

“Estudio microbiológico de un microencapsulado a base de Ilex Guayusa, Vernonanthura patens y Theobroma cacao (cascarilla de cacao)”

Gavin-Quinchuela Karina¹, Maridueña Gabriela ², Manzano Patricia ², Orellana-Manzano Andrea ³

1 Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida (FCV), Campus Gustavo Galindo Km 30.5 vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

Correo: kgavin@espol.edu.ec

2 Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Campus Gustavo Galindo Km 30.5 vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

3 Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Laboratorio para investigación biomédicas, Facultad de Ciencias de la Vida (FCV), Campus Gustavo Galindo km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

Resumen

Introducción: La microencapsulación proporcionar una herramienta para proteger los recursos naturales extractos y compuestos de la acción de bióticos, abióticos y factores biológicos. En este sentido emerge como una metodología confiable no solo para la industria alimentaria, pero también para los campos de la nutrición y salud, donde la estabilidad, eficacia y biodisponibilidad de estos extractos y compuestos son necesarios.

Objetivos: Analizar un microencapsulado a base a base de Ilex Guayusa, Vernonanthura patens y cascarilla de cacao mediante pruebas bromatológicas y microbiológicas para la caracterización de este producto.

Métodos: Se realizaron estudios microbiológicos y bromatológicos de acuerdo a la norma INEN 2381, las muestras fueron secadas y tamizadas para posterior elaboración de la bebida. Para los análisis microbiológicos se extrajo el ADN mediante un kit y posteriormente se analizó mediante secuenciación Sanger. Los análisis bromatológicos realizados fueron humedad, cenizas totales, proteínas, grasas y fibra bajo los protocolos del laboratorio de Bioproductos del CIBE.

Resultados: En el microencapsulado se obtuvo un 95.75% de carbohidrato siendo este porcentaje el mayor en comparación con el resto de macronutrientes. De grasa se obtuvo 1.20% y de proteína se 0.5%. Los parámetros de humedad dieron como resultado 1.75%. Los análisis microbiológicos reportaron que el producto es inocuo por la ausencia de bacterias patógenas como Shigella y salmonella spp y la baja carga de otros microorganismos.

Conclusiones:

El proyecto permitió la determinación de análisis bromatológicos y microbiológicos. De estos primeros análisis se identificó que el contenido de carbohidratos predominan en el producto (>95%), debido a la adicción de maltodextrina a la bebida como agente encapsulante. El producto microencapsulado se considera inocuo debido a que cumplen con las normas establecidas.

Palabras Claves: microencapsulado, nutraceuticos, bebida funcional, análisis bromatológicas, análisis microbiológicos.

Abstract

Introduction: Microencapsulation provide a tool to protect natural resources extracts and compounds from the action of biotic, abiotic and biological factors. In this sense, it emerges as a reliable methodology not only for the food industry, but also for the fields of nutrition and health, where the stability, efficacy and bioavailability of these extracts and compounds are necessary.

Objectives: To analyze a microencapsule based on *Ilex Guayusa*, *Vernonanthura patens* and cocoa husk by means of bromatological and microbiological tests for the characterization of this product.

Methods: Microbiological and bromatological studies were carried out according to the INEN 2381 standard, the samples were dried and sieved for further elaboration of the beverage. For the microbiological analyzes, the DNA was extracted by a kit and subsequently analyzed by Sanger sequencing. The bromatological analyzes performed were humidity, total ash, proteins, fats and fiber under the protocols of the CIBE Bioproductos laboratory.

Results: In the microencapsulation a 95.75% carbohydrate was obtained, this percentage being the highest in comparison with the rest of the macronutrients. Fat obtained 1.20% and protein was 0.5%. Moisture parameters resulted in 1.75%. The microbiological analyzes reported that the product is safe due to the absence of pathogenic bacteria such as *Shigella* and *salmonella* spp and the low load of other microorganisms.

Conclusions: The project allowed the determination of bromatological and microbiological analyzes. From these first analyzes it was identified that the carbohydrate content predominates in the product (>95%), due to the maltodextrin addiction to the beverage as an encapsulating agent. The microencapsulated product is considered safe because they meet the established standards.

Keywords: *microencapsulated, nutraceuticals, functional drink, bromatological analysis, microbiological analysis.*

1. Introducción

Los "alimentos funcionales" surgen como la frontera entre la nutrición y salud, proporcionando un beneficio fisiológico a largo plazo efecto de salud más allá de sus propiedades nutricionales [1].

En los últimos años la investigación científica se ha orientado al estudio, revalorización y aprovechamiento de los recursos naturales autóctonos con propiedades nutraceuticas; por otra parte, se ha incrementado la demanda de alimentos con propiedades preventivas o de control de enfermedades. Dentro de este grupo se encuentra la guayusa *Ilex guayusa*, *vernonanthura patens* plantas que se destacan por sus propiedades estimulantes, energizantes y puede utilizar para limpiar heridas como en erupciones en la piel, aliviar dolor de cabeza ya que es antiinflamatorio [2].

La principal importancia por la tecnología de la encapsulación radica en la protección de compuestos biofuncionales, Las microcápsulas, ayudan a que los materiales alimenticios empleados resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de sus productos [3]. La microencapsulación puede proporcionar una herramienta para proteger los recursos naturales extractos y compuestos de la acción de bióticos, abióticos y factores biológicos. Emerge como una metodología confiable no solo para la industria alimentaria, pero también para los campos de la nutrición y salud, donde la estabilidad, eficacia y biodisponibilidad de estos extractos y compuestos son necesarios [4].

Hay varios factores que afectan los compuestos bioactivos estabilidad en su forma libre sin embargo con Microencapsulación protección de la tecnología de factores tales como luz, humedad, se proporciona calor y oxígeno. Entonces, el organoléptico las características de muchos productos alimenticios pueden enmascararse, pero las características funcionales / biológicas más importantes pueden ser mantenidos después de la ingestión junto con la liberación controlada en un objetivo específico [5], [6].

1.1 Análisis bromatológicos

3 La Bromatología es la disciplina científica que estudia integralmente los alimentos. Permite

conocer su composición cualitativa y cuantitativa; el significado higiénico y toxicológico de las alteraciones y contaminaciones, de qué manera y por qué ocurren y cómo evitarlas; cuál es la tecnología más apropiada para tratarlos y cómo aplicarla; cómo legislar y fiscalizar para proteger los alimentos y al consumidor; qué métodos analíticos aplicar para establecer su composición y determinar su calidad [7].

1.2 Microorganismos en los alimentos

La importancia de los microorganismos en los alimentos es más evidente. La producción de alimentos por técnicas microbiológicas es una actividad de larga historia: los microorganismos alteran los constituyentes de los alimentos de forma que los estabilizan permitiendo su mayor duración y, además, proporcionan compuestos que confieren sabores característicos a los alimentos por ellos producidos. Esta faceta se complementa con la acción de microorganismos alterantes de los alimentos y responsables de su deterioro de forma que se hagan inaceptables por los consumidores [8].

Desde el punto de vista sanitario, los alimentos pueden ser vehículos de infecciones (ingestión de microorganismos patógenos) o de intoxicaciones (ingestión de toxinas producidas por microorganismos) graves. En este sentido se han desarrollado las técnicas de control microbiológico de alimentos. Muchas veces la causa de la contaminación del alimento se debe a medidas higiénicas inadecuadas en la producción, preparación y conservación; lo que facilita la presencia y el desarrollo de microorganismos que producto de su actividad y haciendo uso de las sustancias nutritivas presentes en éste, lo transforman volviéndolo inaceptable para la salud humana [8] [9].

1.3 Principales microorganismos en alimentos

Generalmente, cuando hablamos de calidad de un alimento debemos considerar el aspecto microbiológico que resulta fundamental porque influye en la conservación y la vida útil del producto, pero además, porque los microorganismos pueden ser causantes de enfermedades conocidas como enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) cuyas siglas en inglés es FBI (Foodborne illness). De tal manera que, para garantizar inocuidad del

alimento, se requiere la determinación de criterios para los microorganismos patógenos y/o toxinas y en algunos casos la utilización de microorganismos indicadores (relacionados con la presencia de un patógeno).

Es necesario conocer las normas microbiológicas en materia de alimentos, quienes establecen la calidad microbiológica en términos de ciertos microorganismos que advierten oportunamente de un manejo inadecuado o contaminación que incrementan el riesgo de presencia de patógenos en alimentos [9].

Estos microorganismos indicadores tienen la ventaja de que su detección puede resultar adecuada desde un enfoque de prevención de riesgos, indicando un manejo inadecuado o presencia de contaminación. También, su detección puede resultar más sencilla, rápida y económica, pudiendo brindar información de manera oportuna. Los microorganismos indicadores se pueden dividir en dos grupos:

Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia de proceso que incluyen:

- Mesófilos aerobios (o cuenta total)
- Hongos y levaduras
- Coliformes totales

Indicadores de contaminación fecal

- Coliformes fecales
- *E. coli*
- Enterococos
- *Cl. perfringens*

2. Metodología

El proyecto de investigación tuvo un diseño descriptivo y experimental, el proyecto tuvo duración de 4 meses. Los análisis bromatológicos y microbiológicos fueron realizados en el laboratorio de bioproductos y Fitopatología respectivamente, en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), en la ciudad de Guayaquil.

2.1 Preparación de la bebida funcional

La preparación inicia con la recolección y posterior secado de las hojas de las especies *Ilex Guayusa*, *Vernonanthura patens* en la mufla. Una vez secas se debe moler las hojas usando un molido y se tamiza, para ello se usó los tamices de los siguientes tamaños de malla: 10 (2.000

micras), 35 (500 micras), 60 (250 micras), 120 (125 micras) y 230 (63 micras). El paso siguiente fue pesar en la balanza analítica según el porcentaje ya definido, un 10% de *Theobroma cacao*, 20% *V. patens* y 70% *Ilex Guayusa*,

Se llevó a ebullición 1000 ml de agua y se adiciono adicionar las especies vegetales previamente pesadas. Se dejó reposar por 5 minutos.

Finalmente, se agregó el 10% de maltodextrina del volumen final obtenido posterior al tiempo de reposo la infusión. La elaboración de la bebida se realizó en el laboratorio de control de calidad de la Facultad de Ciencias de la Vida, carrera de Licenciatura en Nutrición.

2.2 Microencapsulación

La microencapsulación se realizó a través del método de secado por aspersión, utilizando el equipo SD-Basic by armfield. Las condiciones del proceso que se manejaron fueron temperatura a 120°C velocidad de aspiración 75 % (30 m³ / h aproximadamente). El equipo utilizado pertenecía al laboratorio de Ingeniería en Alimentos de la Facultad de Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción de la ESPOL. Los extractos obtenidos fueron sometidos a dos tipos de análisis: bromatológico y microbiológico.

2.3 Análisis bromatológicos

Los análisis bromatológicos que se realizaron al microencapsualdo fueron: humedad, cenizas, carbohidratos, proteína, grasas y fibra. Las muestras se analizaron por duplicado y se calculó el promedio para el resultado final. Los protocolos usados para las determinaciones de estas pruebas fueron aquellos que están disponibles en el laboratorio de bioproductos del CIBE.

2.3.1 Determinación de humedad

Para la determinación de humedad se pesó 2g de la muestra y se transfirió a una capsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105°C hasta masa constante, seguidamente se deseco a 105°C durante 3 horas. La capsula se colocó en la desecadora donde se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó, colocando nuevamente en la estufa durante 1 hora y volviendo a pesar, hasta que se obtuvo una masa constante. El protocolo usado fue: CBE-PROT-BP 30

2.3.2 Determinación de cenizas totales

Se pesó así mismo 2g de la porción de ensayo pulverizada en un crisol de porcelana previamente tarada. Se calentó suavemente la muestra a analizar y se aumentó la temperatura hasta carbonizar y posteriormente se incinero en un horno mufla a una temperatura de 700-750°C durante 2 horas. El protocolo usado fue: CBE-PROT-BP 25.

2.3.3 Determinación de proteína

El contenido en proteína de la muestra se calcula teniendo en cuenta el contenido medio en nitrógeno de la proteína en cuestión. La determinación de este macronutriente tiene dos fases: la digestión y destilación. En la primera fase se pesó 2.5g de la muestra en un papel graso, y se transfirió al balón. Así mismo se pesó 1g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 18 g de NaSO_4 anhidro y se añadió al balón. Se midió 30 ml de H_2SO_4 concentrado y se agregó al balón dentro de la Sorbona. En el reverbero del digestor, hasta que se carbonizo la muestra. Posteriormente se dejó en reposo por 1 hora hasta que el balón este frío y se agregon 150ml de agua fría destilada.

Para la segunda fase, de destilación se colocó un tubo Erlenmeyer en el destilador con 50 ml de solución de SO_4H_2 0.1N y 3 gotas del indicador rojo de metilo. Al balón completamente frío se le agrego dos trozos de parafina esto con el fin de moderar la ebullición y evitar la formación de espuma. Se añadió 70 ml de soda Kjeldahl, procurando formar 2 capas de líquido a fin de evitar la reacción violeta y por consiguiente pérdida del amoniaco. Inmediatamente después se agregó 2 granallas de zinc y se insertó en la boca del balón un tapón de caucho. Para asegurar el vacío durante la destilación se colocó un rollpack alrededor del tapón. Se dejó aproximadamente 30 minutos para la destilación.

El destilado obtenido se tituló con NaOH 0.1N, para determinar los ml de H_2SO_4 que no se combinaron. Posteriormente se realizaron los cálculos. El protocolo usado fue: CBE-PROT-BP 28

2.3.4 Determinación de grasa

Se pesó 2.02 g de la muestra y se colocó en papel filtro tarado y se depositó dentro del cartucho de celulosa. El sistema de extracción Soxhlet se armo adicionando 6. Ml de disolvente (éter de petróleo) en el balón.

Se realizó la extracción de la muestra con una velocidad de condensación aproximada de 5 a 6 gotas por segundo durante 4 horas. En la estufa se secó el residuo a una temperatura de 105°C durante 1 hora, posterior a este procedimiento se dejó enfriar en el desecador y se pesó. El protocolo usado fue: CBE-PROT-BP 27

2.3.5 Determinación de fibra

Se pesó 2 g de muestra libre de grasa, como resultado del residuo después del extracto etéreo en la determinación de grasa.

Se transfirió la muestra a los vasos, previamente calentado en la hornilla. Ahí se agregó 200 ml de ácido sulfúrico al 1.25% durante 30 minutos. El residuo se regresó al vaso original. Se retiró de la hornilla y se filtró sobre crisol de Gooch. Se lavó el residuo con agua hirviendo hasta la eliminación del NaOH en el filtrado y se lavó con pequeñas porciones de alcohol. Finalmente el residuo fue llevado a la estufa y se secó a 105°C durante 2 horas. El protocolo usado fue: CBE-PROT-BP 26

2.4 Análisis microbiológicos

2.4.1 Aislamiento de microorganismos en medios de cultivo TSA

El TSA Agar es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes, que incluyen bacterias aerobias y anaerobias. Permite visualizar reacciones hemolíticas que producen muchas especies bacterianas. Tiene por base una fuente proteica (digeridos trópticos, digeridos proteicos de soja) con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales, cloruro sódico y 5% de sangre [10]. Es un medio recomendado para la detección y recuento de una amplia gama de microorganismos. Los microorganismos que se desarrollan en este medio son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Pseudomonas aeruginosa*.

2.4.2 Aislamiento de microorganismos en medios de cultivo PDA

El Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar, PDA, por sus siglas en inglés) es un medio de propósito general para levaduras y mohos que puede ser suplementado con ácidos o antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano. Es recomendado para uso con métodos de conteo en placa para alimentos, productos lácteos 4-6 y pruebas realizadas en

cosméticos. El Agar Papa Dextrosa (PDA) puede ser usado para el cultivo de levaduras y mohos clínicamente significativos [10]. La base (infusión de papa) nutricionalmente rica, estimula la esporulación de los mohos y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos [11].

El Agar Papa Dextrosa está compuesto por Infusión de Papa deshidratada y Dextrosa que fomentan el crecimiento exuberante de los hongos. El agar es adicionado como agente solidificante. Muchos procedimientos estándares usan una cantidad específica de ácido tartárico estéril (10%) para reducir el pH de este medio a $3,5 \pm 0,1$, y así inhibir el crecimiento bacteriano. No recalentar el medio acidificado, el calentamiento en estado ácido hidrolizará el agar [12].

2.4.3 Secuenciación Sanger de ADN

El método de Sanger fue diseñado por Fred Sanger en 1977. También se conoce como método dideoxi o secuenciación por terminación de la cadena. Es un método enzimático que permite determinar la secuencia del molde a medida que se sintetiza su hebra complementaria.

Para realizar la secuenciación se necesitan los siguientes componentes:

- Un ADN de cadena sencilla que actúa como molde
- Un cebador para iniciar la síntesis de ADN
- Los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP)
- La enzima ADN-polimerasa.
- Los cuatro dideoxirribonucleótidos trifosfato (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) que son utilizados por la ADN polimerasa para construir la nueva hebra pero, una vez incorporados, impiden la adición de nuevos nucleótidos.

La secuenciación se lleva a cabo en cuatro tubos. Cada tubo contiene el molde, el cebador, los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), la polimerasa y un dideoxirribonucleótido trifosfato (ddNTP) distinto en cada caso. En cada tubo, cuando la ADN polimerasa incorpora aleatoriamente un ddNTP la reacción se detiene, de manera que se generan fragmentos de distinta longitud, todos ellos con el mismo ddNTP terminal. Los diversos fragmentos se separan en

función de su tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, una técnica que permite separar fragmentos de ADN cuya longitud difiere en un sólo nucleótido. A partir del gel se puede reconstruir la secuencia que se ha sintetizado, que es complementaria a la secuencia del molde. Mediante esta tecnología, se puede determinar la secuencia de moléculas de ADN de hasta 800 nucleótidos de longitud [13],[14].

3. Resultados

3.1 Análisis bromatológicos

Tabla 3.1 Resultados de los análisis microbiológicos

Ensayos realizados	Unidad	Resultados
Humedad	%	1.75
Cenizas	%	0.80
Carbohidratos totales	%	95.75
Proteína	%	0.5
Grasas	%	1.20
Fibra	%	NC*

*NC: no contiene fibra

En la tabla 3.1 se observan los resultados de los análisis realizados al microencapsulado. El porcentaje de humedad que contiene el microencapsulado es de 1.75%, lo cual nos indica que el producto cumple con los requisitos físico-químicos para té de la NTE INEN 2381, el cual establece que el valor de humedad no podrá ser superior al 6%. En relación a las cenizas totales se obtuvo que el producto tiene un porcentaje de 0.80%

Los carbohidratos se encuentran en mayor porcentaje siendo este valor 95.75%. Esto debido a que a la bebida funcional se le adiciona el 10% de maltodextrina, que es un hidrato de carbono proveniente del almidón y por esta razón eleva el contenido de carbohidratos totales del microencapsulado.

Por otro lado, los otros dos macronutrientes como la proteínas y grasa se encuentran presentes pero en porcentajes bajos, siendo estos 0.5% y 1.20%. Si bien es cierto las especies vegetales analizadas a nivel individual

reportaron que tienen un promedio de 13.77% de proteína, sin embargo se debe considerar que al ser sometidas al calor, las proteínas son desnaturalizadas y por esta razón hay una disminución de este nutriente.

En lo que respecta al contenido de fibra el producto no contiene.

3.2 Análisis microbiológicos

Tabla 3.1 Resultados de los análisis microbiológicos

Ensayos realizados	Unidad	Resultados
Hongos y levaduras	UFC/g	1.0X 10 ³
Coliformes totales	NMP/mL	< 3
<i>E. coli</i>	UFC/g	< 3
<i>Salmonella</i> spp	Presencia/ ausencia	Ausencia

Los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos del microencapsulado fueron comparados según los requerimientos de la norma Ecuatoriana NTE INEN 2381 para té soluble instantáneo, ya que este té pasa por un proceso de liofilización o secado y es un proceso que se asemeja al secado por aspersión para la obtención del microencapsulado. Cabe mencionar que las normas INEN si tienen requerimientos para alimentos funcionales, la norma es la NTE 2587:2011. Sin embargo, los requerimientos establecidos son los mínimos y estos no incluyen requerimientos bromatológicos, ni microbiológicos.

En la tabla 3.2 se observa que el resultado de la cantidad de hongos y levaduras es de 1.0X 10³ UFC/g, este valor es menor al valor permitido según la Noma 2381. El contenido mínimo de la bacteria *E. coli* deber ser <3, y efectivamente el producto cumple con este requisito. Finalmente, y pese a que en la norma no está como exigencia la determinación de la bacteria *Salmonella* spp, se la analizó con el fin de asegurar que el producto está libre de agentes patógenos que afecten la salud del consumidor. Como resultado se obtuvo que la bacteria no está presente en el

producto microencapsulado por lo que se puede asegurar la inocuidad alimentaria del producto final.

4. Conclusiones

El proyecto permitió la determinación de análisis bromatológicos así como microbiológicos. De estos primeros análisis se identificó que el contenido de carbohidratos predominan en el producto (>95%), debido a la adicción de maltodextrina a la bebida como agente encapsulante.

En relación a la carga microbiana del microencapsulado se identificó que el producto es seguro para los consumidores ya que los límites permitidos son menores a los exigidos por la norma ecuatoriana INEN 2381 y además se identificó la ausencia de la bacterias patógena *Salmonella* spp.

5. Referencias

- [1] M. N. Vella, L. M. Stratton, J. Sheeshka, y A. M. Duncan, «Functional food awareness and perceptions in relation to information sources in older adults», pp. 1-12, 2014.
- [2] P. Manzano, T. Orellana León, M. Miranda Martínez, J. Abreu Payrol, O. Ruíz, y E. L. Peralta García, «Revista cubana de plantas medicinales.», *Rev. Cuba. Plantas Med.*, vol. 18, n.º 1, pp. 131-139, 2013.
- [3] G. Arrazola y I. Herazo, «Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L .) mediante Secado por Aspersión y Evaluación de la Estabilidad de su Color y Capacidad Antioxidante Anthocyanins Microencapsulation of Eggplant (*Solanum melongena* L .) and Evaluation of Color Stability and Antioxidant Capacity», vol. 25, n.º 3, pp. 31-42, 2014.
- [4] M. I. Dias, I. C. F. R. Ferreira, y M. F. Barreiro, «Microencapsulation of bioactives for food applications», *Food Funct.*, pp. 1035-1052, 2015.
- [5] D. López, «Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión Microencapsulation of oily

- substances by aspersion drying», *Rev. Cuba. Farm.*, vol. 44, n.º 3, pp. 381-389, 2010.
- [6] Q. Ye, N. Georges, y C. Selomulya, «SC», *Trends Food Sci. Technol.*, 2018.
 - [7] Godinez Ma Guadalupe, «MANUAL DE PRÁCTICAS DE BROMATOLOGIA», *Univ. autónoma aguas calientes*, 2009.
 - [8] FAO, *manuales para el control de calidad de los alimentos* 12. 1992.
 - [9] F. A. Rugama y Y. Castillo, «Microbiología de los alimentos», p. 63, 2010.
 - [10] L. Britania, «Trypteína Soya Agar», pp. 1-2, 2015.
 - [11] Murray, P.R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (eds.). 1995. *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 - [12] Mac Faddin, J. F. 1985. *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*, vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
 - [13] Sanger, F. G. A. R. (1976). A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase, 441-448.
 - [14] L. Chen *et al.*, «Rapid Sanger Sequencing of the 16S rRNA Gene for Identification of Some Common Pathogens», vol. 9, n.º 2, pp. 1-10, 2014.