

Metodología para la producción y evaluación de la base de sales del Medio Transporte de Cary-Blair

Methodology for the production and evaluation of the salts base of Cary-Blair Transport Medium

MSc. Dennis Someillan-Iglesias¹, DrC. Raisa Zhurbenko¹, DrC. Tamara Lobaina-Rodríguez^{II}, DrC. Orestes Mayo-Abad^{II}, DrC. Claudio Rodríguez-Martínez^I

dennis.someillan@biocen.cu

¹Dirección de Investigaciones, Centro Nacional de Biopreparados, Bejucal, Mayabeque;

^{II}Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana "José A. Echevarría", La Habana, Cuba

Resumen

En este trabajo se expone un método diseñado para el desarrollo del medio de cultivo de transporte de Cary-Blair para su producción industrial y la evaluación de un producto intermedio. Se elaboró un procedimiento para identificar los factores que provocan la potencial incompatibilidad de las sales que lo componen. Se confeccionó el producto intermedio y se evaluaron las características fisicoquímicas, organolépticas y de rendimiento microbiológico. Se demostró que la compatibilidad del fosfato de sodio y del cloruro de calcio está determinada por la concentración, la temperatura, el pH y el orden de la mezcla. El producto permitió la producción industrial del medio, cumpliendo con la norma ISO 9001:2015. La base de sales junto con el resto de los ingredientes en la formulación, logra la apariencia idónea para su comercialización y cumple con los requisitos para el mantenimiento, conservación y transporte de muestras clínicas.

Palabras clave: medio de cultivo, Cary-Blair; incompatibilidad, fosfato de calcio.

Abstract

In that work is expensed, the method designed for the development of Cary-Blair's transport culture medium for industrial production and the evaluation of an intermediate product is presented. A procedure was developed to identify the factors that cause the potential incompatibility of the salts that compose it. The intermediate product was made and the physicochemical, organoleptic and microbiological performance characteristics were evaluated. It was shown that the compatibility of sodium phosphate and calcium chloride is determined by the concentration, temperature, pH and order of the mixture. The product allowed the industrial production of the medium, complying with the ISO 9001: 2015 standard. The base of salts together with the rest of the ingredients in the formulation, achieves the ideal appearance for its commercialization and fulfills the requirements for the maintenance, conservation and transport of clinical samples.

Keywords: culture medium, Cary-Blair; incompatibility, calcium phosphate.

Introducción

La formulación del Medio Transporte de Cary-Blair cuenta con un conjunto de sales y un agente gelificante (agar), que combinado con el pH alcalino de 8,4, le permiten al medio recolectar, transportar y conservar muestras clínicas para el diagnóstico microbiológico de agentes patógenos y bacterias entéricas, garantizando la supervivencia de estos microorganismos, por largos períodos de tiempo, sin que se produzca sobrecrecimiento o deterioro de la célula bacteriana [1-3].

En las etapas de laboratorio y piloto del proceso de desarrollo del producto en el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen), se detectó un precipitado de color blanco, que sedimentaba en el fondo de los tubos que contenían el medio listo para el uso, que se hacía más visible luego de esterilizar el medio por calor húmedo (100 °C por 15 min). Aunque los controles de calidad evidencian que la funcionalidad microbiológica del medio de transporte no se veía afectada, su apariencia no resultaba idónea para su comercialización como producto terminado.

La precipitación se debe a que una vez mezclados e hidratados los ingredientes, la interacción del fosfato de sodio (Na_2HPO_4) con el cloruro de calcio (CaCl_2), forman el fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) el cual es prácticamente insoluble en agua[4,5].

Estudios preliminares, registrados en el informe analítico del Medio de Transporte de Cary-Blair, demostraron que tanto el Na_2HPO_4 como el CaCl_2 , no muestran incompatibilidad con el resto de los ingredientes incluidos en la fórmula.

La formulación experimental del medio, realizada en los laboratorios de Investigaciones de Medios Diagnósticos de BioCen y las de distintas firmas comerciales extranjeras, incluyen el CaCl_2 con los demás ingredientes (OXOID, 2006; CULTIMED, 2009; CONDA, 2011). No pocas empresas productoras de medios de cultivo, excluyen esta sal de sus formulaciones y solo sugieren agregar una solución al 0,09 %, luego de esterilizar el medio (Difco & BBL, 2009; Britania, 2015).

Esta última alternativa no es muy factible para los laboratorios de diagnóstico microbiológico y de investigación epidemiológica, fundamentalmente para aquellos pertenecientes a la red de hospitales en Cuba, no sólo por representar una acción extra de importación de reactivos, sino que implica realizar actividades adicionales a la metodología diagnóstica.

Ante esta disyuntiva, el departamento de Diagnóstico Microbiológico y la Planta de Medios de Cultivo de BioCen, se propusieron desarrollar una metodología para la producción y evaluación de una mezcla basal de sales que constituiría un producto intermedio para la confección del Medio Transporte de Cary-Blair (MTCB), evaluar sus características fisicoquímicas y organolépticas y el rendimiento microbiológico.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de evaluación de las operaciones para el mezclado y deshidratación de la mezcla de sales en dos etapas: la determinación de la solubilidad del Na_2HPO_4 y el CaCl_2 , según la temperatura, pH y orden de la mezcla, y el proceso tecnológico para la confección del producto intermedio y evaluación de los parámetros de calidad antes y después de incluido en el producto final.

Materias primas

Se empleó un conjunto de sales y un agente gelificante que conformaron la formulación experimental del MTCB de BioCen (tabla 1).

Tabla 1
Reactivos que conforman la composición del MTCB

Fórmula	g/L	Firma	Empleo en el proceso
Na_2HPO_4 (fosfato disódico)	1,1	AppliChem ^(a)	Base de sales ^(c)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloruro de calcio)	0,09	Merck ^(a)	Base de sales
$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2\text{S}$ (tioglicolato de sodio)	1,5	Merck ^(a)	Producto final
NaCl (cloruro de sodio)	5,0	Merck ^(a)	Producto final
Agar bacteriológico	5,5	MEX ^(b)	Producto final

a: Alemania; b: México; c: se utiliza solo la mitad del total de g/L referidos en la formulación del producto final.

Material biológico

Para el estudio de estabilidad en el tiempo del medio (evaluación del rendimiento microbiológico) se emplearon cuatro cepas microbianas de referencia de la *American Type Culture Collection (ATCC)*: *Salmonella Typhimurium* 14028, *Salmonella Enteritidis* 13076, *Shigella sonnei* 25931 y *Shigella flexneri* 12028, procedentes del cepario central del BioCen.

Medios de cultivo

Se utilizó el caldo triptona soya (CTS) (BioCen, Cuba) como medio de enriquecimiento para la preparación del inóculo de los microorganismos utilizados en el ensayo, y el agar triptona soya (ATS) (BioCen, Cuba) para la siembra de las suspensiones bacterianas con el objetivo de cuantificar la promoción, mantenimiento o inhibición del crecimiento. Se empleó el MTCB de OXOID (Inglaterra) como control. Los medios fueron preparados según las especificaciones del fabricante.

Determinación de la solubilidad de las sales preparadas de manera independiente

Se prepararon soluciones de ambas sales (Na_2HPO_4 : 8 g/100 mL y CaCl_2 : 100 g/100 mL), según estudios de solubilidad en agua, a partir de los datos disponibles en catálogos y especificaciones de estos reactivos. Se sometieron a distintas temperaturas de trabajo (25 y 70 °C) y se comprobó la velocidad de dilución según el tiempo. Se determinaron las características organolépticas de la solución en cuanto a transparencia del líquido, presencia de precipitado y cristales y desprendimiento o no de calor.

Determinación de la solubilidad de la mezcla de ambas sales según el orden de adición, la temperatura y pH

Se confeccionaron ocho variantes que evaluaron los parámetros definidos como factores que inciden sobre la solubilidad de ambas sales. Tanto el Na_2HPO_4 como CaCl_2 se emplearon según su concentración en la formulación del producto final (1,1 g/L y 0,09 g/L respectivamente) (tabla 2).

Tabla 2
Total de variantes según las variables evaluadas en la mezcla de ambas sales

Variable	Variantes*	Orden de adición	Temperatura	pH
Orden de adición	V1	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{CaCl}_2$	$25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	7± 1
	V2	$\text{CaCl}_2 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$		
Temperatura	V3	$\text{CaCl}_2 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$	$5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	
	V4		$25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	
	V5		$75 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	
pH	V6	$\text{CaCl}_2 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$	$25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	
	V7			6-7
	V8			8-9

*: Se utilizó 1,1 g/L de Na_2HPO_4 y 0,09 g/L de CaCl_2 para la preparación de ambas soluciones de las sales

Se empleó un baño termostatado (ThermoHaake) y un termómetro de 100 °C (B & C), ambos de procedencia alemana, para lograr una temperatura de trabajo controlada.

Para la determinación del pH se utilizó un pH-metro de superficie (MeterLab, Francia).

Método tecnológico utilizado en la investigación

Se determinó la cantidad de ambas sales para producir 9 kg y la concentración final de sólidos disueltos según el volumen de agua empleado. Para la mezcla de las mismas se definió el orden de cada una y la temperatura de trabajo para lograr la homogeneidad de la disolución concentrada de ambas sales. La mezcla se filtró en dos ocasiones y se deshidrató por aspersión en un equipo Niro Atomizer (Dinamarca) con una temperatura del aire a la entrada de la cámara de 120 °C y a la salida de 72 °C. El producto obtenido constituyó el producto intermedio para la confección del MTCB.

Preparación de la solución de fosfato disódico anhidro y cloruro de calcio dihidratado

Se agregó 50 L de agua desionizada en un tanque de acero inoxidable (100 L de capacidad), a una temperatura de 60 °C. Se adicionó, 8,332 Kg de Na_2HPO_4 , se homogeneizó la solución con agitación constante hasta disolución completa de la sal y se dejó disminuir la temperatura hasta 25 ± 2 °C. Se preparó la solución de CaCl_2 , agregando 1,365 Kg en una cubeta de acero inoxidable (10 L de capacidad) que contenía 5 L de agua desionizada a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

Ambas sales se pesaron en balanza técnica (Sartorius, Alemania) y se disolvieron en agua, por separado. Las disoluciones se homogeneizaron con la ayuda de un electro agitador portátil (IKA, Alemania).

Mezcla de las soluciones de ambas sales

Se agregó la solución de CaCl_2 sobre la solución de Na_2HPO_4 contenida en el tanque de acero inoxidable, de manera gradual, bajo agitación constante (a 1000 rpm) con ayuda de un electroagitador (ANTICO OLINDO E CESARE, Italia), durante 20 min a temperatura ambiente. La mezcla se mantuvo en reposo por 1 h.

Filtrado y secado de la mezcla de sales

Se procedió a filtrar dos veces la mezcla de sales por filtración intermitente, en un filtro prensa (SENorion, Alemania) con un grupo de seis placas filtrantes SA-395 y a una presión de 0,5 kgf/cm², en cada proceso. El líquido se recuperó en un contenedor de acero inoxidable de 100 L, se midió el índice de refracción con un refractómetro (Atago, Japón) a temperatura de 25 a 30 °C y se determinó la transparencia de la solución por el método de la observación visual.

La mezcla filtrada se pesó en una balanza técnica (Sartorius, Alemania) y se pasó a la máquina de secado por aspersión (NiroAtomyzer, Dinamarca) con capacidad para 33 kg. Se secó por espacio de 1 h, a una temperatura de entrada de aire en el equipo de 120 °C y de salida de 72 °C. El polvo resultante (producto intermedio) se pesó y se depositó en bolsas de nylon selladas herméticamente.

Cálculo del rendimiento del proceso de secado por aspersión

El rendimiento del proceso (R) de secado se determinó mediante la relación porcentual entre el sólido obtenido al final del proceso de secado por aspersión (peso neto: Pn), y los sólidos aportados por la mezcla de sales a la entrada en el equipo (Peso teórico: Pt), según la Ecuación (1) [6]. El rendimiento se determinó a partir del balance de materiales en función de la composición de sólidos y considerando que en el agua evaporada no se pierde producto.

$$R(\%) = \frac{P_n}{P_t} \times 100 \quad (1)$$

donde:

R: rendimiento del proceso.

Pn: peso neto total de sólidos al inicio del proceso.

Pt: peso teórico total de sólidos al final del proceso.

Evaluación fisicoquímica y organoléptica del producto intermedio

Se realizó la evaluación de las características fisicoquímicas y organolépticas al producto intermedio (Base de sales para MTCB, ESP 1449) de manera paralela, en los laboratorios de investigaciones de Medios de Cultivo y de Control de Calidad de BioCen (tabla 3), cuyo Sistema de Calidad está

certificado por las ISO 9001:2015, por la compañía británica Lloyd's Register Quality Assurance y la Oficina Nacional de Normalización (ONN) de Cuba.

Tabla 3
Características fisicoquímicas y organolépticas evaluadas a la base de sales para medio transporte de Cary-Blair (producto intermedio)

Requisito de calidad	Límite de aceptación
Perdida por desecación, %	≤ 7
Color del polvo	Blanco
Apariencia del polvo	Fino, seco, homogéneo, fluido, sin presencia de grumos o partículas extrañas insolubles
Apariencia de la solución al 0,12 %*	De transparente a ligeramente opalescente Ausencia de precipitado

* Se pesan 0,12 g de la base de medio en 100 mL de agua destilada o desionizada

Determinación de la pérdida por desecación del producto intermedio

Se empleó el método gravimétrico descrito por la Farmacopea de los Estados Unidos[7], depositando el polvo del producto intermedio en pesa filtros de porcelana. El secado de ambos materiales se realizó en una estufa (Heraeus, Alemania) al vacío (Ecuación 2).

$$PD (\%) = 100 - \left[\frac{A-C}{B} \right] \times 100 \quad (2)$$

donde:

PD: pérdida por desecación.

A: pesa filtro con muestra.

B: peso de la muestra.

C: pesa filtro vacío.

Preparación del MTCB experimental

Para el MTCB experimental (BioCen, Cuba) se pesó 0,64 g del producto intermedio, que contiene 0,09 g/L de CaCl_2 y 0,55 g/L de Na_2HPO_4 . Posteriormente, se pesó 0,55 g/L, que corresponde con el Na_2HPO_4 faltante y el total del resto de los ingredientes: 1,5 g/L de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2\text{S}$, 5,0 g/L de NaCl y 5,5 g/L de agar bacteriológico. Se añadió un litro de agua desionizada, se fundió y distribuyeron 4 mL del medio en tubos de cristal con tapa de rosca. Se esterilizó por calor húmedo (100 °C por 15 min), se dejó enfriar y se cerraron bien los tubos para evitar la pérdida de agua.

Evaluación microbiológica del producto intermedio

Preparación del inóculo y método de siembra

El material biológico se inoculó en tubos con CTS y se incubaron en aerobiosis de 18-24 h a 35 ± 2 °C. Se embebieron hisopos estériles en el medio de enriquecimiento y se introdujeron en tubos que contenían 4 mL de MTCB control (OXOID, Inglaterra) y el experimental (BioCen, Cuba). Se incubaron a temperatura ambiente (25 a 30 °C) desde uno hasta 49 días con tres siembras obligatorias (1, 16 y 49 días), se retiraron los hisopos del MTCB y se sembraron por estría de agotamiento del inóculo en la superficie del medio ATS. Las placas se incubaron en aerobiosis por 24 h a 35 ± 2 °C.

Lectura e interpretación de los resultados

Se realizó por el método cualitativo de la inspección visual de las placas de ATS, clasificando el desarrollo de los microorganismos inoculados por su crecimiento abundante, muy bueno, bueno, escaso o ausencia.

Resultados y discusión

Determinación de la solubilidad de las sales empleadas en el producto intermedio

Se observó alta solubilidad en agua del CaCl_2 (100 g/100 mL) y baja disolución de Na_2HPO_4 (8 g/100 mL) a temperatura ambiente (entre 25 y 30 °C). Se evidenció el doble de la solubilidad, y aumento de la velocidad de dilución, al elevar la temperatura (> 70 °C), en todas las variantes de las soluciones de sales. Se determinó que el Na_2HPO_4 demora en disolverse totalmente, en ambas temperaturas de trabajo, en comparación con CaCl_2 . En ambas sales, preparadas de manera independiente, se observó desprendimiento de energía en forma de calor y no se evidenció producción de precipitado al final de la reacción (tabla 1).

Los resultados en esta etapa demuestran las diferencias en la solubilidad de las sales en estudio. Estudios realizados por Barros y colaboradores en el 2009 [8] refieren que el CaCl_2 es una sal totalmente soluble en agua, en comparación con el Na_2HPO_4 .

Tabla 4
Relación de los indicadores con las características físicas de las soluciones de ambas sales de las variantes experimentales

Variante experimental	Indicador		Características físicas
	Temperatura (°C)	Velocidad de dilución (t)	
ST. Amb (CaCl ₂) *	25	1-2 min ^(a)	Solución transparente, AP, DC (delta T <0)
ST. Amb (Na ₂ HPO ₄)**	25	2-3 min ^(b)	Pr: Solución opalescente, PC Fr: transparente, AP, DC (delta T <0)
SAT(CaCl ₂)*	75	≤ 1min ^(c)	Solución transparente, AP, DC (delta T <0)
SAT (Na ₂ HPO ₄)**	75	1-2 min ^(a)	Pr: Solución opalescente, PC, Fr: transparente, AP, DC (delta T <0)

ST. Amb: solución sometida a temperatura ambiente; **SAT:** solución sometida a altas temperaturas; *: concentración de 100 g/100 mL; **: concentración de 8 g/100 mL; a: dilución rápida; b: dilución lenta; c: dilución muy rápida; AP: ausencia de precipitado; DC: desprendimiento de calor; Pr: principio de la reacción; PC: presencia de cristales; Fr: final de la reacción.

Se comprobó que las temperaturas de trabajo no influyen significativamente sobre la solución de CaCl₂, la cual no muestra variabilidad en sus características físicas, aunque se logra obtener la solubilidad en menor tiempo a temperaturas superiores.

En el caso de la solución de Na₂HPO₄ se logra mayor solubilidad a mayor temperatura que la ambiente.

Para el empleo de ambas sales en la elaboración del producto intermedio, que garantizara la producción de 9 kg de MTCB, es necesario disminuir la concentración de Na₂HPO₄. Lo anterior responde a lo que plantean distintos autores, que a mayor concentración de esta sustancia en una mezcla con una solución de CaCl₂, mayor será la formación de Ca₃(PO₄)₂. Esta sal es un compuesto muy poco soluble, con una Kps de $2,83 \times 10^{-30}$ ⁽⁹⁾. Es resultado de la reacción del Na₂HPO₄ y el CaCl₂ en una disolución, que por ser poco soluble en agua, precipita [4].

Determinación de la solubilidad de la mezcla de ambas sales según la temperatura

Se observó menor opalescencia, formación de precipitado, y cristales salinos en la mezcla de las soluciones de CaCl₂ y Na₂HPO₄ sometida a temperaturas entre 3 a 8 °C con respecto a las mezclas de las sales a temperatura ambiente (28 °C) y por encima de los 70 °C. Se evidenció mayor incompatibilidad de las sales a medida que la disolución era sometida a temperaturas superiores.

Resultados similares obtuvo Sinitsyna y colaboradores en el 2005 [10] cuando demostraron que las temperaturas altas disminuyeron la solubilidad del

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, evidenciado en una mayor formación de precipitado. Lo anterior se justifica en que a medida que la temperatura aumenta, se produce una mayor disociación del ión Ca, por lo que se encuentra más disponible para unirse al fosfato, aumentando la velocidad de reacción y produciendo la precipitación del $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [11-14].

Determinación de la solubilidad de la mezcla de ambas sales según pH de la disolución

La mezcla de sales sometida a un pH entre 4 y 5 no reveló opalescencia, precipitado ni formación de cristales salinos. Similares resultados se obtuvieron con la disolución a pH entre 6 y 7, solo que en este caso se evidenció leve opalescencia del sobrenadante. La mezcla sometida a pH alcalino (8-9) mostró marcada incompatibilidad entre ambas soluciones con una evidente opalescencia del sobrenadante y formación de precipitado depositado en forma de sedimento en el fondo del recipiente.

Estos resultados coinciden con lo reportado por diferentes autores que plantean que un pH en 6,5 de la disolución, disminuye la precipitación del $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [15, 16] y que a pH más ácidos (<5) la estabilidad del Ca con las sales inorgánicas de PO_4 es mayor [11], y por tanto se incrementa la solubilidad [9, [17]. Otros investigadores explican que un aumento del pH disminuye la solubilidad del Ca y el P, ya que habría mayor disponibilidad de H_2PO_4 , por lo que aumenta la probabilidad de precipitación con el Ca [10-12, 18, 19].

Determinación de la solubilidad de la mezcla de sales según el orden de adición

Se observó mayor opalescencia y formación de precipitado al añadir la solución de Na_2HPO_4 sobre la solución de CaCl_2 , que realizando la operación inversa. En este otro aspecto, la investigación coincide con la literatura consultada, que refiere no añadir el PO_4 y el Ca de manera secuencial, además de que aconseja realizar la mezcla de ambas sales añadiendo de manera primaria la sal PO_4 , después los otros elementos de la formulación y por último el Ca, siempre agregándolo de manera suave para evitar precipitación local [11, 20].

En el caso del estudio realizado no se añadieron en el producto intermedio, el $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2\text{S}$ y el NaCl, los cuales podrían ser los microelementos claves para

evitar la formación de precipitado, o al menos atenuar en gran medida su aparición en la disolución.

Los resultados en esta etapa de trabajo demostraron que la concentración de ambas sales, la temperatura, el tiempo, el pH y la presencia de otros elementos en la mezcla, son factores que influyen en la solubilidad del Ca en presencia de las sales inorgánicas de PO_4 . Esta conclusión fue clave para la determinación de la metodología a emplear y los indicadores a tener en cuenta en cada paso de los procedimientos utilizados para la confección de la Base de Sales para el MTCB, como producto intermedio. Es importante destacar que existen otras condicionantes durante el proceso de producción, que pueden incidir en la compatibilidad de la mezcla de ambas sales como son las interacciones físico-químicas de los elementos y materias primas que conforman la formulación del medio de cultivo, los materiales empleados y el ambiente donde se realizan los procesos de producción.

Concentración de las sales para el producto intermedio

Se observó un líquido transparente, en las disoluciones sometidas a temperatura de 70 °C, tanto en la solución de Na_2HPO_4 al 17 % (8,3 kg/50 L), como en la de CaCl_2 al 27 % (1,4 kg/5 L). El total de sólidos en la solución fue de 9,7 kg para un volumen total de agua de 55 L, quedando la mezcla a una concentración final aproximada del 18 %.

La baja solubilidad del Na_2HPO_4 , su elevada concentración en el medio de cultivo, la posibilidad de que al mezclarla con el CaCl_2 , produjera mayor precipitado, unido al inconveniente de emplear mayores volúmenes de agua en la mezcla, impuso la necesidad de disminuir a la mitad la concentración de este reactivo en el producto intermedio. La alta solubilidad de la sal de Ca, permitió emplearlo en su totalidad en la base de sales.

Mezcla de sales para el producto intermedio

Se evidenció un líquido opalescente de color blanco y presencia de precipitado, luego de mezclar la solución de CaCl_2 (1,4 kg/5 L) sobre la de Na_2HPO_4 (8,3 kg/50 L). Se observó un aumento considerable de la temperatura del líquido, que de la inicial (60-70 °C) pasó a ser entre 80 y 85 °C. El peso total de la dilución resultó en 64,69 kg.

A pesar que se empleó el orden de mezcla recomendado por la literatura, la secuencialidad de ambas sales, sin que entre ellas mediara algún micro o macro elemento, la imposibilidad de disminuir el pH a menos de cinco, y el encontrarse la disolución a una temperatura superior a la ambiental, favoreció a una mayor interacción de ambas sales y que se detectara la incompatibilidad y la formación de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Esto está en plena correspondencia con estudios realizados por Delgado y Díaz en el año 2005 [21], que plantean que por la naturaleza inorgánica de estas sales, tienden a disociarse con mayor facilidad y solo el mantenimiento del pH y la temperatura en niveles más bajos, unido a evitar el contacto directo de ambos electrolitos a altas concentraciones, evita la formación de precipitado.

Filtrado y secado de las sales para el producto intermedio

La mezcla de sales contó con un peso inicial de 64,69 Kg, donde el proceso de filtrado mostró una solución opalescente, con presencia de partículas minúsculas en suspensión y ausencia de precipitado. El refiltrado de la dilución permitió obtener un líquido totalmente transparente, con una cantidad final del concentrado de 57,0 kg, un índice de refracción de 1,354 y un total de sólidos de 8,5 kg, para una representación aproximada del 15 % en la mezcla. El rendimiento del proceso resultó en un 88 %.

El valor de la concentración total de la mezcla se considera aceptable para el filtrado y secado por aspersion, teniendo en cuenta que Valiente y colaboradores en el 2015 [22], plantean, que lo ideal es que las soluciones posean de 20 a 30 % de sólidos totales disueltos.

Se obtuvo 4,35 kg de producto seco, en el proceso de secado por aspersion, lo que representó un rendimiento real de 51,2 %. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados a pequeña escala de dos lotes de la base de sales realizados en la etapa piloto del MTCB, donde en cada proceso de filtrado y secado por aspersion, se obtuvo la mitad del producto inicial con un rendimiento entre 50 y 52 %.

Aunque se observa una reproducibilidad de los resultados, a diferentes escalas de producción del producto, es necesario determinar si otros elementos en el proceso inciden en el rendimiento. López y colaboradores en el 2009 [23], plantearon que uno de los factores críticos para un mayor provecho en el

proceso de secado, es el adecuado contenido de sólidos totales. Por lo que una alta concentración de sólidos totales, evita una pérdida considerable del soluto e incrementa el rendimiento del producto final. Otro factor que favorece el rendimiento del proceso, es la temperatura de entrada y de salida; por lo que a un aumento de la misma, garantiza que a escalas superiores se obtengan rendimientos mayores [24].

Si tomamos en cuenta lo referido por Edrisi y colaboradores en el año 2016[25], podemos considerar de adecuado el rendimiento en nuestro estudio. Esto se debe a que secadores por aspersion en pequeña escala con rendimientos entre 60 y 80 % pueden dar indicio de rendimientos más altos en posteriores secados a escalas superiores de producción.

Evaluación fisicoquímica y organoléptica de la base de sales

Se obtuvo un polvo de color blanco con una apariencia fina, deshidratada, homogénea, fluida, sin presencia de grumos o partículas extrañas insolubles. La apariencia de la base de sales en una solución al 0,12 % fue transparente, sin presencia de precipitados. La pérdida por desecación se estableció en 0,5 %, encontrándose por debajo del límite de aceptación ($\leq 7,0$ %).

Se obtuvo una apariencia del polvo satisfactoria, lo cual es consecuencia del empleo de la máquina de secado por aspersion. Esta tecnología es un proceso continuo y controlado, con tiempos cortos de secado, que garantiza un polvo fluido y soluble, homogéneo, que preserva sus propiedades fisicoquímicas, y da como resultado una excelente presentación del producto final [26].

Se comprobó la efectividad del proceso tecnológico en eliminar el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ de la mezcla de sales, al observarse una solución transparente, sin presencia de precipitado. La pérdida por desecación mostró resultados satisfactorios, con valores inferiores al 7 %.

Determinar la humedad fue un paso fundamental, debido al efecto que tiene la misma para mantener la calidad del producto, además que influye directamente en el costo de producción [27-29], lo que garantiza una mayor estabilidad durante la conservación y evita la interacción química y la degradación de sus componentes [30].

Evaluación de la funcionalidad microbiológica de la base de sales

La inclusión de la base de sales en el MTCB experimental evidenció, luego de la preparación y esterilización por vapor fluente, un medio semisólido de apariencia homogénea y ausencia de precipitado. No se observó diferencias significativas, en cuanto a características organolépticas y fisicoquímicas, con el medio de referencia empleado como control (MTCB de OXOID, Alemania).

Se observó crecimiento abundante de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. sonnei* y *S. flexneri* en placas de ATS, luego de ser conservadas las cepas en el MTCB de BioCen (Cuba) y el medio control (OXOID, Alemania), por un período de uno, 16 y 49 días a temperatura ambiente.

No se observó deterioro ni pérdida de las características macroscópicas típicas de los microorganismos en ninguna de las siembras realizadas, mostrando las respuestas bioquímicas y serológicas esperadas en las pruebas de identificación presuntiva y confirmatoria. No se observó diferencias cualitativas significativas, en cuanto a número y características culturales de las colonias desarrolladas, de los microorganismos provenientes del MTCB de BioCen (Cuba) y de OXOID (Alemania).

Los resultados en esta etapa evidencian la efectividad de la metodología y de los procedimientos empleados en todo el proceso productivo, para eliminar la sedimentación, originada por el producto de incompatibilidad de la mezcla de sales, sin afectar la funcionalidad microbiológica del producto final.

Conclusiones

- 1. Se definió una metodología para producir una base de sales, como producto intermedio, que eliminó el producto de incompatibilidad ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) que se produce al mezclar las sales CaCl_2 y Na_2HPO_4 presentes en la formulación del Medio Transporte de Cary-Blair.***
- 2. La concentración de ambas sales, el orden de adición, la temperatura de trabajo, el tiempo de mezclado, pH de la mezcla y la presencia de otros elementos constitutivos del producto final, son factores que influyen en la solubilidad del Ca con las sales inorgánicas de HPO_4 .***

- 3. Las interacciones fisicoquímicas de los elementos y materias primas que conforman la formulación del medio de cultivo, los materiales empleados y el ambiente donde se realizan los procesos de producción, inciden en la compatibilidad de la mezcla de ambas sales.**
- 4. El método para el proceso de secado por aspersion de la mezcla de sales resultó reproducible, con valores aceptables en el rendimiento.**
- 5. La Base de Sales para el Medio Transporte de Cary-Blair cumple con los requisitos de calidad establecidos, en cuanto a las características fisicoquímicas y organolépticas evaluadas, y responde a las exigencias de rendimiento microbiológico del producto final.**
- 6. El producto intermedio, una vez incorporado a la formulación final del medio, logra una correcta conservación de los microorganismos objeto de estudio por un período de más de 49 días a temperatura ambiente, sin que estas cepas sufran cambios en sus características fisiológicas y bioquímicas, lográndose un buen desarrollo en los medios de cultivo habituales y una correcta interpretación de los resultados.**

Referencias bibliográficas

1. CARY, S.G.; BLAIR, E.B. New transport medium for shipment of clinical specimens. I. Fecal specimens. *Journal of Bacteriology*. 1964, 88 (1), 96–98. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC277262/>
2. WASFY, M.; *et al.* Comparison of preservation medio for storage of stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995, 33 (8), 2176–2178. ISSN: 0095-1137.
3. KHARE, R.; *et al.* Comparative Evaluation of Two Comercial Multiplex Panels for Detection of Gastrointestinal Pathogens by Use of Clinical Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014, 52 (10), 3667–3673. Disponible en: <http://doi.org/10.1128/JCM.01637-14>

4. DUARTE-CHÁVEZ, J.M. *Síntesis y caracterización de fosfatos de calcio por el método sol-gel*. Tesis de maestría en Ciencias de la computación, Biomateriales. Facultad Politécnica, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay, 2012.
5. CORREA-FERRÁN, D.F. *Preparación y caracterización de cementos de α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ modificados con β - Ca_2SiO_4 y $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$ para restauraciones óseas*. Tesis doctoral en Ciencias Químicas. Facultad de Química, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, 2014.
6. LÓPEZ-HERNÁNDEZ, O. D.; *et al.* Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersión de extracto acuoso de *Calendula officinalis* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2006, 11 (1). ISSN: 1028-4796.
7. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. Reactivos (Vol.1), USP 35 NF30. 35ta Edición. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, 2012.
8. BARROS-SANTOS, C. *Los aditivos en la alimentación de los españoles y la legislación que regula su autorización y uso*. 2da Edición. Madrid: San Benito, 2009. ISBN: 978-84-9886-466-3.
9. CORDERO-ELVIA, J.; ORTEGA-RODÉS, P.; ORTEGA, E. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2008, 10 (1), 111-121. ISSN: 0123-3475.
10. SINITSYNA, O.V; *et al.* Synthesis of hydroxyapatite by hydrolysis of α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. 2005, 54 (1), 79-86. DOI: 10.1007/s11172-005-0220-9.
11. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL (SENPE). *Consenso español sobre preparación de mezclas nutrientes parenterales*. D.L: Zaragoza, 1996.
12. CASELLES-POMARES, M.J; *et al.* *Química aplicada a la ingeniería*. Edición digital. Universidad Nacional de Educación a distancia, 2015. ISBN: 978-84-362-7031-0.

13. GRANADOS-CORREA, F.; *et al.* Síntesis y caracterización de fosfato de calcio y su relación con las propiedades de adsorción del Cr (VI). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2010, 26 (2), 129-134. ISSN 01884999. Disponible en: <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/20451>
14. RODRÍGUEZ-OTÁLORA, Y.A. *Evaluación de la tecnología del secado por aspersion para la obtención de leche en polvo de búfala (Bubalus bubalis)*. Tesis de posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 2017.
15. DAVID, S.; *et al.* *Principles and applications on soil Microbiology*. 2nd Edition. New Jersey: Prentice Hall, 2005. ISBN 13: 9780130941176.
16. BELTRAN-PINEDA, M.E. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 2014, 15 (1), 101-113. ISSN: 0122-8706.
17. STUMM, W.; MORGAN, J.J. *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. 3rd Edition. Wiley-Blackwell, Iowa, 1995. ISBN: 978-0471511854.
18. FERNÁNDEZ, L.A.; *et al.* Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del suelo*. 2005, 23 (1), 31-37. ISSN: 1850-2067.
19. LARA, C.; ESQUIVEL, L.; NEGRETE, J. Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba- Colombia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2011, 9 (2), 114-120. ISSN: 1692-3561.
20. GOMIS-MUÑOZ, P. Preparación de las nutriciones parenterales pediátricas. *Nutrición Hospitalaria*, SENPE. 2017, 34 (3), 44-49. ISSN: 0212-1611.
21. DELGADO-LÓPEZ, N.E.; DÍAZ, J.A. *Fundamentos de nutrición Parenteral*. Ed. Médica Panamericana. Bogotá, D.C: Colombia, 2005. ISBN: 958-9181-92-984-7903-508-0.

22. VALIENTE-CHÁVEZ, Y.; *et al.* Mejoras tecnológicas en la producción del Vitrocen®MS. *Tecnología Química*. 2015, 35 (2), 139-155. ISSN: 2224-6185.
23. LOPEZ, M. B.E.; *et al.* Establecimiento de condiciones de la mezcla de pulpa de banano (*Musa paradisiaca* L.) para someter a secado por aspersion. *Facultad de Química Farmacéutica*. 2009, 16 (3), 287-296. ISSN: 0121-4004.
24. LÓPEZ-HERNÁNDEZ, O.D *et al.* Estudio de secado por aspersion de extractos de *Plectranthus amboinicus*, *Ocimum tenuiflorum*, *Passiflora incarnata*, *Matricaria recutita* y *Melissa officinalis*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas: BLACPMA*. 2010, 9 (3), 216-220. ISSN: 0717-7917.
25. EDRISI-SORMOLI, M.; LANGRISH-TIMOTHY, A.G. Spray drying bioactive orange - peel extracts produced by Soxhlet extraction: Use of WPI, antioxidant activity and moisture sorption isotherms. *Food Science and Technology*. 2016, 72, 1-8. ISSN: 0023-6438. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.033>
26. MONDRAGÓN, R.; JULIA, J.E.; BARBA, A.; JARQUE, J.C. El proceso de secado por atomización: Formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Boletín Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 2013, 52 (4), 159-168. ISSN: 0366-3175; 2173-0431.
27. HARDY, J.; SCHER, J.; BANON S. Water activity and hydration of dairy powders. *Le Lait, Dairy Science and Technology*. 2002, 82 (4), 441–452. Disponible en: <https://doi.org/10.1051/lait:2002022>
28. CORONEL-DELGADO, A.Y. *Efecto de las condiciones de secado por aspersion en la obtención de un colorante natural a partir de extractos líquidos de cúrcuma (Curcuma longa L)*. Tesis de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia, 2015.
29. YANG, J.; HUANG, M.; PENG, J., SHI, J. Rapid determination of the moisture content of milk powder by microwave sensor. *Measurement*.

2016, 87, 83–86. Disponible en:
<http://doi.org/10.1016/j.measurement.2016.03.012>

30. ZHURBENKO, R.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, C. Bases nutritivas para el cultivo de los microorganismos: Parte 2 - Principales indicadores de calidad. *Salud y Ciencia*. 2009, 16 (6), 645-651. ISSN 1667-8982. Disponible en: <https://www.siicsalud.com/dato/sic/166/expertos166.pdf>