, formación de esporas y formación de ciertas enzimas o sistemas de enzimas. En todos los casos se suministran al organismo materiales esenciales para su crecimiento y reproducción. (31)

Es por esto que los medios de cultivo son sometidos a un minucioso control de calidad para asegurar que estos realicen adecuadamente sus funciones. Ya que los medios de cultivo están compuestos de varios ingredientes, el control de calidad se aplica primero a los ingredientes y luego al producto final, lo cual garantiza que solo aquellos productos que pasen el control de calidad serán incluidos en la preparación de medios de cultivo. (3)

El objetivo de este trabajo es el de presentar el control de calidad al que son sometidas las materias primas para la elaboración de medios de cultivo.

GENERALIDADES

Bailey (1) ha elaborado una definición práctica de los medios de cultivo y es la siguiente: "Es aquel que contenga los elementos nutricios esenciales en concentración adecuada, la necesaria cantidad de sal y el adecuado volúmen de agua; se encuentre exento de sustancias inhibidoras del organismo que se va a cultivar, tenga la consistencia deseada, la reacción (pH) conveniente para el metabolismo del cultivo".

El análisis químico de las bacterias indican que son, esencialmente plantas acuáticas cuyo protoplasma contiene los elementos químicos que se encuentran en otros tipos de proteínas vegetales. Con el fin de multiplicar las células bacterianas, en su fase anabólica, los elementos anabólicos tienen que encontrarse en su propio medio ambiente.

La estructura de muchas de estas sustancias es tan compleja que antes de que puedan ser utilizadas por las bacterias han de descomponerse en componentes mas sencillos. Dichos procesos se realizan por medio de diferentes reacciones de oxidación, reducción, desaminación, etc., las cuales son el resultado de actividades de esencial importancia. Estos cambios se atribuyen al cambio de actividades de enzimas bacterianas que son, como es evidente numerosas y variadas. Los

procesos comprendidos así como sus productos definitivos son extremadamente complejos, por ejemplo: ácidos, alcoholes, cetonas y gases que incluyen hidrógeno, bióxido de carbono, metano, etc.

Los estudios para determinar las formas de carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno de la más fácil utilización por las bacterias para su desarrollo fueron realizados por Naegeli entre 1868 y 1880. Informó que la peptona es útil para el cultivo de microorganismos debido a que su contenido en aminoácidos y otros compuestos nitrogenados que se utilizan por la bacteria con facilidad; la peptona pronto se convirtió en el constituyente más importante de los medios de cultivo.

El extracto de carne sustituye muchas veces a las infusiones de carne pero la preparación de estas sustancias las somete a la pérdida de sus factores nutritivos lábiles al calor de la misma forma que resultan afectadas las infusiones. (10)

En base a las siguientes definiciones los medios de cultivo se han dividido en la siguiente forma: (23)

I.- Agar.- medio sólido para verter en placas, con un contenido de agar del 1% o más;

- II.- Medios de cultivo.- medio semisólido, con un contenido en agar de menos de 1%.
- III.- Caldos.- medio fluído, exento de agar, que contiene productos carnicos o protéicos;
- IV.- Soluciones Nutritivas.- medio sintético, fluído exento agar.

Los medios de cultivo deshidratados se fabrican, ya sea en forma de polvo o bien en forma de granulado.

Los medios de cultivo deshidratados en forma de polvo, se fabrican principalmente por trituración y mezcla de las correspondientes sustancias, mientras que los medios de cultivo deshidratados en forma granulada son sometidos a una granulación. Este es un procedimiento por el que se consigue una deshidratación extrema. Se utiliza en los medios de cultivo que contienen sustancias particularmente higroscópicas y que necesitan por lo tanto, una desecación muy intensa. El polvo del medio de cultivo tratado como consecuencia del procedimiento, se aglomera en pequeños gránulos. (23)

CLASIFICACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo en virtud de sus ingredientes, pueden ser seleccionados con fines generales y específicos. (Bailey)

De acuerdo con Robert E. Duval los medios se clasifican según diferentes criterios, pero todos superponibles. (8)

1.- Su Consistencia:

- a) Líquidos
- b) Sólidos.- importancia muy grande para el aislamiento y purificación de las bacterias.

2.- El modo de esterilización:

- a) La mayoría de las veces por calentamiento a 110°-120°C en el autoclave.
- b) Tindalización.- diversos calentamientos repetidos entre 56° y 100°C.

3.- Su Utilización:

a) Medios Básicos

Estos son los medios que contienen extractos de carne, infusiones, peptonas, agua y sales. Los extractos de carne y las infusiones proveen a los microorganismos aminoácidos, vitaminas, sales y trazas de carbón, nitrógeno y otros elementos. Sales, generalmente cloruro de sodio, es útil para mantener la isotonicidad re-

querida para el mantenimiento de la constante de presión osmótica. Por ejemplo: (9)

- 1) Agua Peptonada (Lynch).- La peptona está compuesta por proteosa, peptona, polipéptidos y aminoácidos.
- 2) Agar Nutritivo.- consiste en extracto de carne, peptona, agar y agua.

b) Medios Enriquecidos

A diferencia de los medios básicos los medios enriquecidos son aquellos a los que se les agrega fluidos corporales, vitaminas, aminoácidos, proteínas o cualquier otra sustancia nutritiva. Por ejemplo; (9)

- 1) Agar Sangre.- Se añade del 5 al 10% de sangre desfibrinada estéril al agar nutritivo derretido, que ha sido enfriado a 45°C.
- 2) Medio de Loeffler.- Es sumamente enriquecido por suero, conteniendo un 75% de este y un 25% de caldo glucosado.

c) Medios Selectivos

Deben su importancia al hecho de que contienen sustancias que impiden el desarrollo de cualquier bacteria que no sea la que este bajo investigación. Se emplean diferentes sustancias, por ejemplo: las sales biliares, en un medio impiden el desarrollo de los microbios no entéricos, el verde de malaquita es inhibidor de los organismos que pertenecen al grupo Mycobacte-

reaceae y el pH ácido permite el desarrollo de hongos pero inhibe las bacterias. En algunos medios se incluye también suplementos para estimular el desarrollo de algunas bacterias específicas, por ejemplo el glicerol en Lowenstein-Jensen. Ejemplos de estos medios son los siguientes:

- 1) Medio de McConkey.- Contiene una peptona como base nutriente: taurocolato de sodio, una sal biliar que impide el desarrollo de microorganismos que no sean entéricos; agar con solidificante; lactosa que es el azúcar que caracteriza el grupo entérico, el rojo neutro como indicador de la fermentación de la lactosa.
- 2) Agar Salmonella Shigella.- Es semejante al anterior pero además de una sal biliar contiene verde brillante que impide el desarrollo de coliformes aunque permita el desarrollo de salmonella y shigella.

d) Medios a Base de Carbohidratos y otras Sustancias Bioquímicas.

Básicamente constan de agua peptonada enriquecida con 1% de azúcar, para estudios de fermentación y de oxidación se añade un indicador. El cambio de color indica la producción de ácido. El metabolismo de los carbohidratos por las bacterias puede producir diferentes sustancias que incluyen gases (CO_2 y H_2) alcoholes y áci-

dos grasos. Por ejemplo:

- 1) Agar con Urea.- El medio de Christensen contiene glucosa y peptona, que permite el desarrollo de gran variedad de microorganismos que producen ureasa dando lugar a carbonato de amonio y el indicador se vuelve rojo.
- 2) Agar con Citrato.- El medio de citrato de Koser modificado por Simmons contiene citrato de sodio y azul de timol como indicador. La única fuente de carbono en este medio es el citrato. Los microorganismos que pueden usar el citrato como fuente de carbono se desarrollan bien y el indicador se vuelve azul.

e) Medio de Transporte

- 1) Solución salina glicerizada amortiguada.- Este medio es útil para el transporte de muestras de heces cuando se sospecha de infección por salmonella y shigella y se requiere preservación.
- 2) Medio de Stuart.- Este medio es semisólido contiene tioglicolato, glicerofosfato y cloruro de calcio. El azul de metileno es un indicador de la reducción por el tioglicolato. (25)

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Todos los organismos vivientes requieren de fuentes de energía para su desarrollo. Por ejemplo aquellos que utilizan la energía solar se llaman fotótrofos, los que utilizan la energía química liberada de las reacciones de óxido-reducción se llaman quimiotrofos. Así como necesitan de energía también necesitan fuentes de carbono, nitrógeno y sales minerales. (30)

Las necesidades nutritivas se pueden clasificar en tres ordenes: elementales, energéticas y específicas, factores de crecimiento. (7)

Necesidades Elementales

Son los diversos elementos que entran en la composición de las sustancias microbianas, "materia prima" de las proteínas, ácidos nucleicos, glúcidos, lípidos.

C,H,N,O, son necesarios en cantidades relativamente importantes; S, P, en cantidades un poco inferiores.

Son necesarias también; K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Mo. Entre éstos últimos, algunos son necesarios al estado de indicios (Mn, Zn, Co, Cu, Mo).

Fuentes de Carbón

Existen grandes variaciones en la fuente de carbón utilizables, pues esta va íntimamente relacionada al metabolismo

energético, y por otra parte porque las capacidades de degradación y de síntesis de los diferentes microorganismos varían grandemente. Algunas bacterias pueden utilizar sustancias relativamente simples ácido acético, citrato sódico, alcohol.

Fuentes de Nitrógeno

Algunas bacterias raras utilizan el nitrógeno atmosférico. La mayor parte exige el nitrógeno combinado pero inorgánico, esencialmente NH_3 o sales de amonio.

Fuentes de Azufre

Prácticamente todos los organismos utilizan el azufre de los sulfatos. Algunos exigen el azufre reducido (sulfuros, tiosulfuros). Para ciertas bacterias el azufre debe ser proporcionado en forma orgánica, lo cual se confunde con su necesidad en factores de crecimiento (metionina, cisteína, biotina).

Fuente de Fósforo

Todas las bacterias utilizan el fósforo de los fosfatos. No parece que existan exigencias en fósforo orgánico.

Necesidades Energéticas.

Son indispensables para cubrir los gastos que lleva consigo la síntesis.

Algunos pueden obtener su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos (H_2 ; compuestos nitrogenados- NH_3 , nitritos; compuestos azufrados- SH_2, S , tiosulfato; hierro).

La mayoría de las bacterias utiliza la energía química liberada de las reacciones óxido-reducción.

Necesidades Específicas en Factores de Crecimiento.

Sobre las bases de las necesidades elementales y energéticas se preparan ciertos medios.

No todas las bacterias son capaces de crecer en tales medios. Hace falta suministrarles un cierto número de compuestos bien definidos que ellas no sean capaces de sintetizar, tales como vitaminas del complejo B (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, biotina). Estas suministran enzimas que las bacterias no son capaces de sintetizar. Otros factores necesarios son aminoácidos, purinas, pirimidinas. (25)

LISTA DE ALGUNAS MATERIAS PRIMAS EMPLEADAS EN LA FABRICACION
DE MEDIOS DE CULTIVO

Agar-Agar

Acido Cítrico

Acetato de Sodio

Acido Tartárico

Almidón

Azida de Sodio

Azul de Bromotimol

Azul de Metileno

Bicarbonato de Sodio

Bilis de Buey

Bromuro de Amonio

Caseína Hidrolizada

L-Cistina

Citrato de Sodio

Cloruro de Calcio

Cloruro de Sodio

Cloruro de Litio

Cloruro de Potasio

Cloranfenicol

D (+) Glucosa

Deshidrógeno Fosfato Amonio

Extracto de Músculo de Corazón

Extracto de Carne de Buey

Extracto de Malta
Extracto de Levadura
Glicocola
Guanina
Infusión de Carne
Lactosa
Maltosa
Manitol
Ornitina
Peptona de Caseína
Peptona de Soya
Peptona de Carne
Rojo de Fenol
Rojo Neutro
Sacarosa
Sales Biliares
Desoxicolato de Sodio
Sulfato de Potasio
Sulfato de He (III)
Sulfato de Sodio
Tioglicolato de Sodio
Urea
Violeta de Cristal
Xantinas

COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La selección de ingredientes que habrán de usarse, es muy importante para tener éxito en la preparación de los medios de cultivo microbiológicos. Los productos de calidad superior producirán a su vez medios de cultivo superiores y disminuirán el tiempo de trabajo requerido para su preparación. (Difco)

Harriette D. Vera y Morris Dumoff nos dicen que la composición base de los medios de cultivo es la siguiente: peptonas, extractos e infusiones, agentes solidificantes, indicadores, agentes selectivos, agentes reductores e indicadores.

Para que un medio sea adecuado debe existir un equilibrio de nutrientes, inhibidores y base para el crecimiento selectivo de microorganismos.

Por lo que un medio de cultivo esta compuesto de:

- a) Soporte
- b) Nutrientes
- c) Minerales
- d) Vitaminas
- e) Indicadores
- f) Inhibidores

a) SOPORTE

La introducción del agar-agar como agente solidificante para los medios de cultivo, constituyó un importante adelanto en la ciencia de Bacteriología. Los medios de agar han hecho posible muchos de los adelantos de la Bacteriología, porque el empleo de estos medios sólidos han abierto el camino para nuestros métodos actuales de cultivos puros para el aislamiento y estudios.

b) NUTRIENTES

- 1.- Aminoácidos.- son sustancias químicamente puros libres de materiales tóxicos que interfieren con los metabolismos microbianos. Se les utiliza ampliamente, incorporados a los medios de cultivo de composición química definida empleados en los estudios nutricionales bacterianos y de otros microorganismos.
- 2.- Los carbohidratos y glucósidos son muy usados como fuente de energía por las bacterias. Las infusiones de carne se solían usar en un principio junto con peptenas como el procedimiento nutritivo de medios de cultivo. Más tarde se encontró que para muchos procedimientos de rutina, el extracto de carne, daba resultados igual de buenos y tenía la ventaja indiscutible de una mayor facilidad de preparación, mayor uniformidad.

c) MINERALES

Son importantes para la conservación de la presión osmótica. Se trabajó en medios con condiciones de isotonía. Ciertas bacterias necesitan una concentración salina muy fuerte (bacterias halófilas).

d) VITAMINAS

Son factores de crecimiento requeridas por algunas bacterias. Estas suministran enzimas necesarias que las bacterias son incapaces de sintetizar.

e) INDICADORES

Los colorantes indicadores son de importancia capital en la preparación de medios de cultivo diferenciales. Actúan como indicadores de los cambios de acidez o de alcalinidad que experimenta el medio.

f) INHIBIDORES

Los colorantes pueden también actuar como inhibidores que impiden o detienen el desarrollo de determinado grupo de microorganismos comensales que restringen, o impiden el crecimiento del germen que está en estudio.

CLASIFICACION DE LOS INGREDIENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

A) S O P O R T E

- 1) Agar-Agar
- 2) Agarosa
- 3) Gelatina

B) N U T R I E N T E S

- 1) Aminoácidos:
 - a) L-Asparagina
 - b) L-Cistina
 - c) L-Ornitina
 - d) Triptofano
- 2) Carbohidratos
y Glúcidos:
 - a) Dextrosa
 - b) Lactosa
 - c) Maltosa
 - d) Sacarosa
 - e) Salicina
 - f) Extracto de Malta
- 3) Peptonas:
 - a) Peptona de Carne
 - b) Peptona de Caseína
 - c) Peptona de Soya
 - d) Peptona Biotriptata
 - e) Polipeptona
- 4) Extractos:
 - a) Extracto de Levadura
 - b) Extracto de Carne

C) MINERALES

- 1) Na
- 2) K
- 3) Li
- 4) Mg

D) VITAMINAS

- 1) Biotina
- 2) Acido Fólico
- 3) Riboflavina

E) INDICADORES

- 1) Azul de Bromotimol
- 2) Azul de Metileno
- 3) Eosina Y
- 4) Erioglaucina
- 5) Fucsina Acída
- 6) Fucsina Básica
- 7) Rojo de Fenol
- 8) Verde Brillante

F) INHIBIDORES

- 1) Colorantes
- 2) Sales Biliares
- 3) Antibióticos

(5) y (12)

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

En general se preparan los medios de cultivo deshidratados en forma de polvo, granulados y tabletas.

La forma más usual es la de polvo, ya que su preparación es relativamente fácil y económica. Los componentes del medio deben mezclarse adecuadamente y posteriormente homogeneizarse finamente, moliéndolo en un molino especial (a base de unas esferas de porcelana de 10 cm de diámetro). Este tratamiento dura aproximadamente 20 horas.

En este tipo de medios es importante que se obtenga una granulación homogénea, ya que de otra forma pueden tener lugar sedimentaciones de las partículas más pesadas, durante el tiempo que permanecen en el envase que las contiene.

Con frecuencia se muelen por separado los colorantes, en caso de requerirse, y posteriormente se mezclan con el resto de los componentes del medio. Como precaución especial se recomienda que antes de ser usados, los medios de cultivo en forma de polvo se agiten vigorosamente.

Un problema con algunos medios de cultivo elaborados como polvo es en algunos casos, aún estando en recipientes

cerrados a temperaturas elevadas tienen la tendencia marcada de algutinarse o endurecerse. Esto se debe a su alto contenido en agua (entre 10 y 20 %). En el agar tiene lugar un intercambio entre el agar y la peptona u otras sustancias higroscópicas, que puedan estar presentes.

Los medios de cultivo granulados para su preparación representa aún mas problema. Los distintos componentes deben procesarse para obtener una pasta, por medio de una mezcla azeotrópica, por ejemplo cloroformo. El ajuste de pH es relativamente difícil y por lo general se emplea carbonato de sodio o ácido cítrico. La pasta así preparada se pasa a través de una prenda con horadaciones, obteniéndose filamentos finos, largos que posteriormente se secan en un secador especial que garantiza el granulado uniforme y a la vez la ausencia de polvo.

Desde el punto de vista calidad, los medios de cultivo granulados son mejores definitivamente, ya que presentan ventajas notables sobre los medios en forma de polvo. Sin embargo por razones de economía no todos los medios de cultivo se elaboran en forma de granulado y por ello es posible que algunos medios de cultivo líquidos o sencillos en su composición continúan elaborándose como polvo. (24)

CONTROL DE CALIDAD

Por tratarse de productos a base de material de origen biológico y de naturaleza no definida en muchos casos, como el agar, peptonas, hidrolizados de caseína o proteínas, etc. Por estas razones no es sencillo hablar de estandarización de los medios.

Para cualquiera de los productos básicos mencionados, por ejemplo peptona, extracto de carne de origen animal, existen variaciones no solo geográficas y raciales, sino también de alimentación y mantenimiento de los animales, métodos de procesamiento, obtención y purificación de ellos, que son decisivas para definir la calidad del producto.

Por ejemplo en algunos casos el material biológico del cual deben obtenerse estos productos es de tal naturaleza, como la carne e incluso a temperaturas bajas, no es posible evitar su degradación enzimática.

Por otro lado, no es posible garantizar que un producto de esta naturaleza, por ejemplo un medio de cultivo o una base posea una homogeneidad y calidad uniforme para los diferentes lotes.

Solo es posible obtener una uniformidad relativa entre diferentes lotes, por medio de mezclas o adiciones específicas en cada caso que permita lograr y garantizar una calidad nutricional o biológica relativa.

Como único criterio de calidad y estandarización quedan los controles estrictos al que el fabricante del medio debe someter no solo las bases empleadas, sino también cada lote de medio que produzca.

Este control involucra varios conceptos:

- 1.- Selección del material a emplear
- 2.- Procesos de fabricación
- 3.- Pruebas sobre el producto final

Todos estos controles requieren tanto de pruebas fisicoquímicas como bacteriológicas, pruebas adicionales y complementarias.

Entre las pruebas fisicoquímicas se encuentran: aspecto, color, pH, que para mantener este rango se usan buffers, y se ajusta a la neutralidad, claridad por nefelometría, color por colorimetría, temperatura por el punto de fusión y gelación, pérdida por secado, residuo de calcinación, proteínas coagulables, nitrógeno total, contenido de triptofano y sulfuro.

Las pruebas bacteriológicas comprenden, pruebas con cepas hemolíticas y no hemolíticas, determinación del número total de gérmenes por vaciado en aerobiosis, ausencia de gérmenes termorresistentes, curva de crecimiento, identificación de indol y producción de H_2S . (3) y (24)

Entre las pruebas complementarias están la determinación cromatográfica de aminoácidos libres, polipéptidos y vitaminas. Sin embargo, aún así pueden presentarse variaciones en cuanto al aspecto físico de los mismos. Un ejemplo de esto es la peptona que por acción del calor durante el secado puede presentar variaciones de tonalidad.

Ante la dificultad de estandarizar un medio de cultivo, en el mismo sentido que se hace en otras áreas de la química analítica, se ha tratado de hacer de acuerdo a criterios biológicos.

A continuación se presenta el certificado de control de calidad de BBL, que realiza para cada medio de cultivo.



Quality Control
Laboratory
Prepared Media

MEDIUM:

CHOCOLATE AGAR (CC AGAR) WITH
HEMOGLOBIN AND ISOVITALEX

PLATED MEDIUM

THIS IS TO CERTIFY that representative samples of each lot of plates are tested in the Quality Control Laboratory according to the following procedure:

I. Product Description.

- A. Nutrient Base. Pretested dehydrated GC Agar Base. See sample Quality Control Certificate on reverse side.
- B. Additives. Pretested hemoglobin and IsoVitaleX Enrichment.
- C. Petri Dishes. Falcon disposable dishes, pretested for sterility and performance.

II. Control Tests. The following tests are performed with representative plates of each lot:

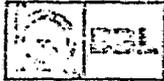
- A. Bacteriological Performance Test. Plates representative of the aseptic filling operation are inoculated with dilutions of the cultures listed below. Plates are incubated at 35°C and examined at 24 and 48 hours for satisfactory growth and colony size.
 - 1. Neisseria gonorrhoeae - two strains
 - 2. Neisseria meningitidis.
 - 3. Haemophilus influenzae - two strains

Note: Twelve cultures are used in testing the dehydrated GC Agar Base.

- B. Appearance. Representative plates are examined for absence of obvious physical defects such as incorrect color, foreign material, bubbles, lumps, and uneven fill.
- C. Firmness. Firmness of plates employed for inoculation is noted during this procedure.
- D. pH. The pH is determined electrometrically and should be 7.2 ± 0.2 .
- E. Sterility. Representative plates are incubated and examined for contamination.

All lots of prepared plates must be satisfactory with respect to the above control tests to be released for distribution.

November 1971



Lot 107-606

QUALITY CONTROL CERTIFICATE

G C AGAR BASE

This is to certify that representative material of this lot was tested in the Quality Control Laboratory. The following data were obtained from selected cultures.

Method	Microbiological Plate Test
With added Hemogoblin, IsoVitalX	12
Growth	Excellent
Test Culture	Hemophilus influenzae 6 Neisseria gonorrhoea 4 Neisseria meningitidis 1 Neisseria catarrhalis 1

pH after autoclaving and cooling to room temperature = 7.3

LABORATORY REPORT
Control No. 92-135

SATISFACTORY
July 1971

Cultures are changed from time to time as strains are found which provide a greater challenge.

BBL

Division of Becton, Dickinson and Company

Cockeysville, Maryland 21030, U.S.A.

PRINTED IN U.S.A.

ANALISIS QUIMICO

Las pruebas químicas a las que son sometidas las materias primas son las siguientes:

a) Identificación de los principales iones:

Ca

Carbonatos y Bicarbonatos

Citratos

Cloruros

Mg

Na

Tartratos

Tiosulfatos

b) Solubilidad

La solubilidad, es una importante propiedad considerada que sirve como indicación cualitativa de su pureza y como factor determinante de su actividad. El estudio de la solubilidad de una materia prima esta determinada solamente de una forma cualitativa.

c) Determinación de Agua

Tomando en consideración que muchas materias primas contienen agua de hidratación o de absorción es importante la

determinación del contenido de electrolitos para verificar que se ajuste a los patrones de la farmacopea.

d) Determinación de pH

Los límites de pH se establecen para aquellas materias en las cuales la actividad del ion hidrógeno redonda en su estabilidad química y física, o bien en su actividad farmacológica.

e) Residuo de la Ignición

Es la cantidad de materia no volátil, exenta de carbón que resulta de la completa combustión de una substancia.

f) Pérdida al Secado

g) Límite de Cloruros y Sulfatos

h) Límite de Fierro

i) Límite de Materiales Pesados

j) Valoración de Nitrógeno por el metodo de Kjeldahl (13)

A continuación se presenta algunas materias primas dando las siguientes referencias:

- 1) Breve descripción del ingrediente a analizar.
- 2) Peso Molecular.
- 3) Fórmula.
- 4) Descripción.
- 5) Solubilidad.
- 6) Análisis.

AGAR-AGAR

El agar-agar es un producto natural que se obtiene de regiones como Japón, Nueva Zelanda, Portugal y México, se extrae del alga *Gelidium cartilagineum* y de las algas rojas con agua caliente y se deja solidificar en tiras que se secan y blanquean al sol. (19)

Químicamente se trata de un poligalactósido, en su estado natural o nativo, contiene una serie de agentes inhibitorios que pueden ser tóxicos, por la cual para garantizar su calidad e idoneidad en el empleo de los medios de cultivo, debe ser sometido a procesos de purificación bastante elaborados. (24)

DESCRIPCION

Haces de tiras delgadas, membranosas, translúcidas, de color anaranjado amarillento, son resistentes cuando están húmedas y quebradizas cuando están secas. Pueden ser aglutinadas en forma granulada o escamosa. Son inodoras y con olor marino y producen sensación mucilaginosa en la lengua.

ANALISIS

Con solución reactiva de yodo, algunos de los fragmentos toma el color negro azulado y muestran algunas áreas rojizas y violetas. Una parte del agar se hierve con 65 veces

su peso en agua, durante 10 minutos, se agita constantemente y se ajusta a una concentración del 1.5% en peso: se forma un líquido claro que congela entre 32°C y 39°C produciendo un gel consistente que funde, cuando menos a 85°C.

ESTABILIDAD DEL GEL

Esta característica es importante al sembrar (inocular) o extender un cultivo sobre la superficie del medio.

Como sabemos la dureza o consistencia del medio, depende de la naturaleza y concentración del agar empleado.

A fin de evitar un rompimiento que pueda ocurrir en la superficie del agar, debido a los medios sumamente blandos, que contienen un bajo contenido de agar; en la actualidad se controla la estabilidad del medio de acuerdo a metodología previamente establecida.

Se emplean dos dispositivos diseñados por Heinken y otro por Costin.

El primero de estos métodos consiste en un aparato en el cual, en la parte inferior de una cápsula (o de un vidrio de reloj) se encuentra una varilla con una pequeña esfera en la punta. La esfera se apoya sobre la superficie del agar que se desea probar y sobre la cápsula se colocan pesas cada vez mayores.

La consistencia del agar se determina cuando la superficie del mismo sufre la presión por la esfera.

Un agar que posea una resistencia de 50 g/min (1.2%) es adecuado para garantizar una estabilidad correcta aún en el caso de emplear concentraciones menores de agar.

Recientemente Costin diseñó un dispositivo que permite medir simultáneamente la estabilidad y la elasticidad de los geles empleados en los medios de cultivo y en general en cualquier agente gelificante.

Este aparato tiene una sensibilidad de aproximadamente 2 g y permite medir consistencias comprendidas entre 0 y 200 g. Para los medios de cultivo usuales a base de agar, con este dispositivo es posible estandarizar la consistencia de los mismos, con una variación no mayor de 1.35. Este método posee además una rapidez tal, que le permite ser aplicado rutinariamente (40-60 seg).

Una temperatura de solidificación elevada tiene la ventaja de gelificar rápidamente y reducir las posibilidades de contaminación en que en ocasiones se pueden observar en las placas de un agar de bajo punto de solidificación. (27)

GELATINA

La gelatina es un producto obtenido por la hidrólisis parcial de la colágena derivada de la piel, tejido blanco conectivo y huesos de animales. (32)

Los huesos no se usan en estado natural sino que se les somete a un proceso químico obteniéndose un producto conocido como osteína, que constituye la sustancia orgánica de los huesos. La osteína se somete a un tratamiento que consiste en lavado, aplicación de álcali para destruir la menor taza de grasas. nuevo lavado aplicación de un ácido para destruir el álcali y un lavado final para obtener el producto neutro.

DESCRIPCION

Hojas, hojuelas o tiras de color amarillo pálido o ambar.

SOLUBILIDAD

No es soluble en agua fría, soluble en agua caliente, ácido acético y en mezclas calientes de agua y glicerina.

ANALISIS

A una solución (1 en 100) agregar trinitrofenol o una solución de dicromato de potasio (1 en 15) previamente mez-

clada con un cuarto del volúmen de ácido clorhídrico 3N: formandose un precipitado amarillo.

A una solución (1 en 5000) añadir ácido tánico: se produce una turbiedad. (35)

EXTRACTO DE CARNE DE BUEY

Es el concentrado del caldo de carne obtenido cociendo con agua, carne de buey, fresca, sana, libre de grasa y tendones y evaporándolo a baja temperatura, generalmente al vacío hasta obtener un residuo espeso, pastoso, de color amarillo café obscuro, ligeramente ácido con olor y sabor agradables. Se conserva en recipientes oscuros herméticamente cerrados.

Para las pruebas siguientes se prepara una solución disolviendo 25 g en agua hasta 250 ml. Esta solución es clara y libre de todo sedimento.

ANALISIS

Ensayo para contenido de nitrógeno de sustancias solubles en alcohol.- en un matraz de Kjeldahl de 500 ml se deposita una porción de alcohol filtrado y de los lavados procedentes de la prueba "sustancias insolubles en alcohol", correspondiente a 1 g de los sólidos solubles en alcohol.

Se agregan aproximadamente 10 g de sulfato de potasio pulverizado y 20 ml de ácido sulfúrico. La mezcla se calienta a baja temperatura hasta que cesa la formación de espuma; se aumenta la temperatura y se hierve hasta que toma una coloración amarilla pálida o es casi incolora. El matraz se enfría se agregan cerca de 250 ml de agua y cuidadosamente se agrega solución 3:10 de hidróxido de sodio hasta alcalinizar y se agrega un exceso de 5 ml. Se conecta el matraz por medio de una trampa para rocío a un refrigerante cuyo tubo de salida está sumergido bajo la superficie de 50 ml de solución 0.1 N de ácido sulfúrico, contenido en un matraz receptor. Se destila la mezcla hasta aproximadamente 100 ml del destilado se haya depositado en la solución ácida. Se agrega solución indicadora de rojo de metilo se titula el exceso de ácido con solución 0.1 N de hidróxido de sodio. Cada ml de solución 0.1 N de ácido sulfúrico equivale a 1.401 mg de N. Se encuentra no menos de 60 mg de nitrógeno. (13)

EXTRACTO DE LEVADURA

Peptona derivada de células de levadura. Contiene vitaminas y otros factores de crecimiento incluyendo, purinas y pirimidinas. (32)

DESCRIPCIÓN

Es un polvo café o amarillo rojizo, soluble en agua.

olor característico, no putrefacto, sus soluciones son de color café o café amarillento y dando reacción ácida (35)

ANALISIS

Determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl, explicado en el análisis para el extracto de carne de buey.

Deberá contener entre 7.2 y 9.5% de Nitrógeno, usando la muestra previamente desecada a 105°C hasta peso constante.

PEPTONA DESECADA

Se refiere a una serie de compuestos protéicos obtenidos por hidrólisis enzimática de una proteína, y constituidos por mezclas de aminoácidos y péptidos puede variarse seleccionando la enzima y el método de hidrólisis adecuada.
(31)

DESCRIPCION

Polvo rojizo amarillento a café, de olor característico a carne pero no pútrido.

ANALISIS

Contenido de nitrógeno.- Se determina por el método de Kjeldahl, el mismo que se empleó para la determinación de nitrógeno en el extracto de carne de buey.

En una muestra previamente desecada a 105°C, hasta peso constante; se encuentra del 14.2 al 15.5% de nitrógeno que corresponde cuando menos al 89% de proteínas. (13)

PEPTONA DE CASEINA

Es un digerido pancreático de caseína, adecuado para el cultivo de muchos grupos de bacterias. (5)

DESCRIPCION

Polvo grisáceo con olor característico pero, no putrefacto.

SOLUBILIDAD

Soluble en agua; insoluble en alcohol y éter.

ANALISIS

Contenido de Nitrógeno.- Se determina por el método de Kjeldahl, explicado anteriormente.

SALES BILIARES

El principal constituyente de bilis de buey es el desoxicolato de sodio, determinado como ácido cólico.

SOLUBILIDAD

Soluble en agua y en alcohol; la solución produce es-

puma abundante cuando se agita.

ANALISIS

Solución tipo de ácido cólico. Se disuelven 50 mg de ácido cólico en ácido acético a 60%, se diluye hasta 100 ml y se mezcla. Se conserva en refrigeración.

Se disuelve un gramo de la muestra en 50 ml de ácido acético al 60%. Se filtra si es necesario dentro de un matraz volumétrico de 100 ml; se lava el recipiente original y el filtro, con pequeñas porciones de ácido acético al 60%, que se agregan al filtrado, diluyendo con la misma solución de ácido hasta el aforo y se mezcla. Con pipeta se toma 10 ml de esta solución se diluyen con ácido acético al 60%, hasta 100 ml y se mezclan.

Se depositan separadamente en dos tubos de comparación, medidos con pipeta, a un ml de solución tipo m de ácido cólico y un ml de la solución de la muestra. A cada uno se le agrega un ml de solución 1:100 de furfural, recientemente preparado. Inmediatamente se ponen los tubos en baño de hielo durante 5 min. y se agrega, a cada uno, 13 ml de ácido sulfúrico diluído que se prepara mezclando cuidadosamente 50 ml de ácido sulfúrico sobre 65 ml de agua. Se mezcla el contenido de cada tubo y se ponen ambas en baño de vapor

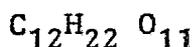
manteniendo a 70° durante 10 min. Inmediatamente se pasan los tubos al baño de hielo durante 2 min. y se determina la absorbancia de cada solución a la longitud de onda de la absorbancia máxima, cercana a 670 nm, en un espectrofotómetro adecuado. Se calcula la cantidad en mg de ácido cólico ($C_{24}H_{40}O_5$) contenido en el peso de la muestra tomada, por medio de la fórmula $500 (A_U/A_S)$, en la que A_U y A_S son las absorbancias de la solución tipo ácido cólico, respectivamente.

(13)

SACAROSA

La sacarosa o azúcar de caña es un disacárido formado por glucosa y fructuosa. Esta también es llamada azúcar de caña. Abunda en el reino vegetal. Es un azúcar no reductor.

FORMULA



PESO MOLECULAR

186

DESCRIPCION

Cristales incoloros o blancos; masas o terrones blancos, cristalinos, o polvo cristalino blanco. Inodoro, sabor dulce y estable al aire.

SOLUBILIDAD

Muy soluble en agua y en mayor grado en agua hirviente, poco soluble en alcohol, insoluble en cloroformo y éter.

ANALISIS

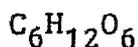
Se disuelven 20 g de sacarosa en suficiente agua y la solución se diluye hasta 100 ml, se filtra si es necesario. En un vaso de precipitados de 250 ml, se pasan 50 ml del líquido claro y 50 ml de solución reactiva de tartrato cúprico alcalino, se tapa el vaso de precipitados con un vidrio de reloj, se calienta la muestra de manera que se necesitan 4 min para alcanzar el punto de ebullición y se hierve du-

rante 2 min. exactamente. En seguida se agregan 100 ml de agua recién hervida y fría e inmediatamente se recoge el precipitado óxido cuproso en un crisol tarado cubierto por una capa de amianto la que previamente se ha lavado con agua caliente y después con 10 ml de alcohol y 10 ml de éter sucesivamente. El crisol se deseca a 105° durante 30 minutos y se pesa antes de recoger el precipitado de óxido cuproso. Se lava el residuo en el filtro con agua caliente, en seguida con 10 ml de alcohol y finalmente con 10 ml de éter se deseca a 105° durante una hora; el peso del óxido cuproso es cuando más de 112 mg. (13)

GLUCOSA

La glucosa se encuentra libre en la miel, en las frutas dulces, en las hojas y tubérculos de casi todas las plantas. Se encuentran formando numerosos glucósidos, disacáridos (lactosa, sacarosa, maltosa). Es el más extendido y el de mayor importancia entre todos los azúcares. (14)

FORMULA



PESO MOLECULAR

180.1

DESCRIPCION

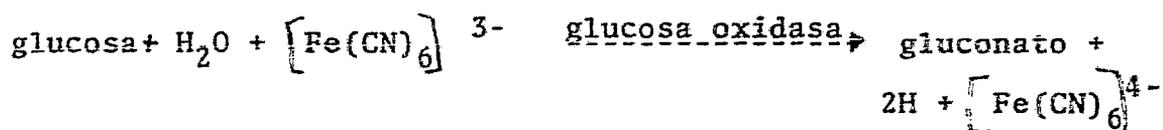
Cristales blancos; los que tienen agua se ablandan calentados a 60° y funden hasta 80-82°, la mitad de dulce

que la sacarosa.

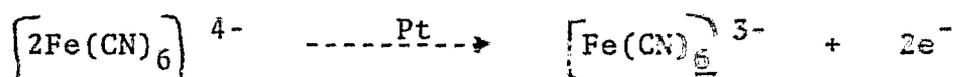
ANALISIS

El análisis de la glucosa se lleva a cabo por medio de un sensor enzimático electroquímico, que esta compuesto de la siguiente forma: un electrodo de platino que contiene la enzima (glucosa oxidasa) y esta cubierto por una membrana semipermeable, la cual va a permitir la difusión de sustancias de bajo peso molecular como glucosa, ácido glucónico, aceptor de electrones.

El principio de la medición se basa en la oxidación específica de la glucosa a ácido glucónico en la presencia de la glucosa oxidasa y el hexacianoferrato (III) como aceptor de electrones de acuerdo con:



El hexacianoferrato (II) formado en esta reacción es reoxidado en el electrodo de platino de acuerdo a:



Para compensar las otras sustancias reductoras presentes en la muestra se hace una lectura diferencial entre el sensor

de la glucosa y un electrodo auxiliar localizado en el sistema electrodo-contador. Por esta técnica es posible corregir el efecto de aquellas sustancias reductoras las cuales pueden oxidar directamente al electrodo de platino, o pudiera causar una interferencia debido a la reducción del hexacianoferrato (III). (30)

MANITOL

Alcohol derivado de hidratos de carbono. Es el alcohol que corresponde a la manosa. Esta extensamente distribuido en el reino vegetal y se encuentra en estado libre. (21)

DESCRIPCION

Cristales ortorómbicos de color blanco cremoso, sabor dulce.

SOLUBILIDAD

1 g se disuelve en 5.5 ml de agua en 83 ml de alcohol, más soluble en agua caliente, insoluble en éter, soluble en piridina y en soluciones álcalis. (18)

ANALISIS

Adicionar 5 gotas de solución saturada de manitol a 1 ml de solución reactiva de cloruro férrico. Adicionar 5 gotas de agua a un segundo tubo conteniendo 1 ml de solución reac-

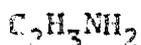
tiva de cloruro férrico. Adicionar 5 gotas de hidróxido de sodio 5N a cada tubo. Se produce un precipitado café en el tubo que no contiene manitol y un precipitado amarillo en el tubo con manitol. Agitar vigorosamente los tubos si produce una solución, dará en el tubo conteniendo manitol y permanece el precipitado en el otro tubo, al adicionar mayor cantidad de NaOH 5 N no se produce precipitado en el tubo que contiene manitol pero si en el otro tubo.

A 500 mg de manitol en un tubo de ensayo adicionar 3 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina. Calentar la mezcla en un baño de agua hirviente por 15 minutos y agitar hasta disolución completa. Enfriar la mezcla, adicionar 20 ml de agua, mezclar y dejar reposar 5 minutos. Filtrar y desecar el precipitado obtenido a 60°C, sobre vacío durante 1 hr. (6)

GLICINA

La glicina es uno de los compuestos fundamentales y más sencillos de los albuminoides. Abunda en la cola de pescado (gernetina) que contiene hasta 25%. (17)

FORMULA



PESO MOLECULAR

75

ANALISIS

Se disuelve 100 gramos de ácido monocloroacético en 35 ml de agua y se vierte la solución a 15° sobre un litro de amoníaco concentrado, agitando fuertemente. Se deja el matraz tapado durante 24 hrs. y se concentra a fuego directo en una vitrina hasta que el olor a amoníaco desaparezca. La solución residual se hierve en un matraz con hidróxido cúprico recién precipitado, el cual se prepara mezclando una solución de 150 gramos de cobre cristalizado en 550 ml de agua con 200 ml de sosa al 15% y lavando por decantación con agua. La solución azul intensa del glucolato de cobre se concentra para que se cristalice o, mejor aún, se evapora a seco en baño maría, se disuelve el residuo en 100 ml de agua y la solución se le agrega 200 ml de alcohol. Así precipita casi todo el glucolato de cobre se enjuaga al cabo de 24 hrs. Se lava sucesivamente con alcohol de 60°, de 80° y 90° hasta que desaparezca la reacción de cloro (procedente del NH_4Cl) y hasta que el alcohol salga incoloro, lo que ordinariamente suele coincidir con dicha desaparición. Para obtener la glucocola de la sal de cobre, esta se disuelve en agua, se añade un poco de hidróxido de aluminio recién precipitado, se satura la solución con H_2S y se hierve algunos minutos. El CuS se separa entonces fácilmente se enjuaga y se lava con agua hervida que contenga H_2S hasta que una prueba del filtrado, hervida con un

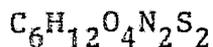
poco de óxido cúprico permanezca incolora, concentrando el líquido filtrado, cristaliza la glucocola en cristales incoloros que, a veces contienen pequeña cantidad de un compuesto amoníaco. Si así ocurre, se hierve la solución con cal viva hasta que desaprezca el olor de amoníaco, se precipita la cal disuelta con la cantidad exacta de carbonato de amonio y se concentra para que cristalice. (14)

L-CISTINA

Por hidrólisis ácida de las sustancias albuminoides queratínicas (garras, uñas, plumas, cuernos, pelos) resulta entre otras sustancias cistina.

Las queratinas son un tipo de escleroproteínas (albuminoides de sostén) muy insolubles, difícilmente hidrolizables, que no se atacan por los fermentos digestivos y que, desde un punto de vista químico se caracteriza precisamente por su alto contenido en azufre, que se encuentra en forma de cistina.

FORMULA



PESO MOLECULAR

240.29

ANALISIS

100 g de plumas o de cabellos se ponen en un matraz redondo con 300 ml de ácido clorhídrico concentrado y se hier-

ve a reflujo durante 6 horas añadiendo un poco de carbón animal. Después de enfriar se añade igual cantidad de agua y se filtra. Al filtrado se le agrega, enfriando, lejía de sosa, hasta que la reacción quede sólo débilmente ácida. Entonces se añaden 30 ml de ácido acético glacial y se coloca en la nevera. La cistina cristaliza después de algunos días (4-5). Las aguas madres se concentran y luego se enfrían a 0°. La cistina bruta se encuentra con frecuencia impurificada por tirosina (reacción del millón, positiva). Para purificarla se disuelve en 10 ml de amoníaco al 10% y se neutraliza con ácido acético glacial, y así precipita la cistina bastante pura. La recristalización se hace repitiendo este tratamiento y añadiendo carbón animal, si es preciso.

Rendimiento.- Unos 2.5 g a partir de cabellos rubios. (14)

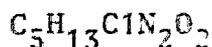
ORNITINA

La ornitina es un aminoácido no protéico que actúa como precursor importante o intermediario en el metabolismo.

La ornitina es intermediario en la síntesis de la arginina. (21)

FORMULA

PESO MOLECULAR



168.62

DESCRIPCION

Cristales finos blancos, soluble en agua, incoloro, de textura característica.

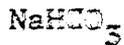
ANALISIS

A 1 ml de una solución de monoclóridato de ornitina (0.2 en 100) adicionar 1 ml de solución de nitroferricianuro de sodio y una solución al 10% de acetaldehído: un color azul no se produce.

A un ml de una solución de monoclóridato de ornitina (0.01 en 100) adicione 1 ml de ácido acético glacial y 1 ml de la solución prueba de ninhidrina y caliente sobre baño de agua por 30 min un color índigo es producido. (53)

BICARBONATO DE SODIO

Se obtiene a partir del bicarbonato de amonio y el cloruro de sodio. (14)

FORMULA**PESO MOLECULAR**

84.01

DESCRIPCION

Polvo cristalino blanco, estable al aire seco. Se descompone lentamente en ambiente húmedo.

SOLUBILIDAD

Soluble en agua, insoluble en alcohol, sus soluciones en agua fría recién preparadas y sin agitar son alcalinas al papel tornasol, alcalinidad que aumenta con el tiempo y también al agitarse o calentarse.

ANALISIS

Se pesan aproximadamente 3 g de bicarbonato de sodio, se mezclan con 25 ml de agua, se agrega solución indicadora de anaranjado de metilo y se valora con solución 1N de ácido sulfúrico. Cada ml de solución 1N de ácido sulfúrico equivale a 84.01 mg de NaHCO_3 . (13)

CLORURO DE SODIO

Presente en el agua de mar y en los lagos salados. En Inglaterra se obtiene a partir de depósitos subterráneos de

de sal-roca. (2)

FORMULA

PESO MOLECULAR

NaCl

58.44

DESCRIPCION

Cristales pequeños anhidros, incoloros o polvo blanco, cristalino, inodoro, de saber salino inalterable en el aire.

SOLUBILIDAD

Muy soluble en agua y en mayor grado en agua hirviente; soluble en glicerina, poco soluble en alcohol.

ANALISIS

Se pesan aproximadamente 250 mg de cloruro de sodio previamente desecado a 105° durante dos horas y se disuelven en 50 ml de agua, en un matraz con tapón esmerilado, se agregan 50 ml de solución 0.1 N de nitrato de plata, 3 ml de ácido nítrico, y 5 ml de nitrobenzeno y 2 ml de solución indicadora de sulfato férrico amónico, se mezclan y se valora el exceso de la solución 0.1 N de nitrato de plata, con 0.1 N de sulfocianuro de amonio. Cada ml de solución 0.1 N de nitrato de plata equivale a 5.845 de NaCl. (13)

CLORURO DE POTASIO

Se encuentra en grandes cantidades en los depósitos de sales potásicas. (2)

FORMULA

PESO MOLECULAR

KCl

74.56

DESCRIPCION

Cristales cúbicos o prismáticos, alargados incoloros, o polvo granular blanco. Inodoro, sabor salino y estable al aire. Sus soluciones son neutras al papel tornasol.

SOLUBILIDAD

Fácilmente soluble en agua, muy soluble en agua hirviente insoluble en alcohol.

ANALISIS

En un matraz con tapón esmerilado se disuelven aproximadamente 250 mg de cloruro potásico en 50 ml de agua mientras se agita se agregan 50 ml de solución 0.1 N de nitrato de plata, 3 ml de ácido nítrico y 5 ml de nitrobencono, se agita nuevamente, se agregan dos ml de solución reactiva de sulfato de amonio férrico y se valora el exceso de nitrato de plata con solución 0.1 N de sulfocianuro de amonio: cada ml de solución 0.1 N de nitrato de plata equivale a 7.456 mg de KCl. (13)

CLORURO DE CALCIO

FORMULA

PESO MOLECULAR

 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

147.02

DESCRIPCION

Fragmentos o gránulos de consistencia dura, blancos e inodoros delicuescentes.

SOLUBILIDAD

Soluble en agua, alcohol y alcohol hirviente. Muy soluble en agua hirviente.

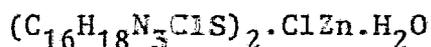
ANALISIS

Se pesa aproximadamente 1 g de cloruro de calcio se deposita en un vaso de precipitados de 250 ml y se disuelve en una mezcla de 100 ml de agua y 5 ml de ácido clorhídrico diluído. Se pasa la solución a un matraz volumétrico de 250 ml se diluye hasta el aforo y se mezcla. Se mide con pipeta 50 ml de la solución, se deposita en un recipiente adecuado, se agregan 100 ml de agua, 15 ml de solución reactiva de hidróxido de sodio y 300 mg del indicador de azul de hidroxinaftol. Se valora con solución 0.05 M de etilendiaminotetraacetato disódico hasta obtener coloración azul intensa cada ml de esta solución equivale a 7.351 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. (13)

AZUL DE METILENO

Colorante del grupo de las tiazinas. Sus dos núcleos aromáticos se hallan enlazados entre sí a través de un átomo de azufre. También es llamado cloruro de metiltionina.

FORMULA



PESO MOLECULAR

355.9

DESCRIPCION

Polvo cristalino verde oscuro, higroscópico. Tiene brillo metálico.

SOLUBILIDAD

Soluble a 20°, en 40 partes de agua, en 110 partes de alcohol y en 450 partes de cloroformo.

ANALISIS

Mezclar 10 ml de una solución al 0.01% con ácido acético, 1 ml y 100 mg de polvo de zinc y calentar; la solución se decolora. Filtrar y dejar el filtrado al aire; el color azul se presenta. (35)

ROJO DE FENOL

Es un colorante muy usado como indicador químico, que pertenece al grupo de las fenolsulfonftaleínas. Es muy usa-

do en pruebas bioquímicas.

DESCRIPCION

Es un polvo cristalino de color rojo brillante a rojo oscuro, es inodoro.

SOLUBILIDAD

Poco soluble en agua; soluble a 20° en 350 partes de alcohol; soluble en soluciones de carbonatos álcalis.

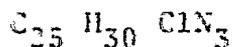
ANALISIS

Disolver 5 mg de rojo de fenol en 0.3 ml de hidróxido de sodio 1 N. Agregar 2 ml de bromo y 1 ml de ácido hidrociorhídrico, agitar y dejar reposar 5 minutos, y alcalinizar con hidróxido de sodio 1 N; se produce un color azul-violeta intenso. (34)

CRISTAL VIOLETA

Es un colorante básico. Es una mezcla de tetra, penta y hexametil pararrosanilin. (36)

FORMULA



PESO MOLECULAR

408.0

DESCRIPCION

Cristales verde obscuro, inodoros.

SOLUBILIDAD

Soluble en agua, etanol, cloroformo y glicerol.

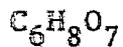
ANALISIS

Disolver 0.5 g en 25 ml de etanol caliente, agregar 25 ml de agua y 25 ml de una solución al 20% de tartrato-(+)sodio potasio. Eliminar el aire del matraz con dióxido de carbono, hasta el final de la reacción. Calentar a ebullición y titular con una solución de cloruro de titanio (III) 0.1 N, la titulación se lleva a cabo durante la ebullición de la solución. Cada ml de cloruro de titanio es equivalente a 0.0204 de $C_{25}H_{30}ClN_3$. (6)

ACIDO CITRICO

Es un ácido orgánico muy usado en la industria de alimentos y farmacéutica. Es utilizado para el mantenimiento de pH. (7)

FORMULA



PESO MOLECULAR

192.13

DESCRIPCION

Pelvo blanco cristalino, fino o granuloso. Inodoro y con fuerte sabor ácido.

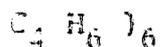
ANALISIS

En un matraz tarado se depositan aproximadamente 3 g de ácido cítrico, se disuelve en 40 ml de agua y se titula con solución 1N de hidróxido de sodio, usando una solución indicadora de fenolftaleína; cada ml de solución 1 N de hidróxido de sodio equivale a 64.04 mg de $C_6H_8O_7$. (13)

ACIDO TARTARICO

Es un ácido dibásico divalente, se encuentra en abundancia en la naturaleza, libre o combinado con el potasio o el calcio.

FORMULA



PESO MOLECULAR

150.09

DESCRIPCION

Polvo cristalino, granular o fino incoloro o cristales blancos translúcidos, inodoro, sabor ácido estable al aire.

SOLUBILIDAD

Soluble en agua y en alcohol.

ANALISIS

Deberá responder a las pruebas para tartratos, a una pequeña cantidad (100 mg de ácido tartárico) adicionar unas gotas de una mezcla de 15 ml de piridina y 5 ml de anhídrido acético se produce una coloración verde esmeralda.

Cuando se lleva a ignición, gradualmente se descompone emitiendo un olor parecido al del azúcar quemada.

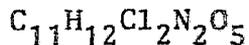
b) Colocar alrededor de 2 g de ácido tartárico previamente seco y exactamente pesado en un matraz y disolver en 40 ml de agua, adicionar unas gotas de solución reactiva de fenolftaleina y titular con solución volumétrica de NaOH

1 N. (35)

CLORANFENICOL

Es un antibiótico producido por *Streptomyces venezuelae*. Puede ser preparado por procesos bioquímicos y también por procesos sintéticos. Tiene características en común con las tetraciclinas. Es de amplio espectro, actúa a nivel de síntesis de proteínas.

FORMULA



PESO MOLECULAR

323.13

DESCRIPCION

Cristales finos como agujas o escamas alargadas, de color blanco a blanco grisáceo o blanco amarillento, sabor amargo.

SOLUBILIDAD

Muy soluble en metanol, etanol, éter etílico, acetona y acetato de etilo. Insoluble en benceno y éter de petróleo.

ANALISIS

Se disuelven en agua separadamente, porciones adecuadas de la muestra y de cloranfenicol, patrón de referencia, y se diluyen respectiva y cuantitativamente, hasta obtener soluciones que contengan 20 microgramos por ml, calentando si es necesario para disolver completamente y se enfrían. En un es-

pectrofotómetro adecuado se determina la absorbancia de cada solución a 278 nm, usando agua como blanco. La absorbancia se calcula como sigue:

$$\text{Absorbancia} = \frac{A_{278} \times 1000}{p(\text{en } 100 \text{ ml})}$$

A_{278} - absorbancia a 278 nm (ya sea de la muestra o de la solución patrón de referencia). p - peso en mg ya sea de la muestra o de la substancia, patrón de referencia.

En un ml de alcohol al 50% se disuelven 10 mg de cloranfenicol, se agregan 3 mg de la solución al 1% p/v de cloruro de calcio y 50 mg de polvo de zinc. En baño de vapor se calienta durante 10 minutos se enfría y se filtra. Al filtrado se le agregan 100 mg de acetato de sodio anhidro y dos gotas de cloruro de benzoilo. Se agita durante un minuto, y se agregan 0.5 ml de solución de cloruro férrico y 3 ml de ácido clorhídrico diluído y se mezclan; se produce coloración que va del violeta rojizo al púrpura. Se repite la prueba omitiendo el polvo de zinc; no se produce las coloraciones mencionadas.

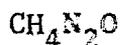
A 5 ml de una solución al 0.1%, p/v, de cloranfenicol se agregan algunas gotas de solución reactiva de plata: no se produce precipitado. En 2 ml de la solución reactiva al-

cohólica de hidróxido de potasio se disuelven 50 mg de cloranfenicol y se calienta a baño maría durante 15 minutos. Se agregan 20 mg de carbón activado del colorante, se agita y se filtra: la solución satisface el ensayo para cloruros, al ser tratada con solución reactiva de nitrato de plata. (13)

UREA

Es una diamida del ácido carbónico, a la que frecuentemente se menciona como carbamida.

FORMULA



PESO MOLECULAR

60.06

DESCRIPCION

Cristales prismáticos, incoloros y transparentes, inodoro.

SOLUBILIDAD

Soluble en agua y etanol, insoluble en éter y cloroforno.

ANALISIS

Poner 0.17 g de urea en un matraz de cuello largo de 500 ml y agregar 25 ml de agua, 2 ml de una solución al 3%

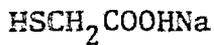
de sulfato de cobre, y 8 ml de ácido sulfúrico, calentar hasta que emitan vapores de trióxido de sulfuro. Calentar durante 15 minutos, enfriar y agregar cuidadosamente 100 ml de agua y 0.2 g de zinc granulado y conectar el matraz a un aparato de destilación de amoniaco el cual tiene un tubo que da directamente a un matraz con 50 ml de ácido hidrociorhídrico 0.2 M.

Calentar el matraz, hasta que el aire haya sido eliminado por la presencia de vapor, agregar poco a poco 75 ml de hidróxido de sodio 5 M, y destilar el amoniaco. Titular el exceso de ácido con 0.2 M de hidróxido de sodio, usando el rojo de metilo como indicador. Repetir la operación, sin la substancia a analizar, la diferencia en las titulaciones nos dará la cantidad de amoniaco liberado por la urea. Cada ml de ácido hidrociorhídrico 0.2 M es equivalente a 0.006006 de urea. (6)

TIOGLICOLATO DE SODIO

El tioglicolato de sodio o ácido tioglicólico cuyo grupo sulfihidrilo anula la toxicidad de los conservadores metálicos permitiendo de esta forma el desarrollo de cualquier organismo viable. (11)

FORMULA



PESO MOLECULAR

114.09

DESCRIPCION

Polvo cristalino blanco, ligero olor característico.

SOLUBILIDAD

Muy soluble en agua, ligeramente insoluble en alcohol.

ANALISIS

Pesar con exactitud alrededor de 250 mg de muestra, disolver en 50 ml de agua libre de O_2 . Adicionar 5 ml de HCl diluido, hervir por dos minutos y enfriar. Titular la solución con una solución volumétrica de iodo 0.1 N adicionando 3 ml de solución de almidón hacia el final de la titulación.

(13)

XANTINAS

Las xantinas son el producto de la degradación de los ácidos nucleicos, pertenecen a las purinas. La palabra xantina proviene del griego, de la palabra xanthos que significa "amarillo", debido al residuo amarillo que se produce por este compuesto cuando es calentado a sequedad con ácido cítrico. (12)

Entre los derivados metilados de la xantina de más importancia esta el grupo de los alcaloides; entre los que se encuentra la teofilina, teobromina, cafeína. (36) (16)
A continuación se presenta el análisis de dos de ellas.

TEOFILINA

Alcaloide del té.

FORMULA

PESO MOLECULAR



188.8

ANALISIS

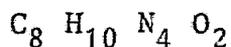
Colocar 250 mg de teofilina, bien pesada, en un matraz cónico de 250 ml, añadir 50 ml de agua y agitar. Calentar la mezcla hasta total disolución en baño de vapor. Enfriar y añadir 20 ml de nitrato de plata 0.1N y 1.0 ml de acul de bromotimol, titular con hidróxido de sodio 0.1N hasta que se

observe un color azul. Cada ml de hidróxido de sodio es equivalente a 18.02 mg de $C_7 H_8 N_4 O_2$. (35)

CAFEINA

Alcaloide del café.

FORMULA



PESO MOLECULAR

193.8

ANALISIS

Disolver 400 mg de cafeína, en 40 ml de anhídrido acético caliente. Enfriar y añadir 80 ml de benceno y titular con ácido perclórico 0.1 N, determinando el punto final de la reacción potenciométricamente.

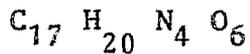
Cada ml de ácido perclórico es equivalente a 19.42 mg de $C_8 H_{10} N_4 O_2$. (35)

RIBOFLAVINA

Se sabe que la riboflavina existe en dos formas en diversos sistemas enzimáticos. La primera es el fosfato de riboflavina (riboflavinmononucleótido) y es constituyente de la enzima amarilla de Warburg, de la citocromo o reductasa y de la aminoácido deshidrogenasa de los L-aminoácidos.

(17)

FORMULA



PESO MOLECULAR

376.37

DESCRIPCION

Polvo cristalino amarillo o amarillo anaranjado, con ligero olor característico. En estado seco, la riboflavina no se altera notablemente por la luz difusa, pero en solución especialmente en presencia de álcalis, se descompone rápidamente por la luz.

SOLUBILIDAD

Muy poco soluble en agua, alcohol y en solución isotónica de cloruro de sodio; es muy soluble en soluciones diluidas de álcalis; insoluble en éter y en cloroformo. Su solución saturada es neutra al papel tornasol.

ANALISIS

Nota: el procedimiento se efectúa evitando la exposición a la luz. En un matraz volumétrico de 1 000 ml, que contenga cerca de 50 ml de ácido acético y suficiente agua hasta obtener 800 ml. Se calienta en baño de vapor protegido de la luz y se agita frecuentemente hasta disolución. Se enfría a 25° , se diluye con agua hasta el aforo y se mezcla.

Esta solución se diluye cuantitativamente con agua, hasta obtener una solución cuya concentración sea la adecuada para determinar su fluorescencia en el fluorómetro empleado.

De igual manera se prepara una solución tipo que contenga en cada ml una cantidad de riboflavina Patrón de Referencia, equivalente a la de la solución por valorar de riboflavina, preparada como se indica en el párrafo anterior y se mide la intensidad de su fluorescencia en un fluorómetro o cerca de 460 nm. Inmediatamente después de verificar la lectura, se agregan a la solución tipo cerca de 10 mg de hidrosulfito de sodio, agitando con una varilla de vidrio hasta disolución y enseguida se mide de nuevo la fluorescencia. La diferencia entre las dos lecturas, representa la intensidad de la fluorescencia (corregida) de la solución.

tipo riboflavina. De igual manera se mide la intensidad de la fluorescencia de la solución de la muestra de riboflavina por valorar, a cerca de 460 nm antes y después de agregarle el hidrosulfito de sodio. Se calcula la cantidad en mcg por ml de $C_{17}H_{20}N_4O_6$ en la solución ensayada de riboflavina, por medio de la fórmula $C(I_u/I_s)$, en la que C es la concentración en mcg por ml de riboflavina, Patrón de Referencia en la solución tipo; I_u e I_s son los valores corregidos de la fluorescencia observada, en las soluciones de la muestra y de la riboflavina Patrón de Referencia respectivamente. (13)

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Es realmente difícil llevar a cabo el control de calidad de los medios de cultivo, ya que las materias primas utilizadas para su elaboración, en su gran mayoría son de origen biológico.
- 2.- Por ser de origen biológico están sujetas a variaciones tales como: alimentación, situación geográfica, procesamiento químico, por lo tanto es difícil lograr uniformidad en cada lote preparado.
- 3.- Es por esto que cada fabricante de medios de cultivo tiene sus propias técnicas, ya que no existen estándares pre establecidos para su elaboración.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bailey Robert W. y Elvyn G. Diagnóstico Microbiológico. Primera edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1973
- 2.- Bentley and Drivers. Textbook of Pharmaceutical Chemistry. Octava edición. Editorial Oxford University. England. 1969
- 3.- BBL. Quality control. Procedures Manual of BBL Prepared Media. USA. 1971.
- 4.- Biro E. Carlos. Terapeutica Microbiana. Séptima edición. Editorial Diógenes. México. 1980
- 5.- Bioxon. Medios de Cultivo y Reactivos de Diagnóstico. México. 1980
- 6.- Brittish Pharmacopea. Editorial London Her Majesty's Stati onary Office. London. 1980.
- 7.- Chambers. Diccionario Tecnológico. Editorial Omega. Barcelona. 1964. Tomo 1.
- 8.- Dauget G.J. Técnicas en Bacteriología. Editorial JIMS. Barcelona. 1977.
- 9.- Delaat Adrian. Microbiology for Allied Health Professions. Segunda edición. Editorial Filadelfia, 1979.
- 10.- Diagnostica Merck. Productor para Microbiología. 1980.
- 11.- Difco Supplementary Literature. Difco Laboratories - - Detroit Michigan. USA. 1962.
- 12.- Brill Victor Alexander. Pharmacology in Medicine. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill. New York. 1971.

- 13.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Cuarta edición 1974.
- 14.- Enciclopedia Salvat de las Ciencias. Editorial Salvat. Primera edición. Barcelona. 1970. Tomo 9.
- 15.- Giral Francisco. Productos Químicos Farmacéuticos. Primera edición. Editorial Atlanta. México. 1946.
- 16.- Goodman S. Louis y Gilman Alfred. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Quinta edición. Editorial Interamericana. México. 1978.
- 17.- Harper Harold A. Manual de Química Fisiológica. Cuarta edición. Editorial El Manual Moderno. México. 1975.
- 18.- Hoover J. E. Remington Pharmaceutical Science. Décimo quinta edición Editorial Pesylvania. USA. 1975.
- 19.- Jenkins Glenn. Química Farmacéutica Cuantitativa. Primera edición. Editorial Atlanta. México. 1951.
- 20.- Kavanagh Frederick. Analytical Microbiology. Primera edición. Editorial Academic Press. Londres. 1973.
- 21.- Kirk Raymond-Othomer Donald. Encyclopedia of Chemical Technology. Segunda edición. Editorial Board. 1969. Tomo 4 y Tomo 20.
- 22.- Kolmer A. John. Métodos de Laboratorio Clínico. Primera edición. Editorial Appleton. Nueva York. 1943.
- 23.- Lenette Edwin H. Manual of Clinical Microbiology. Tercera edición. Editorial American Society. Washington. 1980.

- 24.- Lheninger L. Albert. Bioquímica. Quinta edición. Editorial Omega. México. 1972.
- 25.- Lynch Matthew J. Métodos de Laboratorio. Segunda edición. Editorial Interamericana. México. 1969.
- 26.- Merck. Manual de Microbiología. México. 1979.
- 27.- Merck. Requerimientos para la Promoción y Elaboración de Medios de Cultivo. México. 1978.
- 28.- Maynell G. G. Theory and Practice in Experimental Bacteriology. Segunda edición. Editorial Cambridge. Londres. 1970.
- 29.- Mial Stephen. Diccionario de Química. Segunda edición. Editorial Atlanta. México. 1953.
- 30.- Mor anda Rocco Guarnica . Assay of Glucose using and - Electrometrical Enzimic Sensor. Analytical Biochemistry. (614) 1973.
- 31.- Oxoid. Manual de Medios de Cultivo. 1980.
- 32.- Society of American Bacteriologist. Manual of Microbiology Methods. Editorial Mc Graw Hill. Nueva York. 1957.
- 33.- Tavera Ochoa Guadalupe. Control de Calidad en Medios de Cultivo para Análisis Microbiológico de los Alimentos. 1980. Tesis.
- 34.- The Pharmaceutical Codex. eleventh edition. Editorial Pharmaceutical Press. London. 1979.
- 35.- United States Pharmacopea. décimoquinta edición. Nueva York. 1980.

36.- Murillo Héctor. Química Orgánica. Novena edición. Editorial Eclalsa. México. 1969.