



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS
PREDOMINANTES EN EL JUGO DE CAÑA DE UN INGENIO
Y SU SUSCEPTIBILIDAD A TRES BIOCIDAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

HÉCTOR EDUARDO ZARCO MERCADO



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Q.F.B Aurora Irma Ortegón Ávila
VOCAL: Q.F.B. Juan Diego Ortiz Palma Pérez
SECRETARIO: Dra. Marisela Bernal González
1er. SUPLENTE: Q.F.B. Norma Angélica Camacho de la Rosa
2° SUPLENTE: Dra. María del Carmen Duran Domínguez de Bazúa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorios 301, 302, 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental,
Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Marisela Bernal González

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SUSTENTANTE:

Héctor Eduardo Zarco Mercado

Índice

	Pág.
Glosario	
Resumen	1
Capítulo 1. Problemática	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Objetivos	2
1.3. Hipótesis	4
1.4. Justificación	4
Capítulo 2. Fundamento teórico y antecedentes	5
2.1. La caña azucarera	5
2.1.1. Características de la caña de azucarera	5
2.1.2. Composición de la caña de azúcar	6
2.1.3. Composición nutricional del juego de caña de azúcar	6
2.1.4. La industria azucarera en México	7
2.2. Microorganismos en la caña azucarera	8
2.2.1. El género <i>Leuconostoc</i>	9
2.3. Formación de dextranas	10
2.3.1. Azúcar invertido	11
2.4. Los biocidas	11
2.4.1. Mecanismo de acción de los biocidas	11
2.4.2. Condiciones de un buen biocida (European Commission, 2014)	12
Capítulo 3. Biocidas utilizados	13
3.1. Los ditiocarbamatos como biocidas	13
3.2. Etilén bis-ditiocarbamato de sodio (Nabam) $C_4H_8N_2S_4Na_2$	14
3.2.1. Función tecnológica	14

	Pág.
3.2.2. Estudios de toxicidad del etilén bis-ditiocarbamato de sodio (Nabam)	15
3.2.3. Los métodos analíticos para determinar su identificación (Nabam)	17
3.2.4. Aplicación de Nabam en la industria azucarera	17
3.3. N-metilditiocarbamato de sodio $C_2H_6NS_2Na$ o metam de sodio (MS)	18
3.3.1. Función tecnológica	19
3.3.2. Estudios toxicológicos	19
3.3.3. Aplicación del metam en la industria azucarera	21
3.4. Cloruro de benzalconio (CB) $C_9H_{13}ClNR$	21
3.4.1. Función tecnológica	21
3.4.2. Estudios toxicológicos	24
3.4.3. Aplicación del cloruro de benzalconio en la industria azucarera	26
3.5. Formaldehído, formol o metanal CH_2O	28
3.5.1. Mecanismos de acción del formaldehído	28
3.5.2. Toxicidad del formaldehído	28
Capítulo 4. Metodología	31
4.1. Diagrama de flujo	31
4.2. Material y reactivos	32
4.3. Desarrollo experimental	33
4.3.1. Diseño experimental	33
4.3.2. Toma de muestra	34
4.3.3. Inoculación	35
4.3.4. Lectura	35
4.3.5. Selección y aislamiento de colonias bacterianas para identificación	35
4.3.6. Pruebas preliminares (características morfológicas y bioquímicas) para identificación del género <i>Leuconostoc</i>	33

	Pág.
4.3.7. Confirmación de la identificación	36
4.3.8. Selección de medio de cultivo	36
4.3.9. Diseño experimental 2	37
4.3.10. Prueba de eficiencia de los biocidas	37
4.3.11. Cálculo del porcentaje de efecto inhibitorio	38
4.3.12. Análisis estadístico final	38
Capítulo 5. Resultados y discusión	39
5.1. Pruebas presuntivas (características morfológicas y bioquímicas) para la identificación del organismo <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	39
5.2. Confirmación de la identificación	40
5.3. Análisis estadístico del experimento 1	41
5.3.1. Selección del medio de cultivo	43
5.3.2. Selección la temperatura de trabajo	43
5.3.3. Selección del tiempo de trabajo	44
5.4. Experimentos 2 (optimización de las dosis)	45
5.4.1. Análisis del biocida metam de sodio (MS)	45
5.4.2. Análisis de la mezcla de etilén bis-ditiocarbamato de sodio y de N-metil ditiocarbamato de potasio (QZ)	47
5.4.3. Análisis del formaldehído (FA)	48
5.5. Efecto inhibitorio del experimento 2	48
5.6. Último experimento (metam sodio <i>versus</i> mezcla de ditiocarbamatos <i>versus</i> cloruro de benzalconio)	52
5.6.1. Análisis estadístico del metam sodio para el último experimento	53
5.6.2. Análisis estadístico de la mezcla del etilén bis-ditiocarbamato de sodio y del N-metil ditiocarbamato de potasio en el último experimento	55
5.6.3. Análisis estadístico del cloruro de benzalconio en el último experimento	56

5.7. Efecto inhibitorio para el último experimento (discusión final)	Pág. 59
Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas	62
6.1. Conclusiones	62
6.2. Perspectivas	63
Anexos	64
Anexo A. Datos experimentales	64
Anexo B. Análisis estadístico	66
Anexo C. Disposición controlada de los residuos producidos en esta investigación	78
Bibliografía	79

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1. Composición del jugo de caña de azúcar por cada 100 g (Correa <i>et al</i> , 2004)	7
Tabla 2. Estados productores e ingenios azucareros en México (SIAP, 2013)	7
Tabla 3. Principales microorganismos presentes en la caña de azúcar (Serrano, 2006)	9
Tabla 4. Efectos del etilén bis-ditiocarbamato de sodio en el ser humano (International Programme Chemical Safety, 1988)	15
Tabla 5. Bioacumulación de ditiocarbamatos	16
Tabla 6. Métodos de determinación empleados en el análisis de ditiocarbamatos	17

	Pág.
Tabla 7. Uso y dosificación del “Nabam” (International Programme Chemical Safety, 1988)	18
Tabla 8. Toxicidad (DL50 y CL50) del metam en animales de experimentación	19
Tabla 9. Uso y cantidades del metam (International Programme Chemical Safety, 1988)	21
Tabla 10. Funciones tecnológicas del cloruro de benzalconio	24
Tabla 11. Estudios toxicológicos del cloruro de benzalconio (CB)	25
Tabla 12. Resumen de métodos analíticos para determinar cloruro de benzalconio	26
Tabla 13. Aplicación del cloruro de benzalconio en la industria azucarera (CFR, 2012)	27
Tabla 14. Resumen de biocidas en estudio	29
Tabla 15. Reactivos y materiales utilizados	32
Tabla 16. Diseño experimental 1 selección del medio de cultivo	33
Tabla 17. Diseño experimental 2 selección de dosis óptima	33
Tabla 18. Biocidas utilizados comúnmente en la industria azucarera	34
Tabla 19. Selección del medio de cultivo para el aislamiento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	36
Tabla 20. Observaciones para identificación presuntiva de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	39
Tabla 21. Resultados del análisis automatizado de identificación microbiológica VITEK-2	41

	Pág.
Tabla 22. Análisis de varianza, ANDEVA, para el número de colonias	42
Tabla 23. Efecto del medio de cultivo	43
Tabla 24. Efecto de la temperatura	43
Tabla 25. Efecto del tiempo	44
Tabla 26. Efecto inhibitorio del metam sodio y la mezcla de ditiocarbamatos (QZ) en porcentaje	50
Tabla 27. Último diseño experimental con metam sodio <i>versus</i> la mezcla de ditiocarbamatos <i>versus</i> el cloruro de benzalcanio	52
Tabla 28. Dosis de los biocidas para el último experimento	53
Tabla 29. Efecto inhibitorio del metam sodio, la mezcla QZ y el cloruro de benzalconio para el último experimento, en porcentaje	69
Tabla A.1. Resultados del medio APT para la selección de medio de cultivo para el aislamiento (Experimento 1).	64
Tabla A.2. Resultados del medio MRS para la selección de medio de cultivo para el aislamiento (Experimento 1).	64
Tabla A.3. Resultados del medio M17 para la selección de medio de cultivo para el aislamiento (Experimento 1).	65

Índice de figuras

	Pág.
Fig. 1. Desarrollo experimental	31
Fig. 2. Ingenio azucarero	34
Fig. 3. Caña lavada	34
Fig. 4. Molienda de la caña	34
Fig. 5 a,b. Técnica de estriado en cuadrante radial	35
Fig. 6. Tinción de Gram y agrupación	40
Fig. 7. Tinción de cápsula	40
Fig. 8. Prueba de catalasa	40
Fig. 9. Equipo VITEK 2	41
Fig. 10. Tarjetas de reactivos colorimétricos	41
Fig. 11. Diagrama de Pareto estandarizado: Efecto de los parámetros en estudio	42
Fig. 12. Gráfica de cajas y bigotes para el número de colonias <i>versus</i> medio	44
Fig. 13. Gráfica de cajas y bigotes para el número de colonias <i>versus</i> temperatura	44
Fig. 14. Gráfica de cajas y bigotes para el número de colonias <i>versus</i> tiempo	44
Fig. 15. Resultados de los parámetros de diseño	45
Fig. 16. Promedio de los resultados de la inhibición a diferentes dosis de metam sodio	46
Fig. 17. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> dosis del metam sodio	46
Fig. 18. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> tiempo del metam sodio	46
Fig. 19. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> temperatura del metam sodio	46

	Pág.
Fig. 20. Promedio de los resultados de la inhibición a diferentes dosis de la mezcla de ditiocarbamatos	47
Fig. 21. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> dosis de la mezcla de ditiocarbamatos	48
Fig. 22. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> tiempo de la mezcla de ditiocarbamatos	48
Fig. 23. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición Vs temperatura de la mezcla de ditiocarbamatos	48
Fig. 24. Promedio de la inhibición a diferentes dosis de formaldehído	49
Fig. 25. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> dosis de formaldehído	49
Fig. 26. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> tiempo del formaldehído	49
Fig. 27. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> temperatura del formaldehído	49
Fig. 28. Efecto inhibitorio del metam sodio y la mezcla de ditiocarbamatos en %	51
Fig. 29. Gráfica de cajas y bigotes para el % del efecto inhibitorio <i>versus</i> biocidas (metam sodio <i>versus</i> mezcla de ditiocarbamatos)	51
Fig. 30. Promedio de la inhibición a diferentes dosis de metam sodio	54
Fig. 31. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> la dosis del metam sodio en el último experimento	54
Fig. 32. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> la temperatura del metam sodio en el último experimento	54
Fig. 33. Halo de inhibición del metam sodio	55
Fig. 34. Promedio de la inhibición a diferentes dosis de la mezcla de ditiocarbamatos	55
Fig. 35. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> la dosis de la mezcla de ditiocarbamatos en el último experimento	56

	Pág.
Fig. 36. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> temperatura de la mezcla de ditiocarbamatos en el último experimento	56
Fig. 37. Halo de inhibición de la mezcla de ditiocabamatos (QZ)	57
Fig. 38. Promedio de la inhibición a diferentes dosis del cloruro de benzalconio (CB)	57
Fig. 39. Gráfica de cajas y bigotes para halo de inhibición <i>versus</i> dosis del cloruro de benzalconio (CB) en el último experimento	58
Fig. 40. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición <i>versus</i> dosis del metam sodio en el último experimento	58
Fig. 41. Halo de inhibición del cloruro de benzalconio (CB)	58
Fig. 42. Efecto inhibitorio del metam sodio, la mezcla de ditiocarbamatos y el cloruro de benzalconio en %	60
Fig. 43. Gráfica de cajas y bigotes para el % del efecto inhibitorio <i>versus</i> los biocidas metam sodio <i>versus</i> la mezcla de ditiocarbamatos <i>versus</i> el cloruro de benzalconio	61
Fig. C.1. Disposición controlada de los residuos producidos en esta investigación	78

Glosario

% m/v	Porcentaje masa/masa
% v/v	Porcentaje volumen/masa
µg	microgramos
µL	microlitros
2NaEDTA	Ácido etilén-diamin tetra-acético de sodio
ANDEVA	Análisis de varianza
<i>APT</i>	<i>Agar All Purpose Tween</i>
B1	Tiamina
B2	Riboflavina
B3	Niacina
B5	Ácido pantoténico
BALO	Alosa (carbohidrato)
<i>BCF</i>	Factor de bioconcentración (siglas en inglés)
BGAL	Galactosa (carbohidrato)
°C	Grados Celsius
C ₂ H ₆ NS ₂ Na	N-metil ditiocarbamato de sodio
C ₄ H ₈ N ₂ S ₄ Na ₂	Etilén bis-ditiocarbamato de sodio
C ₉ H ₁₃ ClNR	Cloruro de benzalconio
Ca	Calcio
CB	Cloruro de benzalconio
<i>CDS</i>	<i>Calibration dichotomous susceptibility</i>
<i>CFR</i>	<i>Code of Federal Regulations</i>
CH ₂ O	Formaldehído
CL ₅₀	Concentración letal media
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
ClO ₂	Dióxido de cloro
cm ³	Centímetros cúbicos
CNIAA	Cámara Nacional de la Industria Azucarera y Alcohólica

CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
DL ₅₀	Dosis letal media
DMAL	Maltosa (carbohidrato)
EC	Comisión Europea (siglas en inglés)
EDTA	Ácido etilén-diamin tetra-acético
ETU	Etilén-tiourea
FA	Formaldehído
Fe	Hierro
Ferbam	Dimetil ditiocarbamato de hierro
g	Gramos
GL	Grados de libertad
h	Hora(s)
ha	Hectárea
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión (siglas en inglés)
IARC	<i>International Agency of Research on Cancer</i>
K	Potasio
kcal	Kilocaloría
kg	Kilogramo
K _{oc}	Coeficiente de adsorción
K _{o/w}	Coeficiente de partición octanol-agua
L	Litros
MS2	Espectrometría de masas (siglas en inglés)
LOEL	Nivel mínimo de efecto observable (siglas en inglés)
M17	Agar según Terzaghi
Maneb	Etilén bis-ditiocarbamato de manganeso
McFarland	En microbiología, los estándares McFarland se usan como una referencia para ajustar la turbiedad de suspensiones bacterianas de tal forma que el número de bacterias esté dentro de un rango dado para estandarizar la prueba microbiana. Un ejemplo de tal prueba es la de la susceptibilidad a antibióticos con mediciones de concentraciones mínimas inhibitorias que rutinariamente se usan

en la microbiología, especialmente la médica y la investigación en general. Si una suspensión es demasiado turbia o demasiado diluida se tendrá un resultado erróneo (ya sea de falsamente resistente o de falsamente susceptible) para cualquier agente antimicrobiano. Los estándares McFarland originales se obtenían mezclando cantidades específicas de cloruro de bario y ácido sulfúrico juntos. Al mezclarlos se forma un precipitado de sulfato de bario, que justamente causa turbiedad en la solución. Un estándar 0.5 McFarland se prepara mezclando 0.05 mL de cloruro de bario dihidratado al 1.175% ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), con 9.95 mL de ácido sulfúrico al 1% (H_2SO_4). Ahora hay estándares McFarland preparados a partir de suspensiones de partículas de látex que alargan la vida de anaquel y la estabilidad de las suspensiones. El estándar se puede comparar visualmente con la suspensión bacteriana en medio salino estéril o caldo de nutrientes. Si la suspensión bacteriana es demasiado turbia puede diluirse con más medio salino o caldo de cultivo. En caso contrario, si no fuera lo suficientemente turbia se pueden agregar más bacterias

Metam	N-metil ditiocarbamato de sodio
mg	Miligramo
min	Minuto
<i>MITC</i>	Isotiocianato de metilo (siglas en inglés)
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRS	Agar de Man, Rogosa y Sharpe
MS	Metam sodio (N-metil ditiocarbamato de sodio)
Nabam	Etilén bis-ditiocarbamato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
<i>NOEL</i>	Nivel de efecto no observable (siglas en inglés)
OMS	Organización Mundial de la Salud

pH	Potencial de iones hidrógeno
PIB	Producto Interno Bruto
pka	Constante de disociación ácida
ppm	Partes por millón (mg/kg)
QACs	Sales cuaternarias de amonio (siglas en inglés)
QZ	Nombre de mezcla Etilén bis-ditiocarbamato de sodio con N-metil ditiocarbamato de potasio
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México
Thiram	Etilén bis-ditiocarbamato disulfuro de tetrametil tiuran
ton	Tonelada
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UGA	Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM (entidad responsable de la disposición de residuos)
<i>US-FDA</i>	<i>United States Food and Drug Administration</i>
UV	Luz ultravioleta
VITEK 2	Sistema de identificación microbiana Biomerieux
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>
Zineb	Etilén bis-ditiocarbamato de zinc
Ziram	Dimetil ditiocarbamato de zinc

Nota:

Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009)

Resumen

El jugo de la caña debe recibir un tratamiento desinfectante ya que entra en contacto directo con grandes cantidades de microorganismos que consumen y provocan la inversión de la sacarosa, reportando a las bacterias del género *Leuconostoc* como principales consumidores de sacarosa. Por tanto, existen productos para la desinfección y/o sanitización de la caña de azúcar como son: ditiocarbamatos, sales cuaternarias de amonio y formaldehído, entre otros. Por ello, tomando como ejemplo a la bacteria mesófila aerobia o facultativa (*Leuconostoc mesenteroides*), el objetivo de esta investigación es aislarla y comprobar su susceptibilidad a los tres biocidas más usados en la industria azucarera de México. Esto se realizará mediante la toma de muestras, inoculación y lectura de las bacterias presentes en jugo de caña obtenido en el laboratorio. Se seleccionaron y aislaron colonias para su identificación. Dicha selección fue sometida a la prueba de difusión de agar para determinar su susceptibilidad. Cada placa se incubó a 25, 35 y 45°C por 72 h y luego se midió el diámetro del halo de inhibición. Se realizó un análisis estadístico para determinar si existía diferencia significativa entre el efecto inhibitorio de cada biocida. Con ayuda de los resultados y de sus características toxicológicas se determinó cuál podría ser la mejor opción según esta investigación. Los resultados demuestran que el medio MRS adicionado con vancomicina fue ideal para el aislamiento de *Leuconostoc mesenteroides*. Se confirmó este aislamiento de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* mediante la prueba automatizada de identificación VITEK 2 con un 95% de confiabilidad. El halo de inhibición promedio del formaldehído fue de 10.85 mm. En esta investigación fue utilizado como referencia por su conocido poder biocida. El porcentaje de efecto inhibitorio respecto al formaldehído del metam sodio fue de 85, 107 y 172% utilizando dosis de 30, 40 y 50 mg L⁻¹, respectivamente. Para la mezcla de ditiocarbamatos fue de 97, 112 y 179% utilizando dosis de 30, 40 y 50 mg L⁻¹, respectivamente. Finalmente, con el cloruro de benzalconio se obtuvieron porcentajes de 192, 266 y 329% utilizando dosis de 10, 15, 20 mg L⁻¹, respectivamente, siendo este último biocida el de mayor eficacia.

Palabras clave: Aislamiento, *Leuconostoc mesenteroides*, biocida, halo de inhibición, formaldehído, metam, mezcla de ditiocarbamatos cloruro de benzalconio

CAPÍTULO 1

PROBLEMÁTICA

1.1. Planteamiento del problema

La caña de azúcar es uno de los cultivos más eficientes desde el punto de vista fotosintético. Una hectárea de caña de azúcar puede producir hasta 100 toneladas de caña por año, la cual es más del doble de la producción agrícola de otros cultivos (Arvizu-Bernal y Ramos Medina, 2010; Bonilla-Vidal, 2013). Uno de los inconvenientes en la industria azucarera en general, es la inversión de la sacarosa en el jugo de caña que va desde el momento de su extracción en los molinos hasta que llega a la sala de cocimiento. El jugo de la caña no tratado químicamente al pasar por las canaletas y cañerías, entra en contacto directo con una gran cantidad de microorganismos que están adheridos a las superficies del metal, provocando pérdidas que pueden alcanzar hasta el 1.0% de la sacarosa. Algunos autores reportan a las bacterias del género *Leuconostoc* y al grupo de coliformes como los principales microorganismos consumidores de sacarosa (Egan y Rehbein, 1963; Hernández *et al.*, 1978). Estas bacterias pueden causar pérdidas del 3-5% en masa, debido a la multiplicación continua a pesar de que se realice una limpieza frecuente en molinos. Además, los lodos o fangos que se acumulan en los molinos constituyen la fuente más importante de contaminación microbiana y con ello la producción de invertasa, ocasionando el desdoblamiento de la sacarosa. Por tanto, el efecto perjudicial de las dextranas comienza desde el momento en que éstas se forman, consumiendo 0.2 kg ton^{-1} de azúcar o 0.02 kg ton^{-1} de caña procesada (Flores-Santillán y Pérez-Cordero, 2013).

1.2. Objetivos

El objetivo principal de esta investigación es el de evaluar el efecto de tres agentes biocidas (cloruro de benzalconio, N-metil-ditiocarbamato de sodio y una mezcla

comercial de etilén bis-ditiocarbamato de sodio y N-metil ditiocarbamato de potasio) sobre una bacteria mesófila aerobia o facultativa predominante en jugo de caña.

Dentro de los objetivos particulares están los de aislar e identificar a una de las bacterias mesófilas aerobias o facultativas predominantes en el jugo de caña de un ingenio, *Leuconostoc mesenteroides*.

1.3. Hipótesis

Se plantea en esta investigación como hipótesis nula la siguiente:

Nula Ho = La aplicación de biocidas no produce efectos inhibitorios a las bacterias del género *Leuconostoc*.

Como hipótesis alternativa se tiene la siguiente:

Alternativa Ha = La aplicación del biocidas produce efectos inhibitorios a las bacterias del género *Leuconostoc*

1.4. Justificación

Los productos que se han utilizado para la desinfección y/o sanitización de la caña de azúcar son: ditiocarbamatos, cloruro de benzalconio y otras sales cuaternarias de amonio como bifluoruro de amonio y formaldehído (Kochergin, 2002). Sin embargo, el uso de reactivos químicos para el control de microorganismos en la industria alimentaria se ve confrontado con el hecho de que pueden ser tóxicos al humano o dañar al ambiente (Cuervo-Mulet *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES

2.1. La caña azucarera

La caña de azúcar es una gramínea gigante perenne del género *Saccharum* que crece en los climas tropicales y subtropicales, con temperaturas promedio de 20 a 30°C (Carmona, 1997). Durante la temporada del año en que prevalecen temperaturas altas y es máxima la actividad pluvial, la caña de azúcar alcanza un gran crecimiento.

Bajo estas condiciones la fotosíntesis se desplaza hacia la producción de carbohidratos de alta masa molecular como la celulosa y otros compuestos que constituyen el follaje y el soporte fibroso del tallo que es donde se acumula sacarosa en el periodo de maduración (GEPLACEA, 1988). La caña florece luego de estar completamente madura por lo que el corte para su uso industrial se produce antes de la floración.

2.1.1. Características de la caña azucarera

La caña de azúcar tiene el tallo macizo, que puede llegar a medir hasta 6 metros de altura, y de 2 a 8 centímetros de diámetro. Este tallo está lleno por dos partes diferenciadas: un tejido esponjoso y dulce en la parte central (médula), del que se extrae un jugo rico en sacarosa; y una parte periférica, rica en fibra, que en el proceso de extracción del azúcar constituirá el “bagazo”.

El número de tallos de la planta, el color y el hábito de crecimiento dependen de la variedad de la planta. En general, puede tener de uno hasta tres tallos. Típicamente se conoce que el tallo de las cañas es liso con “anillos” fibrosos, que se denominan nudos. Las partes que se encuentran entre nudo y nudo del tallo se denominan entrenudos. Sus hojas se originan de los nudos del tallo, son largas y linguadas.

La flor es una inflorescencia en forma de panícula de pequeñas espigas: sedosas, largas y vellosas. Cada inflorescencia suele tener un tallo principal o raquis que contiene una flor hermafrodita con tres anteras y un ovario con dos estigmas. Florece según los países donde crezca.

Su raíz está en el sistema radicular, es decir, se pueden diferenciar dos tipos de raíces: las primordiales, delgadas y muy ramificadas, que pueden vivir hasta 3 meses y las raíces permanentes, que brotan de los nuevos tallos de la caña. Estas segundas son más numerosas, gruesas y de rápido crecimiento. La caña de azúcar puede multiplicarse mediante acodos, plantando un tallo que tenga un nudo y una yema incipiente. Existen alrededor de 25 especies en el mundo reconocidas como cañas de azúcar (CONABIO, 2009).

2.1.2. Composición de la caña de azúcar

El tallo de la caña contiene agua entre 73 a 76%, sacarosa de un 8 a un 15% y fibra entre 11 a 16%. Estas proporciones pueden variar según el tipo de cultivo y variedad de la planta. Sin embargo, la importancia de la composición nutricional de la planta recae en el jugo de su tallo, del que se extrae el azúcar. El jugo de la caña equivale del 70 al 80% de la masa del tallo y el 15 al 30% restante constituye el bagazo (Davidse *et al.*, 1994).

2.1.3. Composición nutricional del jugo de caña de azúcar

En la Tabla 1 se muestra la información nutrimental del jugo de caña de azúcar mostrando que los carbohidratos simples como la sacarosa constituyen entre un 40-60%, la glucosa 6-9% y la fructosa de un 5-10%. En variedades silvestres el porcentaje de sacarosa puede ser tan solo del 12% y aún menor para los demás glúcidos. En cuanto a las vitaminas contiene tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3) y ácido pantoténico (B5). Los minerales presentes en el jugo son potasio (K), calcio (Ca) y hierro (Fe) y, finalmente, los ácidos que contiene son el aconítico, málico y cítrico, principalmente.

2.1.4. La industria azucarera en México

De acuerdo con la Cámara Nacional de la Industria Azucarera Y Alcohólica (CNIAA), la producción de caña de azúcar se registra en 15 estados del país y 57 ingenios azucareros. Veracruz es el estado con mayor número de ingenios azucareros con 22, seguido por Jalisco con 6 y San Luis Potosí con 4. En la Tabla 2 se presentan los nombres de los ingenios azucareros de todos los estados productores de caña de azúcar del país (SIAP, 2013).

Tabla 1. Composición del jugo de caña de azúcar por cada 100 g (Correa et al., 2004)

Calorías	62 kcal
Azúcares	16.5 g
Proteínas	0.6 g
Grasas	0.1 g
Fibra	3.1 g
Calcio	8.0 mg
Hierro	1.4 mg
Tiamina	0.02 mg
Riboflavina	0.01 mg
Niacina	0.10 mg
Vitamina C	3 mg

kcal; kilocalorías, g; gramos y mg; miligramos

Tabla 2. Estados productores e ingenios azucareros en México (SIAP, 2013)

Estado	Ingenio azucarero	Número
Campeche	La Joya	1
Colima	Quesería	1
Chiapas	Huixtla, Pujilic (Cía. La Fe)	2
Jalisco	Bellavista, José María Martínez (Tala), José María Morelos, Melchor Ocampo, San Francisco Ameca, Tamazula	6
Michoacán	Lázaro Cárdenas, Pedernales, Santa Clara	3
Morelos	Casasano (La Abeja), Emiliano Zapata	2
Nayarit	El Molino, Puga	2
Oaxaca	Adolfo López Mateos, El Refugio, Pablo Machado (La Margarita)	3
Puebla	Atencingo, Calipam	2
Quintana Roo	San Rafael de Pucté	1
San Luis Potosí	Alianza Popular, Plan de Ayala, Plan de San Luis, San Miguel del Naranjo	4
Sinaloa	El Dorado, La Primavera, Los Mochis	3
Tabasco	Azsuremex-Tenosique, Presidente Benito Juárez, Santa Rosalía	3
Tamaulipas	Aarón Sáenz Garza, El Mante	2
Veracruz	Central Motzorongo, Central Progreso, Constancia, Cuatotolapam, El Carmen, El Higo, El Modelo, El Potrero, Independencia, La Concepción, La Gloria, La Providencia, Mahuixtlán, Nueva San Francisco (Naranjal), San Cristóbal, San Gabriel, San José de Abajo, San Miguelito, San Nicolás, San Pedro, Tres Valles, Zapoapita-Pánuco	22
Total		57

En el país, se benefician 227 municipios de la caña de azúcar. La agroindustria de la caña de azúcar tiene un efecto socioeconómico en 12,000,000 de personas (SAGARPA, 2009-2013).

Actualmente en México operan 58 ingenios azucareros y la Unión Nacional de Cañeros participa con el 43% de la producción total de caña. El cultivo de la caña se obtiene en una superficie de 680,000 hectáreas a nivel nacional. La superficie cosechada en el ciclo 2003-2004 fue de 610,000 hectáreas, lo cual representó en un 0.6% en el PIB nacional, ocupando el cuarto lugar en relación producción de caña de azúcar por hectárea a nivel mundial (CNIAA, 2014).

México también es reconocido en el contexto mundial de azúcar con los siguientes lugares: séptimo lugar en producción y consumo de azúcar, cuarto lugar en producción de azúcar por hectárea y quinto lugar en la producción de campo de caña de azúcar. Esta industria de producción de caña de azúcar genera 440,000 empleos directos y millones de empleos indirectos. El consumo per cápita oscila alrededor de 44 kg anualmente (CNIAA, 2014).

2.2. Microorganismos en la industria azucarera

Los microorganismos presentes en la caña de azúcar proceden del suelo y de las estructuras vegetales en putrefacción. La rizosfera (suelo en interacción con la raíz) contiene una amplia gama de microorganismos, aunque no se sabe si la rizosfera de la caña de azúcar, está asociada de manera constante con microorganismos específicos. En un estudio (Mayeux y Colmer, 1960) se encontró un elevado número de *Enterobacter* (10^5 UFC g^{-1}) en el suelo próximo a la caña y en menor cuantía a medida que aumentaba la distancia desde el tallo. Aunque no de forma constante, la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* también puede encontrarse en la rizosfera en un número superior a 5×10^3 UFC g^{-1} . Con el clima húmedo y caluroso el jugo que exuda de la caña, contiene un elevado número de microorganismos, aproximadamente 10^9 UFC de bacterias y 10^6 UFC de levaduras y mohos por gramo,

los cuales pueden contaminar la caña al ser cortada (Mayeux y Colmer, 1960; Silliker *et al.*, 1980). La infección de la caña por el insecto *Diatraea saccharalis*, conocido como “borer” y el ataque de roedores favorecen la contaminación microbiana de la gramínea en el campo. Durante la investigación bibliográfica se encontró información acerca de la microbiota acompañante de la caña de azúcar (Tabla 3), en donde cabe destacar que se encontró que la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* es la que más problemas da a la industria azucarera debido a su producción de la enzima invertasa, la cual es utilizada para consumir la sacarosa presente en la caña.

Tabla 3. Principales microorganismos presentes en la caña de azúcar (Serrano, 2006)

Tipo microorganismo	Especies
Bacterias	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc detranicum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerógenes</i> , <i>Citrobacter freudii</i> , <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Klebsiella sp</i> , <i>Corynebacteirum sp</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus fragilis</i> y <i>Clostridium sp</i> .
Levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. rouxii</i> , <i>Saccharomyces pombe</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida micoderma</i> , <i>Candida intermedia</i> , <i>Pichia farinosa</i> , <i>P. membranofaciens</i> y <i>Hansenula anomala</i>
Mohos	<i>Penicillum citrovorum</i> , <i>Penicillum funiculosum</i> , <i>Aspergillus variatum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma viride</i> y <i>Monilia sitiophila</i>

Este gran número de especies demuestra la diversidad de la microbiota presente en los jugos de caña; sin embargo, hay algunas especies que se desarrollan en el jugo con más frecuencia que otras y que, por lo tanto, adquieren una gran importancia económica al consumir la sacarosa y formar polisacáridos como en el caso particular del género *Leuconostoc* (Serrano, 2006).

2.2.1. El género *Leuconostoc*

Leuconostoc es un género de bacterias del ácido láctico Gram positivas de la familia Leuconostocaceae. Las especies de *Leuconostoc* tienen generalmente forma de cocoide ovoide y a menudo forman cadenas. Son resistentes intrínsecamente a la vancomicina y catalasa negativos (lo cual los distingue de *Staphylococcus*). Son heterofermentativos, capaces de producir dextrana a partir de la sacarosa (Björkroth y Holzapfel, 2006).

Aunque inicialmente se consideraban comensales no patógenos en humanos, desde la descripción en 1985 del primer caso de bacteremia por *Leuconostoc spp.*, algunas especies son también capaces de producir infecciones a los seres humanos (Cuervo-M. *et al.*, 2008). Se consideran patógenas oportunistas aunque con muy baja frecuencia, pudiéndose encontrar en pacientes críticamente enfermos, inmunocomprometidos y con infecciones intrahospitalarias. Generalmente, se asocian a bacteremia por dispositivos intra-vasculares y al uso de nutrición parenteral total. Sin embargo, también se han descrito otras infecciones asociadas, dentro de las que se encuentran meningitis, osteomielitis, infección del torrente sanguíneo, de vías urinarias y peritonitis (Vagiakou-Voudris *et al.*, 2002). Debido a que estas enfermedades son raras, los kits estándar de identificación comerciales a menudo no identifican estos organismos (Kulwichit *et al.*, 2007).

2.3. Formación de dextranas

Las dextranas no son compuestos propios de la caña. El contenido de estos polisacáridos en la caña es mínimo o nulo. Su formación ocurre por la acción de la enzima dextransacarasa de microorganismos contaminantes que la atacan posteriormente al ser dañada su corteza. La bacteria *Leuconostoc mesenteroides* es el principal microorganismo productor de dextranas, aunque no es el único (Rodríguez, 2005; Rodríguez-Berthely, 2014).

Esta bacteria da origen a las dextranas utilizando la sacarosa y contribuyendo así, a la pérdida del disacárido. Las dextranas son polisacáridos constituidos por unidades de glucosa unidas en forma de cadena recta mediante enlaces α 1-6. Al menos entre 50 y 60% de las uniones deben ser α 1-6 para que el polímero se defina como dextrana, existiendo un amplio intervalo de masas moleculares entre ellos, ya que oscilan desde unos miles hasta millones de unidades de masa molecular (Rodríguez, 2005; Rodríguez-Berthely, 2014).

Bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, la dextransacarasa hidroliza la sacarosa y forma dextranas. Además de las pérdidas de sacarosa a consecuencia de la formación de dextranas, estos polímeros incrementan la viscosidad de los

jugos, creando problemas en los evaporadores y “tachos” (Larrahondo, 1995; Rodríguez, 2005; Villa, 2008).

2.3.1. Azúcar invertido

Se conoce con el nombre de azúcar invertido a la mezcla de glúcidos producida cuando la sacarosa se hidroliza, química o enzimáticamente. El nombre de inversión se refiere al cambio del poder rotatorio que se observa durante dicha hidrólisis, la sacarosa (+66°), al dividirse en glucosa (+52°) y fructosa (-92°), desarrolla dicho poder rotatorio sobre la luz polarizada por la fuerte influencia de la fructosa, lo que conlleva a dificultades para la cristalización del azúcar, característica indeseable en algunos casos (Baduí-Dergal, 1999).

2.4. Los biocidas

Los biocidas pueden ser sustancias químicas sintéticas o de origen natural o microorganismos que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo considerado nocivo para el hombre (European Commission, 2014).

2.4.1. Mecanismos de acción de los biocidas

Las sustancias biocidas por lo general actúan a nivel de la membrana celular del microorganismo, penetrándola y destruyendo los sistemas que permiten vivir al microorganismo. El biocida provoca la lisis de la pared proteica o lipoproteínica del organismo y penetra en su interior interrumpiendo las reacciones bioquímicas que sustentan la vida en el organismo.

Existen diferentes tipos de biocidas que se pueden presentar de tres formas: (1) Físico: Fuentes de radiación de alta energía (luz UV) que oxidan la pared proteica y prácticamente queman al microorganismo. (2) Biológicos: Sustancias creadas por organismos superiores para autodefensa, generalmente son de tipo proteico y se denominan enzimas, por ejemplo lisozimas y (3) Químicos: Pueden ser, a su vez, inorgánicos o de síntesis orgánica, por ejemplo, el dióxido de cloro (ClO₂),

isotiazolinas, cloraminas, bromuros de alquilo, cloruros de alquilo o arilo, etc. (European Commission, 2014).

2.4.2. Condiciones de un buen biocida (European Commission, 2014)

Las características deseables en un biocida son:

- Debe tener un amplio espectro de actividad, es decir, debe cubrir una amplia gama de microorganismos y virus (bacterias, virus y hongos)
- Efectivo a baja concentración: Mientras más baja es la dosis, más económico resulta el tratamiento
- Efectivo en un amplio rango de pH
- Solubles en agua
- Compatible con otras especies químicas en el medio
- Alta persistencia: Debe ser efectivo a través del tiempo
- Fácil de neutralizar: Debe poseer mecanismos desactivadores para su posterior neutralización
- Baja toxicidad humana: No debe ser perjudicial en su manipulación segura por parte del operador.

En el siguiente capítulo se presentan los más viables para consumo en la industria alimentaria.

CAPÍTULO 3

BIOCIDAS UTILIZADOS

El método de control empleado habitualmente en la industria contra los microorganismos y en especial de las bacterias ácido-lácticas como *Leuconostoc sp* es el uso de productos químicos; sin embargo, la industria alimentaria o aquella industria que elabora productos de consumo humano se ve en dificultad para el control de microorganismos usando compuestos químicos, dado que estos generalmente pueden ser tóxicos para el humano o acarrear graves consecuencias al ambiente. Existen productos que se han utilizados para la desinfección y/o sanitización de la caña de azúcar y los más comunes son: los ditiocarbamatos y otros carbamatos, el cloruro de benzalconio y las sales cuaternarias de amonio como bifluoruro de amonio y el formaldehído (Tabla 14). El ditiocarbamato de sodio es ampliamente utilizado en la industria azucarera durante la extracción del jugo de caña debido a su acción inhibitoria de *Leuconostoc mesenteroides*, principal responsable de la formación de dextranas (Hernández *et al.*, 1978).

3.1. Los ditiocarbamatos como biocidas

Los biocidas basados en los ditiocarbamatos son compuestos derivados del ácido carbámico que poseen una ligera actividad anticolinesterásica y presentan una gran capacidad para la captación de metales e interacción con radicales sulfhídrico. Existen diferentes tipos de biocidas a base de ditiocarbamatos como los que se presentan a continuación (International Programme Chemical Safety, 1988):

- Bis- ditiocarbamatos (Thiram) (Disulfuro de tetrametiltiuran)

- Etilén-Bis-ditiocarbamatos (Maneb, Zineb y Nabam) (Etilén-bis-ditiocarbamato de manganeso, zinc y sodio). Su biodegradación provoca que se degraden a etilén-tiourea (ETU) que tienen efectos biociógeno y cancerígeno
- Dimetil- ditiocarbamatos (Ziram y Ferbam) (zinc y hierro). Su biodegradación se convierten en disulfuro de carbono tiene efectos neurotóxicos
- Metil-ditiocarbamatos (sodio y potasio) comúnmente conocidos como Metam de sodio y Metam de potasio

El mecanismo de acción y efectos generales de los ditiocarbamatos son:

- Altamente sensibilizantes
- No inhiben las colinesterasas
- El thiram daña los microsomas y el citocromo P-450
- Inhibe la deshidrogenasa alcohólica y produce reacciones antabus disulfiram
- Se absorben a través del sistema digestivo y respiratorio, además irritan piel y mucosas su vía de eliminación es la orina.

3.2. Etilén bis-ditiocarbamato de sodio (Nabam) $C_4H_8N_2S_4Na_2$

Entre los biocidas utilizados en la industria alimentaria se encuentra el Nabam, que es un sólido incoloro soluble en agua. Se descompone en agua a 50°C para dar el sulfuro de hidrógeno y el disulfuro de carbono que es tóxico e inflamable (International Programme Chemical Safety, 1988).

3.2.1. Función tecnológica

Tiene una amplia gama biocida entre los microorganismos (bacterias, algas y hongos) encontrados normalmente en molinos y torres de enfriamiento (International Programme Chemical Safety, 1988).

Si se utilizan en los molinos (*mill grinding*), estrujadores (*crushers*) y en los sistemas de difusión en las cantidades indicadas. Las cantidades de cada aditivo individual están expresadas en términos de caña cruda o de remolacha cruda. Las concentraciones utilizadas en molinos que procesan caña de azúcar son de N-metil ditiocarbamato de potasio 3.5 mg L⁻¹, dimetil ditiocarbamato de sodio 3.0 mg L⁻¹ y de etilén bis-ditiocarbamato de sodio 3.0 mg L⁻¹ (CFR, 2012).

3.2.2. Estudios de toxicidad del etilén bis-ditiocarbamato de sodio (Nabam)

En la Tabla 4 se dan resultados sobre pruebas de toxicidad aguda (DL₅₀ y CL₅₀) de ditiocarbamatos en animales de experimentación. Además de la toxicidad aguda, es importante considerar otros efectos que se pueden presentar como resultado de la exposición laboral al etilén bis-ditiocarbamato de sodio los cuales se describen en la Tabla 4.

Tabla 4 Efectos del etilén bis-ditiocarbamato de sodio en el ser humano (International Programme Chemical Safety, 1988)

Efectos	Descripción	Reversibilidad
Cambios funcionales	El contacto regular con ditiocarbamatos puede ocasionar cambios funcionales en los sistemas nervioso y hepatobiliar	SD
Sensibilización e irritación	El contacto con la piel puede inducir dermatitis y algunos ditiocarbamatos inducen sensibilización	SD
Aberraciones cromosomales	La incidencia media de aberraciones cromosomales en linfocitos se incrementa en los trabajadores expuestos profesionalmente a ciertos ditiocarbamatos	SD
Tumores y carcinogenicidad	Trabajadores profesionalmente expuestos a ditiocarbamatos no mostraron incremento en la incidencia de tumores en la tiroides	SD

SD: sin dato

En la Tabla 5 se mencionan los resultados de algunos estudios de bioacumulación de ditiocarbamatos en animales de laboratorio, los cuales muestran que las sustancias de este grupo son metabolizadas y/o excretadas con rapidez por los mamíferos, lo cual disminuye el riesgo de daño a la salud cuando sucede la exposición a pequeñas dosis de la sustancia.

Tabla 5. Bioacumulación de ditiocarbamatos

Órganos afectados	Descripción	Reversibilidad	Referencias
Sangre, hígado, riñones, intestinos	Ziram: concentración máxima en el hígado (26.6 mg kg ⁻¹ de tejido) Al final del primer día, la concentración en los intestinos alcanza un máximo y decrece abruptamente, detectándose 5% del compuesto inalterado en las heces y Glándulas adrenales: 2.4 mg kg ⁻¹	Sangre: 2 días Glándulas adrenales: 3 días Bazo: 6 días	International Programme Chemical Safety (1988) Vekshtein y Khitsenko (1971)

El etilén bis-ditiocarbamato no es inhibidor de la colinesterasa y de la acetaldehído deshidrogenasa (Morgan, 1989). La principal vía de exposición del etilén bis-ditiocarbamato de sodio es la exposición ocupacional por contacto dérmico en los lugares donde se utiliza o fabrica la sustancia. Durante el proceso de fabricación se puede presentar la liberación del compuesto al ambiente. También se puede liberar esta sustancia en las labores de aplicación cuando se utiliza como fungicida. En un estudio sobre irritación y sensibilización en humanos se utilizó una prueba convencional denominada de parche o cojincillo. La prueba consistió en humedecer un cuadro de algodón con una solución de NABAM (etilén bis-ditiocarbamato de sodio), colocarlos a una población de 25 personas sobre la piel del antebrazo para exponerlos a la solución, 14 días después se repitió el procedimiento en el antebrazo opuesto. En una segunda prueba el cojincillo permaneció en contacto con la piel durante 48 h. De los 25 sujetos que recibieron el tratamiento 13 mostraron irritación (eritema leve y prurito). Cuando se aplicó por segunda ocasión, 18 de los 25 reaccionaron con eritemas leve a severo, edema y vesiculación, lo cual se interpreta como sensibilización (WHO, 2012).

El etilén bis-ditiocarbamato se degrada por la luz ya que la absorbe en la región ultravioleta del espectro y, por lo tanto, es susceptible a la fotólisis directa a los rayos del sol (Toxicology Data Network, 2012). También se puede degradar por humedad y el calor y su principal producto de degradación es el etilén-tiourea (ETU). Cuando alcanza la atmosfera o atmósfera se presenta en fase particulada puede ser removido de la atmosfera por procesos de deposición húmeda o seca (Sanborn, 1977; Tomlin, 2004; WHO, 2012). Por su factor de bioconcentración (BCF=3) y su

valor de partición octanol-agua, que es de $\log K_{ow} = 4.24$, se sugiere que tiene un bajo potencial de bioacumulación en organismos acuáticos (Meylan y Howard, 1995).

En un reactor de lodos activados a escala del laboratorio se observó que su degradación ocurre a una velocidad de 96% por día, lo cual indica que la biodegradación es un proceso importante de su movimiento en el ambiente (Toxicology Data Network, 2012).

3.2.3. Los métodos analíticos para determinar su identificación (Nabam)

Se dispone de varios métodos de determinación que permiten la cuantificación de etilén-bis-ditiocarbamato de sodio en muestras de alimentos y en muestras de agua (Tabla 6). Algunos de ellos son generales (para el grupo de ditiocarbamatos), mientras que otros son específicos para algunos de ellos.

Tabla 6. Métodos empleados en el análisis de ditiocarbamatos

Técnica	Limite de detección / % de recuperación.	Cantidad de muestra	Referencia bibliográfica
Espectrofotométrico	0.1 mg kg ⁻¹ / 74 a 100%	500 g	Crnogorac y Schwack (2007)
Cromatografía de gases (CG)	0.001 mg kg ⁻¹ / SD	20 g	Crnogorac y Schwack (2007)
Cromatografía líquida con fotometría para ditiocarbamatos intactos	49 µg L ⁻¹ / 90 a 99%	SD	Crnogorac y Schwack (2007)
Cromatografía líquida con espectrometría de masas LC-MS2	0.01 mg kg ⁻¹ / 79 a 100%	SD	Brewin <i>et al.</i> (2008)
Método polarográfico	0.02 mg kg ⁻¹ / SD	SD	Brewin <i>et al.</i> (2008)
Cromatografía líquida de alta presión, CLAR (HPLC)	0.01 mg kg ⁻¹ / SD	SD	Gustafsson y Thompson (1981)

SD – sin dato

3.2.4. Aplicación de Nabam en la industria azucarera

En la Tabla 7 se describe la dosificación y la función tecnológica del nabam. La dosis máxima permisible es 3.0 mg L⁻¹ como sustancia pura, registrada por la FDA en FDA21CFR173.320(b)2. Si se utilizan en molinos (*mil grinding*), estrujadores (*crushers*) y en los sistemas de difusión en las cantidades indicadas (CFR, 2012).

Las cantidades de cada aditivo individual están expresadas en términos de masa de caña cruda.

Tabla 7. Uso y dosificación del nabam (International Programme Chemical Safety, 1988)

Ingrediente activo	Función tecnológica	Objetivo de la aplicación	Dosis recomendada
Etilén-bis-ditiocarbamato de sodio	Plaguicida en alimentos procesados	Eliminar o reducir la carga microbiana contaminante	10 a 15 g ton ⁻¹ caña molida (10-15 mg L ⁻¹)

El producto comercial aplicado en la dosis recomendada en la ficha técnica del producto, 10 a 15 g ton⁻¹ caña molida (10-15 mg L⁻¹). De acuerdo con el límite establecido por la US-FDA, 3.0 mg L⁻¹ de nabam con base en caña molida, la recomendación técnica excede dicho límite. La regulación correspondiente de la US-FDA (CFR, 2012) indica que el límite se establece para la aplicación de un aditivo individual. De esta manera, la concentración recomendada por la ficha técnica rebasaría en cualquier caso (intervalos alto y bajo) para dicho límite. La Comisión Europea establece límites máximos permisibles para diferentes productos de origen agrícola; sin embargo, no se contempla el azúcar entre ellos. En la regulación de la Comunidad Europea (EC Commission Regulation No 839, 2008) se encuentran estos límites pero, específicamente, para caña de azúcar y para miel de abeja no hay un límite marcado.

3.3. N–metilditiocarbamato de sodio C₂H₆NS₂Na o metam sodio (MS)

Es otro biocida de la familia de los ditiocarbamatos es una sal de sodio de metilditiocarbamato, también conocida como metam sodio (MS). El metam sodio es un producto químico en estado líquido para la fumigación preventiva de suelos, que se convierte en el gas isotiocianato de metilo (*MITC*, por sus siglas en inglés). Este compuesto en el suelo tiene una movilidad muy alta y es degradado por acción de los microorganismos (vida media estimada de 0.5 a 50 días). En el agua es eliminado por hidrólisis, mostrando vida media de 65 a 178 días a un pH = 7, de 7 a 10 días a

pH = 10 y de 15 a 67 días a pH = 5. Su potencial de bioconcentración en organismos acuáticos es bajo (Van Leeuwen *et al.*, 1985).

3.3.1. Función tecnológica

Tiene una amplia gama biocida entre los microorganismos (bacterias, algas, hongos) encontrados normalmente en molinos y torres de enfriamiento en la industria azucarera. Por ello es que funciona como sanitizante y controlador de la inversión del azúcar. Se dosifica en los molinos dependiendo del sistema de imbibición (agua caliente adicionada al bagazo para disolver el azúcar residual), buscando que el jugo ya tratado circule por todas las partes de la batería de molinos y sistemas coladores, si se utiliza en los molinos (*mill grinding*) y estrujadores (*crushers*) y en los sistemas de difusión en concentraciones de 3.5 mg L^{-1} , expresada en términos de masa de caña cruda o de remolacha cruda (CFR, 2012). Otro de los usos del metam es como desinfectante, inhibidor de la corrosión, coagulante, agente vulcanizante y fungicida. Es utilizado en el tratamiento de agua, para la industria del caucho o hule y está registrado como biocida para aceites de cortes y sistemas acuosos en industrias como la curtiduría y la fabricación de papel. También se utiliza como microbicida en pinturas y recubrimientos (Toxicology Data Network, 2012). En todas estas aplicaciones existe el riesgo de liberación de la sustancia hacia el ambiente a través de distintas corrientes de desechos.

3.3.2. Estudios toxicológicos

La Tabla 8 muestra los diferentes estudios realizados al metam para determinar su grado de toxicidad en mamíferos y ambientes acuáticos.

Tabla. 8. Toxicidad (DL₅₀ y CL₅₀) de metam en animales de experimentación

Compuesto	Especie	Dosis	Referencia
Metam	Rata de experimentación	DL ₅₀ = 1000 mg kg^{-1}	Lewis (1996)
	Ratón de experimentación	DL ₅₀ = 1500 mg kg^{-1}	Lewis (1996)
	<i>Poesilia reticulata</i>	CL ₅₀ = $2.6 \text{ mg L}^{-1} / 96 \text{ h}$	Verschueren (2001)
	<i>Salmo gairdneri</i>	CL ₅₀ = $6.4 \text{ mg L}^{-1} / 60 \text{ días}$	Verschueren (2001)

En el trabajo de Moriya *et al.* (1983), se reporta que el metam resultó positivo en los estudios de mutagenicidad realizados utilizando el ensayo de reversión en sistemas bacterianos (*Bacterial reversion-assay systems*) con 5 cepas de *Salmonella typhimurium* y una de *Escherichia coli*.

Cuando ocurre su liberación hacia la atmosfera permanece en fase particulada en su forma salina y no es volátil. En su fase particulada puede ser removido de la atmosfera por deposición húmeda o seca. Cuando el metam se libera en el suelo tiene una gran movilidad debido a que su coeficiente de partición es $K_{oc} = 2.2$. Su pK_a estimado es de 5.4, lo que indica que este compuesto permanece principalmente en su forma disociada a los valores de pH normales en los componentes del medio ambiente. Su volatilización en los suelos húmedos o secos no es un destino importante (Toxicology Data Network, 2012).

En un ensayo de biodegradación anaerobia del metam se formaron como producto de descomposición disulfuro-tetrametil-thiuram y monosulfuro-tetrametil-thiuram (Toxicology Data Network, 2012).

Bajo los valores normales de pH en el ambiente, el metam permanece en su forma disociada y, por lo tanto, su volatilización desde el ambiente acuático su movilidad no es un proceso importante. La bioconcentración tampoco es un proceso importante ya que se hidroliza rápidamente bajo condiciones de pH ácido y también como resultado de su carácter iónico. La vida media del metam por hidrólisis a pH de 5.0, 7.0 y 9.0 fue de 18 min, 25.9 h y 433.3 h, respectivamente (Toxicology Data Network, 2012).

Se ha demostrado que la fotólisis en soluciones acuosas y en el suelo es un proceso de degradación importante para el compuesto relacionado. La exposición ocupacional a esta sustancia puede ocurrir por inhalación y por contacto dérmico en los puestos de trabajo donde se fabrica o se manipula. Su manejo es extenso para el

tratamiento de agua a escala industrial, para lo cual existen equipos de manejo mecanizados que minimizan la exposición de los trabajadores a esta sustancia.

3.3.3. Aplicación del metam en la industria azucarera

En la Tabla 9 se detallan la función tecnológica y las cantidades recomendadas.

Tabla 9. Uso y cantidades del metam (International Programme Chemical Safety, 1988)

Ingrediente activo	Función tecnológica	Objetivo de la aplicación	Dosis recomendada
Metam	Biocida en molinos y estrujadores	Eliminar o reducir la carga microbiana contaminante	8 a 12 g/ton de caña molida

3.4. Cloruro de benzalconio (CB) $C_9H_{13}ClNR$

El cloruro de benzalconio es un surfactante catiónico cuya acción biocida se da por la modificación en la tensión superficial en las superficies que contacta. Este producto posee un excelente poder tensoactivo, es decir, que al disolverlo en agua se acumulan en las interfaces superficiales, dando lugar a la característica orientación del grupo polar. Derivada de esta propiedad hay que resaltar su capacidad para adherirse a materias sólidas, como el cabello; características que tendrá su aplicación en la elaboración de productos para el cuidado capilar (Koyama y Shimazu, 2005).

3.4.1. Función tecnológica

El cloruro de benzalconio y la mayoría de las sustancias cuaternarias son solubles en agua sin importar su dureza (contenido de sales disueltas). Es incompatible con jabones y humectantes aniónicos y perfectamente compatible con anfóteros, detergentes no iónicos y otros tensoactivos catiónicos.

Los componentes de las sales cuaternarias de amonio (QAC, por sus siglas en inglés) son usados como biocidas, con un amplio espectro antimicrobiano. Son usados ampliamente en la industria alimentaria, en la textil y en hospitales. Se han

realizado numerosos estudios sobre la síntesis y características antimicrobianas de varias de estas sales cuaternarias y se ha revelado que su acción antimicrobiana en la pared celular tiene un efecto letal directo o indirecto sobre las células microbianas. Por lo tanto, se utiliza el CB para la síntesis de nuevos biocidas con características similares mejoradas, con dobles sales de amonio (*bis-QAC*) (Maeda *et al.*, 1999).

Dentro de los desinfectantes químicos se encuentran los compuestos de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio, cloruro de alquildimetilbenzilamonio y cloruro de dodecildimetilamonio), los cuales son ampliamente utilizados como desinfectantes. Son compuestos que no manchan, son inodoros, no corrosivos y relativamente no tóxicos. Su acción se atribuye a la inactivación de las enzimas productoras de energía, desnaturalización de las proteínas celulares esenciales y principalmente por la ruptura de la membrana celular (Villa, 2008).

El mecanismo de acción germicida se basa en sus propiedades tensoactivas. La molécula se va uniendo a la pared celular hasta cubrirla por completo, impidiendo el tránsito de nutrientes entre el microorganismo y el medio hasta el punto de provocarle la muerte. El sitio principal de acción de estos compuestos parece ser la membrana celular, donde se absorben y causan cambios en la permeabilidad. Es un antiséptico eficaz que destruye en pocos minutos a muchas bacterias, hongos (incluso levaduras) y protozoarios pero no actúa contra virus y esporas (Villa, 2008).

También es usado en investigaciones farmacéuticas donde este surfactante catiónico se emplea como potenciador o mejorador de permeación para la administración de fármacos por vía oral, contribuyendo al transporte a través de la membrana con un comportamiento transcelular (Whitehead y Mitragotri, 2008).

Es utilizado en estudios microbiológicos como agente bactericida catiónico contra biopelículas bacterianas (*Pseudomonas aureoginosas* y *Staphylococcus aureus*) que son patógenos oportunistas en los seres humanos, especialmente de aquellas

correlacionadas con el uso de dispositivos médicos como catéteres (Campanac *et al.*, 2002).

El efecto de inhibición del cloruro de benzalconio en la proliferación y desarrollo de especies de hongos contaminantes en alimentos, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Alternaria alternata*, también ha sido estudiado *in vitro*, ya que los microorganismos pueden formar una biopelícula invisible sobre la superficie de alimentos duros. Por ello se requiere de un agente desinfectante y esterilizante efectivo, persistente y durable en la industria alimentaria para todos los productos que están en contacto con la superficie de los alimentos, incluyendo equipo, utensilios, unidades de refrigeración, aparatos para empaquetado y distribución de alimentos entre otros (Basaran, 2011). El cloruro de benzalconio es un desinfectante incoloro e inodoro comúnmente usado por la industria alimentaria para desinfectar superficies contra un gran número de microorganismos. El CB es activo a bajas concentraciones, considerado rápido y de ligera toxicidad en mamíferos (Basaran, 2011). Los componentes de sales cuaternarias de amonio mostraron la mayor eficacia contra la infección de *Fusarium sp* de plantas de plátano que estuvieron expuestas durante 30 segundos. Con una concentración de 0.005 mg mL^{-1} inhibe *in vitro* significativamente el crecimiento de los micelios de *A. parasiticus*, causante de la contaminación por aflatoxinas (compuestos cancerígenos probados). Las combinaciones CB+EDTA y CB+Na₂EDTA son más efectivas que el CB (Bazaran 2011), aunque no es conveniente usar el EDTA porque se desconoce todavía su posible efecto en los seres humanos.

Es usado en el aseguramiento de la calidad microbiológica de los vegetales frescos empleando soluciones del lavado que contienen 0.1 mg mL^{-1} del cloruro de benzalconio. Se evaluó para *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, en lechugas y jitomates contaminados. De la misma forma, se hizo para ácido láctico al 0.2% y para soluciones acuosas de cloro a 200 mg L^{-1} . Las alteraciones de la apariencia de los productos fueron evidentes después de 7 días de almacenamiento. Las hojas de lechuga y los jitomates almacenados a 4°C mostraron características organolépticas

aceptables, excepto para el CB y grupos tratados con ácido láctico, que presentan pequeñas manchas amarillentas en la superficie. Aún así, el CB es uno de los desinfectantes con menor cantidad de UFC (unidades formadoras de colonias). Para *Yersinia enterocolitica* (Velázquez et al., 2009), su capacidad surfactante le permite penetrar y adherirse a superficies porosas lo que lo hace eficaz contra organismos Gram positivo y negativos.

El CB es el preservativo más comúnmente usado para fórmulas oftálmicas en varias formas y dosificaciones. El nivel de CB utilizado en las preparaciones farmacéuticas está generalmente en un intervalo de 0.002-0.02%, pero podría ser mayor de 0.2% en algunos casos, dependiendo de los variados atributos de la formulación oftálmica (Liu et al., 2009). Como se observa en la Tabla 10 existen varios usos para las soluciones de cloruros de benzalconio, como desinfectante tópico preoperatorio, como esterilizante de guantes e instrumentos quirúrgicos, para antisépticos usados de lentes de contacto y para conservadores de fármacos (Xue et al., 2004).

Tabla 10. Funciones tecnológicas del cloruro de benzalconio (CB)

Función tecnológica	Cantidad	Referencia
Desinfección de la caña de azúcar	Concentración mínima inhibitoria = 40 mg L ⁻¹	Villa (2008)
Surfactante catiónico para administración de fármacos vía oral	No aplica	Whitehead y Mitragotri (2008)
Agente bactericida contra biopelículas bacterianas	0.1-5.0 mL /10 L	Campanac et al. (2002)
Para síntesis de nuevos biocidas	Varias	Maeda et al. (1999)
Desinfectante de alimentos y equipo para su manejo	0.005 mg mL ⁻¹	Basaran (2011) Kröckel et al. (2003) Velázquez et al. (2009)

3.4.2. Estudios toxicológicos

Se realizó un estudio en ratas macho tipo Wistar para evaluar el efecto irritante del CB, específicamente posibles lesiones como dermatitis y conjuntivitis como resultado de la irritación inducida por el cloruro de benzalconio. Se detectó que, a concentraciones de 0.05-0.10 m/v %, induce lesiones en la mucosa de la cavidad

nasal de las ratas. Los resultados se muestran en la Tabla 11 (Kuboyama *et al.*, 1997).

Tabla 11. Estudios toxicológicos del cloruro de benzalconio (CB)

Especie	Vía de administración	Dosis	Referencia
Ratas	Oral	DL ₅₀ : 234 mg kg ⁻¹	Xue <i>et al.</i> (2004)
	Intravenosa	DL ₅₀ : 14 mg kg ⁻¹	Xue <i>et al.</i> (2004)
Humano	Citotoxicidad aguda en células	DL ₅₀ : 6.5x10 ⁻⁵ mg kg ⁻¹	Maeda <i>et al.</i> (1999)
	Oral	Fatal: 100-400 mg kg ⁻¹	Xue <i>et al.</i> (2004)
	Intravenosa	Fatal: 5-15 mg kg ⁻¹	Xue <i>et al.</i> (2004)

Estudios *in vitro* de genotoxicidad y citotoxicidad de CB en células respiratorias epiteliales indicaron que causa cambios relevantes en las células respiratorias en las concentraciones comúnmente empleadas en preparaciones nasales comercialmente disponibles. El momento de la muerte microbiana cambió dependiendo de la dosis, con el valor máximo de 0.02% y disminuyó a concentraciones más altas (Deuschle *et al.*, 2006).

El CB a bajas concentraciones, que son las normalmente utilizadas en productos conservantes o estabilizantes en la medicina (0.007-0.01%), no se han reportado casos de intoxicación o envenenamiento. Se han presentado algunas respuestas alérgicas en soluciones tópicas y locales de la mucosa, causadas por gotas oculares o aerosoles nasales. La mayoría de los casos de las intoxicaciones ha sido resultado de la ingesta accidental de productos como detergentes o desinfectantes que contienen cantidades significativas de CB menores al 10% (Xue *et al.*, 2004). Se han reportado casos fatales de envenenamiento por cloruro de benzalconio en los cuales la solución ingerida tenía una concentración de 10%. Como síntomas de intoxicación pueden mencionarse una sensación punzante o de picor de las membranas mucosas orales, dolor de garganta, cianosis, convulsiones y, en caso más graves, el coma (Koyama y Shimazu, 2005).

Existe un caso de envenenamiento reportado, de un hombre de 22 años que tomó 20-100 mL de una solución al 10% de CB mezclado con café. Los síntomas

presentados fueron: presión sanguínea 120/60 mm Hg, 94 pulsaciones por minuto, temperatura corporal de 36.4°C, 16 respiraciones/minuto, consciente, reacción a la luz. Las concentraciones en suero sanguíneo eran de 52 mg mL⁻¹ en total, concentraciones en los jugos gástricos de 54.4 µg mL⁻¹ (Koyama y Shimazu, 2005).

Los métodos analíticos para determinar su identidad, pureza y contaminantes se muestran en la Tabla 12. Una de las razones por las que los datos analíticos del CB son limitados es su dificultad de ser analizado en material biológico. Existen varios métodos reportados para determinar CB, por ejemplo: extracción de CB formando complejos con tintes, pirólisis y subsecuente cromatografía de gases, valoración de componentes de sales cuaternarias de amonio, espectrometría de masas con entrada directa y varias técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución (*HPLC*, en inglés) para soluciones acuosas no biológicas (Xue *et al.*, 2004).

Tabla 12. Resumen de métodos analíticos para determinar cloruro de benzalconio

Técnica	Limite de detección	Cantidad de muestra	Referencia
Análisis CG/EM	Para método de exploración: 1-2 ng mL ⁻¹ Obtenido por cuantificación de cromatografía de masas: 10 ng mL ⁻¹	10 µL	Koyama y Shimazu (2005)
<i>HPLC</i>	La detección fue a longitud de onda de 209 nm	50 µL	Liu <i>et al.</i> (2009) Kröckel <i>et al.</i> (2003)
<i>RP-LC</i>	50-150 µg mL ⁻¹ , longitud de onda 215 nm	50 µL	Trivedi y Patel (2010)
<i>LLE-LC-MS/MS</i>	0.6 ng mL ⁻¹ para valoración, 4/19 ng L ⁻¹ para muestra de agua	10 µL	Martinez-Carballo <i>et al.</i> (2007)
Celda de difusión	Longitud de onda, 214 nm Detecta concentraciones entre 1-400 mg L ⁻¹	0.1 mL	Smith <i>et al.</i> (2002)

Cromatografía de gases (CG)/espectrometría de masas(EM), cromatografía de líquidos de alta resolución (*HPLC*), cromatografía líquida en fase reversa (*RP-LC*), extracción líquido-líquido (*LLE*)-cromatografía líquida(*LC*)-espectrometría de masas(*MS*)/*tandem* espectrometría de masas(*MS*)

3.4.3. Aplicación del cloruro de benzalconio en la industria azucarera

El cloruro de benzalconio es regulado por la *Food and Drug Administration, FDA*, de los EEUU y formulado para la industria azucarera en el registro de la FDA y es el 21 CFR Ch Sec. 172.165 (USFDA, 2011).

De acuerdo con esta formulación, el aditivo puede ser agregado en el jugo de caña de azúcar, antes de la clarificación y el tratamiento del zumo de caña de azúcar debe tratarse como se detalla en la Tabla 13 (CRF, 2012).

Tabla 13. Aplicación de cloruro de benzalconio en la industria azucarera (CRF, 2012)

Ingrediente activo	Función tecnológica	Operación unitaria en que se aplica	Objetivo de la aplicación	Dosis recomendada
Cloruro de benzalconio	Sanitizante y controlador de la inversión	Molinos	Evitar la formación de residuos gelatinosos	10 a 20 kg por cada 1000 ton de caña molida

Los productos químicos más comúnmente usados aprobados por la *Food and Drug Administration (FDA)* para uso como desinfectante en contacto con la superficie de la comida, es el cloro, el peróxido de hidrógeno y los componentes de sales cuaternarias de amonio (Basaran, 2011).

Utilizado en los molinos (70% dosificación y 30% inicial) se aplica en el proceso de extracción del jugo, en una dosis de 10-20 mg L⁻¹ / ton de caña molida como sanitizante y controlador de la inversión límite permitido por la *FDA* (CFR, 2012)

Es utilizado en la industria azucarera en el área de trituración de la materia prima y obtención del extracto debido a las ventajas que presenta:

- Evita la formación de residuos gelatinosos, que dan lugar a la proliferación de bacterias en puntos localizados.
- Por sus propiedades humectantes y dispersantes, penetra rápidamente evitando la adherencia de microorganismos al sistema, reduciendo el tiempo de limpieza en los molinos.
- Por su carácter catiónico tiene un poder bactericida mayor que otros productos similares, dando por resultado una dosificación menor manteniendo más tiempo su actividad.

De acuerdo con los proveedores, el cloruro de benzalconio puede agregarse al jugo de forma continua o por choque, en una proporción de 10 a 20 mg L⁻¹ con relación a la masa de la caña (10-20 kg por cada 1000 ton de caña molida), concentraciones dentro de lo permitido por la FDA.

3.5. Formaldehído, formol o metanal (CH₂O)

El formaldehído, por su parte, se utiliza ampliamente como bactericida o conservador, en la fabricación de ropa, plásticos, papel y tableros. La industria azucarera lo utiliza para el control de microorganismos contaminantes.

3.5.1. Mecanismo de acción del formaldehído

Su capacidad bactericida se da por su efecto alquilante de los grupos sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo o amina. Produce hidroximetilaciones o condensaciones (entrecruzamientos) en las proteínas y en los nitrógenos de los anillos de las bases púricas, por lo que su espectro es muy amplio (OMS, 1982).

3.5.2. Toxicidad del formaldehído

Es importante destacar que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer en sus últimos reportes lo ha clasificado en el grupo 1, carcinógeno confirmado para humanos. Aún que todavía se utiliza como conservador en la formulación de algunos cosméticos y productos de higiene personal como champúes, cremas para baño y sales de yodo para la higiene íntima femenina.

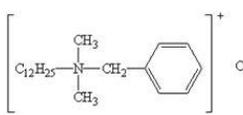
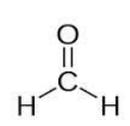
Se está utilizando también en los alisados permanentes del cabello, pero su uso en estos productos se ha prohibido ya en algunos países debido al alto riesgo para la salud de quien trabaja con ellos habitualmente (OMS, 1982).

En la Tabla 14 se muestra el resumen de los biocidas en estudio con algunos de sus estudios de toxicidad, fórmula condensada, estructura y No. CAS.

Tabla 14. Resumen de los biocidas en estudio

N-metil ditiocarbamato de sodio				QZ-881 Mezcla de Etilén bis-ditiocarbamato de sodio y N-metil ditiocarbamato de potasio			
Fórmula condensada: C ₂ H ₆ NS ₂ Na Número CAS: 137-42-8 $\left[\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{N} - \text{C} - \text{S}^- \\ \\ \text{S} \end{array} \right] \text{Na}^+$				Fórmula condensada: C ₄ H ₈ N ₂ S ₄ Na ₂ y C ₂ H ₆ NS ₂ K Número CAS: 142-59-6 y 128-03-0 $\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{S} - \text{Na} \\ \\ \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{S} - \text{Na} \\ \\ \text{S} \end{array}$			
Nombre del estudio	Animal del estudio	Dosis	Referencia	Nombre del estudio	Animal del estudio	Dosis	Referencia
Examen patológico	Conejo	0.5-1.5 g/kg	Sheftel (2000)	DL50 rata (Etilén bis-ditiocarbamato de sodio)	Rata	210 mg/kg	WHO (2012)
Exposición subcrónica o precrónica	Conejo	100 mg/kg	Sheftel (2000)	CL50 (Etilén bis-ditiocarbamato de sodio)	Trucha	11 mg/kg	EPA-RED (2010)
Efectos tóxicos <i>in vivo</i>	Ratas	2.5 mL/kg	Dailey (1969)	NOEL (N-metil ditiocarbamato de potasio)	Rata	12.5 mg/kg	Rodwell (1988)
Neurotoxicidad	Conejo	100mg/kg	Stack y Rodricks (1971)	LOEL (N-metil ditiocarbamato de potasio)	Ánade real	12.5 mg/kg	Rodwell (1988)
DL50 rata	Rata	DL50= 1000mg/kg	Lewis (1996)				

Tabla 14. Resumen de biocidas en estudio (cont.)

Cloruro de benzalconio (CB)				Formaldehído ó formina (FA)			
Fórmula condensada: $[C_6H_5 - CH_2N(CH_3)_2R]^+Cl^-$ Número CAS: 8001-54-5				Fórmula condensada: CH_2O Número CAS: 50-00-0			
							
Nombre del estudio	Animal del estudio	Dosis	Referencia	Nombre del estudio	Animal del estudio	Dosis	Referencia
Toxicidad en especies acuáticas	Carpa y pez cebra	500 mg/L	Rieger <i>et al.</i> (1980)	Exposición aguda	Ratas wistar macho	30 mg/L /6h	Castleman y Ziem (1994)
Toxicidad oral exposición aguda	Ratas	7 mL (al 1%) /kg	Walker (2003)	Exposición subcrónica	Ratón	40 mg/L /5h	Zhang <i>et al.</i> (2013)
Toxicidad oral exposición aguda	Ratas	5 mL (al 13%) /kg	Ferk <i>et al.</i> (2006)	Carcinogenicidad ó exposición crónica	Ratón	Sol. 10% en agua	IARC (2004)
DL50 oral en ratas	Ratas	400 mg/kg	Walker, 2003	Carcinogenicidad ó exposición crónica	Ratas Wistar hem-bra	15 o 82 mg/kg	Til <i>et al.</i> , 1989
Toxicidad ocular exposición aguda	Conejos albinos	0.1 mL (al 0.65%) / c/ojo	Walker, 2003	Carcinogenicidad ó exposición	Embriones de ratas	1500 o 1000 mg/L	Soffritti <i>et al.</i> , 2002

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

4.1. Diagrama de flujo

En la Fig. 1 se presenta la estrategia experimental que se siguió para el desarrollo de esta investigación.

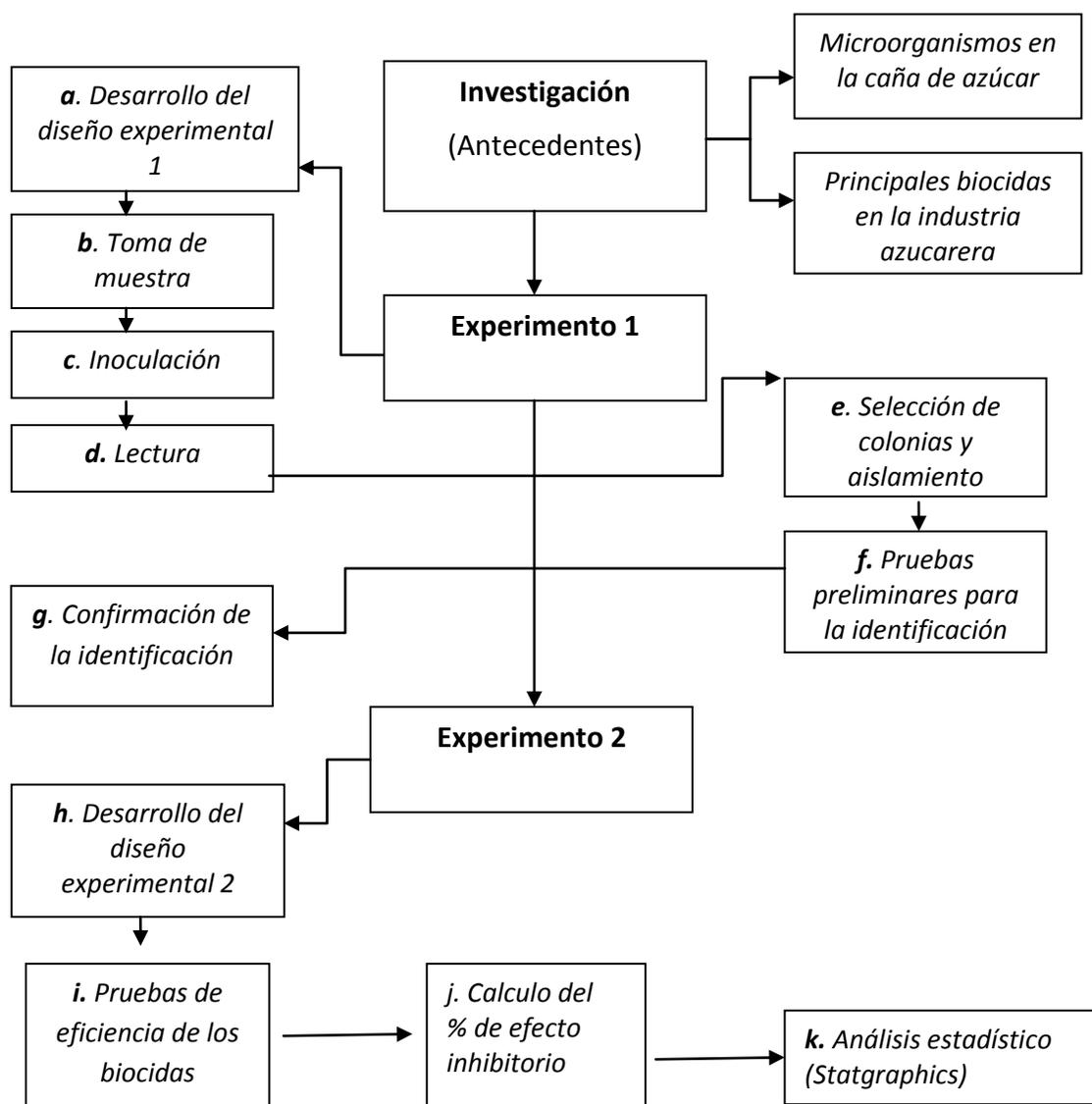


Fig. 1. Desarrollo experimental

4.2. Material y reactivos

El material y reactivos empleados se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Reactivos y materiales utilizados

Reactivos y equipo	Marca - proveedor-modelo
Agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe)	Dibico
Agar M17 (Seg. Terzaghi)	Dibico
Agar APT (All Purpose Tween)	Dibico
Agua estéril al 0.9% de NaCl	PiSA S.A. de C.V.
Cajas Petri de 100 x 15 mm	SyM Laboratorios
Asa bacteriológica	Veravitrum
Formaldehído (FA) (biocida)	J.T. Baker
N-metilditiocarbamato de sodio (MS) (biocida)	Chem Service S.A. de C.V.
Mezcla QZ-881 (biocida)	Zuker S.A. de C.V.
Incubadora a 35°C	SEV-BIGM48S
Incubadora a 45°C	LUZEREN mod: DHP-9052
Campana de flujo laminar	SEV-CFL102
Autoclave	AESA mod: CV-250
Equipo de análisis automatizado	MS-bioMérieux VITEK 2.0 systems 06.01
Hisopos estériles	Industrias Ruisánchez S.A de C.V.
Extractor casero	Oster mod. 333-08
Colorante cristal violeta	HYCEL de México S.A de C.V.
Safranina	HYCEL de México S.A de C.V.
Solución alcohol-acetona al 20%	J.T. Baker
Lugol	HYCEL de México S.A de C.V.
Tinta china	Pelikan

4.3. Desarrollo experimental

4.3.1. Diseño experimental

Se inició planteando el diseño experimental, es de tipo factorial considerando tres factores (a) medio; (b) temperatura y (c) tiempo y tres niveles dando como resultado 3^3 es decir 27 pruebas las cuales se realizaran por triplicado con un total de 81 experimentos.

El diseño experimental para determinar el medio de cultivo óptimo para el aislamiento de *Leuconostoc* se presenta en la Tabla 16. Los tres factores (a) medio; (b) temperatura y (c) tiempo y tres niveles dando como resultado un diseño de 3^3 igual a 27 experimentos que serán repetidos tres veces dando un total de 81 experimentos.

Tabla 16. Diseño experimental 1. Selección del medio de cultivo

Factores	Niveles		
	1	2	3
(a) Medio	MRS	M17	APT
(b) Temperatura (°C)	Ambiente	35	45
(c) Tiempo (horas)	24	48	72

MRS (De Man, Rogosa y Sharpe), M17 (Seg. Terzaghi), APT (All Purpose Tween)

Una vez seleccionado el medio de cultivo se procede a seleccionar la dosis óptima de inhibición mediante el diseño experimental presentado en la Tabla 17 con 4 factores (a) biocida, (b) dosis, (c) temperatura y (d) tiempo y tres niveles en cada uno de los factores dando como resultado un diseño de 3^4 igual a 81 experimentos con 3 repeticiones dando un total de 243 experimentos.

Tabla 17. Diseño experimental 2. Selección de la dosis óptima

Factores	Niveles		
	1	2	3
(a) Biocida	MS	QZ	FA
(b) Dosis	A	B	C
(c) Temperatura(°C)	Ambiente	35	45
(d) Tiempo (horas)	24	48	72

MS: ditiocarbamato de sodio; QZ: mezcla QZ-881; FA: Formaldehído; A, B y C son dosis descritas en la Tabla 18

Teniendo como base la información bibliografía presentada en la Tabla 18, con los biocidas más usados en la industria azucarera, así como los intervalos de las dosis empleadas de cada uno de ellos, se pudieron establecer las dosis de trabajo (A,B,C).

Tabla 18. Biocidas utilizados comúnmente en la industria azucarera

Nombre del biocida	Dosis empleada	DL50	Referencias
Metam (ditiocarbamato de sodio) (MS)	(A) 15-20 mg kg ⁻¹	1000 mg kg ⁻¹ oral en ratas	Bonilla-Vidal (2013)
Mezcla QZ o QZ-881 (Etilénbisditiocarbamato de sodio y N-metil ditiocarbamato de potasio)	(B) 15-20 mg kg ⁻¹	210 mg/kg oral en ratas	Villa (2008)
Formaldehído (FA)	(C) 2-5 mg kg ⁻¹	100 mg kg ⁻¹ , oral en ratas	OMS (1982)

4.3.2. Toma de muestra

Para la obtención de la muestra se molió caña de azúcar proveniente de un ingenio azucarero cooperante del Estado de Veracruz, México (Fig. 2). La caña se lavó y secó envolviéndola en papel periódico para su conservación en un cuarto frío a 4°C hasta su uso (Fig. 3). Posteriormente, se llevó a cabo la molienda (Fig. 4), para la extracción del jugo de la caña con ayuda de un extractor casero (Oster mod. 333-08). El jugo fue colectado en un recipiente estéril de 250 cm³ obteniendo aproximadamente 300 mL de jugo de caña a partir de 1 kg de caña de azúcar.



Fig. 2. Ingenio azucarero



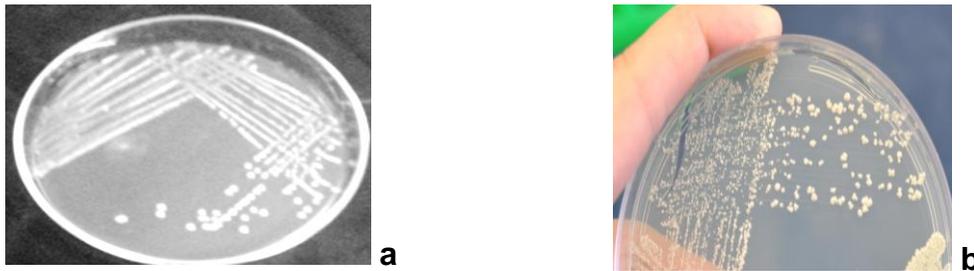
Fig. 3. Caña lavada



Fig. 4. Molienda de la caña

4.3.3. Inoculación

La inoculación se hizo mediante el método de siembra en superficie en placas Petri, para lo cual cada muestra de jugo fue diluida en agua peptonada al 0.1% (Merck) hasta una dilución de 10^{-4} . Se inocularon 0.1 cm^3 en tres diferentes medios: el MRS (De Man, Rogosa y Sharpe), el M17 (Seg. Terzaghi) y el APT (*All Purpose Tween*). Se optó por usar la técnica de estriado en cuadrante radial (Figs. 5a y b) debido a que dicha técnica ayuda a generar colonias aisladas y así poder facilitar el estudio de las características morfológicas para la identificación posterior (Ramírez-Gama *et al.*, 2008).



Figs. 5 a y b. Técnica de estriado en cuadrante radial

4.3.4. Lectura

Posterior a la incubación, se realizaron las observaciones de cada placa a las 24, 48 y 72 horas. Las incubadoras utilizadas fueron la SEV-BIGM48S a temperatura de 35°C y la LUZEREN mod: DHP-9052 a una temperatura de 45°C .

4.3.5. Selección y aislamiento de colonias bacterianas para la identificación

Se llevó a cabo una selección preliminar de patrones de colonias según sus características morfológicas, eligiéndose el medio en el cual la bacteria se encuentre en mayor abundancia.

4.3.6. Pruebas preliminares (características morfológicas y bioquímicas) para identificación del género *Leuconostoc*

Dicha preselección se sometió a una serie de pruebas afines a la identificación del género *Leuconostoc* como son: Tinción de Gram, tinción de cápsula, características macroscópicas de colonia, agrupación y prueba de catalasa.

4.3.7. Confirmación de la identificación

A partir de las colonias que coincidan con el perfil bioquímico se analizaron las muestras de colonias para su identificación mediante el sistema de microbiología automatizada VITEK 2.

4.3.8. Selección del medio de cultivo

Fue realizada una revisión de la bibliografía en la cual se obtuvo información para el aislamiento de *Leuconostoc mesenteroides*, las técnicas que se emplean y los múltiples medios utilizados para su crecimiento (Cuervo-Mulet *et al.*, 2010; Erten, 1998; Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004). En la Tabla 19 se muestran los medios de cultivo seleccionados para la realización de las pruebas.

Tabla 19. Selección de medios de cultivos para el aislamiento de *Leuconostoc mesenteroides*

Medio de cultivo	Características	Imagen
MRS*	El polisorbato 80, el magnesio y manganeso actúan favoreciendo el crecimiento óptimo de los lactobacilos y biodegradadores de lactosa. La dextrosa es la fuente de energía. El fosfato de sodio ayuda a controlar el pH. El acetato de sodio junto con el valor del pH del medio de cultivo inhibe considerablemente la microbiota acompañante	
APT*	Para cultivo, aislamiento y cuenta de organismos lactobacilos “heterofermentativos” ¹ y otros microorganismos exigentes que requieren de un alto contenido de tiamina, a partir de diversas muestras	
M17*	El glicerofosfato de sodio aumenta la capacidad de mantener el equilibrio de los iones hidrógeno, favoreciendo el crecimiento de organismos “heterofermentativos” lácticos. La lactosa es la fuente de energía	

*Medios adicionados con vancomicina para una mayor selectividad del género *Leuconostoc mesenteroides*

¹ La fermentación fue estudiada por Pasteur, quien le dio este nombre a la bioconversión anaerobia de glucosa a alcohol etílico y dióxido de carbono por *Saccharomyces cerevisiae*. Por ello, cualquier otra bioconversión NO es una fermentación sino una biorreacción

4.3.9. Diseño experimental 2

Como se mencionó antes (Tablas 17,18), este diseño es de tipo factorial considerando cuatro factores (a) biocida; (b) temperatura, (c) tiempo y (d) dosis, con tres niveles dando como resultado 3^4 es decir 81 pruebas las cuales se realizaron por triplicado con un total de 243 experimentos.

4.3.10. Prueba de eficiencia de los biocidas

Para determinar la susceptibilidad de cada cepa a los biocidas seleccionados (Tabla 14), se utiliza como guía el “método estandarizado de prueba de susceptibilidad por disco, versión 8” de la Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana (Bell *et al.*, 2009) con algunas modificaciones y variando la dosis según la revisión bibliográfica. El método se denomina originalmente *CDS* por sus siglas en inglés (*Calibration Dichotomous Susceptibility*). El método propuesto consiste en lo siguiente:

- (1). Distribuir 20 mL de agar en placas de Petri de 90 mm de diámetro
- (2). Almacenar placas de agar a una temperatura de 2 a 8°C durante un máximo de 4 semanas en recipientes sellados, bolsas de plástico o celofán. Las placas deben estar completamente secas y, en caso contrario, esperar que se sequen antes de ser usadas
- (3). Utilizando un espectrofotómetro preparar una suspensión en solución salina 0.9% para alcanzar una turbidez cuyos valores de absorbancia se encuentren entre una longitud de onda de 0.15 a 640 nm, correspondiente a una curva estándar de 0.5 McFarland, para ello fue necesario seguir el procedimiento propuesto por Bell *et al.* (2009):
 - (a). Diluir la suspensión 1:5 (1 parte de suspensión y 4 partes de solución salina) en solución salina normal para obtener la suspensión de *CDS*
 - (b). Con un asa recta tomar una colonia cuyo diámetro se encuentre entre 1 y 2 mm, la masa bacteriana debe ser visible en la punta del alambre recto

- (c). Inocular el material bacteriano en 15 mL de solución salina contenida en un tubo de cultivo, haciendo girar el alambre recto al menos 10 veces con la punta en contacto con la parte inferior del tubo
 - (d). Mezclar la solución salina mediante agitación al menos 10 veces
 - (e). Una vez que se tenga la suspensión de bacterias al 0.5 McFarland con ayuda de una pipeta Pasteur distribuir la suspensión en la placa Petri y retirar el exceso con la misma pipeta Pasteur
- (4). Esterilizar las pinzas de punta roma con alcohol y a la flama del mechero y en condiciones de asepsia (cámara de flujo laminar), tomar un disco de papel filtro e impregnarlo con el agente químico a probar: Metam sodio, MS, mezcla de etilén bis-ditiocarbamato de sodio con N-metil ditiocarbamato de potasio, QZ, formaldehído, FA, cloruro de benzalconio, CB, a diferentes dosis, eliminando el exceso por escurrimiento. Depositar el disco sobre el agar presionando ligeramente sobre la superficie. Repetir este paso para cada uno de los agentes químicos a evaluar.

4.3.11. Cálculo del porcentaje de efecto inhibitorio

El porcentaje de efecto inhibitorio es el resultado de un halo de inhibición de un agente químico de prueba comparado con otro agente químico o control, cuyo poder biocida es conocido. La ecuación (1) que se utiliza para calcular el % de efecto inhibitorio fue propuesta por Gamazo *et al.* (2010):

$$\% \text{ de Efecto de } \textit{inhibitorio} = \frac{\text{Longitud del halo de inhibición de prueba}}{\text{Longitud del halo de inhibición control}} \times 100 \quad (1)$$

4.3.12. Análisis estadístico final

Con los resultados del primero, segundo y tercer diseño experimental se utilizará un programa estadístico llamado STATGRAPHICS CENTURION XV.II para facilitar el tratamiento de los datos y determinar si existe diferencia entre los factores utilizados en los diseños experimentales.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Pruebas presuntivas (características morfológicas y bioquímicas) para la identificación del organismo *Leuconostoc mesenteroides*

En la Tabla 20 se muestran las características de las colonias que crecieron en los medios seleccionados.

Tabla 20. Observaciones para la identificación presuntiva de *Leuconostoc mesenteroides*

Medio de cultivo	No. colonia	Características macroscópicas de colonia	Gram	Cápsula	Agrupación	Catalasa
MRS	1	Forma circular, superficie lisa, translúcida, color crema, consistencia viscosa, elevación convexa y borde entero	+	+	Cocobacilos agrupados en pares	-
MRS	2	Forma puntiforme, superficie lisa, color blanco, consistencia viscosa, elevación convexa y borde entero	+	-	Bacilos agrupados en cadenas cortas	-
M17	3	Forma circular, superficie lisa, translúcida, color gris, consistencia viscosa, elevación convexa y borde entero	+	+	Cocobacilos agrupados en cadenas cortas	-
M17	4	Forma irregular, superficie lisa, translúcida, color amarilla, consistencia viscosa, elevación convexa y borde ondulado	+	-	Cocos agrupados	+
APT	5	Forma circular, superficie lisa, translúcida, color crema, consistencia viscosa, elevación convexa y borde entero	+	+	Cocobacilos agrupados en pares y cadena corta	-

Las pruebas se realizaron a temperatura ambiente y destacan las colonias números 1, 3 y 5 mostrando características típicas de *Leuconostoc mesenteroides sp* como la agrupación en cocobacilos en cadenas cortas, gram (+), formación de cápsula y la

prueba de catalasa (-) debido a que no puede degradar el peróxido de hidrógeno por la falta de la enzima catalasa (Erten, 1998; Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004). Las imágenes de las pruebas presuntivas se observan en la Figs. 6 a 8.

Estas pruebas son presuntivas debido a la complejidad del microorganismo, por lo cual se necesitaron más pruebas bioquímicas para tener una mayor certeza. Para ello se realizaron pruebas con el sistema de identificación de microbiología automatizado VITEK 2.

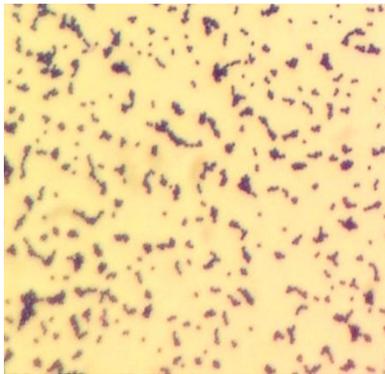


Fig. 6. Tinción de Gram y agrupación

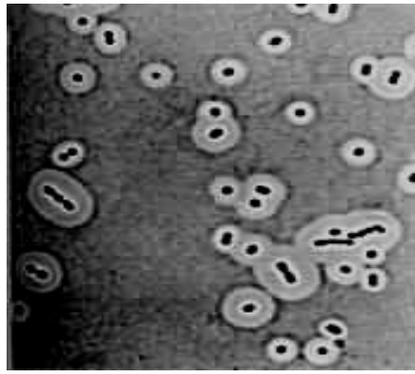


Fig. 7. Tinción de cápsula



Fig. 8. Prueba de catalasa

5.2. Confirmación de la identificación

El sistema VITEK 2 es un sistema de microbiología automatizado utilizando la tecnología basada en los requerimientos para el desarrollo que tiene cada microorganismo. Dicho sistema se ayuda acomodando y depositando simultáneamente un inóculo en tarjetas de reactivo colorimétrico que se incuban y se leen de forma automática provocando una serie de resultados que son comparados con la base de datos del sistema VITEK 2 (Figs. 9, 10) para arrojar un dictamen de identificación y probabilidad de un microorganismo (Pincus, 1998). En la Tabla 21 se muestran los resultados de las pruebas. Puede verse que son bastante concluyentes por el alto porcentaje de confiabilidad que muestra el estudio con la confirmación de la obtención del aislamiento de *Leuconostoc mesenteroides ssp.*



Fig. 9. Equipo VITEK 2

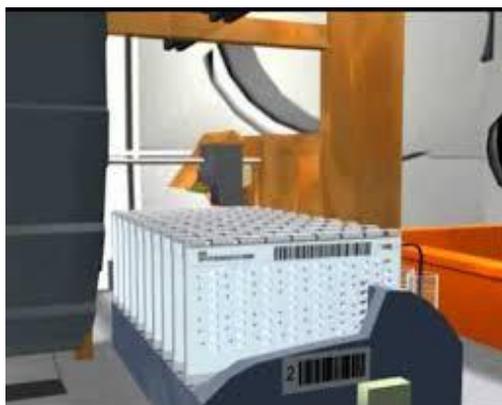


Fig. 10. Tarjetas de reactivo colorimétrico

Tabla 21. Resultados del análisis automatizado de identificación microbiológica VITEK 2

Información de identificación	Tipo de tarjeta: GP	Fecha de análisis: 04-Abr-2014	Tiempo de análisis: 6 horas
Organismo seleccionado	<u>Leuconostoc</u> <u>mesenteroides ssp</u> <u>cremoris</u>	Nivel de confianza: Identificación muy buena	Probabilidad: 95%
Perfil típico contraindicante	BGAL(76)	DMAL(20)	BALO(76)

Donde: BGAL = galactosa, DMAL = maltosa y BALO = alosa

5.3. Análisis estadístico del experimento 1

Una vez realizados todas las pruebas del diseño de experimental 1 con las características mostradas en la Tabla 16. Los resultados obtenidos fueron tratados mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XV.II. En primer término el factor de mayor influencia en el experimento es el medio de cultivo>el tiempo>combinación tiempo-medio y finalmente la temperatura como se muestra en la Fig.11. En la Tabla 22 el análisis de varianza, ANDEVA (*ANDEVA*, en inglés)

reparte la variabilidad de número de colonias en piezas separadas para cada uno de los efectos. Se prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, tres efectos el medio, el tiempo y el medio-tiempo (variables) tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0% y por lo tanto afectan significativamente la respuesta (número de colonias).

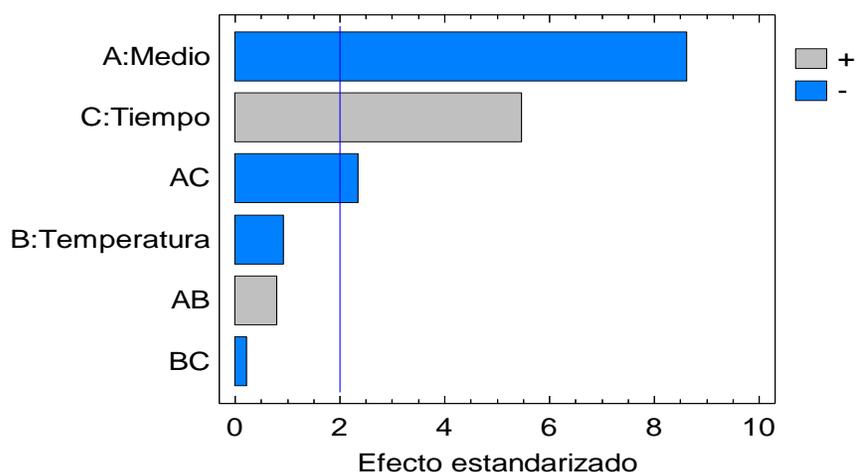


Fig.11. Diagrama de Pareto estandarizado: Efecto de los parámetros en estudio

Tabla 22. Análisis de varianza, ANDEVA, para el número de colonias

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Medio	3634.24	1	3634.24	283.59	0.00
B:Temperatura	48.1667	1	48.17	3.76	0.06
C:Tiempo	1688.96	1	1688.96	131.79	0.00
AB: Medio-Temperatura	36.0	1	36.0	2.81	0.10
AC: Medio-Tiempo	312.11	1	312.11	24.35	0.00
BC: Temperatura-Tiempo	2.78	1	2.78	0.22	0.64
Error total	909.88	71	12.82		
Total (corr.)	10449.80	80			

Gl: Grados de libertad

5.3.1. Selección del medio de cultivo

Se llevó a cabo el análisis de los datos para la obtención del medio óptimo para el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* bajo las condiciones establecidas. Los resultados muestran que el medio de cultivo sí tiene un efecto significativo en el número de colonias (Tabla 23, Fig. 12), los resultados muestran que estadísticamente el agar M17 es menos efectivo para el aislamiento de *Leuconostoc mesenteroides* por lo cual los medios MRS (Man Rogosa y Sharpe) y APT son las opciones adecuadas ya que no existe diferencia significativa entre ellos.

Tabla 23. Efecto del medio de cultivo

Medio	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación %	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo estándar
1(MRS)	27	26.30	10.45	39.73	11.0	44.0	33.0	0.69
2 (APT)	27	23.96	9.88	41.19	11.0	43.0	32.0	1.51
3 (M17)	27	9.89	5.63	56.95	2.0	22.0	20.0	1.49
Total	81	20.05	11.43	57.01	2.0	44.0	42.0	2.08

5.3.2. Selección la temperatura de trabajo

Según el análisis estadístico no existe diferencia significativa en las temperaturas propuestas de ambiente ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$), 35°C y 45°C (Tabla 24, Fig. 13,) por lo cual se puede trabajar en cualquiera de ellas sin afectar el desarrollo de las colonias.

Tabla 24. Efecto de la temperatura

Temperatura	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo estándar
$20\pm 5^{\circ}\text{C}$	27	16.59	9.27	55.92%	4.0	35.0	31.0	0.97
35°C	27	28.85	11.72	40.63%	10.0	44.0	34.0	-0.16
45°C	27	14.70	7.47	50.81%	2.0	27.0	25.0	-0.15
Total	81	20.04	11.42	57.44%	2.0	44.0	42.0	2.08

5.3.3. Selección del tiempo de análisis

Los resultados muestran que el tiempo sí tiene un efecto significativo en el número de colonias (Tabla 25 y Fig. 14).

Tabla 25. Efecto del tiempo

Tiempo	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación %	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo estándar
24 h	27	13.85	6.98	50.40	3.0	30.0	27.0	1.55
48 h	27	21.25	12.10	56.95	2.0	42.0	40.0	0.47
72 h	27	25.03	11.80	47.14	7.0	44.0	37.0	0.49
Total	81	20.04	11.42	57.00	2.0	44.0	42.0	2.08

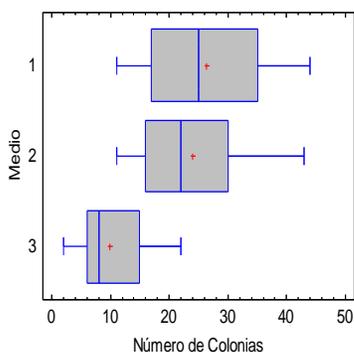


Fig. 12. Gráfica de cajas y bigotes para el número de colonias versus medio

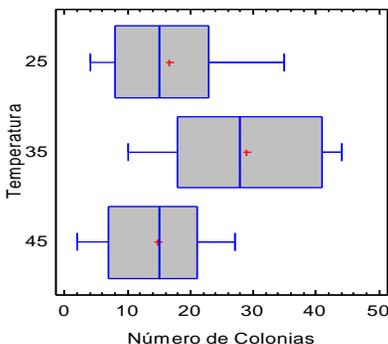


Fig. 13. Gráfica de cajas y bigotes para el número de colonias versus temperatura

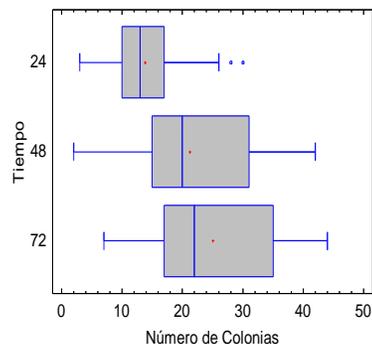


Fig. 14. Gráfica de cajas y bigotes para el número de colonias versus tiempo

Como se observa en la Fig. 15, para el factor del medio de cultivo, el medio MRS (1) es el que da mejores resultados debido a un mayor desarrollo de colonias, seguido muy de cerca del medio APT (2), pero no existe diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$), es decir, que se puede emplear cualquiera de los dos medios.

Para el factor temperatura es claramente favorecedora la opción de los 35°C lo cual es adecuado ya que al ser un microorganismo mesófilo, esta temperatura está muy cercana a la óptima de proliferación (Cuervo-Mulet *et al.*, 2010). El factor tiempo tiene un comportamiento exponencial por lo que la mayor respuesta se da en un tiempo de

72 horas, existiendo diferencia significativa con respecto al de 24 horas ($p < 0.05$). El caso contrario ocurre con el tiempo a 48 horas ya que no hay diferencia significativa.

Donde: 1=MRS; 2=APT; 3=M17

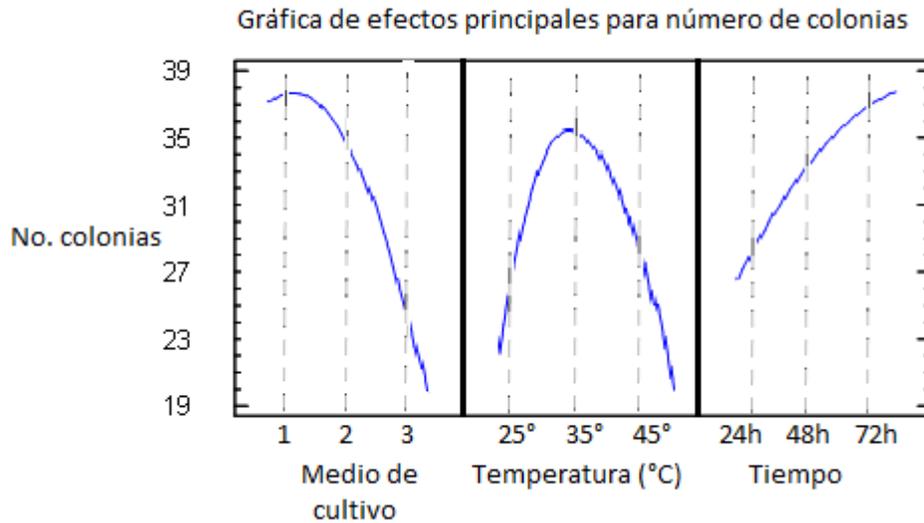


Fig. 15. Resultados de los parámetros de diseño

5.4. Experimento 2 (optimización de las dosis)

Los resultados obtenidos de dicho experimento se basaron en las características ya establecidas en la Tabla 17 que contiene el diseño experimental 2 para selección de la dosis óptima de biocida.

5.4.1. Análisis del biocida metam sodio (MS)

En la Fig. 16 se muestran los promedios de los resultados de cada una de las dosis para el metam sodio (MS). Los halos de inhibición que manifestaron con el metam fueron similares en sus 3 dosis. Se debe tomar en cuenta que la dosis más baja presenta un halo de inhibición mínimo ya que el promedio de sus resultados fueron de 6 mm de inhibición, misma longitud que el diámetro de los discos utilizados para el experimento.

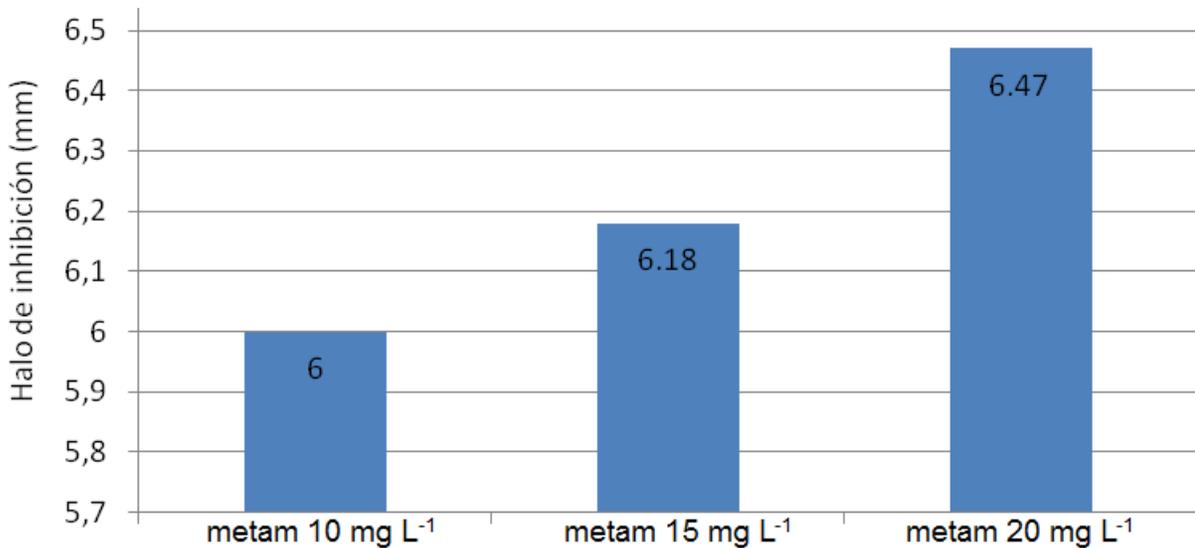


Fig. 16. Promedio de los resultados de la inhibición a diferentes dosis de metam sodio (MS)

En el análisis estadístico con la gráficas de cajas y bigotes en la Fig. 17 se observó que la dosis a 20 mg L⁻¹ da la mayor respuesta a diferencia de las de 10 y 15 mg L⁻¹ que no tienen diferencia significativa entre ellas ($p < 0.05$).

En el factor del tiempo, en la Fig. 18 se mostró que, a 24 horas, tiene un efecto mayor ya que a 48 y 72 horas no existe diferencia significativa. Para el factor temperatura, se manifestó un mayor efecto a 25°C mientras que a las temperaturas de 35 y 45°C no se observaron diferencias significativas (Fig. 19).

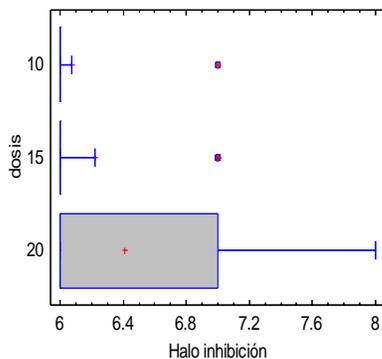


Fig. 17. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus dosis del metam sodio

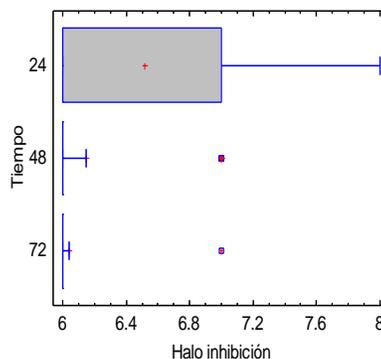


Fig. 18. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus tiempo del metam sodio

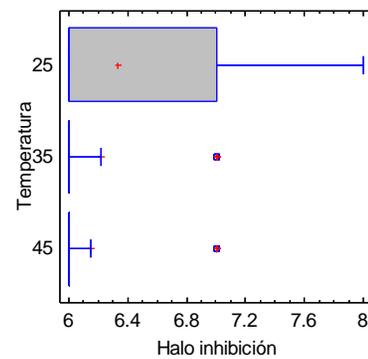


Fig. 19. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus la temperatura del metam sodio

5.4.2. Análisis de la mezcla de etilén bis-ditiocarbamato de sodio y de N-metil ditiocarbamato de potasio (QZ)

Para el QZ, que es una mezcla de ditiocarbamatos, los resultados se muestran en la Fig. 20. Se utilizaron las dosis recomendadas por el fabricante del producto.

Respecto del análisis estadístico, las dosis de 20 y 15 mg L⁻¹ (Fig. 21) no muestran diferencia significativa. Sin embargo, la dosis de 10 mg L⁻¹ sí muestra diferencia estadística ($p < 0.05$), ya que el efecto es mucho menor con respecto a las otras dosis manejadas.

En la Fig. 22 se observa el factor del tiempo sobre el QZ y se observó un comportamiento similar al del metam sodio (Fig. 18) ya que el tiempo con mayor efecto fue de 24 horas mostrando diferencia significativa con 48 y 72 horas que no son distintos estadísticamente. En la temperatura, el último factor sobre la mezcla QZ, se observó que a 45°C tiene un efecto menor y que a temperatura ambiente (20±5°C) y 35°C no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) por lo que es indistinto usarlo a esas temperaturas (Fig. 23).

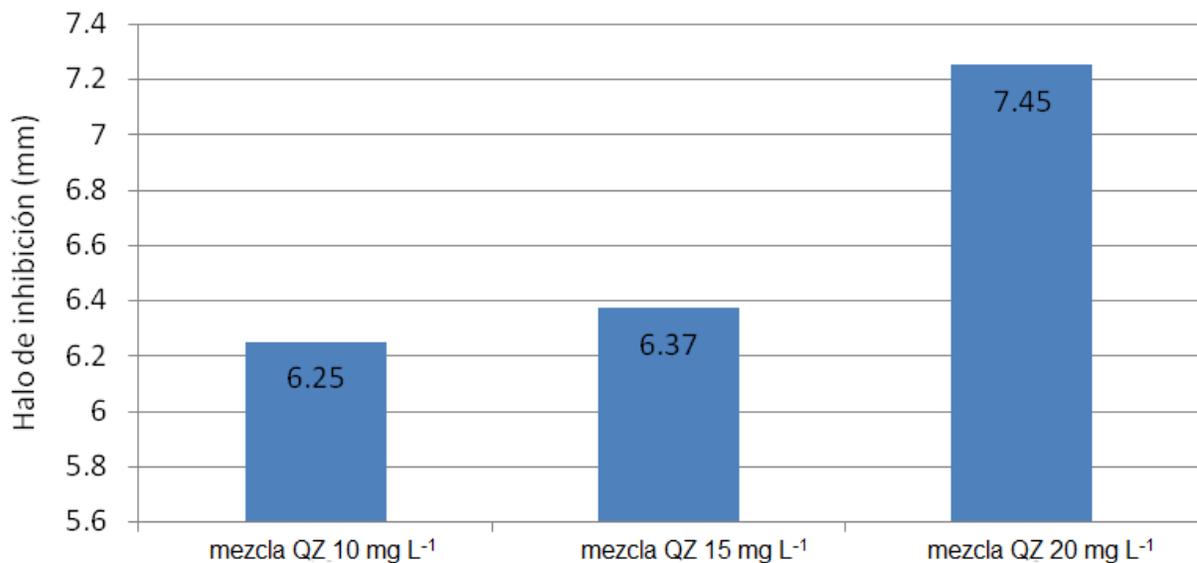


Fig.20. Promedio de los resultados de la inhibición a diferentes dosis de la mezcla QZ

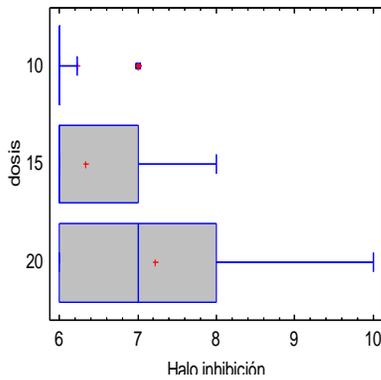


Fig. 21. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus la dosis de la mezcla QZ

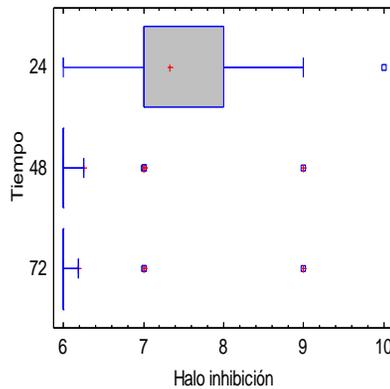


Fig. 22. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus tiempo de la mezcla QZ

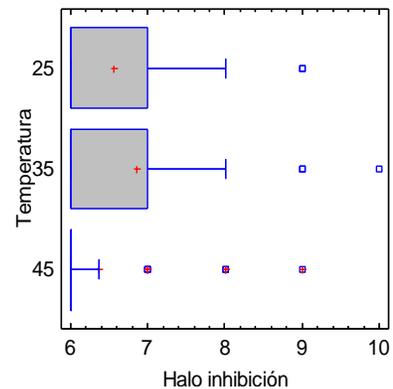


Fig. 23. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus la temperatura de la mezcla QZ

5.4.3. Análisis del formaldehído (FA)

El formaldehído (FA) mostró un comportamiento diferente debido a que sus resultados fueron más eficientes, como puede observarse en la Fig. 24. En las tres dosis supera por mucho el poder inhibitorio de los 2 anteriores (metam sodio y la mezcla de ditiocarbamatos). A pesar de utilizar una dosis menor, su potencia y eficiencia como biocida es muy evidente, mostrando el más alto efecto inhibitorio la dosis de 5 mg L^{-1} que resultó con un promedio de 10.85 mm de halo de inhibición. Respecto del análisis estadístico para el factor de la dosis sobre el formaldehído sí existe diferencia significativa entre las dosis empleadas por lo que no son indistintas las dosis para la inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* (Fig. 25). El tiempo es un factor que según el análisis estadístico (Fig. 26) no muestra diferencia significativa en sus 3 niveles (24, 48 y 72 horas). El factor de la temperatura sobre el formaldehído se observó en la Fig. 27 que no existe diferencia significativa, por lo que su uso como biocida es similar a temperatura ambiente ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), 35° y 45°C .

5.5. Efecto inhibitorio del experimento 2

Se tomó en cuenta como referencia o biocida control al formaldehído, ya que es el más eficiente de los tres biocidas probados hasta el momento además de que su efecto inhibitorio está demostrado, pero debido a sus efectos adversos al ambiente y

su toxicidad hacia los humanos no puede ser utilizado como biocida en alimentos para humanos, (OMS, 1982).

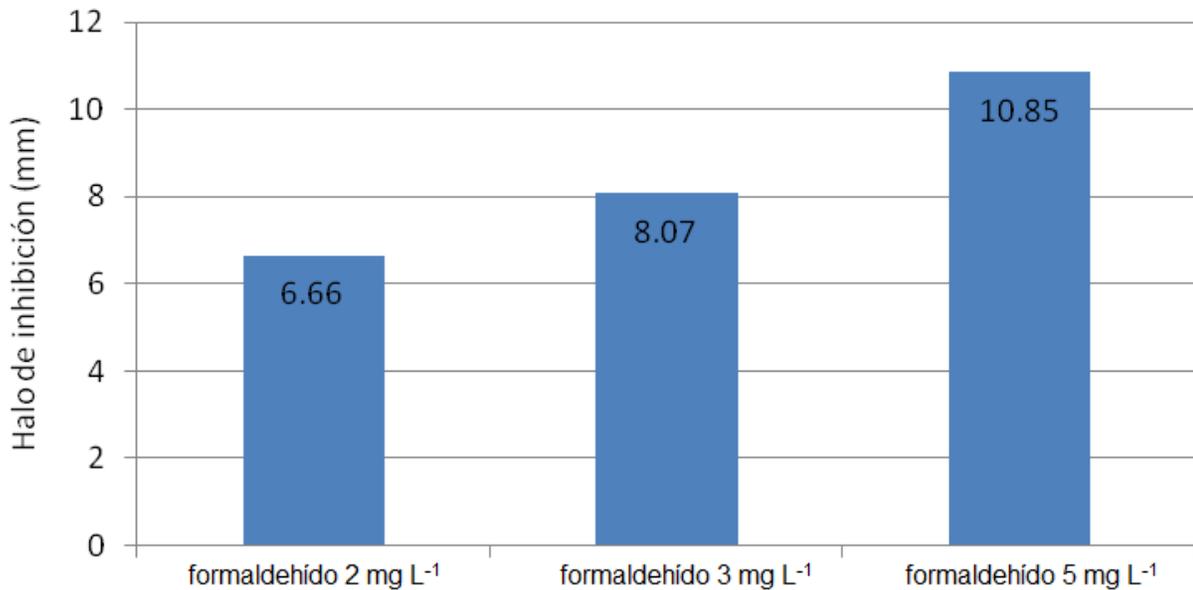


Fig. 24. Promedio de la inhibición a diferentes dosis de formaldehído

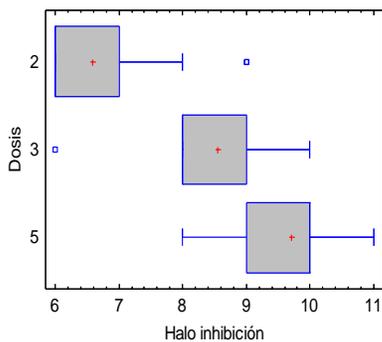


Fig. 25. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus la dosis para el formaldehído

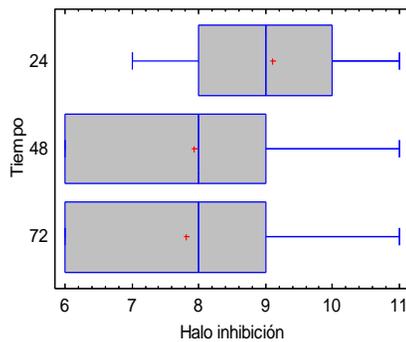


Fig. 26. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus el tiempo para el formaldehído

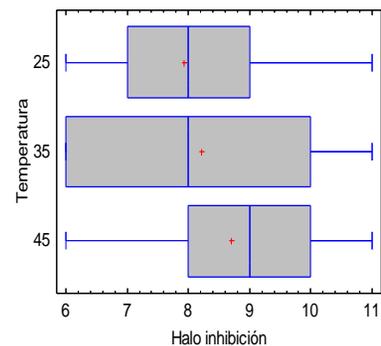


Fig.27. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus la temperatura para el formaldehído

La exposición frecuente a este compuesto puede provocar una verdadera reacción alérgica cutánea e incluso en exposiciones crónicas provoca sensibilización inmuno-mediada y efectos cancerígenos (Castleman y Ziem, 1994; IARC, 2004; Soffritti et al., 2002; Til et al., 1989; Zhang et al., 2013).

La dosis de 5 mg L⁻¹ del formaldehído manifestó el mejor promedio inhibitorio por lo que se optó para que fuera utilizada como la dosis control de biocida para el cálculo del porcentaje de efecto inhibitorio de los biocidas en estudio (Tabla 26 y Fig. 28). Un ejemplo de cálculo se muestra a continuación:

$$\% \text{ de Efecto de inhibitorio} = \frac{\text{Halo de inhibición METAM 10 ppm}}{\text{Halo de inhibición formaldehído 5 ppm}} \times 100$$

$$\% \text{ de Efecto de inhibitorio} = \frac{6 \text{ mm}}{10.85 \text{ mm}} \times 100 = 55.30\% \text{ respecto al formaldehído (5 ppm)}$$

Los porcentajes entre las dosis del metam sodio y la mezcla de ditiocarbamatos (QZ) son muy similares, con una leve tendencia de superioridad por parte de la mezcla de ditiocarbamatos (Fig. 28), aunque al hacer el análisis estadístico como se muestra en la Fig. 29 no se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la mezcla y el metam sodio para inhibir a *Leuconostoc mesenteroides*.

Los resultados en la Tabla 26 indican que la mezcla de ditiocarbamatos y el metam sodio a estas dosis no son efectivos como biocidas si se les compara con el formaldehído debido a que no superan o igualan el 100% del efecto inhibitorio. Sus valores son menores a dicha cantidad por lo que es necesario aumentar las dosis para obtener una inhibición efectiva similar a la del mejor parámetro (formaldehído).

Tabla 26. Efecto inhibitorio del metam sodio y la mezcla de ditiocarbamatos (QZ) en porcentaje

Biocida/ dosis	Diámetro promedio del halo de inhibición (mm)	Efecto inhibitorio (%)
METAM 10 ppm	6	55.30
METAM 15 ppm	6.18	56.96
METAM 20 ppm	6.47	59.63
QZ 10 ppm	6.25	57.60
QZ 15 ppm	6.37	58.71
QZ 20 ppm	7.25	66.82

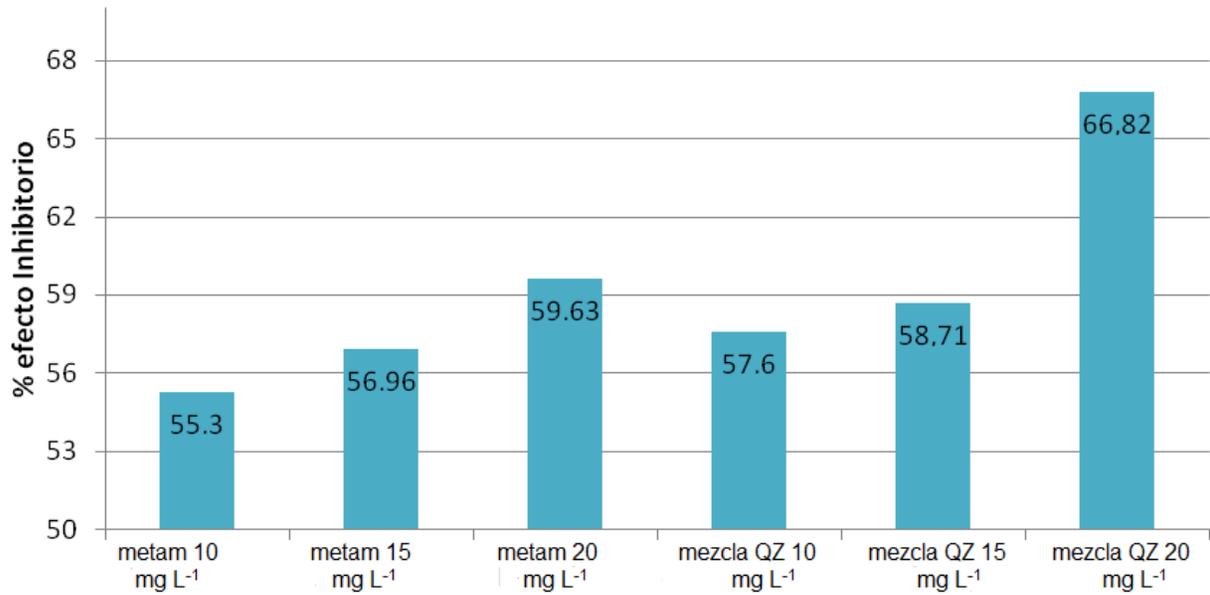


Fig. 28. Efecto inhibitorio del metam sodio y la mezcla de ditiocarbamatos en %

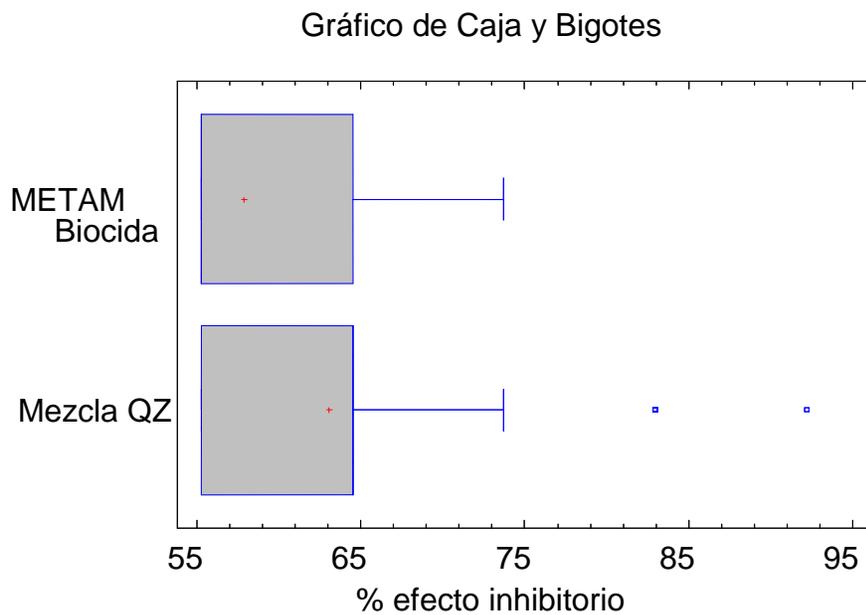


Fig. 29. Gráfica de cajas y bigotes para el % del efecto inhibitorio *versus* biocidas (metam sodio *versus* mezcla de ditiocarbamatos)

5.6. Último experimento (metam sodio *versus* mezcla de ditiocarbamatos *versus* cloruro de benzalconio)

En un último diseño de experimentos similar a los anteriores (Tablas 16, 17), como se muestra en la Tabla 27, se utilizaron nuevas variables, adicionando al cloruro de benzalconio como biocida control, ya que según lo encontrado en la literatura ha mostrado un excelente efecto biocida y su baja toxicidad en humanos está comprobada. Esto podría hacer de él una opción a tomar en cuenta para esta investigación.

Se demostró en los apartados anteriores que el factor de la temperatura de experimentación sí afecta significativamente por lo que se optó por aumentar las temperaturas de trabajo para simular un ambiente real de trabajo en un ingenio azucarero del estado de Veracruz que maneja alrededor de 50° a 60°C al interior del ingenio en las etapas de proceso mencionadas.

Finalmente, el tiempo según los análisis estadísticos realizados no es un factor que afecte significativamente debido a la rápida degradación de los biocidas, por lo que se optó por utilizar 24 h para este último experimento.

Tabla 27. Último diseño experimental con metam sodio *versus* la mezcla de ditiocarbamatos *versus* el cloruro de benzalconio

	Niveles		
Factores	1	2	3
(a) Biocida	MS	QZ	CB
(b) Dosis	A	B	C
(c) Temperatura(°C)	35	45	55

MS: metil-ditiocarbamato de sodio o metam sodio; QZ: Q-881(Mezcla); CB: cloruro de benzalconio; A, B y C representan las dosis descritas en la Tabla 28

Las dosis del metam sodio y de la mezcla de ditiocarbamatos que se muestran en la Tabla 28 son dosis mayores que las del experimento 1 (Tabla 18) debido a que los resultados reportados en la Tabla 26, no fueron satisfactorios para la obtención del 100% de efecto inhibitorio. Se destaca que las dosis empleadas en este tercer y

último experimento son superiores a los límites reportados por la US-FDA (CFR, 2012) para el caso del metam sodio, de 3.5 mg kg⁻¹, y de la mezcla de etilén bis-ditiocarbamato de sodio y N-metil ditiocarbamato de potasio, de 3.0 mg kg⁻¹ y 3.5 mg kg⁻¹, respectivamente.

Las dosis del cloruro de benzalconio están dentro de los límites permitidos por la *Food and Drug Administration* de los EEUU (USFDA, 2011) que, para su uso en jugo de caña azucarera, son de 10-20 mg kg⁻¹.

Tabla 28. Dosis de los biocidas para el último experimento

Nombre del biocida	Dosis a emplear	DL50	Referencias
Metam (ditiocarbamato de sodio) (MS)	(A) 30-50 mg/kg	1000 mg kg ⁻¹ oral en ratas	Bonilla-Vidal (2013)
Mezcla QZ-881 (etilénbisditiocarbamato de sodio y N-metil ditiocarbamato de potasio)	(B) 30-50 mg/kg	210 mg kg ⁻¹ oral en ratas	Villa (2008)
Cloruro de benzalconio (CB)	(C) 10-20 mg/kg	234 mg kg ⁻¹ oral en ratas	Xue <i>et al.</i> (2004)

5.6.1. Análisis estadístico del metam sodio para el último experimento

En la Fig. 30 se muestra el promedio de la inhibición de las 3 dosis de metam sodio utilizadas en el último experimento (Tabla 28). La imagen de los halos producidos por el efecto inhibitorio se observan en la Fig. 33.

Los halos que se encontraron como respuesta inhibitoria (Fig. 31) demuestran que las dosis de 30 y 40 mg L⁻¹ no muestran diferencia significativa comparadas con la dosis más alta (50 mg L⁻¹) que sí indica una diferencia estadísticamente significativa.

En cuanto a la variable de la temperatura, el metam sodio se vio afectado significativamente ya que mostró un mayor efecto biocida a la temperatura de 35°C seguida de los 45°C para dejar en último lugar con un menor efecto a la temperatura

de 55°C, lo que demuestra que a temperaturas altas se degrada el metam sodio y tiene menor efecto sobre los microorganismos (Fig. 32).

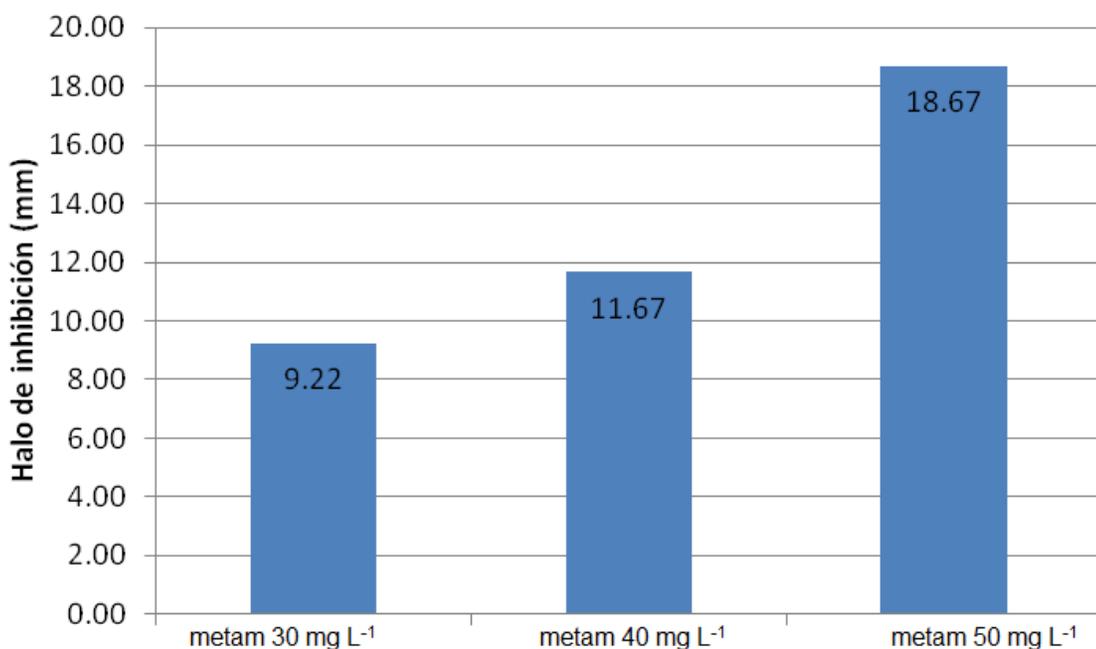


Fig. 30. Promedio de la inhibición a diferentes dosis de metam sodio

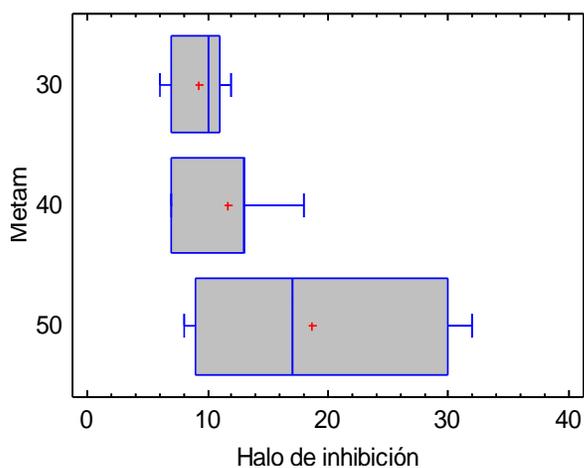


Fig 31. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus la dosis del metam sodio en el último experimento

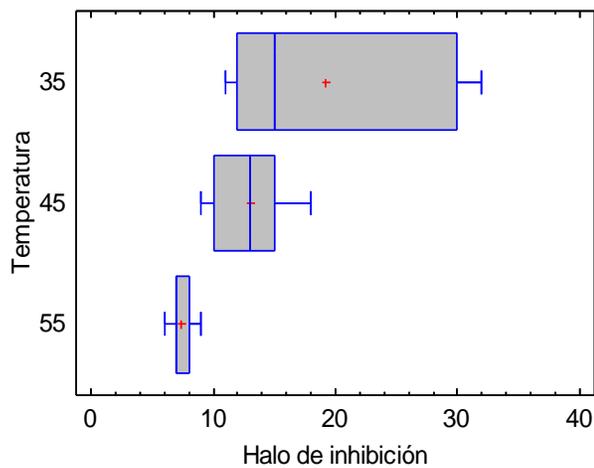


Fig. 32. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus la temperatura del metam sodio en el último experimento

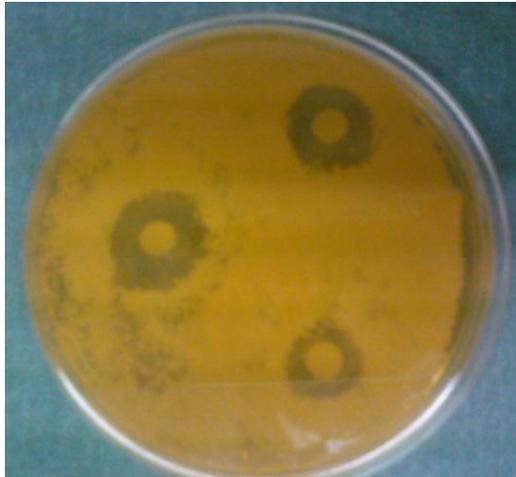


Fig. 33. Halo de inhibición del metam sodio

5.6.2. Análisis estadístico de la mezcla del etilén bis-ditiocarbamato de sodio y del N-metil ditiocarbamato de potasio en el último experimento

Para el caso de la mezcla de ditiocarbamatos (QZ) la Fig. 34 muestra los promedios que resultaron de las 3 diferentes dosis que se emplearon en el último experimento.

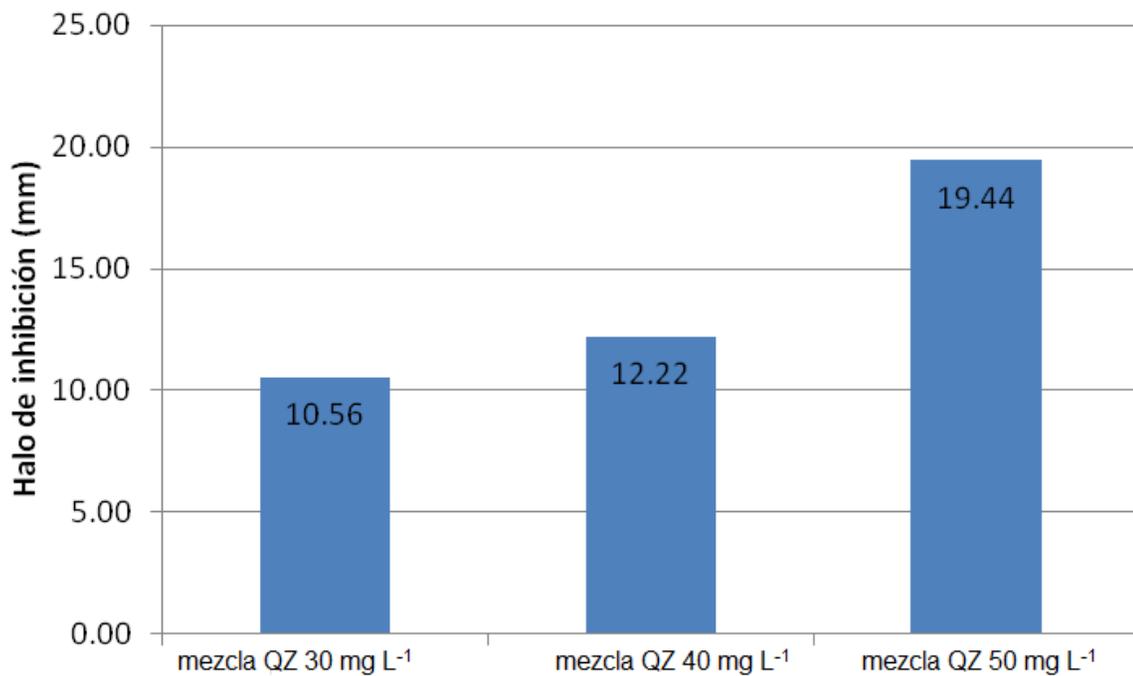


Fig. 34. Promedio de la inhibición a diferentes dosis de la mezcla de ditiocarbamatos

El análisis estadístico de la dosis se representa con la gráfica de cajas y bigotes (Fig. 35) en la que se muestra un comportamiento similar a los resultados del análisis del metam sodio ya que las dos primeras dosis (30 y 40 mg L⁻¹) no presentan diferencia significativa (p<0.05) y la dosis de 50 mg L⁻¹ es la que tiene un mayor efecto biocida y muestra diferencia significativa.

El QZ, al ser una mezcla de ditiocarbamatos, tiene un comportamiento similar al metam sodio, incluso frente a altas temperaturas, ya que según la Fig. 36, la gráfica de cajas y bigotes del halo de inhibición contra la temperatura, la mezcla de ditiocarbamatos también se degrada y tiene un menor efecto a la temperatura de 55°C, dando una mejor respuesta inhibitoria a las temperaturas de 35°C y 45°C. La imagen de los halos producidos por el efecto inhibitorio se observan en la Fig. 37.

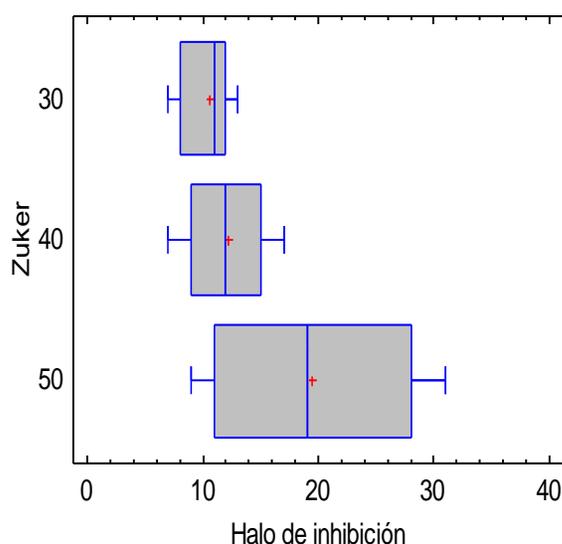


Fig. 35. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus la dosis de la mezcla QZ para el último experimento

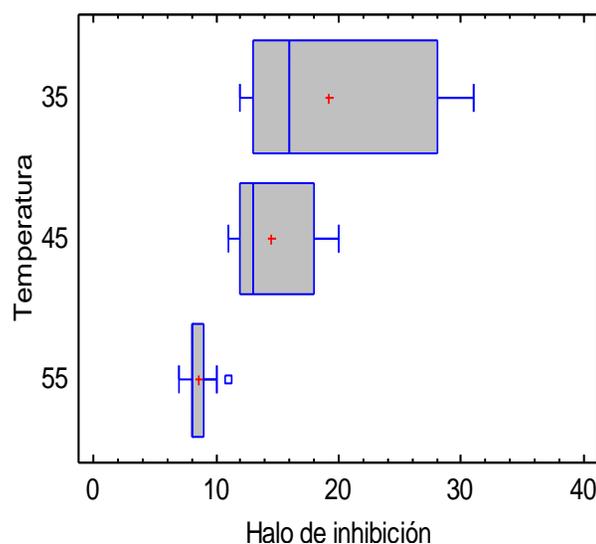


Fig. 36. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus la temperatura de la mezcla QZ para el último experimento

5.6.3. Análisis estadístico del cloruro de benzalconio en el último experimento

Por último, para el cloruro de benzalconio se manejaron 3 concentraciones para las dosis (Tabla 28), diferentes a las de los otros biocidas (metam sodio y mezcla QZ). La Fig. 38 muestra los promedios del halo de inhibición de las 3 dosis empleadas en

las que se puede observar un resultado superior a lo obtenido con el metam sodio (Fig. 30) y la mezcla de ditiocarbamatos (Fig. 34).

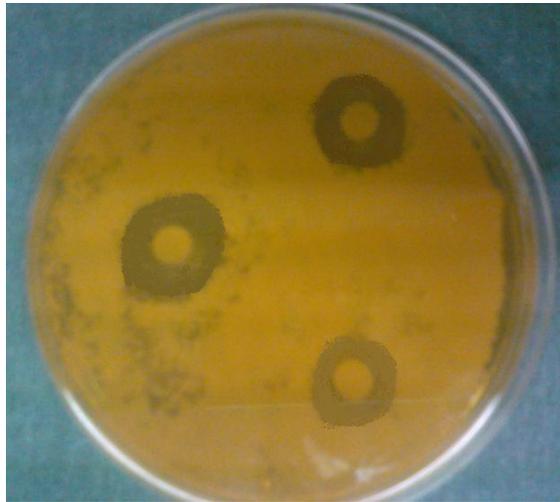


Fig 37. Halo de inhibición de la mezcla QZ

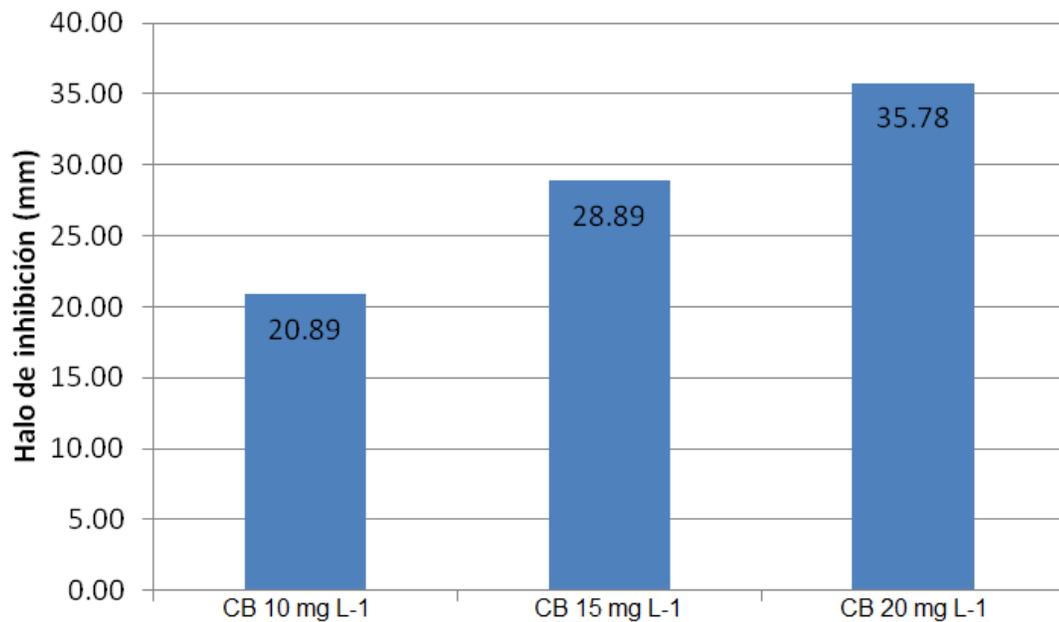


Fig. 38. Promedio de la inhibición a diferentes dosis del cloruro de benzalconio

En el análisis estadístico (Fig. 39) de las dosis muestra que las 3 dosis de cloruro de benzalconio son estadísticamente diferentes entre si, por lo tanto la dosis sí afecta el

resultado de inhibición al emplear el CB como biocida. En cuanto a la temperatura según la Fig. 40 no representa problema alguno para su utilización ya que las 3 temperaturas (35°, 45° y 55°C) no muestran diferencia significativa alguna son estadísticamente iguales, dicho resultado manifiesta un importante punto a favor del CB ya que la temperatura es un factor que limita la efectividad del metam y de la mezcla de ditiocarbamatos. La Fig. 41 muestra el efecto biocida manifestado con un halo de inhibición al utilizar el cloruro de benzalconio.

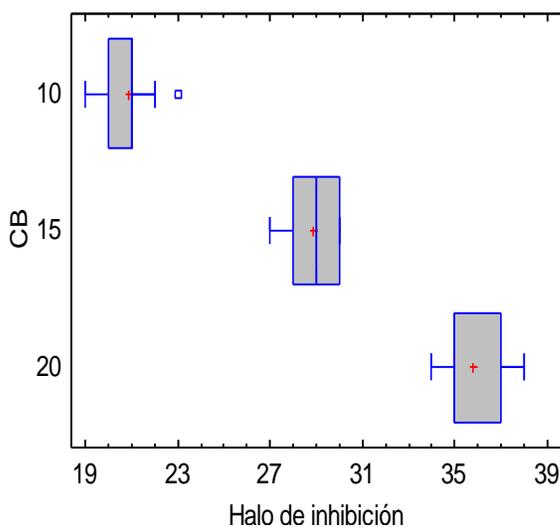


Fig. 39. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus la dosis del CB en el último experimento

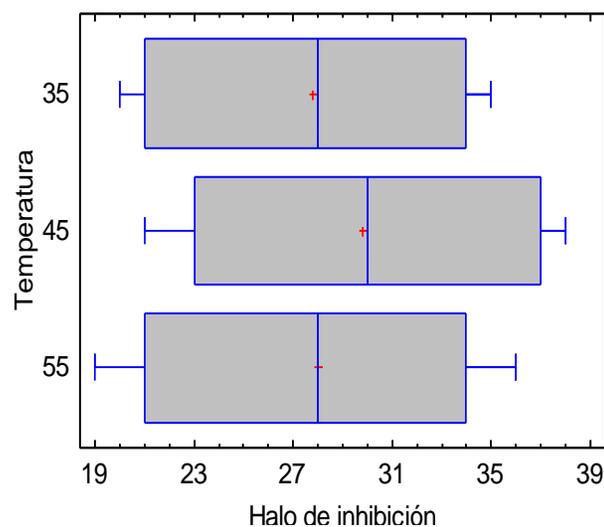


Fig. 40. Gráfica de cajas y bigotes para el halo de inhibición versus la temperatura del CB en el último experimento

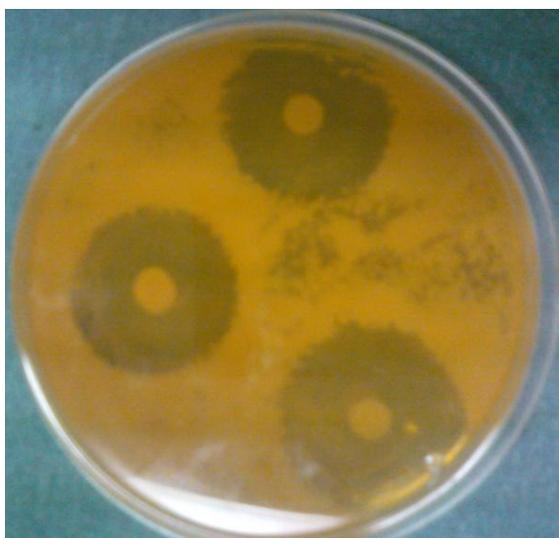


Fig. 41. Halo de inhibición del cloruro de benzalconio

5.7. Efecto inhibitorio para el último experimento (discusión final)

Para el cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio a partir de los resultados del último experimento se usó la ecuación (1) previamente utilizada para el segundo experimento (Tabla 26) y el patrón de referencia del formaldehído a 5 ppm, con un promedio de 10.85 mm de halo de inhibición.

La Tabla 29 y la Fig. 42 muestran las tres dosis de los tres diferentes biocidas utilizados en el último experimento donde cabe destacar que solamente las dosis de 30 mg L⁻¹ del metam sodio y de la mezcla de ditiocarbamatos no son superiores al 100% de efecto inhibitorio, por lo que no son tan eficaces para inhibir a *Leuconostoc mesenteroides* a diferencia de las tres dosis del CB que superaron por mucho a sus similares metam sodio y la mezcla de ditiocarbamatos e, incluso, las dosis más altas de los biocidas con ditiocarbamatos no son tan efectivos como la dosis más baja del cloruro de benzalconio.

Tabla 29. Efecto inhibitorio del metam sodio, la mezcla QZ y el cloruro de benzalconio para el último experimento, en porcentaje

Biocida-dosis (mg L⁻¹)	Promedio de halo de inhibición (mm)	Efecto Inhibitorio (%)
Metam 30	9.22	85.00
Metam 40	11.67	107.53
Metam 50	18.67	172.04
Mezcla QZ 30	10.56	97.29
Mezcla QZ 40	12.22	112.65
Mezcla QZ 50	19.44	179.21
CB 10	20.89	192.52
CB 15	28.89	266.26
CB 20	35.78	329.75

Nota: se subrayan las dosis que superan el 100% de efecto inhibitorio respecto al formaldehído

En la Fig. 43 se ve la gráfica de cajas y bigotes en la que se muestra que entre el metam sodio y la mezcla de ditiocarbamatos no existe una diferencia significativa en sus dosis de 30, 40 y 50 mg L⁻¹ a diferencia de las dosis del cloruro de benzalconio que muestra una diferencia estadísticamente significativa desde su dosis mas baja (10 mg L⁻¹) por lo que su superioridad es clara.

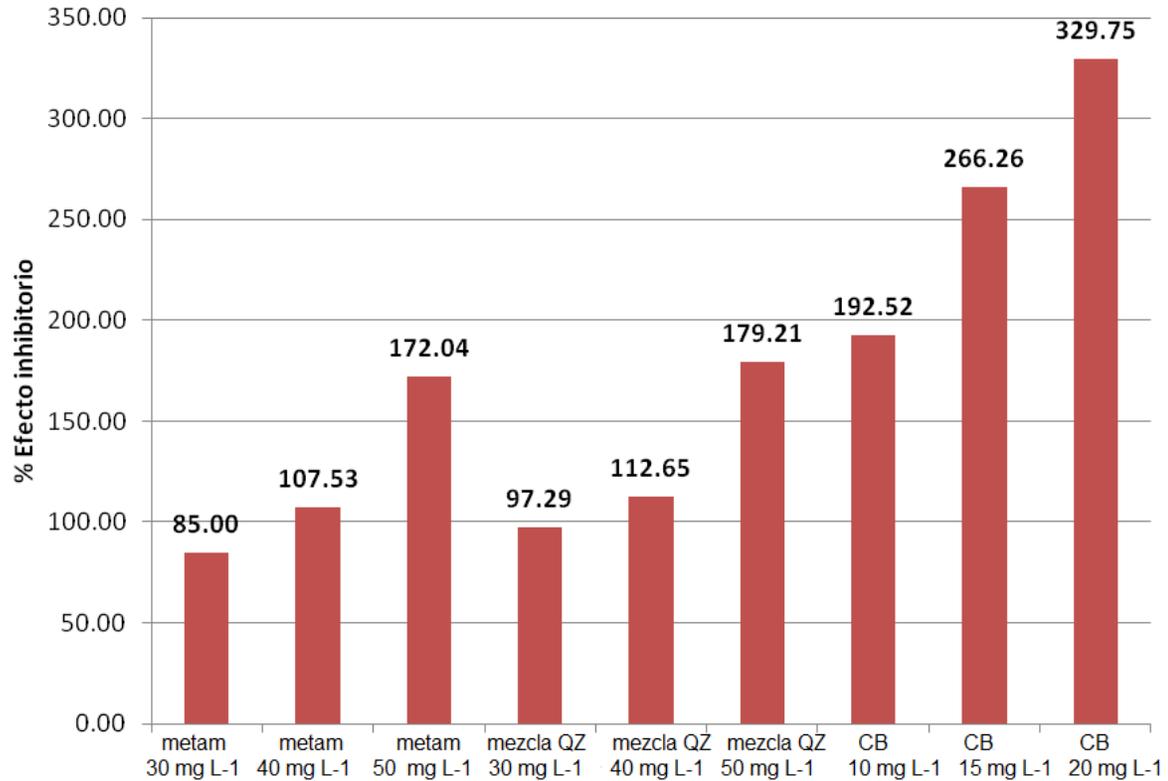


Fig. 42. Efecto inhibitorio de metam, mezcla de ditiocarbamatos y cloruro de benzalconio, %

La opción de usar al cloruro de benzalconio como biocida desde esta óptica es buena ya que su efectividad es comparable con el resultado obtenido en el estudio del efecto inhibitorio de algunos antibióticos sobre *Leuconostoc mesenteroides* como la amoxiciclina a una concentración de 10 µg mL⁻¹ provocando un halo de inhibición de 15 mm o la clindamicina a una concentración de 100 µg/mL que dio un halo de inhibición de 13.5 mm (Mora-Peñaflor y García-Guerrero, 2007). Estos resultados son menores a la mitad del halo inhibitorio promedio del cloruro de benzalconio para 10 mg L⁻¹, que es de 20.89 mm, por lo que el alcance de este estudio puede ser aún mayor, ya que si el cloruro de benzalconio es un biocida efectivo, puede ser mejor que algunos antibióticos ya que este biocida no genera resistencia y según esta investigación es superior a otros biocidas con base en ditiocarbamatos y el formaldehído.

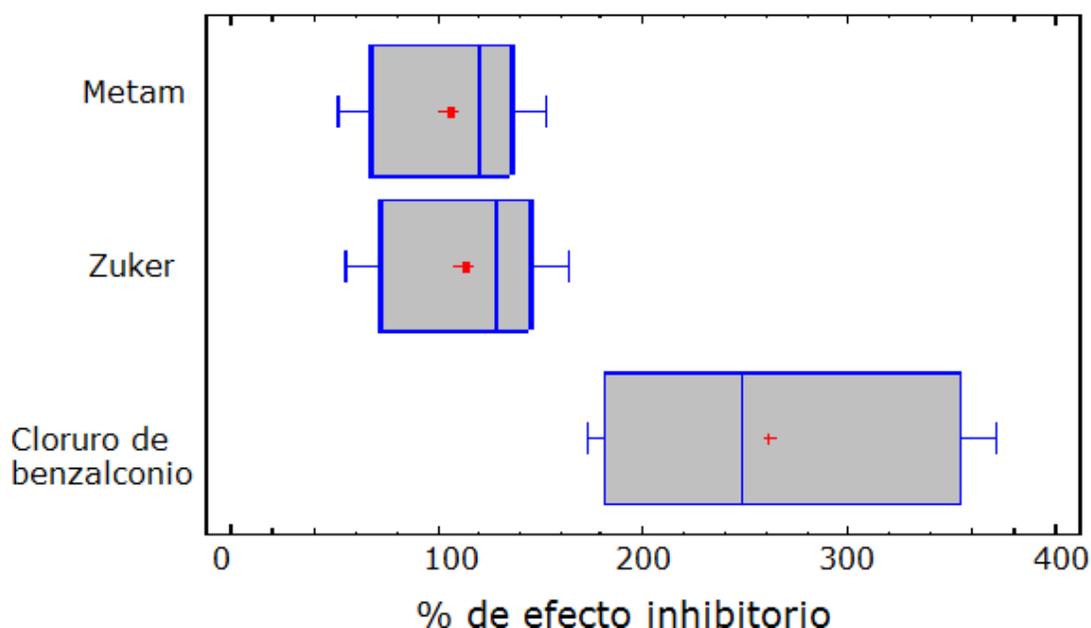


Fig. 43. Gráfica de cajas y bigotes para el % del efecto inhibitorio *versus* los biocidas metam sodio *versus* la mezcla de ditiocarbamatos *versus* el cloruro de benzalconio

Se debe tomar en cuenta que a pesar de no ser aparentemente tóxico para el humano y esté avalado por la US-FDA como sustancia que puede ser utilizada por industrias de alimentos no sobrepasando los límites establecidos, el CB es ecotóxico sobre todo para los ecosistemas acuáticos (Rieger *et al.*, 1980). Por tanto, su uso tampoco es del todo viable y amerita ser investigado.

El metam sodio y la mezcla de ditiocarbamatos (QZ) superaron el 100% de efecto inhibitorio en sus dosis de 40 y 50 mg L⁻¹, aunque desafortunadamente sobrepasan ampliamente los límites establecidos por la USFDA (2011).

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1. Conclusiones

De acuerdo con el objetivo de esta investigación que era el de identificar una de las bacterias mesófilas aerobias o facultativas predominantes en el jugo de caña de un ingenio, *Leuconostoc mesenteroides* sp, y su susceptibilidad a tres biocidas (mezcla de ditiocarbamatos, cloruro de benzalconio y ditiocarbamato de sodio) y a las hipótesis consideradas: Nula H_0 = La aplicación de biocidas no produce efectos inhibitorios a las bacterias del género *Leuconostoc* y alternativa H_a = La aplicación del biocidas produce efectos inhibitorios a las bacterias del género *Leuconostoc*, puede concluirse lo siguiente:

- Se logró la proliferación de las bacterias presentes en el jugo de caña, destacando la presencia y aislamiento de *Leuconostoc mesenteroides* en los medios seleccionados comprobando que los medios de cultivo MRS y el M17 son los más adecuados para su aislamiento
- Se identificó a *Leuconostoc mesenteroides* mediante una prueba confirmativa utilizando el sistema VITEK 2 que permite obtener datos concluyentes en microbiología con un alto porcentaje de confiabilidad que, para este caso, fue del 95%
- Mediante la experimentación se llegó a la conclusión de que los factores de mayor influencia en el experimento en orden decreciente fueron el medio de cultivo>el tiempo>combinación tiempo-medio y que la temperatura no tiene un efecto estadísticamente significativo

- Se dio la confirmación de la hipótesis de que *Leuconostoc mesenteroides sp* es susceptible a los tres agentes biocidas más utilizados en la industria azucarera, la mezcla de ditiocarbamatos (QZ), metam (MS) y cloruro de benzalconio (CB)
- El cloruro de benzalconio resultó ser el más eficiente de los biocidas en la inhibición del *Leuconostoc mesenteroides sp*, pero se debe tomar en cuenta que dicho biocida es tóxico para ecosistemas acuáticos por lo cual no es recomendable su uso hasta no ser investigado y certificado.

6.2. Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos, en las siguientes etapas de la investigación será importante investigar, dado que se observa que para una eficiente inhibición en el caso de los ditiocarbamatos se debe de rebasar los límites establecidos por la FDA y debido a la falta de normativas respecto a los límites máximos permisibles de ditiocarbamatos en el jugo de caña en México, los compuestos en los que se degradan esta clase de biocidas para determinar si existe algún riesgo para la salud al corto, mediano y largo plazo por la ingesta de los residuos de degradación que pudieran estar presentes en los productos intermedios antes de obtener el azúcar de caña.

Es necesario implementar una normativa en México aplicada al uso y manejo de estos biocidas en productos de consumo humano, con la finalidad de controlar y reducir los posibles riesgos que pudieran presentarse por un mal manejo de estos productos o de alguno de sus productos de degradación.

Con respecto a la falta de normativas aplicables, sugiero investigar el manejo de residuos que tiene implementado la industria azucarera ya que algunos biocidas usados como el formaldehído y el cloruro de benzalconio son ecotóxicos y los daños a los ecosistemas del país deben ser evaluados.

ANEXOS

ANEXO A Datos experimentales.

Tabla A.1. Resultados del medio APT para la selección de medio de cultivo para el aislamiento (Experimento 1).

Resultados del medio de cultivo APT						
MEDIO/ Día	TEMP. (C°)	No. de colonias	TEMP. (C°)	No. de colonias	TEMP. (C°)	No. de colonias
APT / 1	25	17	35	28	45	14
APT / 1	25	15	35	30	45	13
APT / 1	25	11	35	24	45	11
APT / 2	25	23	35	38	45	15
APT / 2	25	18	35	34	45	16
APT / 2	25	20	35	41	45	20
APT / 3	25	23	35	42	45	21
APT / 3	25	22	35	43	45	25
APT / 3	25	19	35	40	45	22

Tabla A.2. Resultados del medio MRS para la selección de medio de cultivo para el aislamiento (Experimento 1).

Resultados del medio de cultivo MRS						
MEDIO/ Día	TEMP. (C°)	No. de colonias	TEMP. (C°)	No. de colonias	TEMP. (C°)	No. de colonias
MRS / 1	25	11	35	17	45	15
MRS / 1	25	15	35	26	45	16
MRS / 1	25	13	35	20	45	14
MRS / 2	25	31	35	39	45	23
MRS / 2	25	28	35	42	45	23
MRS / 2	25	22	35	40	45	21
M17 / 3	25	35	35	43	45	25
M17 / 3	25	32	35	42	45	27
M17 / 3	25	31	35	41	45	23

Tabla A.3. Resultados del medio M17 para la selección de medio de cultivo para el aislamiento (Experimento 1).

Resultados del medio de cultivo M17						
MEDIO/ Día	TEMP. (C°)	No. de colonias	TEMP. (C°)	No. de colonias	TEMP. (C°)	No. de colonias
M17 / 1	25	4	35	12	45	3
M17 / 1	25	7	35	10	45	5
M17 / 1	25	6	35	13	45	7
M17 / 2	25	6	35	15	45	2
M17 / 2	25	7	35	20	45	6
M17 / 2	25	5	35	18	45	4
M17 / 3	25	10	35	19	45	10
M17 / 3	25	8	35	17	45	7
M17 / 3	25	9	35	22	45	11

ANEXO B Análisis estadístico

Tablas y gráficos de análisis estadístico

Análisis del metam halo de inhibición *versus* dosis en subgrupos

Resumen Estadístico

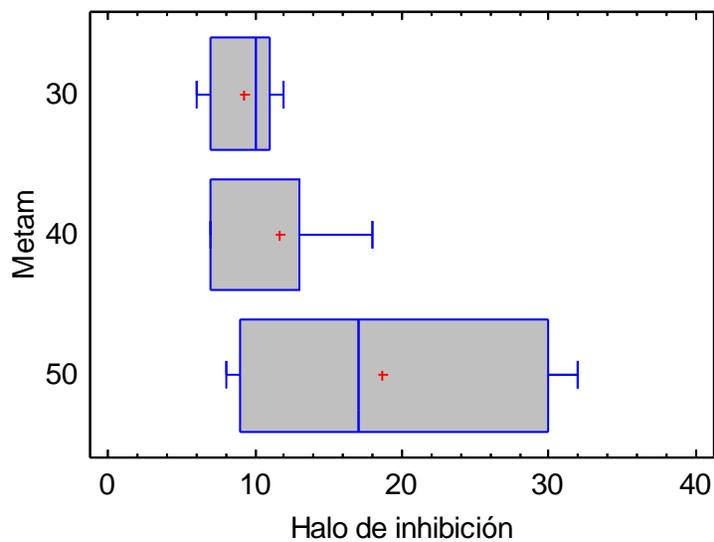
Datos/Variable: Halo de inhibición

			<i>Desviación</i>	<i>Coficiente</i>				<i>Sesgo</i>	<i>Curtosis</i>
<i>Metam</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Estándar</i>	<i>de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>	<i>Estandarizado</i>	<i>Estandarizada</i>
30	9	9.22222	2.10819	22.8598%	6.0	12.0	6.0	-0.458015	-0.832854
40	9	11.6667	3.90512	33.4725%	7.0	18.0	11.0	-0.0220345	-0.56735
50	9	18.6667	9.97497	53.4373%	8.0	32.0	24.0	0.459572	-1.04234
Total	27	13.1852	7.30141	55.3758%	6.0	32.0	26.0	3.46152	2.19501

El StatAdvisor

Esta tabla presenta las estadísticas muestrales para los 3 niveles de Metam.

Gráfico de Caja y Bigotes



Análisis del metam halo de inhibición *versus* dosis ANDEVA multifactorial

Análisis de Varianza para Halo de inhibición - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Metam	432.519	2	216.259	5.44	0.0112
RESIDUOS	953.556	24	39.7315		
TOTAL (CORREGIDO)	1386.07	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANDEVA descompone la variabilidad de Halo de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Halo de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición por Metam

Método: 95.0 porcentaje LSD

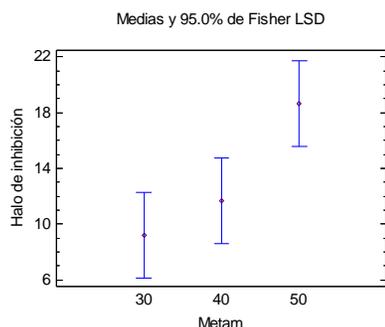
Metam	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
30	9	9.22222	2.1011	X
40	9	11.6667	2.1011	X
50	9	18.6667	2.1011	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
30 - 40		-2.44444	6.13268
30 - 50	*	-9.44444	6.13268
40 - 50	*	-7.0	6.13268

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (*LSD*, en inglés) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.



Análisis del metam halo de inhibición *versus* temperatura en subgrupos.

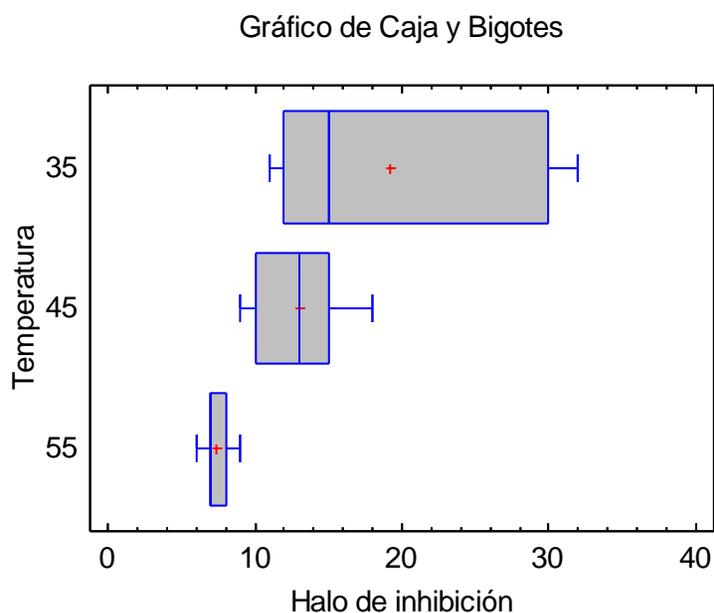
Datos/Variable: Halo de inhibición

			<i>Desviación</i>	<i>Coficiente</i>				<i>Sesgo</i>
<i>Temperatura</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Estándar</i>	<i>de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>	<i>Estandarizado</i>
35	9	19.2222	9.10738	47.3795%	11.0	32.0	21.0	0.824832
45	9	13.0	3.16228	24.3252%	9.0	18.0	9.0	0.485506
55	9	7.33333	0.866025	11.8094%	6.0	9.0	3.0	0.808122
Total	27	13.1852	7.30141	55.3758%	6.0	32.0	26.0	3.46152

	<i>Curtosis</i>
<i>Temperatura</i>	<i>Estandarizada</i>
35	-1.05719
45	-0.640804
55	0.50545
Total	2.19501

El StatAdvisor

Esta tabla presenta las estadísticas muestrales para los 3 niveles de Temperatura.



Análisis del metam halo de inhibición *versus* temperatura ANDEVA multifactorial.

Análisis de Varianza para Halo de inhibición - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	636.519	2	318.259	10.19	0.0006
RESIDUOS	749.556	24	31.2315		
TOTAL (CORREGIDO)	1386.07	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANDEVA descompone la variabilidad de Halo de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Halo de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

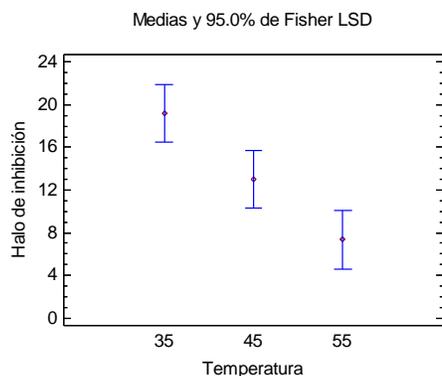
Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
55	9	7.33333	1.86284	X
45	9	13.0	1.86284	X
35	9	19.2222	1.86284	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
35 - 45	*	6.22222	5.43725
35 - 55	*	11.8889	5.43725
45 - 55	*	5.66667	5.43725

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD, en inglés) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.



Análisis del QZ halo de inhibición *versus* dosis en subgrupos.

Resumen Estadístico

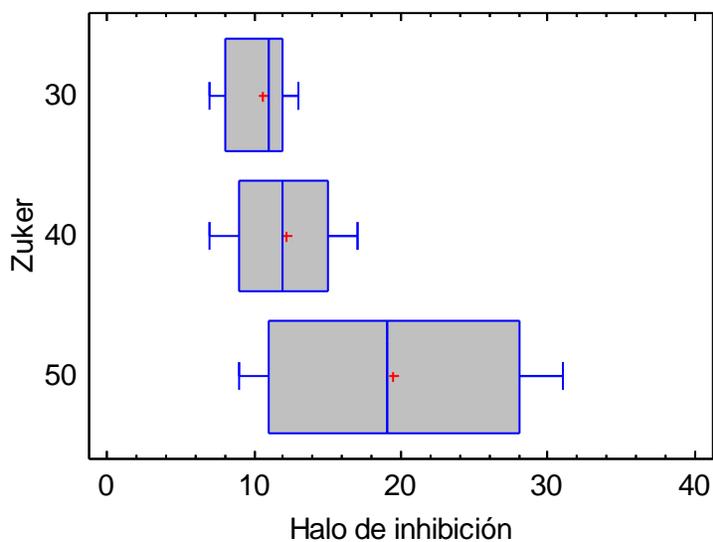
Datos/Variable: Halo de inhibición

			<i>Desviación</i>	<i>Coficiente</i>				<i>Sesgo</i>	<i>Curtosis</i>
<i>QZ</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Estándar</i>	<i>de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>	<i>Estandarizado</i>	<i>Estandarizada</i>
30	9	10.5556	2.29734	21.7643%	7.0	13.0	6.0	-0.696656	-0.883736
40	9	12.2222	3.59784	29.4369%	7.0	17.0	10.0	-0.258387	-0.877151
50	9	19.4444	8.44262	43.4192%	9.0	31.0	22.0	0.148798	-0.976207
Total	27	14.0741	6.557	46.5892%	7.0	31.0	24.0	2.95736	1.48977

El StatAdvisor

Esta tabla presenta las estadísticas muestrales para los 3 niveles de QZ.

Gráfico de Caja y Bigotes



Análisis del QZ halo de inhibición *versus* dosis ANDEVA multifactorial.

Análisis de Varianza para Halo de inhibición - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:QZ	401.852	2	200.926	6.73	0.0048
RESIDUOS	716.0	24	29.8333		
TOTAL (CORREGIDO)	1117.85	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANDEVA descompone la variabilidad de Halo de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Halo de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición por QZ

Método: 95.0 porcentaje LSD

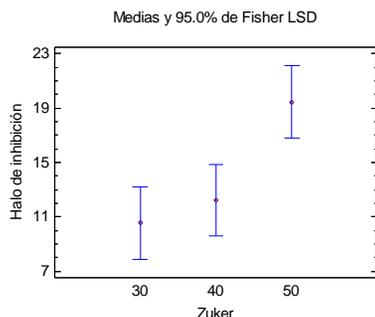
QZ	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
30	9	10.5556	1.82066	X
40	9	12.2222	1.82066	X
50	9	19.4444	1.82066	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
30 - 40		-1.66667	5.31415
30 - 50	*	-8.88889	5.31415
40 - 50	*	-7.22222	5.31415

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD, en inglés) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.



Análisis del QZ halo de inhibición *versus* temperatura subgrupos

Resumen Estadístico

Datos/Variabile: Halo de inhibición

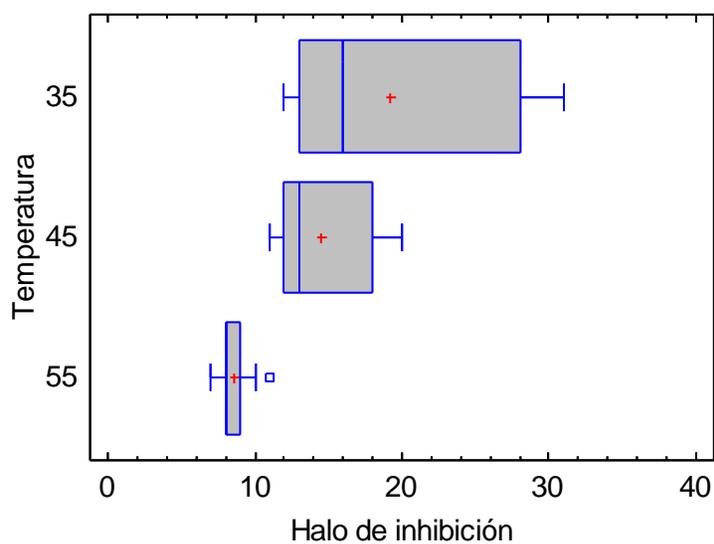
			<i>Desviación</i>	<i>Coficiente</i>				<i>Sesgo</i>
<i>Temperatura</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Estándar</i>	<i>de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>	<i>Estandarizado</i>
35	9	19.2222	7.80669	40.6129%	12.0	31.0	19.0	0.881566
45	9	14.4444	3.5746	24.7472%	11.0	20.0	9.0	0.84858
55	9	8.55556	1.33333	15.5844%	7.0	11.0	4.0	0.80989
Total	27	14.0741	6.557	46.5892%	7.0	31.0	24.0	2.95736

	<i>Curtosis</i>
<i>Temperatura</i>	<i>Estandarizada</i>
35	-0.957438
45	-0.890181
55	-0.0938037
Total	1.48977

El StatAdvisor

Esta tabla presenta las estadísticas muestrales para los 3 niveles de Temperatura.

Gráfico de Caja y Bigotes



Análisis del QZ halo de inhibición *versus* temperatura ANDEVA multifactorial

Análisis de Varianza para Halo de inhibición - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Temperatura	513.852	2	256.926	10.21	0.0006
RESIDUOS	604.0	24	25.1667		
TOTAL (CORREGIDO)	1117.85	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANDEVA descompone la variabilidad de Halo de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Halo de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

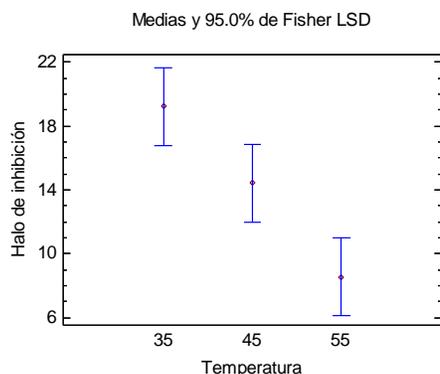
Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
55	9	8.55556	1.67221	X
45	9	14.4444	1.67221	X
35	9	19.2222	1.67221	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
35 - 45		4.77778	4.88085
35 - 55	*	10.6667	4.88085
45 - 55	*	5.88889	4.88085

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (*LSD*, en inglés) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.



Análisis del CB halo de inhibición *versus* dosis subgrupos

Resumen Estadístico

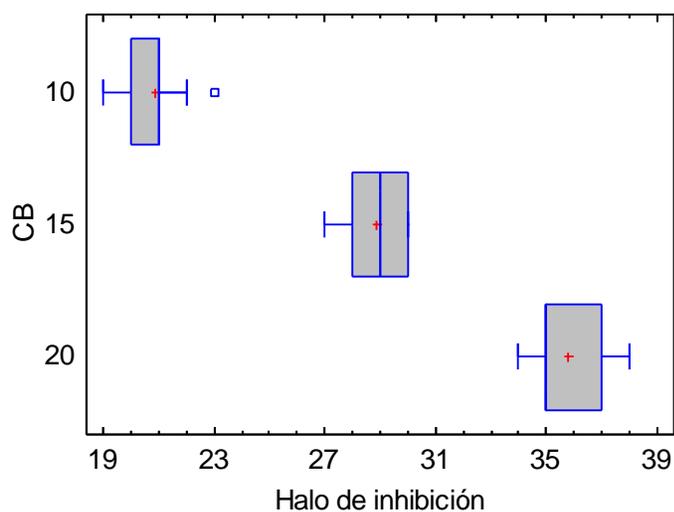
Datos/Variable: Halo de inhibición

			<i>Desviación</i>	<i>Coficiente</i>				<i>Sesgo</i>	<i>Curtosis</i>
<i>CB</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Estándar</i>	<i>de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>	<i>Estandarizado</i>	<i>Estandarizada</i>
10	9	20.8889	1.16667	5.58511%	19.0	23.0	4.0	0.327483	0.331855
15	9	28.8889	1.16667	4.03846%	27.0	30.0	3.0	-0.41624	-0.966708
20	9	35.7778	1.56347	4.36995%	34.0	38.0	4.0	0.573524	-0.820684
Total	27	28.5185	6.32681	22.1849%	19.0	38.0	19.0	-0.123412	-1.47253

El StatAdvisor

Esta tabla presenta las estadísticas muestrales para los 3 niveles de CB.

Gráfico de Caja y Bigotes



Análisis del CB halo de inhibición *versus* dosis ANDEVA multifactorial

Análisis de Varianza para Halo de inhibición - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CB	999.407	2	499.704	290.15	0.0000
RESIDUOS	41.3333	24	1.72222		
TOTAL (CORREGIDO)	1040.74	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANDEVA descompone la variabilidad de Halo de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Halo de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición por CB

Método: 95.0 porcentaje LSD

CB	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	9	20.8889	0.437445	X
15	9	28.8889	0.437445	X
20	9	35.7778	0.437445	X

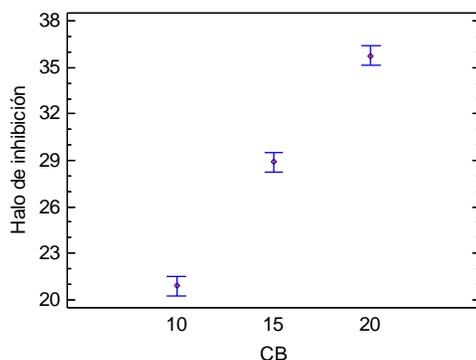
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
10 - 15	*	-8.0	1.27681
10 - 20	*	-14.8889	1.27681
15 - 20	*	-6.88889	1.27681

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD, en inglés) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Análisis del CB halo de inhibición *versus* temperatura Subgrupos

Resumen Estadístico

Datos/Variable: Halo de inhibición

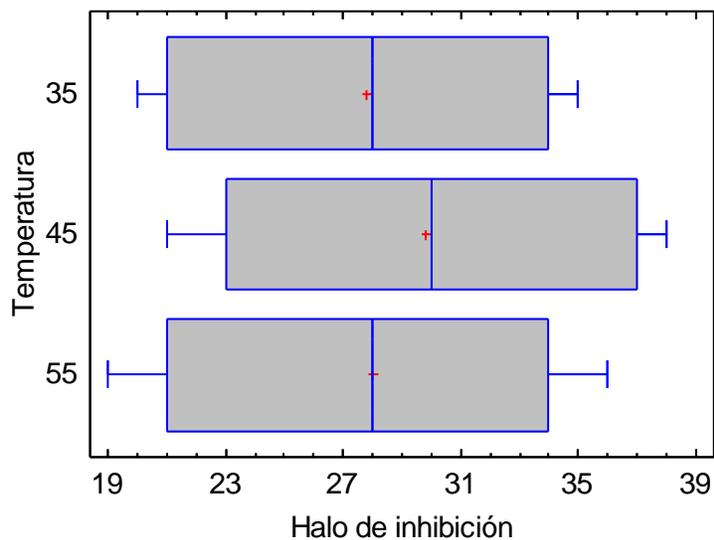
			<i>Desviación</i>	<i>Coficiente</i>				<i>Sesgo</i>
<i>Temperatura</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Estándar</i>	<i>de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>	<i>Estandarizado</i>
35	9	27.7778	6.28048	22.6097%	20.0	35.0	15.0	-0.196676
45	9	29.7778	6.81502	22.8862%	21.0	38.0	17.0	0.0185333
55	9	28.0	6.44205	23.0073%	19.0	36.0	17.0	-0.247382
Total	27	28.5185	6.32681	22.1849%	19.0	38.0	19.0	-0.123412

	<i>Curtosis</i>
<i>Temperatura</i>	<i>Estandarizada</i>
35	-1.07102
45	-1.00724
55	-0.973462
Total	-1.47253

El StatAdvisor

Esta tabla presenta las estadísticas muestrales para los 3 niveles de Temperatura.

Gráfico de Caja y Bigotes



Análisis del CB halo de inhibición *versus* temperatura ANDEVA multifactorial

Análisis de Varianza para Halo de inhibición - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	21.6296	2	10.8148	0.25	0.7772
RESIDUOS	1019.11	24	42.463		
TOTAL (CORREGIDO)	1040.74	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANDEVA descompone la variabilidad de Halo de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Halo de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
35	9	27.7778	2.17212	X
55	9	28.0	2.17212	X
45	9	29.7778	2.17212	X

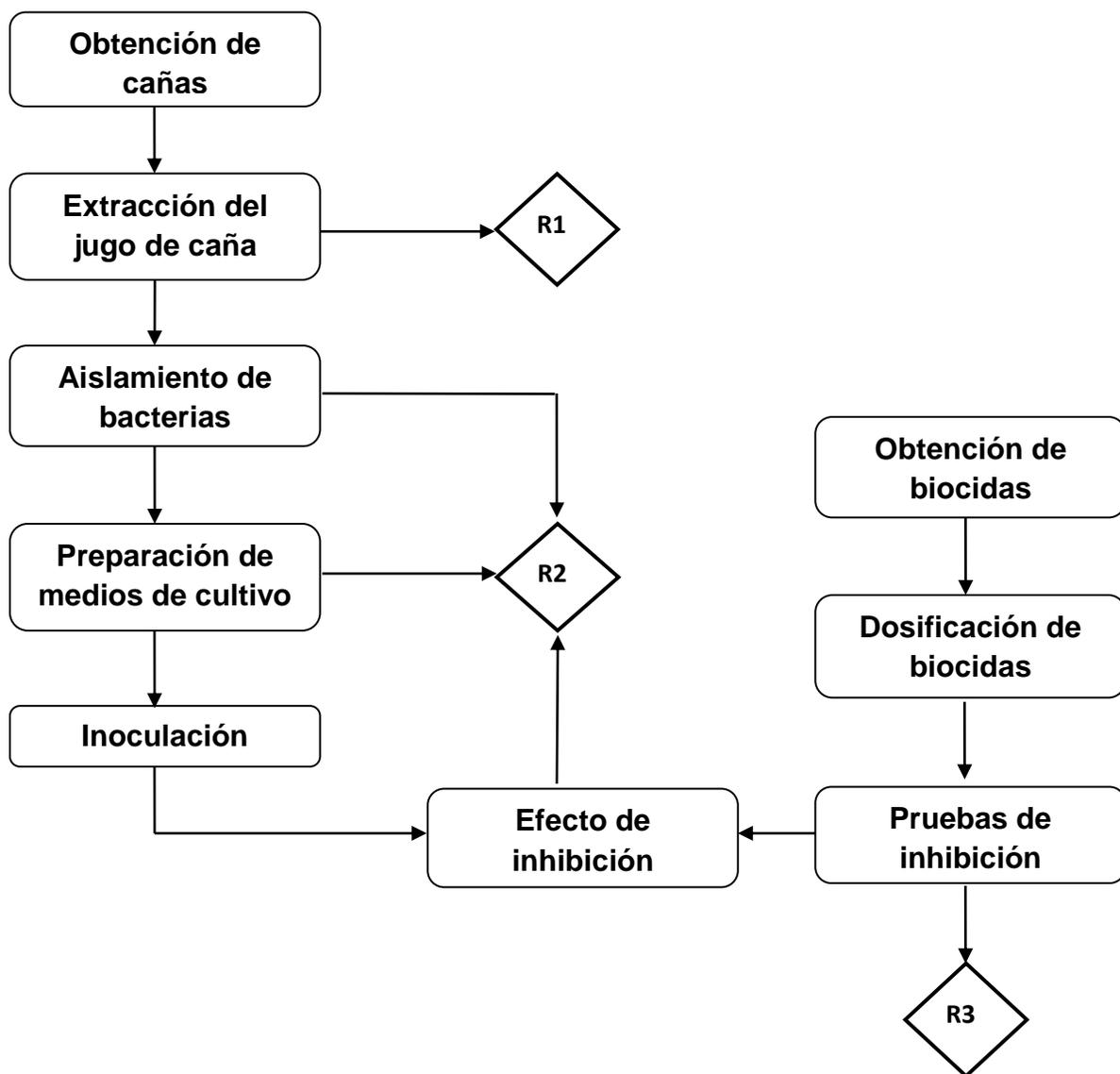
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
35 - 45		-2.0	6.33998
35 - 55		-0.222222	6.33998
45 - 55		1.77778	6.33998

* indica una diferencia significativa

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD, en inglés) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

ANEXO C Tratamiento de residuos



Residuo	Corresponde a	Tratamiento
R1	Desechos orgánicos de la extracción del jugo (cáscara, bagazo)	Se desecha con los residuos orgánicos
R2	Cajas de Petri, medio de cultivo contaminado	Se recolectan en un contenedor especial para su futura incineración. Se entregan a la UGA
R3	Restantes de biocida (metam, mezcla de ditiocarbamatos, cloruro de benzalconio)	Se recolectan individualmente y pueden ser eliminados por temperatura, fotólisis, ácidos o bases fuertes. Se entregan a la UGA

Fig. C.1. Disposición controlada de los residuos producidos en esta investigación

Bibliografía

- Arvizu-Bernal, D. I., Ramos-Medina, J. C. (2010). Degradación del ditiocarbamato de sodio usado como plaguicida en el proceso de elaboración de azúcar en México mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Tesis profesional de Químicos de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México
- Baduí-Dergal, S. (1999). Química de los alimentos. Editorial Pearson. México D.F. México.
- Bazaran, P. (2011). Inhibition effect of benzalkonium chloride treatment on growth of common food contaminating fungal species. *Food Science Technology*. 48(4):515-519.
- Bell, S. M., Pham, J. N., Fisher, G. T. (2009). Antibiotic susceptibility testing by the CDS method. En *A Manual for Medical and Veterinary Laboratories*. 5a edición. South Eastern Area Laboratory Services. Randwick, Australia.
- Björkroth, J., Holzapfel W. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In M. Dworkin (ed.), *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, vol. 4, 3rd ed. Springer-Verlag, New York, NY. EE.UU. Pp. 267-319.
- Bonilla-Vidal, F. (2013). Efecto de algunos factores de proceso sobre la degradación de la metilamina, uno de los subproductos del ditiocarbamato de sodio utilizado como agente biocida contra *Leuconostoc mesenteroides* en los ingenios azucareros mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Tesis profesional de Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México:
- Brewin, S., Miller, C., Khoshab, A. (2008). 7th European Pesticide Residues Workshop (EPRW), Book of Abstracts, Berlin, Alemania. P. 142.
- Campanac, S., Pineau, L., Payard, A., Baziard-Mouysset, G., Roques, C. (2002). Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(5):1469-1474.

- Carmona, H. (1997). Estudio de la calidad de materias primas, productos intermedios y producto final en un ingenio azucarero azucarero. Tesis profesional de Química de Alimentos. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México.
- Castleman, B. I., Ziem, G. E. (1994). American Conference of Governmental Industrial Hygienists: Low threshold of credibility. *American Journal of Industrial Medicine*. 26(1):133-143.
- CFR. (2012). Title 21; Chapter 1; Subchapter B; part 173; Subchapter D; Section 173.320 Dirección electrónica (consultada el 22 de julio de 2014). <http://www.law.cornell.edu/cfr/text/21/173.320>.
- CNIAA. (2014). Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcohólica. Producción de azúcar de caña de México. Dirección electrónica (consultada el 18 de julio de 2014). <http://www.camaraazucarera.org.mx/>
- CONABIO. (2009). Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, México, D.F.
- Correa A., Galdames C., Stapf M. (2004). *Cat. Pl. Vasc. Panamá* 1–599. Smithsonian Tropical Institute, Panamá.
- Crnogorac, G., Schwack, W. (2007). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 4009. En: Crnogorac, G., Schwack, W. 2009. Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. *Trends in Analytical Chemistry*. (28)1:40-50.
- Cuervo-M., S.I., Cortés-L., J., Rodríguez-R., E., Hormaza-A., N., Vargas-S., E. (2008). *Leuconostoc* sp en pacientes con cáncer: Estudio descriptivo / *Leuconostoc* sp in cancer patients: A descriptive study. *Rev. Chil. Infect.* 25(3):184-188.
- Cuervo-Mulet, R. A., Ángel-Ledesma, J., Durán-Vanegas, J. A., Argote-Vega, F. E. (2010). Isolation and microbiological control of *Leuconostoc mesenteroides*, into sugar refinery to optimize the performance of sugar and ethanol. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 8(2):31-40.
- Dailey, J. E., Marcuse, P. M. (1969). Gonadotropin secreting giant cell carcinoma of the lung. *Cancer*. 24(2):388-396.

- Davidse, G., Sousa M., Chater A. (1994). Alismataceae a Cyperaceae. 6: i–xvi, 1–543. In G. Davidse, G., Sousa M. y Chater A. (eds.) *Fl. Mesoamerica* Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F
- Deutschle, T., Porkert, U., Reiter, R., Keck, T., Riechelmann, H. (2006). *In vitro* genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicology In Vitro*. 20:1472-1477.
- DOF. (2009). Jueves 24 de septiembre de 2009. DIARIO OFICIAL (Primera Sección). Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. CUARTO.- Se modifica el encabezado de la tabla 13 para quedar como sigue: Tabla 21 - Reglas para la escritura de los números y su signo decimal. Signo decimal El signo decimal debe ser una coma sobre la línea (,) o un punto sobre la línea (.). Si la magnitud de un número es menor que la unidad, el signo decimal debe ser precedido por un cero. Diario Oficial de la Federación: Jueves 24 de septiembre de 2009. Poder Ejecutivo Federal. México D.F., México.
- EC Commission Regulation No 839. (2008). Amending Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV on maximum residue levels of pesticides in or on certain products.
- Egan, B. T., Rehbein, C. A. (1963). Bacterial deterioration of mechanically harvested cut-up sugar cane during storage over weekends. En *Proceedings of the 30th Congress Queensland Society of Sugarcane Technologists*. Queensland Society of Sugarcane Technologists. Queensland, Australia. Pp. 11-25.
- EPA-RED. (2010). Nabam EPA 738-R95-035 January 1996 USEPA/Office of Prevention Pesticides and Toxic Substances; Registration Eligibility Decision Document-Nabam EPA 738-R95-035. Washington, DC. EE.UU.
- Erten, H. (1998). Metabolism of fructose as an electron acceptor by *Leuconostoc mesenteroides*. *Process Biochemistry*. 33(7):735-739.

- European Commission. (2014). La Comisión Europea legislación de la UE. Dirección electrónica (consultada el 15 de junio de 2014).
http://ec.europa.eu/atoz_en.htm.
- Ferk, F.M., Misík, M., Hoelzl, C., Uhl, M., Fuerhacker, M., Grillitsch, B., Parzefall, W., Nersesyan, A., Micieta, K., Grummt, T., Ehrlich, V., Kansmüller, S. (2007). Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations. *Mutagenesis*. 22(6):363-370.
- Flores-Santillán, B.A. y Pérez-Cordero, V.A. (2013). Determinación y cuantificación del isotiocianato de metilo (MITC) bajo diferentes parámetros de operación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Tesis profesional de Química de Alimentos. México D.F., México: Facultad de Química, UNAM.
- Gamazo, C., Sánchez, S., Camacho, A. (2010). Microbiología basada en la experimentación. 1ª edición. Editorial Elsevier. Madrid, España. Pp. 91-93.
- GEPLACEA. (1988). Manual de los derivados de la caña de azúcar. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, ICIDCA. Colección GEPLACEA. Grupo de Países de Latinoamérica y el Caribe Exportadores de Azúcar. México D.F. México.
- Gustafsson, K.H., Thompson, R. A. (1981). High-pressure liquid chromatographic determination of fungicidal dithiocarbamates. *J. Agric. Food Chem.* 29:729-732.
- Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology, and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*. 14:467-494.
- Hernández, M. T., Dauval, C., Pérez, M. E. (1978). Acción del *Leuconostoc mesenteroides* y otros microorganismos sobre los componentes del jugo de caña [*Saccharum officinarum*]. *Centro Azúcar (Cuba)*. 5(1):69-87.

- IARC. (2004). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 83: Tobacco smoke and involuntary smoking. International Agency for Research on Cancer. Lyon, Francia.
- International Programme Chemical Safety. (1988). Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea and propylenethiourea: A general introduction. World Health Organization. Ginebra, Suiza. Dirección electrónica: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/39117>
- Kochergin, V. (2002). Processing opportunities for the future. *Int. Sugar J.* 104(1243):290-300.
- Koyama, K., Shimazu, Y. (2005). Benzalkonium chloride. En *Drugs and passions in humans. Handbook of practical analysis.* Suzuki, O., Watanabe, K. Eds. Cap. 5.2. Springer-Verlag. Berlín, Heidelberg, Nueva York. Alemania, EE.UU. Pp. 407-414.
- Kröckel, L., Jira, W., Wild, D. (2003). Identification of benzalkonium chloride in food additives and its inefficacy against bacterial in minced meat and raw sausage batters. *European Food Research and Technology.* 216(5):402-406.
- Kuboyama, Y., Suzuki, K., Hara, T. (1997). Nasal lesions induced by intranasal administration of benzalkonium chlorides in rats. *The Journal of Toxicological Sciences.* 22(2):153-160.
- Kulwichit, W., Nilgate, S., Chatsuwan, T. (2007). Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays». *BMC Infectious Diseases* 7: Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Bangkok, Thailand. Pp. 69.
- Larrahondo, J. (1995). La calidad de la caña de azúcar. En *El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia.* CENICAÑA. Cali, Colombia. Pp. 337-354.
- Lewis, M. N. (1996). Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica. El elefante marino del sur: Biología de la especie, descripción general de la agrupación de la Península Valdés y protocolos de trabajo. Informes técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica

- (Puerto Madryn, Argentina). Fundación Patagonia Natural. Chubut, Argentina. P. 16.
- Liu, J., Lu, G. W., Sandoval, M., Ciring, Y., Xue, G., Jaeger, D., Kompanik, K., Jiao, J., Gelotte, K. M. (2009). Determination of benzalkonium chloride partition in micelle solutions using ultrafiltration method. *AAPS Pharm SciTech*. 10(4): 1216-1223.
- Maeda, T., Manabe, Y., Yamamoto, M., Yoshida, M., Okazaki, K., Nagamune, H., Kourai, H. (1999). Synthesis and antimicrobial characteristics of novel biocides, 4,4-(1,6-Hexamethylenedioxydicarbonyl) bis(1-alkylpyridinium iodides). *Chem. Pharm. Bulletin*. 47(7):1020-1023.
- Martinez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Sitka, A., Kreuzinger, N., Scharf, S., Gans, O. (2007). Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry. Part II Application to sediment and sludge samples in Austria. *Environmental pollution*. 146(2):543-547.
- Mayeux, P. A., Colmer, A. R. (1960). Studies on microflora associated with *Saccharum officinarum*. *Sugar Journal*. 23(7):28-32.
- Meylan, W. M., Howard, P. H. (2012). Sodium N-dimethyldithiocarbamate. *J. Pharm. Sci.* 84:83-92. En: Toxicology Data Network, 2012. Dirección electrónica (consultada 31 de marzo de 2014). <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6811>
- Mora-Peñaflor, N., García-Guerrero, A. (2007). Susceptibilidad de las bacterias acidolácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis profesional de Química de Alimentos. Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, UAEH. Pachuca de Soto, Hidalgo. México.
- Morgan, D. P. (1989). Recognition and management of pesticide poisonings. 4th ed. P. 101 EPA 540/9-88-001. U. S. Government Printing Office, March. Washington, DC. EE.UU.
- Moriya, M., Ohta, T., Watanabe, K., Miyazawa, T., Shirasu, Y. (1983). Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. *Mutation Res.* 116(3):185-216.

- OMS. (1982). FAO/OMS. Food and Agriculture Organization of the United Nations/Organización Mundial de la Salud. Residuos de plaguicidas en los alimentos. Estudio FAO: Producción y Protección Vegetal N° 37. Informe de la Reunión Conjunta 1981 del Cuadro de Expertos de la FAO en Residuos de Plaguicidas y el Medio Ambiente y el grupo de Expertos de la OMS en Residuos de Plaguicidas. Roma, Italia.
- Pincus, D, H. (1998). Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 System. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO. EE.UU.
- Ramírez-Gama, R.M., Luna-Millán, B., Velázquez-Madrado, O., Vierna-García, L., Mejía-Chávez, A., Tsuzuki-Reyes, G., Hernández-Gómez, L., Müggenburg, I., Camacho-Cruz, A. Urzúa-Hernández, M. del C. (2008). Manual de practicas de microbiología general. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.
- Rieger, F., Shelanski, M. L., Greene, L. A. (1980). The effects of nerve growth factor on acetylcholinesterase and its multiple forms in cultures of rat PC12 pheochromocytoma cells: Increased total specific activity and appearance of the 16 S molecular form. *Developmental Biology*. 76(1):238-243.
- Rodríguez, E. (2005). La dextrana a lo largo de la industria azucarera. *Biología Aplicada*, 22(1):11-19.
- Rodríguez-Berthely, C.A. (2014). Cuantificación de dextranas (falsa sacarosa) en caña de azúcar cronológicamente rezagada. Tesis profesional de Ingeniería Química. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México.
- Rodwell, D.E. (1988). Teratology study in rats with Busan 85. SLS Study No 3138.17 Springborn Life Sciences, Inc., Wareham, MA. Pp. 1-20. En: OEHHA, 2007. Proposition 65 Maximum Allowable Dose Level (MADL) for Reproductive Toxicity for Potassium Dimethyldithiocarbamate. Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). Washington, DC. EE.UU.
- SAGARPA. (2009-2013). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Programa Nacional de la Agroindustria de la Caña de Azúcar. Dirección electrónica (consultada el 14 de junio de 2014).

<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Documents/PRONAC.pdf>.

Sanborn, J. R. (1977). The degradation of selected pesticides in soil. USEPA-600/9-77-022. En: Toxicology Data Network, 2012. Sodium N-dimethyldithiocarbamate. Dirección electrónica (consultada 31 de marzo de 2014).

[http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-](http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6811)

[bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6811](http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6811).

Serrano, L. (2006). Determinaciones de las poblaciones microbiológicas en el proceso de extracción de jugo de caña de azúcar en el ingenio Manuelita S.A. Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. Colombia.

Sheftel, V. O. (2000). Indirect food additives and polymers: migration and toxicology. CRC Press. Boca Raton, FL, EE.UU.

SIAP. (2013). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México D.F. México. Dirección electrónica (consultada el 5 julio de 2014).

<http://www.campomexicano.gob.mx/azcf/reportes/reportes.php?tipo=CIERR>
E

Silliker, J. H., Chairman, R. P. A. Bryan, J. H. B. Christian, D. S., Clark, J. C., Olson, Jr. T.A. (1980). Ecología Microbiana de los Alimentos. 2. Productos Alimenticios. Elliott Editorial Coordinator. Zaragoza, España.

Smith, M.J., Flowers, T. H., Cowling, M. J., Duncan, H. J. (2002). Method for the measurement of the diffusion coefficient of benzalkonium chloride. Water Research. 36(6):1423-1428.

Soffritti, M., Belpoggi, F., Lambertin, L., Lauriola, M., Padovani, M., Maltoni, C. (2002). Results of long - term experimental studies on the carcinogenicity of formaldehyde and acetaldehyde in rats. Annals of the New York Academy of Sciences. 982(1):87-105.

Stack, M., Rodricks, J. V. (1971). Method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin. Journal Association of Official Analytical Chemists. 54(1):86-90.

- Til, H. P., Woutersen, R. A., Feron, V. J., Hollanders, V. H. M., Falke, H. E., Clary, J. J. (1989). Two-year drinking-water study of formaldehyde in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 27(2):77-87.
- Tomlin, C. D. S. (ed). (1994). *The pesticide manual – World Compendium*. 10th ed. The British Crop Protection Council, p. 714. En: *Toxicology Data Network*, 2012. Sodium N-dimethyldithiocarbamate. Surrey, UK (Reino Unido). Dirección electrónica (consultada el 31 de marzo de 2014).
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6811>
- Toxicology Data Network. (2012). Sodium N-dimethyldithiocarbamate. Dirección electrónica (consultada el 03 de mayo de 2014):
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6811>.
- Trivedi, H.K., Patel, M.C. (2010). Development and validation of a precise and stability indicating LC method for the determination of benzalkonium chloride in pharmaceutical formulation using and experimental design. *E-Journal of Chemistry*. 7(4):1514-1522.
- USFDA. (2011). Código Federal de Regulación. Título 21(3):21CFR172.165 Dirección electrónica (consultada el 13 de mayo de 2014):
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/CFR>
- Vagiakou-Voudris, E., Mylona-Petropoulou, D., Kalogeropoulou, E., Chantzis. A., Chini, S., Tsiodra, P., Malamou-Lada, E. (2002). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 34(10):766-767.
- Van Leeuwen, C.J., Maas-Diepeveen, J.L., Niebeek, G., Vergouw. W.H.A., Griffioen, P.S., Luijken, M.W. (1985). Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. I. Short-term toxicity tests. Laboratory for Ecotoxicology, Government Institute for Sewage and Waste Water Treatment, P.O. AA Lelystad, Netherlands Pp. 145-164.
- Vekshtein, M. S., Khitsenko, I. L. (1971). Ziram metabolism in warm-blooded animals. En: *International Programme on Chemical Safety*, 1988. Dithiocarbamate

- pesticides, ethylenethiourea and propylenethiourea: A general introduction. Hyg. Sanit., 36:28-33.
- Velázquez, L. C., Barbini, N. B., Escudero, M. E., Estrada, C. L., De Guzman, A. M. S. (2009). Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride, lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersenia enterocolitica* on fresh vegetables. Food Control. 20:262-268.
- Verschueren, K. (2001). Handbook of Environmental Data on Organic Chemical. Volumes 1-2. 4th ed. John Wiley y Sons. New York, N.Y. p 913. En: Toxicology Data Network, (2012). Sodium N-dimethyldithiocarbamate. Dirección electrónica (consultada el 20 de marzo de 2014).
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6811>
- Villa, M. D. (2008). Efectos de microbicidas y antagonistas microbianos sobre microorganismos causales del deterioro poscosecha de caña y su impacto en las pérdidas de sacarosa en el ingenio. Tesis de Maestría en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional. Tlaxcala, Tlax., México.
- Walker, E. B. (2003). Quaternary ammonium compounds. En Handbook of topical antimicrobials: industrial applications in consumer products and pharmaceuticals. Pp. 99-116.
- Whitehead, K., Mitragotri, S. (2008). Mechanistic analysis of chemical permeation enhancers for oral drug delivery. Pharmaceutical Research. 25(6):1412-1419.
- WHO. (2012). Environ. Health Criteria 78: Dithiocarbamate Pesticides, Ethylenethiourea and Propylenethiourea (1988). Ginebra, Suiza.
- Xue, Y., Hieda, Y., Kimura, K., Takayama, K., Fujihara, J., Tsujino, Y. (2004). Kinetic characteristics and toxic effects of benzalkonium chloride following intravascular and oral administration in rats. Journal of Chromatography B. 811(1):53-58.
- Zhang, J., Nazarenko, Y., Zhang, L., Calderon, L., Lee, K. B., Garfunkel, E. y Mainelis, G. (2013). Impacts of a nanosized ceria additive on diesel engine

emissions of particulate and gaseous pollutants. *Environmental Science & Technology*. 47(22):13077-13085.