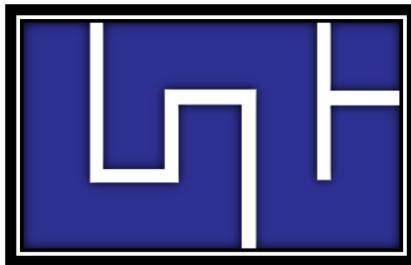


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Evaluación de la eficiencia de películas bioactivas como inhibidoras de la actividad microbiana usando la técnica Kirby-Bauer y su biodegradación por envejecimiento.

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

Br. José Félix Rodríguez Romero.

PARA OPTAR AL TITULO DE:

INGENIERO QUIMICO

TUTOR

MPA. Ing. Helia Taleno.

Managua, Nicaragua, 2020

Agradecimientos.

A Dios por haberme permitido culminar esta etapa de mi vida con gran satisfacción y salud.

A mi familia y amigos que estuvieron muy al pendiente de todo este proceso y que de cierta forma aportaron en la elaboración y culminación de mi investigación de tesis.

A mi tutora MPA.Helia Taleno por aportar dedicada mente a la elaboración y culminación de la investigación.

A mi asesor el Lic. Alejandro Hernández y el Ing. Cristhian Sánchez por haber aportado en gran manera en la parte técnica experimental de la investigación.

Dedicatoria.

A mis padres José Félix Rodríguez Hernández y Juanita Iris Romero Castillo, por haberme dado siempre su apoyo incondicional, por forjarme en la persona que soy; e inculcarme siempre el valor del estudio, muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este.

A mis educadores que dedicaron fuerzas y tiempo para ayudar a formarme en el profesional que hoy en día soy, este nuevo logro es en gran parte gracias a todos ustedes, quisiera dedicarles mi tesis, personas de bien, luchadoras y dignas de admiración. Muchas gracias a ustedes seres queridos que siempre llevare presente.

José Félix Rodríguez Romero

Resumen

En este trabajo los objetivos fueron; determinar la formulación óptima de una película con actividad inhibitoria frente a un microorganismo, evaluar la eficiencia de películas bioactivas tratadas con suero láctico y definir el tiempo de biodegradación del material determinado como óptimo.

El trabajo se desarrolló en las etapas siguientes; formulación y elaboración de las películas bioactivas, aplicación de la técnica Kirby-Bauer al material definido como óptimo y para finalizar una prueba de envejecimiento simulando el proceso natural de biodegradación a la intemperie de la película bioactiva óptima e inhibitoria.

Para llevar a cabo la primera etapa, se empleó el diseño experimental 2^k definiendo como factores: cantidad de almidón de yuca, cantidad de glicerina, y cantidad de suero láctico simple sin fermentar y como variables respuesta dureza y flexibilidad, los componentes restantes: ácido acético, agua y benzoato de sodio fueron incorporados en cantidades constantes en las formulaciones. De acuerdo con los mejores resultados de dureza y flexibilidad se seleccionó una formula base para ser empleada en las siguientes etapas.

En la segunda etapa, se realizó una fermentación controlada de tres sustratos de suero láctico a temperatura ambiente durante 48 horas midiendo pH y grados Brix en el tiempo, señalando tres tipos de sustratos: A1 (suero con inóculo de 3% en peso de leche agria), A2 (suero enriquecido con 3% en peso de melaza), y A3 (suero láctico simple), considerando la fórmula base de la primera etapa, se elaboraron películas con los sueros en estudio de las que se obtuvieron discos de 6mm de diámetro identificándolos como DA1, DA2 y DA3. La aplicación de la técnica Kirby-Bauer consistió en colocar estos discos sobre un cultivo de E.coli a una concentración 0,5 en escala de Mac-Farland, en un medio de agar nutritivo incubando por 18 a 24 horas a 34°C.

En la tercera etapa se realizó una prueba de envejecimiento para conocer el comportamiento y tiempo de biodegradación de la película que generó mayor halo de inhibición en milímetros y una buena secuencia de biodegradación, perdiendo un 23.27 % de peso inicial en un mes de prueba y notándose degradación visible en su estructura.

Índice de contenido.

Contenido	Página
Agradecimientos.....	i
Dedicatoria.....	ii
Resumen.....	iii
Lista de tablas.....	vi
Lista de figuras.....	vii
I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	2
2.1 Objetivo general.....	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
III. Marco teórico.....	3
3.1 Generalidades Materiales.....	3
3.2 Diseño experimental.....	9
3.3 Técnica de Kirby-Bauer.....	11
3.4 Generalidades de las bacterias.....	15
3.5 Pruebas bioquímicas para la clasificación de cepas puras de microorganismos.....	20
3.6 Evaluación de Biodegradación.....	23
3.6.1 Determinación de biodegradación por composteo.....	24
IV. Material y método.....	25
4.1 Materiales.....	25
4.2 Parte Experimental.....	27
4.3. Determinación de la dureza y flexibilidad de la película.....	31
4.4 Determinación de la eficiencia inhibitoria por la técnica kirby-bauer.....	32
4.5. Determinación del tiempo de biodegradación de las películas bioactivas.....	36
V. Análisis y Discusión de Resultados.....	38
5.1 Formulaciones de las películas bioactivas elaboradas a distintas concentraciones de almidón, suero y glicerina.....	38
5.2 Resultados de mediciones de dureza a las distintas formulaciones.....	40
5.3 Resultados de mediciones de flexibilidad a las distintas formulaciones.....	43
5.4 Resultados de actividad inhibitoria de las películas bioactivas por la técnica Kirby-Bauer.....	47
5.5 Determinación del tiempo de biodegradación por envejecimiento.....	51
V. Conclusiones.....	54
VII. Recomendaciones.....	55
VIII. Nomenclatura.....	56

IX. Referencias.58
X. Anexos.....61

Lista de tablas.

N°	Contenido	Página
Tabla 3.1	Sensibilidad de las cepas de control zona de inhibición en mm.....	13
Tabla 3.2.	Antibiograma de disco interpretación de resultados.....	14
Tabla 3.3	Normas para la determinación de biodegradabilidad de plásticos.	23
Tabla 4.1	Materiales de laboratorio y cristalería.	25
Tabla 4.2	Equipos de laboratorio.	26
Tabla 4.3	Reactivos.	26
Tabla 4.4	Matriz de experimentos del diseño experimental.	27
Tabla 4.5	Valores estándares pruebas de dureza y flexibilidad polímeros blandos.	32
Tabla 5.1	Composición %P/P de las películas bioactivas.	38
Tabla 5.2	Valores de dureza en las distintas formulaciones.	40
Tabla 5.3	Datos de Dureza respecto a la combinación de tratamientos y el diseño experimental....	40
Tabla 5.4	valores de estiramiento para pruebas de flexibilidad.	43
Tabla 5.5	Datos de Flexibilidad respecto a la combinación de tratamientos y el diseño experimental.	44
Tabla 5.6	Resultados grados brix y pH del suero Láctico.	47
Tabla 5.7	Resultados grados Brix y pH del suero Láctico.....	47
Tabla 5.8	Halos de Inhibición obtenidos con diferentes tipos de discos.	49
Tabla 5.9	pH final en películas bioactivas incorporadas con suero fermentado.....	49
Tabla 5.10	Control de pérdida de peso en películas bioactivas.	51
Tabla 10.1	Usos comunes del suero láctico.....	61
Tabla 10.2	Composición general del suero láctico y distribución proteica.	62

Lista de figuras.

N°	Contenido	Página
Figura 4.1	Tamizado del almidón.....	28
Figura 4.2	Filtración de suero láctico.	28
Figura 4.3	Placa Petri como molde.....	28
Figura 4.4	Películas bioactivas secas moldeadas en papel aluminio.....	29
Figura 4.5	Secado de películas bioactivas.....	29
Figura 4.6	Diagrama de bloque elaboración de la película bioactiva.	30
Figura 4.7	Uso del durómetro Shore D para medidas de dureza.....	31
Figura 4.8	Pruebas de flexibilidad en películas bioactivas.	31
Figura 4.9	Lectura colonias de 2-3 mm en medio EMB.	33
Figura 4.10	Dilución a escala 0,5 de McFarland.	33
Figura 4.11	Prueba Tinción Gram, negativa para E.coli.	33
Figura 4.12	Morfología en forma de bacilos para microorganismos E.coli.....	34
Figura 4.13	Prueba catalasa para cepa E.coli.	34
Figura 4.14	Prueba oxidasa para cepa E.coli.	34
Figura 4.15	Siembra de la dilución en medio agar nutritivo.	35
Figura 4.16	Control de peso película bioactiva.	36
Figura 4.17	Análisis de imagen mediante microscopio óptico.....	36
Figura 4.18	Película bioactiva antes de ser expuesta a la intemperie.	37
Figura 4.19	película bioactiva después de prueba de envejecimiento.	37
Figura 5.1	Diagrama de Pareto efectos de Dureza.....	42
Figura 5.2	Diagrama de Pareto ajustado para Dureza.....	42
Figura 5.3	Grafica de efectos para Dureza.	43
Figura 5.4	Diagrama de Pareto para el factor Flexibilidad.	45
Figura 5.5	Diagrama de Pareto ajustado para Flexibilidad.	46
Figura 5.6	Grafica de efectos para el factor Flexibilidad.	46
Figura 5.7	Halos de inhibición, discos con suero A1 ambas corridas.	48
Figura 5.8	Halo de inhibición, disco con suero A2, primera corrida.	48
Figura 5.9	Halo de inhibición, disco con suero A3, primera corrida	49
Figura 5.10	acondicionamiento de agua destilada.....	50
Figura 5.11	Dilución de películas en agua destilada pH neutro.	50
Figura 5.12	Películas bioactivas a la intemperie.	51
Figura 5.13	Control de peso en película PE. 1.....	53

Figura 5.14 Control peso en película PE.2.....53

Figura 10.1 Clasificación de las bacterias por su forma.....63

Figura 10. 2 Uso de papel aluminio como molde.63

Figura 10.3 Moldeado en papel aluminio.64

Figura 10.4 Control de pH suero A1.65

Figura 10. 5 Control grados Brix suero A1.....65

Figura 10.6 Control pH suero A2.66

Figura 10.7 Control grados Brix suero A2.66

Figura 10.8 Control de pH suero A3.67

Figura 10.9 Control grados Brix suero A3.....67

Figura 10.10 Selección de un horador con 6 mm de longitud.68

I. Introducción.

La inocuidad de los alimentos en las grandes industrias ha sido tema de estudio y preocupación por años, por lo tanto hasta la fecha se han implementado diversos estándares y normas antes, durante y después del proceso de elaboración, que se deben cumplir para garantizar inocuidad en los productos terminados. Hoy en día aún se buscan novedosos métodos que van más allá de la esterilización, pasteurización o cocción de los alimentos, todos con el fin de hacer más larga su vida útil.

Pero cuál es la causa de la degradación de los alimentos, hay muchas razones, una de las principales es la presencia de microorganismos vivos. Los patógenos que se encuentran en los alimentos comúnmente son adquiridos debido a malas prácticas de manufactura.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la carga de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), provocadas por microorganismos y / o productos químicos es considerable, una de cada diez personas puede resultar afectada, uno de cada tres es un niño y ha causado alrededor de 420,000 muertes. (WHO, 2015).

Existen estudios experimentales enfocados en la solución de este problema por medio de la creación o innovación de películas orgánicas a base de almidones de: maíz (Garcia, 2015), malanga (Rosangeles, 2016), yuca (Gladys, 2006) con componentes orgánicos como: quitosano, maltodextrinas (Lopez, 2016), alginato o incorporadas con antibióticos naturales a partir de aceites esenciales de apio u orégano, (Calle & Ximena, 2013) en ciertos estudios se han utilizado ácidos de tipo cítricos y acético, además de otras fuentes que reportan estudios experimentales con antibióticos producidos a partir de microorganismos lácticos como la nisina. (Chattererjee, 2011).

Otros estudios actuales se enfocan en mejorar polímeros sintéticos existentes como el EVOH (Etilen-Vinil-Alcohol) adicionando enzimas de remolacha confiriendo al envase mayores propiedades de conservación sin afectar sus propiedades térmicas y mecánicas. (Biotech, 2020).

En este trabajo se evaluó la eficiencia de películas bioactivas elaboradas a partir de sueros lácticos fermentados como inhibidoras microbianas usando la técnica kirby-bauer y su biodegradación por envejecimiento.

II. Objetivos.

2.1 Objetivo general.

Evaluar la eficiencia de películas bioactivas elaboradas a partir de sueros lácticos fermentados como inhibidoras microbianas usando la técnica kirby-bauer y su biodegradación por envejecimiento.

2.2 Objetivos específicos.

- Determinar la formulación base de las películas bioactivas elaboradas a distintas concentraciones de suero, almidón y glicerina, midiendo la dureza y flexibilidad de estas.
- Determinar actividad inhibitoria en la película bioactiva base obtenida mediante la técnica Kirby-Bauer.
- Definir el tiempo de biodegradación de la película bioactiva inhibitoria por prueba de envejecimiento.

III. Marco teórico.

3.1 Generalidades Materiales.

Los bioplásticos son fabricados a partir de recursos renovables de origen natural, como el almidón o la celulosa (caña de azúcar, maíz, yuca, remolacha, papa). Para crear un bioplástico, se buscan estructuras químicas que permitan la degradación del material por microorganismos, como hongos y bacterias, a diferencia del polipropileno y poliestireno expandido, cuya producción se basa de los derivados del petróleo (recurso que es no renovable). No obstante, hay que precisar que los plásticos biodegradables pueden proceder del petróleo y no deben confundirse con los bioplásticos.

Los empaques biodegradables son generalmente producidos a partir de materiales poliméricos naturales, abundantes y renovables tales como: proteínas, polisacáridos, lípidos o la combinación de estos. Este material debe ser completamente biodegradable en un periodo de tiempo corto, contribuyendo así a la protección del medio ambiente. Además, tienen un gran potencial para evitar el deterioro de muchos productos alimenticios, protegiéndoles y extendiendo su vida de anaquel. (Calle & Ximena, 2013).

Los plásticos biodegradables procedentes del petróleo tienen aditivos que mejoran su capacidad de degradación, pero no satisfacen las normas internacionales de biodegradabilidad: DIN V 54900, EN 13432, ISO 14855, por citar algunas, mientras que los bioplásticos si lo hacen. Los productos desechables bioplásticos se degradan en un periodo menor a un año, donde el residuo final del proceso es la generación de CO₂, agua y biomasa. Al contrario de los productos desechables plásticos y de poliestireno expandido (durapax) que pueden tomar hasta 1,200 años en degradarse, generando una contaminación acumulativa al ecosistema. (Garcia, 2015)

Los bioplásticos se pueden degradar por acción biológica, química, foto degradación, o una combinación de algunas de ellas. La degradación final de todos los materiales plásticos degradables, sea que inicialmente se degraden química por luz, será la acción de microorganismos. Los bioplásticos son biodegradables, desintegrantes y carecen por completo de ecotoxicidad, también pueden ser incinerados, porque el CO₂ producido por la incineración es equivalente al que anteriormente fue absorbido por las plantas utilizadas para su fabricación durante su crecimiento.

Los nuevos materiales cumplen con la norma europea EN 13432 (Embalaje – Requerimientos para embalaje y envases recuperables a través del compostaje y biodegradación). Esquema de pruebas que verifica el control de los componentes y verifica la ausencia de metales pesados. El umbral de biodegradabilidad exigido por la norma es del 90% y un máximo de seis meses. La biodegradación de los bioplásticos empieza con un proceso llamado hidrolisis donde hay una ruptura de las cadenas poliméricas.

Siendo esta la etapa que mayor tiempo conlleva para los desechables plásticos y de poliestireno expandido, en los que llega a ser de cientos de años. Seguidamente se establece una destrucción de los enlaces como efecto de la luz, el estrés mecánico, la presencia de oxígeno, temperaturas mayores a 60°C, y la acción de bacterias aerobias. (Gladys, 2006).

Un envase activo es un sistema en el que el producto, el envase y el medio ambiente interactúan de una manera positiva para extender el periodo de conservación de la seguridad microbiana o propiedades sensoriales, al igual que el almacenamiento de la calidad de productos alimenticios. Los polímeros son los materiales usados para empaques activos debido a sus propiedades intrínsecas que constituyen un soporte ideal para los principios activos.

El aprovechar los recursos renovables como fuente de conservación y reciclaje los convierte en una excelente opción de innovación como nuevos productos biodegradables. Su total biodegradación en CO₂, agua y posteriormente en abono orgánico es una gran ventaja frente a los plásticos sintéticos, causando menor impacto en el medio ambiente. En el proceso de biodegradación intervienen agentes biológicos como: enzimas, bacterias y microorganismos. (Calle & Ximena, 2013).

Se define la biodegradación como la capacidad metabólica de los microorganismos para transformar o mineralizar contaminantes orgánicos en compuestos menos peligrosos, que puedan integrar en los ciclos biogeoquímicos naturales. Sin embargo, en la biodegradación natural de los contaminantes se debe dar una serie de factores y condiciones vitales para el crecimiento de la bacteria, como son la humedad, los nutrientes, el oxígeno, el pH o la temperatura.

Así mismo en este proceso influye la composición, concentración y disponibilidad de los contaminantes, o las características físicas y químicas del lugar contaminado. (Garcia, 2015)

Una película o film bioactiva es un tipo de bioplástico, definida como un recubrimiento o capa protectora para empaque de ciertos productos o alimentos, este film o película puede ser bioactiva debido a los componentes en su fórmula.

En la formulación de bioplásticos se emplean diversos materiales. A continuación, se describen las características fisicoquímicas de materias primas utilizadas para la elaboración de películas.

Se pueden distinguir dos tipos de ordenamiento en el almidón termoplástico después de su procesamiento: la cristalinidad residual clasificada en las formas tipo A, B y C causadas por la fusión incompleta durante la plastificación y la cristalinidad inducida durante el procesamiento, de acuerdo a los arreglos generados en las cadenas poliméricas, el tipo A es común en almidones de cereales, el B en tubérculos y el C en ciertas raíces y semillas. La cantidad de cristalinidad residual está relacionada con la temperatura y el esfuerzo de corte aplicado durante el procesamiento; de igual manera la composición de la mezcla de alimentación también influye indirectamente en esta cantidad de cristalinidad remanente. (Vicente, 2010).

El almidón de yuca es considerado como uno de los principales materiales biodegradables comestibles con mayor aplicación, debido a su abundancia, bajo costo, fácil manipulación, procesamiento y por su contenido de amilosa. El almidón posee propiedades termoplásticas hidrofílicas, por lo que pueden ser un sustituto de plásticos tradicionales.

Los gránulos de almidón están compuestos por capas externas de amilopectina y capas internas de amilosa. Es un polisacárido formado por unidades glucosídicas, es decir, es una macromolécula formada por gran cantidad de moléculas de glucosa que se repiten.

El uso solo de almidón en la formulación de bioplásticos, produce materiales quebradizos y muy sensibles al agua, con propiedades mecánicas pobres. Por lo que es muy importante combinar con otros materiales poliméricos que mejoren sus propiedades mecánicas, resistencia al agua le otorguen mayor flexibilidad y resistencia al rompimiento. Cabe recalcar que los materiales utilizados en la combinación del almidón deben tener buena biodegradabilidad y ser hidrófobos o apolares. (Calle & Ximena, 2013).

Para convertir un almidón seco en un material bioplástico es necesario romper y fundir la estructura granular semicristalina del mismo. El almidón sin los aditivos adecuados (plastificantes) no tiene las propiedades necesarias para trabajar como termoplástico, los plastificantes incrementan la flexibilidad del almidón debido a su habilidad para reducir la interacción de los enlaces de hidrógeno, además de aumentar el espacio molecular.

Los plastificantes son pequeñas moléculas agregadas para suavizar un polímero por debajo de su transición vítrea para reducir su cristalinidad o punto de fusión (Valarezo, Altamirano Calle 13 M 2012). Los plastificantes comunes utilizados en la producción de películas de almidón son: agua, glicerol, Sorbitol, y otros compuestos de bajo peso molecular. El glicerol y el sorbitol son ampliamente utilizados como plastificantes, debido a su estabilidad y comestibilidad. (Calle & Ximena, 2013).

La Glicerina ($C_3H_8O_3$) es utilizada por ser un plastificante que ayuda en la lubricación. Su presencia es fundamental para que el biopolímero tenga la elasticidad necesaria, lo cual hace que se adapte fácilmente a los moldes. Los gliceroles son agentes suavizantes para los almidones, mejorando la flexibilidad de las películas resultantes. El glicerol se adiciona en bajas concentraciones, las cuales son suficientes para modificar significativamente las propiedades mecánicas de las películas. Esta sustancia brinda al producto final características elásticas, permitiendo su maleabilidad, incrementando su permeabilidad al vapor.

Esto se debe a la naturaleza hidrofílica del glicerol, el cual fácilmente forma puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. El calentamiento de la mezcla se hace con el fin de gelatinizar el almidón, fundir otras sustancias y evitar la formación de burbujas que pueden afectar la calidad final de la película luego al secado. (Calle & Ximena, 2013)

El agua destilada es recomendada como el mejor diluyente, aunque no debe encontrarse en proporciones muy altas con relación al almidón, debido a que en el proceso de polimerización es necesario elevar la temperatura de la mezcla hasta la temperatura de ebullición del agua, lo que puede degradar la estructura del almidón.

El ácido acético (CH_3COOH), también llamado ácido metilcarboxílico o ácido etanoico, se usa para disminuir la absorción de agua, que se encuentra en la mezcla. El ácido acético es recomendado como modificador químico, ya que tiene la propiedad de disminuir el carácter hidrofílico de almidón, brindándole propiedades hidrofóbicas al material mejorando así sus propiedades mecánicas. (Bejarano, 2018).

El benzoato sódico ($C_7H_5NaO_2$), es un aditivo conservante antimicrobiano. Se produce por neutralización de ácido benzoico con bicarbonato sódico, carbonato de sodio o hidróxido de sodio. Es apto para alimentos, zumos de frutas y refrescos, sobre todo los que tienen un rango de pH ácido.

El benzoato de sodio ha sido incluido en la lista de la Administración de drogas y alimentos de USA (FDA) de sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS). Además el comité de expertos de la comisión europea, establece una cantidad diaria admisible (IDA) de 0-5 mg/kg de peso corporal para el ácido benzoico y de sus sales. (Blog.nutrienda, 2020)

El suero láctico es un subproducto de la industria láctea que contiene metabolitos o nutrientes como lactosa, proteína de excelente calidad y sales minerales. El suero ha sido tradicionalmente tratado como desperdicio. Por lo tanto, es de interés utilizar este subproducto como sustrato de fermentación para la obtención de productos de valor agregado. (Chatterjee, 2011).

El lacto suero o suero láctico se define como un producto lácteo obtenido de la separación del coágulo de la leche, de la crema o de la leche semidescremada durante la fabricación del queso, mediante la acción ácida o de enzimas del tipo del cuajo (renina, enzima digestiva de los rumiantes) que rompen el sistema coloidal de la leche en dos fracciones:

1). Una fracción sólida, compuesta principalmente por proteínas insolubles y lípidos, las cuales en su proceso de precipitación arrastran y atrapan minoritariamente algunos de los constituyentes hidrosolubles.

2) Una fracción líquida, correspondiente al lacto suero en cuyo interior se encuentran suspendidos todos los otros componentes nutricionales que no fueron integrados a la coagulación de la caseína.

De esta forma, se encuentran en el lacto suero partículas suspendidas solubles y no solubles (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales), y compuestos de importancia biológica-funcional.

El suero en consecuencia, no constituye un sustituto integral de la leche de vaca por ser una fracción de la misma, pero contiene nutrientes y compuestos con potenciales beneficios nutricionales y de salud que se aprovechan en algunos países para la fabricación de productos alimenticios y suplementos, o como materia prima para la producción de otros ingredientes, y compuestos. Tabla 10.1 Anexo.

La producción mundial anual de lacto suero en el año 2011 se estimó en más de 145 millones de toneladas, siendo los principales productores Estados Unidos y la Unión Europea (primordialmente Alemania, Francia, e Italia) con aproximadamente el 70% de la producción mundial. Este aumento en la producción parece estar asociado al incremento en la producción de queso y productos lácteos per se y a los avances científicos y tecnológicos para la recuperación de los subproductos del suero.

Sin embargo, a pesar del valor nutricional potencial del suero y al aumento en su aprovechamiento para la producción de otros alimentos, aún gran parte es descartado, causando problemas de contaminación en ríos y suelos. La eliminación del suero se debe entre otros aspectos, al desconocimiento de algunos productores sobre las bondades nutricionales de este subproducto y a la dificultad para acceder a las tecnologías apropiadas para su manejo y procesamiento; también, a limitaciones en la regulación alimentaria que permitan la apropiada utilización como ingrediente alimenticio. (SciELO, 2012)

La composición nutricional del lacto suero puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y del proceso de tecnología empleado en la elaboración del queso. A partir de estas diferencias se encuentran dos tipos fundamentales de lacto suero:

1) Suero dulce, cuando se produce a partir de acción enzimática y contiene más lactosa.

2) Suero ácido, aquel que se obtiene por acción ácida, con mayor concentración de proteínas.

En cuanto a minerales, el lacto suero puede contener aproximadamente el 90% del calcio, potasio, fósforo, sodio y magnesio presente en la leche. Estos minerales se transfieren al suero o a los permeados después de la coagulación de la proteína en la producción de la cuajada. Investigaciones hechas en ratas evidencian que el calcio lácteo presente en la fracción del suero puede ser incluso más biodisponible en comparación con algunas fuentes de calcio utilizadas comercialmente como suplementos, entre ellas se mencionan, el carbonato de calcio, el citrato de calcio y el lactato de calcio.

El lacto suero también contiene compuestos biológicamente activos y péptidos bioactivos definidos, como fragmentos específicos de proteínas, que tienen un impacto positivo sobre funciones o

condiciones corporales y que pueden influir sobre la salud humana, más allá de una nutrición normal y adecuada.

Estos péptidos son resistentes a la acción de peptidasas digestivas, lo que les permite su absorción y paso al torrente sanguíneo sin ninguna alteración estructural para ejercer determinados efectos biológicos y fisiológicos. Vea tabla 10.2 Anexo.

Se encuentran péptidos opioides principalmente de α -lactoglobulina y de albumina sérica con efecto sobre el sistema nervioso e inhibición de la actividad de la ACE; péptidos in-munomoduladores que incrementan la actividad fagocítica de los macrófagos, y ejercen efectos antimicrobianos y antivirales; péptidos con efectos favorables sobre el sistema cardiovascular, vía antitrombótica, antihipertensiva e hipocolesterolemica y péptidos antioxidantes, entre otros. (SciELO, 2012)

Los metabolitos son los productos intermedios y productos del metabolismo. El término metabolito generalmente se limita a pequeñas moléculas.

Es el conjunto de procesos y reacciones químicas anabólicas y catabólicas por los cuales un metabolito obtiene la energía y los nutrientes que necesita para vivir y reproducirse. Las características metabólicas específicas de un metabolito constituyen el principal criterio para determinar su papel ecológico, su responsabilidad en los ciclos biogeoquímicos y su utilidad en los procesos industriales.

Un metabolito principal está directamente implicado en el crecimiento normal, el desarrollo y la reproducción. El alcohol es un ejemplo de un metabolito primario producido en gran escala por parte de la microbiología industrial. Muchos fármacos son metabolitos secundarios producidos por otros seres vivos. Por ejemplo, muchos antibióticos son metabolitos producidos por microorganismos, como la penicilina G que es producida por hongos del género *Penicillium*.

Los metabolitos finales que no participan en otras rutas metabólicas se suelen conocer como productos de desecho, pues no pueden ser utilizados por el organismo para sintetizar cualquier otra sustancia. Estos productos son excretados a través de diversas vías, principalmente orina y sudor.

Muchas toxinas y la mayoría de fármacos deben ser metabolizadas y transformadas en otras sustancias, es decir, en metabolitos, para que puedan ser eliminados. (Curiosoando, 2020)

Un metabolito secundario no está directamente involucrado en esos procesos, pero por lo general tiene una importante función ecológica. Los ejemplos incluyen los antibióticos y pigmentos. Algunos antibióticos de uso metabolitos primarios como precursores, tales como actinomicina que se crea a partir del triptófano principal metabolito. (EcuRed, 2019).

Muchos fármacos son metabolitos secundarios producidos por otros seres vivos. Por ejemplo, muchos antibióticos son metabolitos producidos por microorganismos, como la penicilina G que es producida por hongos del género *Penicillium*. (Curiosoando, 2020)

La dureza es la resistencia de un material a ser rayado o penetrado, por lo cual estamos midiendo la cohesión entre los átomos del material. Esto, por tanto, guarda relación con la resistencia a la deformación y a la rotura, y cuanto más duro sea un material, más resistente será también. (Aula.edu, 2020)

Por tanto, en general, se entiende por dureza a la propiedad que tienen los materiales de resistir la penetración de un indentador sometido bajo carga, y en este sentido, la dureza se define como la resistencia de un material a la deformación plástica localizada en su superficie su unidad de medida se da en escala Shore.

De la anterior definición de dureza se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- 1) la dureza, por definición, es una propiedad de la capa superficial del material, y no es una propiedad del material en sí.
- 2) los métodos de dureza por indentación presuponen la presencia de esfuerzos de contacto, y por lo tanto, la dureza puede ser cuantificada dentro de una escala. (Ingemecanica, 2020)

La escala de dureza Shore se usa frecuentemente para medir elementos blandos o semiblandos. Califican entre ellos: plásticos, cauchos y elastómeros. Se requiere verificar que la superficie donde se realizará la prueba sea plana, de lo contrario las cuentas no resultarán exactas.

Para fines prácticos, el evaluador debe tomar en cuenta que entre la dureza de un material y otras de propiedades mecánicas, no existe relación alguna como sucede con los aceros. Esto se traduce en que no necesariamente un material más duro, tendrá mayor aguante a la tracción. Es habitual que dos materiales de la misma dureza sean totalmente distintos. Es determinante que el tamaño de la pieza sea mayor a cuatro milímetros para llevar a cabo una valoración correcta.

El durómetro empleado para aplicar el ensayo de dureza Shore, suele ser de acero, en forma de cilindro, dotado de una punta redonda y fuerte. En algunos casos también puede ser de diamante. Por lo general, tendrá un peso de, máximo, siete gramos. Al momento de realizar la lectura, el tubo estará fijado a una escala de 140 divisiones. Cuando este marca 100, se trata de un durómetro hecho de acero templado para medir la dureza de herramientas terminadas. En cualquiera de los casos, el proceso tiene una duración de apenas dos segundos.

Éste puede ser colocado en cualquier posición que el investigador desee: inclinado, horizontal o vertical. Si la medición se realizará cuando esté en horizontal, bastará con restar 10 al resultado arrojado. Asimismo, 18 y 26 cuando se encuentra invertido. (Rocasyminerales, 2020)

La flexibilidad del material consiste en la facilidad que tiene este para doblarse sin romperse. Material flexible: es el material que se dobla fácilmente. Ejemplos: goma, algunos plásticos. Material rígido: es el material que es difícil doblar. Ejemplo: algunos metales. Material elástico: es el material que si se deforma puede recuperar su forma inicial. Ejemplos: goma de rueda de bicicleta, resortes.

Los plásticos de mejor calidad son generalmente más flexibles. No hay un valor estándar para todos los tipos de plásticos. La prueba mencionada a continuación es útil para comparar estas resinas y su flexibilidad con el plástico. Prueba de tracción destructiva: esta prueba le indicará que el plástico se rompe debido a un alargamiento más prolongado (plástico de mejor calidad) o un alargamiento corto (calidad inferior). (Eurolab laboratory services, 2020).

3.2 Diseño experimental.

El más importante de los casos especiales de los diseños factoriales es el que tiene k factores cada uno a dos niveles. Estos niveles pueden ser cuantitativos, valores de temperatura o presión, o pueden ser cualitativos, tales como 2 máquinas o dos operadores, o tal vez pueda ser la presencia o ausencia de un factor. Una réplica completa de tal diseño requiere $2 \times 2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ observaciones y se conoce como un diseño factorial 2^k .

Como cada factor en el experimento tiene 2 niveles se llaman nivel bajo (-) y nivel alto (+). El diseño más pequeño en este tipo de experimento es el que tiene $k = 2$ factores.

Es importante realizar réplicas de cada tratamiento o combinación en el experimento ya que esto permite comparar entre valores (datos obtenidos en los diferentes niveles de un factor fijando los demás factores) y dentro de valores (datos obtenidos de una misma combinación).

El número de corridas a realizarse en el experimento es $2^k \times n^\circ$ réplicas. Además, también es importante que el orden en que se realizan las corridas sea aleatorio, es por esto que el experimento es un experimento completamente aleatorio.

Muchas veces resulta conveniente escribir la data en orden descendente de las combinaciones de los tratamientos. Esta forma de tabular se le conoce como el orden estándar. Algo muy importante que hay que tener en cuenta es que cuando no hay replicas no se tiene estimado de error. Los factores que sean significativos van a tener una distribución con promedio distinto de cero y se alejaran de la línea formada por los no significativos.

Esta línea se le conoce como el Trazo Normal de los efectos (Trazo de Daniela). Este método ayuda a distinguir aquellos efectos que sobresalen para explicar la respuesta. Este método parte de la premisa de que cuando k es lo suficientemente grande, todas las fuentes de variación no serán relevantes; algunas de ellas deben pertenecer al error o ruido. (Academic.edu, 2020).

La Magnitud del Efecto (ME) es simplemente una manera de cuantificar la efectividad de una particular intervención, relativa a alguna comparación. Es fácil de calcular y entender, y puede aplicarse a algún resultado medido en educación o ciencias sociales. Este concepto nos permite movernos más allá de la simple pregunta "¿el método A es efectivo o no?" a una más sofisticada como "¿Qué tan bien funciona el método A en varios contextos?".

Más aún, al poner énfasis en el aspecto más importante de una intervención -la magnitud del efecto- más que en su significancia estadística (que pone en conflicto a la magnitud del efecto y el tamaño de la muestra), promueve un enfoque más científico a la acumulación de conocimientos. Por estas razones, la ME es una herramienta importante para reportar e interpretar la efectividad de una condición específica o para describir las diferencias (Revista de Psicología de la PUCP., 2003)

Los efectos principales se estiman usando las ecuaciones 3.1 a 3.6

$$A = \frac{1}{4.n} [a + ab + ac + abc - (1) - b - c - bc] \text{ Ecuación 3.1}$$

$$B = \frac{1}{4.n} [b + ab + bc + abc - (1) - a - c - ac] \text{ Ecuación 3.2}$$

$$C = \frac{1}{4.n} [c + ac + bc + abc - (1) - a - b - ab] \text{ Ecuación 3.3}$$

$$AB = \frac{1}{4.n} [abc - bc + ab - b - ac + c - a + (1)] \text{ Ecuación 3.4}$$

$$AC = \frac{1}{4.n} [(1) + a - b - ab - c - ac + bc + abc] \text{ Ecuación 3.5}$$

$$ABC = \frac{1}{4.n} [abc - bc - ac + c - ab + b + a - (1)] \text{ Ecuación 3.6}$$

Donde:

n: es el número de réplicas.

A, B, C: factores del diseño experimental.

(1), a, b, c: combinaciones de tratamiento.

3.3 Técnica de Kirby-Bauer.

En el manejo clínico de la enfermedad infecciosa es indispensable la identificación del agente causal con el objeto de hacer un control terapéutico, en lo posible, específico. Tratándose de entidades de origen bacteriano, este concepto es aún más estricto, toda vez que el médico cuenta con gran cantidad de agentes antimicrobianos de los cuales debe seleccionar aquéllos que además de su fácil administración, buena penetración y baja toxicidad sean realmente activos contra el microorganismo causal.

La prueba de sensibilidad utilizando el procedimiento del disco es una modificación de la técnica descrita por Bauer, Kirby, Sherris y Turk; es la técnica que se recomienda para los laboratorios clínicos. La prueba es rápida, práctica y reproducible. Los procedimientos de diluciones en agar o diluciones en caldo para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antimicrobianos son también procedimientos satisfactorios. (Bernal & Guzman., 1984).

Los discos, para antibiograma son producidos por casas comerciales bajo un riguroso protocolo de control internacional. Cada disco contiene una concentración predeterminada que permite una correlación más o menos precisa con la concentración mínima inhibitoria que dicho antibiótico alcanza "in vivo" según los resultados de resistencia o susceptibilidad. Solo deben utilizarse discos con nombre genérico. La conservación de los discos es crítica ya que de ella depende la confiabilidad de los resultados. Se debe, por lo tanto, tener particular cuidado al respecto siguiendo las indicaciones siguientes:

Los recipientes individuales que contienen los discos deben mantenerse refrigerados de 4-5°C. o almacenados a -20°C, hasta que sean utilizados; los discos que contienen drogas de la familia de la penicilina o de las cefalosporinas deben mantenerse siempre congelados, excepción de una pequeña cantidad de discos para el trabajo diario, los cuales pueden mantenerse refrigerados hasta por una semana. Los nuevos recipientes con discos de sensibilidad deben colocarse a temperatura ambiente antes de abrirlos para ponerlos en uso.

Los dispensadores que contienen discos para pruebas de susceptibilidad deben almacenarse con un desecante en el refrigerador pero debe permitirse que alcancen la temperatura ambiente antes de ser utilizados. Se debe desechar todo disco cuya fecha de expiración, expresamente puesta por la casa manufacturadora, esté vencida. Los discos deben mantenerse secos hasta que se utilicen.

Las técnicas de antibiogramas por difusión han sido normalizadas para microorganismos de crecimiento rápido, tales como *Staphylococcus* y *Enterobacteriaceae* pero no son confiables cuando se aplican a microorganismos de crecimiento lento, los cuales pueden mostrar zonas de inhibición mucho más grandes que aquéllos de crecimiento rápido.

Sin embargo, la total resistencia puede ser significativa; por lo tanto, la prueba de susceptibilidad de microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales o que necesiten una atmósfera anaeróbica o concentraciones altas de CO₂ o que representan una rata de crecimiento particularmente lenta, deben estudiarse por métodos de antibiograma por dilución o específicos como los ya desarrollados y estandarizados de difusión para este tipo de microorganismos. (Bernal & Guzman., 1984).

Para que los resultados del antibiograma de discos sean realmente confiables es de primordial importancia, además de los aspectos técnicos, introducir un control de calidad interno mediante el uso de las cepas control.

Estas son de uso universal, se trata de cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *Ps aeruginosa* las cuales tienen un patrón de sensibilidad ya conocido frente a los antimicrobianos tabla 3.1, sensibilidad que debe ser reproducida en cada laboratorio asegurando con ello que el procedimiento empleado está operando en óptimas condiciones.

Las suspensiones bacterianas se comparan visualmente con los estándares hasta encontrar al más similar en turbiedad y se lo relaciona con el número de células de acuerdo a cada estándar. Se debe tomar en cuenta que al momento de comparar los estándares con una suspensión bacteriana se debe utilizar tubos similares en diámetro para eliminar los errores. (Núñez, 2017).

La escala McFarland consiste básicamente en una serie de tubos estandarizados que contienen una suspensión de un precipitado fino que se asemejan a suspensiones bacterianas en opacidad. Los estándares que se utilizan son precipitados de Sulfato de bario que se obtiene al mezclar Cloruro de Bario con Ácido Sulfúrico; mezclando distintas cantidades de reactivo se obtiene diez estándares con diferente turbiedad.

Las cepas control deben probarse cada vez que se realicen las pruebas y, el tamaño de los halos de inhibición debe anotarse en una hoja de control de calidad para cada antibiótico. El diámetro de la zona de inhibición para los microorganismos control debe caer dentro del rango indicado en el tabla 3.1. Las variaciones en cada uno de los límites deben investigarse y corregirse para asegurar resultados válidos. (Bernal & Guzman., 1984).

Tabla 3.1 Sensibilidad de las cepas de control zona de inhibición en mm.

ANTIMICROBIANO	POTENCIA DEL DISCO	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Acido Nalidixico	30 mcg	████████	21 - 25	████████
Acido Oxolinico	2 mcg	13 - 10	20 - 24	████████
Amikacina	30 mcg	18 - 24	18 - 24	15 - 22
Ampicilina	10 mcg	24 - 35	15 - 20	████████
Carbenicilina	100 mcg	████████	24 - 29	20 - 24
Cefalotina	30 mcg	25 - 37	18 - 23	████████
Cefamandole	30 mcg	28 - 34	24 - 31	████████
Cefotaxima	30 mcg	████████	████████	████████
Cefoxitina	30 mcg	23 - 28	23 - 28	████████
Clindamicina	2 mcg	23 - 29	████████	████████
Cloranfenicol	30 mcg	19 - 26	21 - 27	6 - 12
Colistina	10 mcg	████████	11 - 15	12 - 16
Eritromicina	15 mcg	23 - 30	8 - 14	████████
Gentamicina	10 mcg	19 - 27	19 - 26	16 - 21
Kanamicina	30 mcg	19 - 26	17 - 25	6
Neomicina	30 mcg	18 - 26	17 - 23	████████
Nitrofurantoina	300 mcg	20 - 24	20 - 24	████████
Oxacilina	5 mcg	17 - 22	████████	████████
Penicilina G	10 U	26 - 37	████████	████████
Polimixina B	300 U	7 - 13	12 - 16	11 - 16
Sulfisoxazole	300 mcg	23 - 27	22 - 26	6
Tetraciclina	30 mcg	19 - 28	18 - 25	9 - 14
Trimetoprim-Sulfa	1.25/23.75 mcg	24 - 32	24 - 32	████████
Tobramicina	10 mcg	19 - 29	18 - 26	19 - 25
Vancomicina	30 mcg	15 - 19	████████	████████

(Bernal & Guzman., 1984)

Los resultados obtenidos deben interpretarse de acuerdo con la tabla 3.2. En la interpretación de tales resultados es necesario tener en cuenta lo siguiente: El diámetro de las zonas obtenido con aminoglucósidos depende del medio utilizado, debido a la variación del contenido de cationes y depende de la calidad del medio de Mueller-Hinton que ofrecen las casas productoras. Los rangos de interpretación son los siguientes:

Tabla 3.2. Antibiograma de disco interpretación de resultados.

ANTIMICROBIANO	Disco (mcg)	Zona Inhibición (mm)			OBSERVACIONES
		R(≤)	I	S(≥)	
Acido Nalidíxico	30	13	18 - 14	19	Infección urinaria
Acido Oxolínico	2				Infección urinaria
Amikacina	10	11	12 - 13	14	
Ampicilina	10	11	12 - 13	14	Entéricos y Enterococo
Ampicilina	10	20	21 - 28	29	<u>Staphylococcus</u> y otros sensibles a Penicilina G
Ampicilina	10	19		20	Haemophilus
Carbenicilina	100	17	18 - 22	23	<u>Proteus</u> y <u>E. coli</u>
Carbenicilina	100	13	14 - 16	17	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>
Cefalotina	30	14	15 - 17	18	
Cefamandole	30	14	15 - 17	18	
Cefotaxima	30				
Cefoxitina	30	14	15 - 17	18	
Clindamicina	2	14	15 - 16	17	
Cloranfenicol	30	12	13 - 17	18	
Colistina	10	8	9 - 10	11	Infección urinaria
Eritromicina	15	13	14 - 17	18	
Gentamicina	10	12	13 - 14	15	
Kanamicina	30	13	14 - 17	18	
Neomicina	30	12	13 - 16	17	
Nitrofurantoina	300	14	15 - 16	17	Infección urinaria
Oxacilina	5	10	11 - 12	13	
Penicilina G	10 U	20	21 - 28	9	<u>Staphylococcus</u>
Penicilina G	10 U	11	12 - 21	22	Otros microorganismos
Polimixina B	300 U	8	9 - 11	12	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>
Sulfisoxazole	300	12	13 - 16	17	
Tetraciclina	30	14	15 - 18	19	
Trimetoprim - Sulfa	125/ 2375	10	11 - 15	19	
Tobramicina	10	11	12 - 13	14	
Vancomicina	30	9	10 - 11	12	

R = Resistente I = Intermedio S = Sensible

(Bernal & Guzman., 1984)

3.4 Generalidades de las bacterias.

Las bacterias son organismos microscópicos unicelulares. Se encuentran entre las formas de vida más antiguas conocidas en el planeta. Hay miles de tipos de bacterias diferentes y pueden vivir en todos los medios y ambientes imaginables, en cualquier parte del mundo. Viven en el suelo, en el agua del mar y en las profundidades de la corteza terrestre. Se ha podido comprobar que ciertas bacterias pueden vivir, incluso, en los desechos radiactivos. Muchas bacterias viven en y en los cuerpos de personas y animales, en la piel y en las vías respiratorias, la boca y los tractos digestivo, reproductivo y urinario, sin causar ningún daño.

Estas bacterias se denominan flora saprófita o microbiana. Hay al menos tantas bacterias en nuestra flora residente como células en el cuerpo. Gran parte de la flora saprófita es realmente útil para las personas, por ejemplo, ayudando a digerir los alimentos o al impedir el crecimiento de otras bacterias más peligrosas.

Solo unos pocos tipos de bacterias causan enfermedades son las conocidas con el nombre de patógenos. A veces, las bacterias que por lo general viven en el cuerpo de forma inocua provocan enfermedades.

Las bacterias causan enfermedades mediante la producción de sustancias nocivas (toxinas), la invasión de tejidos o ambas cosas. Algunas bacterias pueden desencadenar una inflamación que puede afectar el corazón, el sistema nervioso, los riñones o el tubo digestivo. Algunas bacterias (como *Helicobacter pylori*) aumentan el riesgo de cáncer. Ciertas bacterias tienen el potencial de ser utilizadas como armas biológicas. Entre estas bacterias se encuentran las que causan carbunco, botulismo, peste y tularemia. (Larry M. Bush, 2018)

Las bacterias se clasifican de varias maneras:

Nombres científicos: las bacterias, al igual que otros seres vivos, se clasifican por género (basado en la existencia de una o varias características comunes) y, dentro del género, por especie. Su nombre científico se compone del nombre del género seguido por el de la especie a la que pertenecen (por ejemplo, *Clostridium botulinum*). Dentro de una especie, puede haber diferentes tipos, denominados cepas. Las cepas difieren en su composición genética y en sus componentes químicos. En ocasiones, ciertos medicamentos y vacunas solo son efectivos frente a determinadas cepas.

Tinción: las bacterias pueden ser clasificadas por el color que adquieren después de que se les apliquen ciertos productos químicos (tinciones). La tinción de Gram es un proceso de tinción comúnmente utilizado. Algunas bacterias se tiñen de azul, por lo que se denominan grampositivas. Otras se tiñen de color rojo son las gramnegativas. Las bacterias grampositivas y las gramnegativas se tiñen de forma distinta porque sus paredes celulares son diferentes. También causan diferentes tipos de infecciones, y hay distintos tipos de antibióticos eficaces contra ellas.

Formas: todas las bacterias se pueden clasificar en una de las tres formas básicas: esferas (cocos), bastones (bacilos) y espirales o hélices (espiroquetas). figura 10.1 Anexo.

Necesidad de oxígeno: las bacterias también se clasifican en dos grupos, según si necesitan oxígeno para vivir y crecer o no les es necesario. Las que necesitan oxígeno se denominan aerobias, y las que tienen problemas para vivir o crecer en presencia de oxígeno se denominan anaerobias. Algunas bacterias, llamadas bacterias facultativas, pueden vivir y crecer con o sin oxígeno.

Composición genética: Pruebas especializadas que permiten determinar diferencias en la composición genética (genotipo) de las bacterias. (Larry M. Bush, 2018)

Los médicos clasifican las infecciones bacterianas en función de las diversas formas de clasificación de las bacterias. Por ejemplo, las infecciones pueden clasificarse como causadas por bacterias gram-negativas o gram-positivas. Esta distinción es importante porque el tratamiento de los dos tipos puede requerir diferentes clases de antibióticos.

Las infecciones gramnegativas comprenden las siguientes: Brucelosis, Infecciones por *Campylobacter*, Enfermedad por arañazo de gato, Cólera, Infecciones por *Escherichia coli*, Gonorrea, Infecciones por *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*, Infecciones por *Legionella*, Infecciones meningocócicas, Tosferina (pertusis), Peste, Infecciones por *Pseudomonas*, Infecciones por *Salmonella*, shigelosis, Fiebre tifoidea, tularemia.

Las infecciones grampositivas comprenden las siguientes: Carbunco, Difteria, Infecciones por enterococos, erisipelotricosis, listeriosis, nocardiosis, Infecciones neumocócicas, Infecciones estafilocócicas, Infecciones por estreptococo. Estas se identifican por tinción de Gram.

Algunas infecciones se clasifican según la forma de la bacteria. Por ejemplo, las infecciones causadas por espiroquetas (bacterias en forma de espiral) se clasifican como infecciones por espiroquetas. Las infecciones por espiroquetas incluyen las siguientes: Bejel, pian y pinta, leptospirosis, enfermedad de Lyme, fiebre por mordedura de rata, fiebre recurrente, sífilis.

Otras infecciones se pueden clasificar según si las bacterias que las causan requieren oxígeno o bien crecen en un ambiente sin oxígeno. Las bacterias que necesitan oxígeno para vivir y proliferar se denominan aerobias. Las que viven y crecen sin oxígeno se denominan anaerobias. Las infecciones anaeróbicas comprenden las siguientes: actinomicosis, bacteroides, botulismo, infecciones por clostridios, tétanos.

Se comercializan muchos antibióticos distintos para el tratamiento de las infecciones bacterianas. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos que presentan las bacterias constituye una gran preocupación. (Larry M. Bush, 2018)

Las bacterias tienen muchas formas de autodefenderse.

➤ Biofilm

Algunas bacterias segregan una sustancia que les ayuda a fijarse a otras bacterias, células u objetos. Esta sustancia se combina con la bacteria para formar una capa adherente llamada biofilm o biopelícula. Por ejemplo, ciertas bacterias forman un biofilm en los dientes (llamado placa dental). El biofilm atrapa partículas de comida, que las bacterias procesan y utilizan, y en este proceso es probable que causen caries dentales. Las biopelículas también ayudan a proteger a las bacterias de los antibióticos.

➤ Cápsulas

Algunas bacterias están envueltas en una cápsula protectora. Esta cápsula ayuda a las bacterias a evitar ser ingeridas por los glóbulos blancos o leucocitos, que se encargan de combatir las infecciones. Tales bacterias reciben el nombre de encapsuladas.

➤ Membrana externa

Bajo la cápsula, las bacterias gramnegativas tienen una membrana externa que las protege contra ciertos antibióticos. Al deteriorarse, esta membrana libera sustancias tóxicas llamadas endotoxinas, que contribuyen a la gravedad de los síntomas en las infecciones por bacterias gramnegativas.

➤ Esporas

Algunas bacterias producen esporas, una forma bacteriana inactiva (latente). Las esporas permiten a las bacterias sobrevivir cuando las condiciones ambientales son difíciles. Cuando las condiciones son favorables, cada espora germina y se transforma en una bacteria activa.

➤ Flagelos

Los flagelos son filamentos largos y delgados que sobresalen de la superficie celular y permiten el movimiento de las bacterias. Las bacterias sin flagelos no pueden moverse por sí mismas. (Larry M. Bush, 2018)

Algunas bacterias son resistentes natural a los antibióticos.

Otras bacterias desarrollan resistencia a los medicamentos, bien porque adquieren genes de otras bacterias que se han vuelto resistentes, bien porque sus propios genes sufren mutaciones. Por ejemplo, poco después de que la penicilina fuese introducida a mediados de la década de 1940, unas pocas bacterias individuales *Staphylococcus aureus* adquirieron genes que hicieron que la penicilina fuese ineficaz frente a ellas las cepas que poseían estos genes especiales tenían una ventaja evolutiva cuando se usaba la penicilina de modo habitual para tratar infecciones. Las cepas de *Staphylococcus aureus* que carecían de estos nuevos genes fueron destruidas por la penicilina, lo que permitió que las bacterias resistentes a la penicilina se reprodujeran y con el tiempo se volvieran más comunes.

Posteriormente, los químicos alteraron la molécula de la penicilina, creando un medicamento diferente pero similar, la metilicina, que podía matar a las bacterias resistentes a la penicilina. Poco después de ser introducida la metilicina, ciertas cepas de *Staphylococcus aureus* desarrollaron unos genes que las hacían resistentes a la metilicina y fármacos similares. Estas cepas se llaman *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina Los genes que codifican la resistencia a los medicamentos pueden pasar a las siguientes generaciones de bacterias, o incluso a veces a otras especies de bacterias. (SARM).

Cuanto más frecuente sea el uso de antibióticos, más probable es el desarrollo de bacterias resistentes. Por lo tanto, los expertos recomiendan que los médicos prescriban antibióticos solo cuando sean necesarios. En particular, los médicos deberían prescribir antibióticos solo en caso de infecciones bacterianas, no para las de origen vírico, como el resfriado o la gripe. Administrar antibióticos a personas que probablemente no tengan una infección bacteriana, como las que tienen tos y síntomas de resfriado, no causa una mejoría de los síntomas, sino que favorece la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos.

El uso extensivo de los antibióticos, que han sido a veces muy mal utilizados, ha provocado el desarrollo de muchas bacterias resistentes a algunos de ellos. Las bacterias resistentes pueden transmitirse de persona a persona. Dado que los viajes internacionales son tan frecuentes, las bacterias resistentes pueden propagarse a muchas zonas del mundo en poco tiempo.

La propagación de estas bacterias en los hospitales es un problema importante; las bacterias resistentes son frecuentes en los hospitales porque allí los antibióticos son necesarios en muchas ocasiones, y tanto el personal del hospital como los visitantes pueden propagar la bacteria si no siguen estrictamente los procedimientos sanitarios adecuados.

Además, muchos pacientes hospitalizados tienen el sistema inmunitario debilitado, por lo que son más vulnerables ante las infecciones. Las bacterias resistentes también pueden transmitirse de los animales a las personas; son frecuentes entre los animales de granja, porque a menudo se administran antibióticos de forma rutinaria a los animales sanos para prevenir infecciones que puedan afectar el crecimiento o causar enfermedades. Muchos países han prohibido el uso de antibióticos en animales para reducir el riesgo de lo siguiente:

- Consumo de bacterias resistentes en productos alimentarios de origen animal.
- Infección con bacterias resistentes a través del contacto con animales.
- Exposición a antibióticos en productos alimentarios de origen animal.

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benidina negativas carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. (Ramirez, 2007).

La clasificación de las BAL en géneros diferentes es basada en principio en la morfología, modo fermentación de la glucosa (homofermentativa y heterofermentativa,) el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia acida o alcalina. En la naturaleza existen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Vagococcus* etc, (Axelsson, 2011).

La acción conservadora de las BAL es debido a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos por varios productos finales de la fermentación. Estas sustancias son ácidos como láctico y acético, peróxido de hidrogeno, diacetileno, bacteriocinas y productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrogeno y tiocianato (Shirai, 2011).

Las BAL, además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva. Además los probióticos son cultivos puros, o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que al ser consumidos por el hombre y los animales en cantidades adecuadas mejoran la salud. La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL. Sin embargo, otros alimentos son también excelentes medios de crecimiento y producción de metabolitos de bacterias lácticas, entre ellos se encuentran las masas de cereales, los vegetales y la carne (Axelsson, 2011).

Escherichia coli (*E. coli*) es un grupo de bacterias gramnegativas que residen habitualmente en el intestino de personas sanas, pero algunas de sus cepas pueden provocar infección del tubo digestivo, las vías urinarias o muchas otras partes del organismo. Las infecciones *E. coli* se desarrollan al consumir alimentos contaminados, por el contacto con animales infectados o por la ingestión de agua contaminada en una piscina.

Las infecciones intestinales causan diarrea, a veces grave o con sangre, y dolor abdominal. Los antibióticos pueden tratar con eficacia las infecciones por *E. coli* que no sean del tracto digestivo, y la mayoría de las infecciones intestinales, pero no se utilizan para tratar infecciones intestinales causadas por una cepa de esta bacteria.

Las infecciones más habituales debidas a E. coli se encuentran en los lugares siguientes:

Aparato digestivo (causando gastroenteritis), vías urinarias, E. coli es la causa más frecuente de infección de vejiga en las mujeres. Estas bacterias también pueden causar las infecciones siguientes: Infección de la próstata (prostatitis), Infección de la vesícula biliar, Infecciones que se desarrollan después de apendicitis y diverticulitis, Infecciones de heridas (incluidas las heridas producidas durante la cirugía), Infecciones en úlceras de decúbito (úlceras por presión), Infecciones del pie en personas con diabetes, Neumonía, Meningitis en recién nacidos, Infecciones del flujo sanguíneo.

En personas debilitadas, residentes en centros sanitarios, o que hayan tomado antibióticos se desarrollan muchas infecciones de E. coli que afectan zonas externas al sistema digestivo. E. coli pueden causar infecciones fuera del intestino si este está desgarrado (perforado) o dañado, por ejemplo por una lesión o una enfermedad, como la enfermedad inflamatoria del intestino. En ese caso, las bacterias pueden abandonar el intestino y extenderse a las estructuras cercanas, que no tienen defensas contra ellas, o pueden entrar en el torrente sanguíneo.

Una cepa produce una toxina que causa una diarrea acuosa de corta duración. Este trastorno (conocido como diarrea del viajero) suele darse en personas que han consumido comida o agua contaminadas en zonas donde el agua no está adecuadamente depurada. Muchas otras infecciones por E. coli, por lo general de la vejiga u otras infecciones de las vías urinarias, se tratan con antibióticos, como trimetoprima-sulfametoxazol, una nitrofurantoína o una fluoroquinolona.

Sin embargo, muchas bacterias, especialmente las adquiridas en un centro sanitario, son resistentes a algunos antibióticos. Para aumentar la probabilidad de que los antibióticos sean eficaces, se pueden usar conjuntamente varios de ellos hasta que se obtenga el resultado de las pruebas que indiquen qué antibióticos presentan mayor probabilidad de ser eficaces. Una vez obtenido el resultado, se cambia los antibióticos utilizados si es necesario. Para infecciones más graves, pueden utilizarse antibióticos efectivos contra muchas bacterias diferentes (antibióticos de amplio espectro). (Larry M. Bush, 2018).

E. coli en los alimentos:

El E. coli puede llegar a la carne durante el procesamiento. Si la carne infectada no se cocina a 160°F (71°C), las bacterias pueden sobrevivir e infectarlo cuando come la carne. Esta es la manera más común en que las personas en los Estados Unidos se infectan con E. coli. Cualquier alimento que haya estado en contacto con carne cruda también puede infectarse. Otros alimentos que se pueden infectar con E. coli incluyen:

Leche o productos lácteos crudos. Las bacterias pueden propagarse de las ubres de una vaca a su leche. Revise las etiquetas de los productos lácteos para asegurarse de que contengan la palabra "pasteurizado". Esto significa que el alimento se ha calentado para destruir las bacterias. Frutas y verduras crudas, como la lechuga, los brotes de alfalfa, o la sidra sin pasteurizar u otros jugos sin pasteurizar que hayan entrado en contacto con excremento de animales infectados.

A veces, el excremento humano o animal infectado con E. coli llega a lagos, piscinas y suministros de agua. Las personas pueden infectarse cuando el suministro de agua de una ciudad o de un pueblo contaminados no ha sido tratado en forma adecuada con cloro o cuando las personas tragan de manera accidental agua contaminada mientras nadan en un lago, en una piscina o en un canal de riego. (Cigna, 2020).

3.5 Pruebas bioquímicas para la clasificación de cepas puras de microorganismos.

La Tinción de Gram diferencia a los microorganismos en dos grupos, los que retienen el tinte primario (Gram-positivos) y los que pierden el tinte primario, debido a la estructura de su pared celular, y toman el color de la contratinción (Gram-negativos). Bacterias Gram-positivas colonias color violeta oscuro bacterias Gram-negativas Colonias color rojo anaranjadas. El procedimiento necesita cuatro reactivos: colorante primario (solución de cristal violeta), solución de yodo (Lugol), decolorante (decolorante de acetona etanol) y la contratinción (solución de safranina). Esta tinción tiene gran importancia en taxonomía bacteriana ya que indica diferencias fundamentales de la pared celular de las distintas bacterias.

El procedimiento se puede modificar de acuerdo con las preferencias del usuario para lograr una intensidad de color más débil o más fuerte, cambiando los tiempos de tinción, lavado, etc. Los frutis o cultivos viejos podrían dar resultados atípicos, es por esto que se recomiendan utilizar cultivos o frotis recientes (18-24 horas). Es muy importante controlar la fijación por calor (unos pocos segundos), cualquier exceso de calentamiento podría producir resultados erróneos. El agua del grifo altamente clorada podría debilitar la contratinción (Condalab, 2019).

La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos. Para la observación morfológica es preferible examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos. En este paso de la identificación es muy importante el aislamiento de las bacterias en cultivo puro ya que esta debería estar compuesta por un solo tipo de microorganismos y procedería de una única célula. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color.

El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie. Por ejemplo, las colonias de estreptococos tienen un tamaño más pequeño que las de los estafilococos y las enterobacterias. La forma está determinada por los bordes y el grosor de la colonia. El borde puede ser liso o rugoso e irregular; la colonia, abultada o plana. La textura de la colonia es también importante. Puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular. (Condalab, 2019)

En los medios de cultivo las bacterias se multiplican y es necesario esperar al menos 18-24 horas para visualizarlas. En términos generales todas las bacterias tienen unos requerimientos nutricionales imprescindibles para su crecimiento. Necesitan una fuente de energía, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, algunas sales, oligoelementos y agua. Todos los medios de cultivo han de cumplir como mínimo con estos requisitos pero en muchas ocasiones se necesitan además otras sustancias adicionales como vitaminas, factores o aminoácidos esenciales.

En los Servicios de Microbiología Clínica se utilizan medios de cultivo líquidos y sólidos. En los medios líquidos las sustancias nutritivas se encuentran disueltas. Los medios sólidos suelen consistir en una base de agar, polímero de origen vegetal que se mantiene en fase líquida a altas temperaturas y que forma un gel al enfriarse, que mantiene una alta humedad y contiene los elementos nutricionales necesarios. El cultivo sobre medios sólidos permite disponer fácilmente de las colonias bacterianas. Por otro lado, en medios líquidos, el crecimiento suele ser mayor porque la disponibilidad de nutrientes también es mayor. (Ana Olmos, 2010)

El uso de uno u otro tipo de medios depende del tipo de muestra y del patógeno que se busca. Según su capacidad para permitir el crecimiento microbiano se clasifican en medios básicos o generales, de enriquecimiento, selectivos y diferenciales. También deben mencionarse los medios cromogénicos.

- a) Medios básicos: son medios ricos en nutrientes que permiten el crecimiento de la gran mayoría de las bacterias. Se utilizan en la siembra primaria de las muestras clínicas ejemplo:

Agar nutriente: es un medio rico en nutrientes que permiten el crecimiento de la gran mayoría de las bacterias. Se utilizan en la siembra primaria de las muestras clínicas. (Britania, 2020)

- b) Medios de enriquecimiento: están desarrollados para recuperar bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales. Se utilizan para bacterias que no crecen en medios básicos. Los más utilizados suelen ser medios líquidos como es el caldo de tioglicolato o el caldo cerebro corazón (BHI).

- c) Medios selectivos: contienen sustancias como cloruro sódico a dosis elevadas, citrato sódico, cristal violeta, sales biliares o antibióticos y antisépticos que fomentan el crecimiento de algunas bacterias y evitan el de otras. Son de gran utilidad para el aislamiento bacteriano a partir de una población bacteriana mixta. Ejemplo :

Caldo Lauril sulfato: el Caldo Lauril Sulfato (Caldo Lauril Triptosa-LTB) es un medio selectivo recomendado para la enumeración de coliformes en agua y productos lácteos, así como para pruebas de confirmación de fermentación de lactosa con producción de gas por coliformes en alimentos. Otra ventaja de este medio es que la prueba de indol se puede realizar directamente en el tubo. (Condalab, 2019)

APHA recomienda el uso de Caldo Lauril Sulfato para la prueba presuntiva de número más probable de coliformes en aguas, efluentes o aguas residuales, también como una prueba confirmatoria de fermentación de lactosa con producción de gas para muestras de leche y para la detección de coliformes en alimentos. Este caldo fue elaborado para promover un crecimiento abundante y una alta producción de gas a partir de pequeños inóculos de organismos coliformes.

Caldo Lauril Sulfato está recomendado por la norma ISO 4831 e ISO 7251 para la detección y enumeración de coliformes y E. coli, respectivamente, por la técnica de número más probable. (Ana Olmos, 2010)

- d) Medios diferenciales: se utilizan para poner de manifiesto características distintivas de las colonias. Son medios que distinguen entre distintos grupos bacterianos en función casi siempre del color de sus colonias. Por ejemplo, el agar MacConkey es un medio sólido que permite el crecimiento de bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores de lactosa. Los primeros adoptan una coloración rosada que los diferencia de los segundos. Los medios diferenciales, además, pueden poner de manifiesto mezclas y contaminaciones en los cultivos. Ejemplo:

Agar EMB: Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB) es un medio diferencial, utilizado para el aislamiento de Enterobacterias. El uso de eosina y azul de metileno permite la diferenciación entre organismos fermentadores de lactosa y no fermentadores. Es ampliamente utilizado en bacteriología médica, en técnicas recomendadas por APHA y para la detección y enumeración de coliformes, contaminantes de alimentos y agua potable. (Condalab, 2019)

Características de las colonias:

- Las colonias de Salmonella y Shigella son translúcidas y de color ámbar o incoloras.
- Los coliformes que usan lactosa y / o sacarosa producen colonias azul oscuro con centros oscuros y un brillo metálico verdoso.
- Otros coliformes como Enterobacter forman colonias mucoides rosadas.
- Las cepas de Enterococcus faecalis se inhiben parcialmente en este medio y aparecen como colonias incoloras.

e) Medios cromogénicos: en estos se incorporan sustancias cromogénicas para detectar distintas enzimas producidas por los microorganismos. Cuando la bacteria produce el enzima, hidroliza el sustrato y se libera un compuesto cromogénico que adquiere un color intenso, dando color a la colonia.

Estos enzimas pueden ser específicas de un género, una especie o de un grupo reducido de especies. En algunos casos la identificación presuntiva de las bacterias aisladas tiene una especificidad tan elevada que, en la práctica podría hacer innecesaria la realización de pruebas confirmatorias. En muchas ocasiones los medios de cultivo entran en más de una categoría de las anteriores. No es infrecuente el empleo de medios de enriquecimiento que son a su vez selectivos para algunos microorganismos.

También se usan medios que son diferenciales y selectivos al mismo tiempo, es el caso del agar manitol, selectivo para bacterias del género Staphylococcus y diferencial para Staphylococcus aureus (fermenta el manitol y sus colonias aparecen de color amarillo sobre el agar como resultado de la acidificación del medio). Los medios con capacidad simultánea de seleccionar y diferenciar microorganismos ofrecen grandes ventajas en el diagnóstico microbiológico porque ahorran tiempo y orientan decisivamente hacia el resultado definitivo. (Ana Olmos, 2010).

La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. El principal objetivo de esta prueba es separar Micrococaceae (positiva) de Streptococcus spp y Enterococcus spp (negativa). (Ana Olmos, 2010)

Oxidasa es una prueba que sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en alguna microaerófila (Vibrio fetus), pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa.

Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que esta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica. (Ana Olmos, 2010).

Para la prueba de movilidad se usa un medio semisólido utilizado para la detección de la motilidad bacteriana. El uso de medios semisólidos para la determinación de la motilidad bacteriana elimina las deficiencias de los métodos microscópicos como la técnica de la gota colgante. La motilidad se manifiesta macroscópicamente por una zona difusa de crecimiento que se extiende desde la línea de inoculación. Las bacterias no móviles generalmente dan un crecimiento que se limita a la línea de equilibrio, tienen márgenes claramente definidos. (Condalab, 2019).

3.6 Evaluación de Biodegradación.

La degradación de los polímeros conduce a una modificación de la estructura original debido a la rotura de los enlaces en las cadenas principales o en los grupos laterales, motivados por acciones químicas o físicas. Las causas químicas son la hidrólisis y la oxidación; las físicas corresponden a los efectos de radiaciones, calor o fuerzas mecánicas. Estas últimas atacan puntos localizados y específicos de la cadena polimérica.

El envejecimiento y deterioro de los polímeros se deben a procesos simultáneos y no controlados, siendo el más importante la foto oxidación. La acción de la luz conduce a una disminución del peso molecular, una variación de la distribución de los pesos moleculares, fenómenos de ramificación y reticulado y cambios en la cristalinidad. (Tecnología de los plásticos, 2020)

Los nuevos polímeros que ofrecen propiedades mejoradas relativas a la susceptibilidad de ataques microbianos han sido introducidos a los mercados internacionales. Esto necesita de una evaluación de la propensión de los materiales de ser degradados biológicamente.

La Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM) y la Organización Internacional de Estándares (ISO) han desarrollado estándares para la prueba de biodegradabilidad en diferentes condiciones específicas. Muchos de estos métodos dan resultados similares, aunque generalmente se complementan uno a otro. Basados en la naturaleza de los plásticos y en las rutas disponibles para su disposición final en un país, ejemplos de algunos métodos utilizados para evaluar las propiedades biodegradables de plásticos se pueden consultar en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Normas para la determinación de biodegradabilidad de plásticos.

Código	Método
ASTM G21-96	Determinar la resistencia de materiales poliméricos a hongos.
ASTM 5247	Determina la biodegradación anaeróbica de plásticos degradables por microorganismos.
ASTM 5338 - 98	Determina la biodegradación aeróbica de plásticos degradables por microorganismos.
ASTM 5988 - 96	Determina la biodegradación aeróbica en suelos de materiales plásticos o residuos plásticos después de composteo.
ASTM 6002 - 96	Evalúa la posibilidad de composteo de plásticos degradables ambientalmente
ASTM 6400 - 99	Especificación estándares para plásticos de composteo.

Fuente: (Jose, 2009)

El aspecto más importante es seleccionar el procedimiento apropiado basado en la naturaleza de los plásticos y las condiciones climáticas del país. Las propiedades biodegradables son evaluadas bajo algunas condiciones.

3.6.1 Determinación de biodegradación por composteo.

El composteo es un proceso administrado que controla la descomposición biológica y la transformación de materiales biodegradables en una sustancia llamada composta. Por tratarse de actividad biológica, durante el proceso, se produce elevación de temperatura, en ocasiones suficientemente alta como para causar ignición de los materiales.

El tiempo de biodegradación es variable, dependiendo de los materiales que se utilicen y de la cantidad pero en promedio se puede empezar a utilizar el producto de este proceso, a partir de unas pocas semanas o meses de un año. (Arevalo & Katiushka, 1996).

Los polímeros biodegradables son la mejor opción para reducir los residuos plásticos que generan los envases y la gestión de compostaje es el camino para valorizar esos desechos.

Dentro de las medidas propuestas para disminuir la generación de residuos plásticos, los polímeros biodegradables aparecen como una alternativa a los polímeros convencionales. Un polímero biodegradable se puede definir como un polímero que es capaz de descomponerse químicamente por la acción de microorganismos, obteniéndose diversos productos en función de la ausencia o presencia de oxígeno en el medio.

El proceso de biodegradación de un polímero se puede llevar a cabo en diversos ambientes, en función de dónde finalice la vida útil del producto. Se considera que el compostaje es el medio más favorable, ya que mediante este proceso se consigue valorizar los residuos, obteniendo un compost que puede ser empleado en agricultura, en lugar de simplemente eliminar dichos residuos.

Además de ser biodegradable (capaz de descomponerse químicamente por la acción de microorganismos), un polímero puede ser también compostable. Para ello, ha de cumplir varios requisitos, referidos a su composición (límites en el contenido de metales pesados y otras sustancias tóxicas), biodegradabilidad (degradación química), capacidad de desintegración (degradación física) y calidad del compost obtenido.

Para garantizar que un producto o, en concreto, un envase es biodegradable o compostable, es necesario realizar ensayos, preferiblemente normalizados. En función de si lo que se quiere comprobar es la biodegradabilidad o compostabilidad, se emplearán distintas normas de ensayo. (Packaging, 2020).

IV. Material y método.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química (F.I.Q) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI).

4.1 Materiales

El suero láctico simple utilizado se obtuvo de forma natural como subproducto del proceso de elaboración de queso a partir de leche vacuna integra.

El benzoato de sodio ($C_7H_5NaO_2$), es un antiséptico y preservante que se utiliza en la industria alimentaria, se agregó a la formulación para evitar desarrollo de microorganismos.

El ácido acético (CH_3COOH) al 3.3%, se utilizó con el fin de ayudar a romper los enlaces glucosídicos del almidón por hidrólisis; utilizando almidón de yuca, como agente plastificante, obtenido a partir de uno de los tubérculos más cosechados en el país.

La glicerina ($C_3H_8O_3$) se usó como un agente gelificante en la formulación de la película bioactiva.

En las tablas 4.1 y 4.2 se describen los materiales y equipos utilizados en la investigación.

Tabla 4.1 Materiales de laboratorio y cristalería.

Materiales	Capacidad	Cantidad
Beaker	250 ml	6
Portaobjetos	6
Tubos de ensayo	10 ml	10
Pipeta	1ml-5ml-10 ml	35
Placas de vidrio	10 cm	2
Espátulas	2
Juego horadores	1
Placas de Petri	10 cm	20
Varilla de vidrio	1
Bandeja plástica	30x 45 cm	1
Asa de siembra	2
Asa acodada	1
Papel aluminio	10 x 20 cm	12

Tabla 4.2 Equipos de laboratorio.

Equipo	Característica
Agitador rotatorio o Shaker	Agitador uniforme de muestras
Balanza Analítica	Peso en gr de muestras
Contador de Colonia	Conteo microbiológico
Microscopio óptico binocular	Observación aumentada de muestras
Placa calefactora	Calefacción controlada
Horno	Secado de muestras
Incubadora	Temperaturas de incubación
pH-metro	Medidor de pH
Refractómetro	Medir grados Brix
Calibrador digital	Medir grosor y longitudes en mm
Tamiz	Separar materia solida a granel.

En la siguiente tabla se muestra la lista de reactivos y su grado de pureza, los cuales fueron utilizados en la parte experimental.

Tabla 4.3 Reactivos.

Reactivo	Grado de Pureza
Suero Láctico	-
Caldo Lauril Sulfato	Comercial
Agar nutritivo	Comercial
Agar EMB	Comercial
Agua destilada	-
Compost	Comercial
Cepa microorganismo (E.Coli)	Aislado (pura)
Ácido acético	3.3%
Almidón de yuca	Comercial
Benzoato de sodio	Comercial
Glicerina	Comercial
Reactivo de Kovacs	1% (P/V).
Peróxido de Hidrogeno (H ₂ O ₂)	Comercial

4.2 Parte Experimental.

Las películas bioactivas fueron formuladas y elaboradas a partir de las posibles combinaciones descritas por el diseño factorial 2^K con 3 factores a 2 niveles máximo y mínimo, resulto la matriz de experimentos, descrita en tabla 4.4, con ocho número de experimentos en total.

Tabla 4.4 Matriz de experimentos del diseño experimental.

Nº. Experimento	Factores	Niveles (+) (-)	
1	Almidón	10 g	-
	Glicerina	10 g	-
	Suero Láctico	20 ml	-
2	Almidón	20 g	+
	Glicerina	10 g	-
	Suero Láctico	20 ml	-
3	Almidón	10 g	-
	Glicerina	15 g	+
	Suero Láctico	20 ml	-
4	Almidón	20 g	+
	Glicerina	15 g	+
	Suero Láctico	20 ml	-
5	Almidón	10 g	-
	Glicerina	10 g	-
	Suero Láctico	30 ml	+
6	Almidón	20 g	+
	Glicerina	10 g	-
	Suero Láctico	30 ml	+
7	Almidón	10 g	-
	Glicerina	15 g	+
	Suero Láctico	30 ml	+
8	Almidón	20 g	+
	Glicerina	15 g	+
	Suero Láctico	30 ml	+

Se aplicó el método estadístico 2^K , con el fin de obtener los valores de magnitud de efecto que tuvieron cada uno de los factores sobre las variables respuestas dureza y flexibilidad.

En la primera etapa: mezclado, se pesaron los gramos de almidón de yuca previamente tamizado figura 4.1, malla 0,5 mm para evitar grumos en la mezcla, y 0.1 gr de benzoato de sodio como agente antiséptico, se mezclaron adicionando lentamente 40 ml de agua destilada, 15ml de ácido acético y posteriormente se agregaron los gramos de glicerina.

Figura 4.1 Tamizado del almidón.



Para la segunda etapa la mezcla fue calentada en placa calefactora a 65°C por 10 minutos. La mezcla homogénea se dejó reposar hasta enfriamiento a 50°C por un período de 2 a 3 minutos. El suero láctico se filtró antes de incorporarlo para prevenir grumos en la mezcla resultante. Figura 4.2.

Figura 4.2 Filtración de suero láctico.



Tercer etapa moldeado: la mezcla resultante se extendió sobre placas de Petri de 10 cm de diámetro y láminas de papel aluminio de 10 x 20 cm para obtener un grosor, desmoldado y secado más uniforme a diferencia de moldear en vidrio figura 4.3 y figura 4.4. Figuras 10.2 y 10.3 del anexo.

Figura 4.3 Placa Petri como molde



Figura 4.4 Películas bioactivas secas moldeadas en papel aluminio.



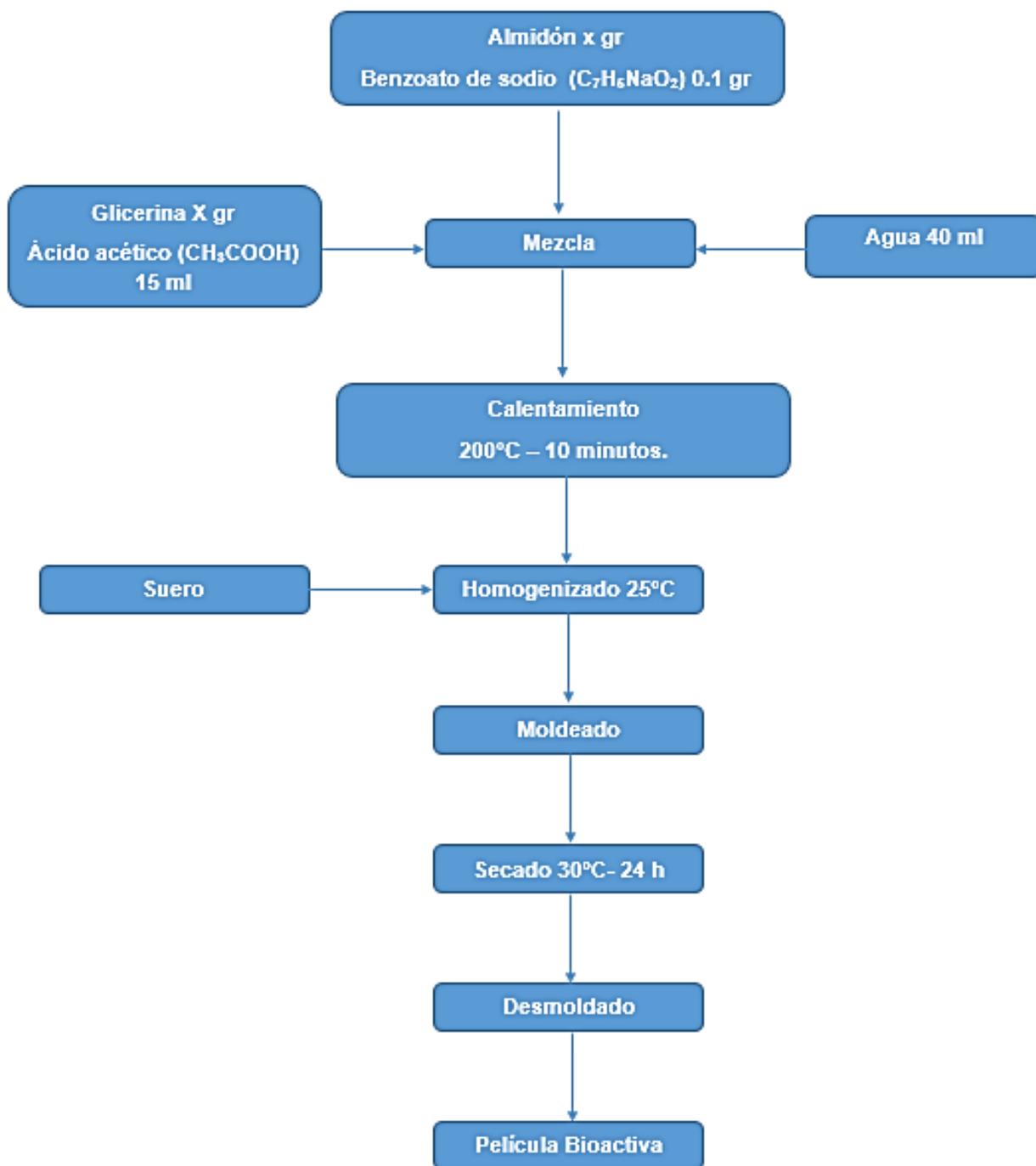
Cuarta etapa secado: Se procedió a colocar las mezclas previamente moldeadas sobre papel aluminio para su secado en un horno a 30 °C por 24 horas con aireación. Figura 4.5.

Figura 4.5 Secado de películas bioactivas.



Quinta etapa, desmoldado y producto final: pasado el tiempo de secado se procedió al desmoldado manual y así se completó el procedimiento de elaboración y obtención de las películas bioactivas. Figura 4.6.

Figura 4.6 Diagrama de bloque elaboración de la película bioactiva.



4.3. Determinación de la dureza y flexibilidad de la película.

El equipo con el que se determinó la dureza de las películas es un Durómetro shore tipo D. La escala Shore es la más utilizada mundialmente para medir la dureza de materiales blandos y semiduros como cauchos, elastómeros y plásticos, basado en la penetración de una punta troncocónica en contra de la reacción de un resorte metálico calibrado como se muestra en la Figura 4.7

Figura 4.7 Uso del durómetro Shore D para medidas de dureza.



Para la flexibilidad se realizó una prueba de estiramiento aplicando fuerza o tensión en los extremos hasta observar ruptura y se tomaron los valores de estiramiento hasta su ruptura en mm con una regla. Figura 4.8

Figura 4.8 Pruebas de flexibilidad en películas bioactivas.



Se compararon los resultados obtenidos con los valores estándar para pruebas de dureza y flexibilidad de polímeros blandos indicados en la tabla 4.5 establecidos por la ASTM (Sociedad Americana para Pruebas y Materiales).

Tabla 4.5 Valores estándares pruebas de dureza y flexibilidad polímeros blandos.

Pruebas	Indicadores	Valores estándar
Flexibilidad	mm	1-5 mm
Dureza	Escala Shore	5- 45 SH (shore hardness) Scale

Fuente: (Rosangeles, 2016).

Con los resultados de las propiedades dureza y flexibilidad de las películas bioactivas se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con ayuda del Software Minitab: Data analysis, statistical and proces improvement tools, corriendo ocho pruebas realizadas por duplicado resultando 16 experimentos.

4.4 Determinación de la eficiencia inhibitoria por la técnica kirby-bauer.

Para determinar la eficiencia de inhibición de la película bioactiva base se procedió a aplicar la técnica Kirby-Bauer con tres tipos de suero láctico fermentados siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

1. El suero láctico se caracterizó midiendo grados Brix y pH iniciales.
2. Se colocaron 500 ml de suero láctico en tres erlenmeyer y se rotularon como suero A1, suero A2 y suero A3.
3. Los sueros rotulados se trataron de la manera siguiente, suero A1 inoculado con leche agria 3% en peso, suero A2 enriquecido con melaza 3% en peso y suero A3 sin ningún tratamiento.
4. Se midieron grados Brix y pH a cada tratamiento de suero láctico durante la fermentación a temperatura ambiente.
5. Una vez obtenido el pH deseado (valor de 3) se midió grados Brix.

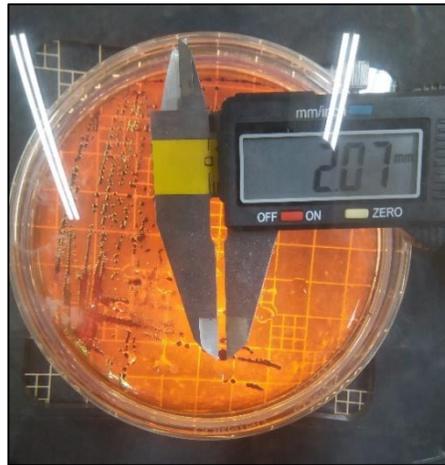
La técnica consistió en aplicar sobre un medio de agar nutritivo inoculado con un microorganismo específico, en este caso se utilizó E.coli, discos de las películas bioactivas de 6 mm de diámetro, obtenidos con un horador, figura 10.10 del anexo, incorporados con los tres tipos de sueros previamente fermentados.

Para confirmar la cepa utilizada de E coli se realizaron los siguientes pasos:

- 1) Se preparó un medio de caldo Lauril Sulfato (250 ml), se distribuyeron en 10 tubos de ensayo con 9 ml cada uno y se esterilizaron en autoclave.
- 2) De un cultivo de E.coli en agar nutritivo, se inocularon los tubos de caldo Lauril Sulfato con tubos Durham invertidos, incubando a 34°C por 48 horas para comprobar la formación de gas.
- 3) De los tubos positivos con presencia de gas, se sembró por extensión en medio EMB, incubándose a 34°C por 24 horas de esa forma se confirmó la presencia de E.coli; identificando colonias 2-3 mm de diámetro, con brillo metálico verdoso a la luz reflejada, con centro oscuro

hasta negro en luz transmitida, identificando el tipo de microorganismo con el que se estaba trabajando por morfología de las colonias. Figura 4.9

Figura 4.9 Lectura colonias de 2-3 mm en medio EMB.



- 4) De una colonia aislada en el medio EMB, se diluyó en agua estéril hasta una escala 0,5 de McFarland para sembrar en placas de Petri y realizar la técnica de Kirby Bauer, figura 4.10

Figura 4.10 Dilución a escala 0,5 de McFarland.



- 5) De la colonia aislada se sembró en tubos inclinados de agar nutritivo para realizar pruebas de identificación morfológica y bioquímica para E.coli: Tinción Gram (-) figura 4.11, morfología (bacilos) figura 4.12, Catalasa (+) figura 4.13, oxidasa (-) figura 4.14, motilidad (+).

Figura 4.11 Prueba Tinción Gram, negativa para E.coli.

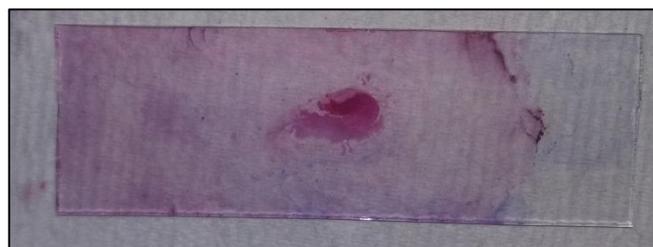


Figura 4.12 Morfología en forma de bacilos para microorganismos E.coli.

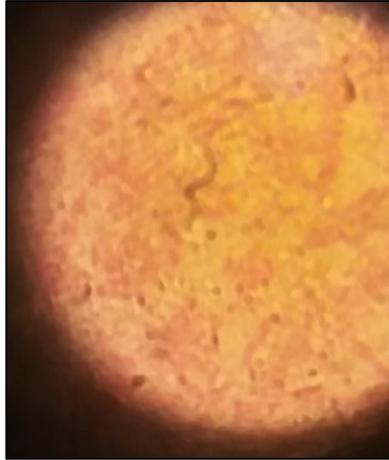
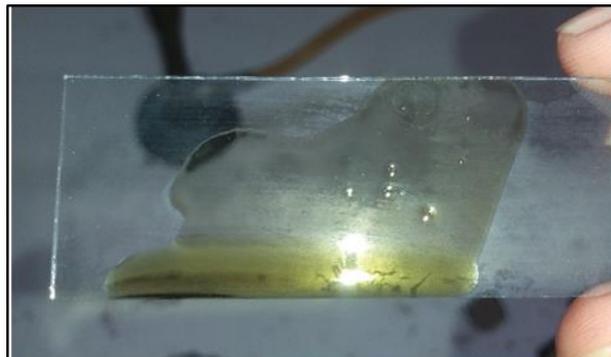


Figura 4.13 Prueba catalasa para cepa E.coli.



Figura 4.14 Prueba oxidasa para cepa E.coli.



De la dilución obtenida a 0,5 en la escala McFarland se sembró en placas de Petri con medio de cultivo de agar nutritivo 0.2 ml de solución.

Se distribuyó en el medio con un asa acodada por encima del nivel del contenido de la placa y se rotó contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo, figura 4.15, permitiendo que la superficie del medio sembrado se secase durante 5 minutos, manteniendo la caja con la tapa cerrada.

Figura 4.15 Siembra de la dilución en medio agar nutritivo.



Discos de 6 mm de diámetro de películas tratadas se colocaron con una pinza estéril, presionando ligeramente sobre la superficie del medio para asegurar un contacto uniforme con la bacteria en prueba; colocando 1 disco en el centro de cada placa.

Se Incubaron las placas a 34°C por 24 horas. Posteriormente se procedió a leer los halos obtenidos en el medio después de 18-24 horas de incubación.

Se midió la zona de inhibición de cada disco contra una superficie oscura bajo luz reflejada midiendo el diámetro de la zona, incluyendo los 6 mm del disco, con una regla y un calibrador digital.

El punto final de inhibición completa del crecimiento se estimó a simple vista. Las lecturas obtenidas se clasificaron en Resistentes, Intermedio o Sensible, siendo resistente ≤ 6 mm, Intermedio >6 mm, sensible ≥ 10 mm estas categorías indicarán que tan efectivo es el antibiótico presente en el disco ante el microorganismo utilizado. (R.Taroco, 2020).

4.5. Determinación del tiempo de biodegradación de las películas bioactivas.

Para esta prueba se realizó un control de peso y análisis de imagen a películas bioactivas óptimas y con el suero más eficiente determinado en la prueba del halo, con el fin de simular su tiempo de biodegradación al medio ambiente, para eso fue necesario montar un sistema sobre compost comercial al aire libre, monitoreando su peso y textura por un aumento de imagen.

Los datos del peso se tomaron a diferentes tiempos (0, 5, 10,15, 20,25, 21, y 30 días) para realizar un control de peso y analizar su comportamiento. Figura 4.16

Figura 4.16 Control de peso película bioactiva.



A los tiempos de 0 y 30 días aproximadamente, se realizó un análisis de imagen mediante un microscopio óptico figura 4.17, para observar la desestructuración de las películas. Se obtuvieron imágenes en aumento 10x antes y después de ser expuestas a la intemperie, figuras 4.18-4.19

Figura 4.17 Análisis de imagen mediante microscopio óptico.



Figura 4.18 Película bioactiva antes de ser expuesta a la intemperie.

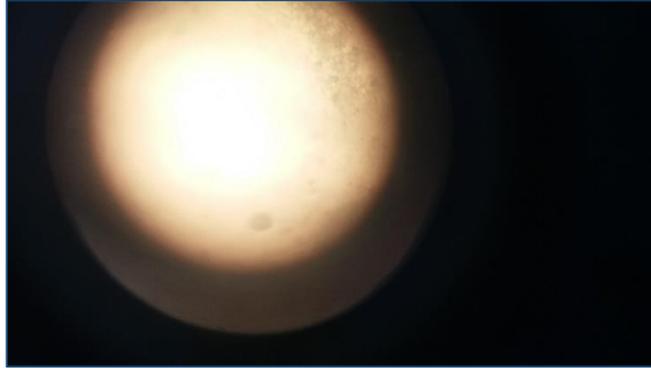


Figura 4.19 película bioactiva después de prueba de envejecimiento.



V. Análisis y Discusión de Resultados.

5.1 Formulaciones de las películas bioactivas elaboradas a distintas concentraciones de almidón, suero y glicerina.

La composición final de cada una de las películas formuladas a partir de la mezcla de almidón, glicerina, suero láctico, benzoato de sodio, agua ácido y acético.

Tabla 5.1 Composición %P/P de las películas bioactivas.

Componente/ formulación	1	2	3	4	5	6	7	8
Almidón	11.43	20.51	10.81	19.51	10.27	18.63	9.77	17.80
Glicerina	11.43	10.26	16.22	14.63	10.27	9.32	14.66	13.35
Suero láctico	19.91	17.87	18.83	16.10	28	25.40	26.63	24.27
Benzoato de sodio	0.11	0.10	0.11	0.097	0.10	0.093	0.098	0.10
Agua	41.94	37.64	39.68	35.80	37.70	34.19	36.84	32.67
Ácido acético	15.18	13.62	14.36	12.96	13.64	12.37	12.98	11.82
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100	100

Película bioactiva n° 1 estuvo compuesta por: 10 g de almidón, 10 g de glicerina y 20 ml de suero láctico. Al notar un secado uniforme se procedió a sacar del horno, se observó en la película bastante transparencia y uniformidad en su textura.

La película bioactiva n° 2 compuesta por: 20 g de almidón, 10 g de glicerina y 20 ml de suero láctico. Al notar un secado uniforme se procedió a sacar del horno, se observó en la película bastante transparencia y uniformidad en su textura, un poco quebradiza al tacto y poco flexible.

La n° 3 compuesta por: 10 g de almidón, 15 g de glicerina y 20 ml de suero láctico. Al notar un secado uniforme se procedió a sacar del horno, se observó en la película bastante transparencia y uniformidad en su textura, su composición asemeja a experimento n°1 por tanto se obtuvo una similar estructura y propiedades.

En la n° 4 compuesta por: 20 g de almidón, 15 g de glicerina y 20 ml de suero láctico. Al notar un secado uniforme se procedió a sacar del horno, se observó en la película bastante transparencia y uniformidad en su textura, se notó una mejor maleabilidad pero aun ligeramente quebradiza.

Con la n° 5 se usaron: 10 g de almidón, 10 g de glicerina y 30 ml de suero láctico. Al notar un secado uniforme se procedió a sacar del horno, se observó en la película bastante transparencia, pero una alta viscosidad y deformidad en su estructura muy pegajosa y dificultaba su manejo.

La n° 6 su composición fue: 20 g de almidón, 10 g de glicerina y 30 ml de suero láctico. Al notar un secado uniforme se procedió a sacar del horno, se observó en la película bastante transparencia y uniformidad en su textura, aun un poco quebradiza y poco maleable.

Los componentes de la n°7: 10 g de almidón, 15 g de glicerina y 30 ml de suero láctico. Al notar un secado uniforme se procedió a sacar del horno, se observó en la película bastante transparencia y uniformidad en su textura, bastante maleabilidad pero se notó muy húmeda lo cual dificultaba su maleabilidad.

Y en la n° 8 su formulación: 20 g de almidón, 15 g de glicerina y 30 ml de suero láctico. Al notar un secado uniforme se procedió a sacar del horno, se observó en la película bastante transparencia y uniformidad en su textura, bastante maleabilidad y poco quebradiza.

5.2 Resultados de mediciones de dureza a las distintas formulaciones.

Las pruebas se realizaron por duplicado a cada una de las películas bioactivas, en la tabla 5.2 se indican los valores determinados.

Tabla 5.2 Valores de dureza en las distintas formulaciones.

película bioactiva N°	Valores de dureza 1 (shore)	Valores de dureza 2 (shore)
1	3.1	3.4
2	5.8	5.2
3	3.3	2.3
4	9.8	11.1
5	5.3	6.1
6	5.4	6.2
7	3.4	3.5
8	9.7	9.8

En la tabla 5.3 se presentan los valores totales de dureza en cada combinación de tratamientos de acuerdo con el diseño experimental definido, siendo los factores del diseño experimental (A= cantidad de Almidón, B= cantidad de Glicerina, C=cantidad de Suero láctico), siendo n= 2 números de réplicas.

Tabla 5.3 Datos de Dureza respecto a la combinación de tratamientos y el diseño experimental.

Combinación de tratamiento	Factores de diseño			Dureza		Total
	A	B	C			
(1)	-1	-1	-1	3.1	3.4	6.5
a	1	-1	-1	5.8	5.2	11
b	-1	1	-1	3.3	2.3	5.6
ab	1	1	-1	9.8	11.1	20.90
c	-1	-1	1	5.3	6.1	11.4
ac	1	-1	1	5.4	6.2	11.6
bc	-1	1	1	3.4	3.5	6.9
abc	1	1	1	9.7	9.8	19.5

Los efectos principales se estimaron usando las ecuaciones 3.1 a 3.6 del marco teórico.

Recopilando los resultados tenemos:

$$A = 4.07 \quad B = 1.55, \quad AB = 2.09 \quad C = 0.67 \quad AC = -0.87 \quad ABC = 0.2$$

Los resultados indicaron que el factor A (cantidad de almidón) es el que tiene una mayor magnitud de efecto sobre los resultados de dureza de las películas bioactivas.

Para corroborar los resultados se analizaron los datos en el software minitab y se obtuvo lo siguiente:

Diseño factorial completo: Resumen del diseño

Factores: 3 Diseño de la base: 3; 8
 Corridas: 16 Réplicas: 2
 Bloques: 1 Puntos centrales (total): 0

Regresión factorial: Respuesta vs. A; B; C Análisis de Varianza (ANOVA).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	116.678	16.6682	60.07	0.000
Lineal	3	77.855	25.9517	93.52	0.000
A	1	66.422	66.4225	239.36	0.000
B	1	9.610	9.6100	34.63	0.000
C	1	1.823	1.8225	6.57	0.034
Interacciones de 2 términos	3	38.662	12.8875	46.44	0.000
A*B	1	33.640	33.6400	121.23	0.000
A*C	1	3.063	3.0625	11.04	0.011
B*C	1	1.960	1.9600	7.06	0.029
Interacciones de 3 términos	1	0.160	0.1600	0.58	0.469
A*B*C	1	0.160	0.1600	0.58	0.469
Error	8	2.220	0.2775		
Total	15	118.898			

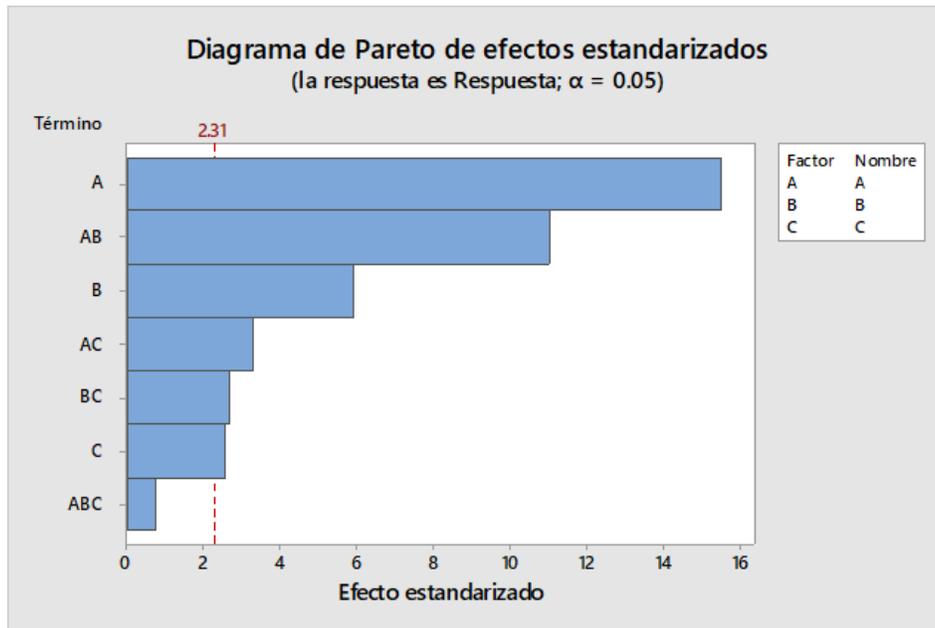
Coefficientes codificados:

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		5.837	0.132	44.33	0.000	
A	4.075	2.038	0.132	15.47	0.000	1.00
B	1.550	0.775	0.132	5.88	0.000	1.00
C	0.675	0.338	0.132	2.56	0.034	1.00
A*B	2.900	1.450	0.132	11.01	0.000	1.00
A*C	-0.875	-0.438	0.132	-3.32	0.011	1.00
B*C	-0.700	-0.350	0.132	-2.66	0.029	1.00
A*B*C	0.200	0.100	0.132	0.76	0.469	1.00

En la columna de efectos se pueden corroborar los resultados de los efectos calculados con las ecuaciones 3.1-3-6.

En la figura 5.1 se puede apreciar el nivel de efecto de cada uno de los factores y sus posibles interacciones.

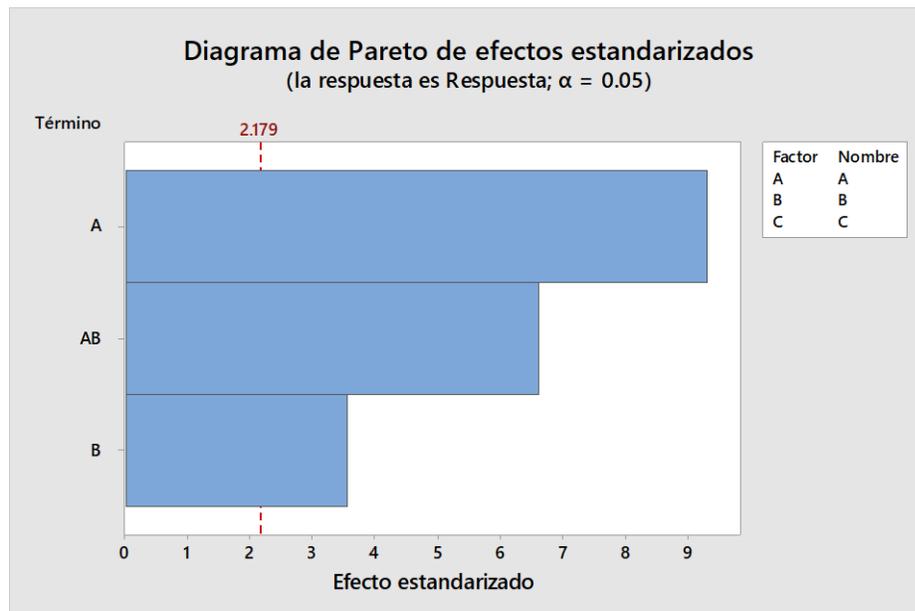
Figura 5.1 Diagrama de Pareto efectos de Dureza.



El diagrama muestra que el factor A es el que representa una mayor magnitud de efecto sobre los resultados de dureza, seguido de la interacción de los factores AB y el factor B.

Realizando los ajustes de interacciones se obtiene, figura 5.2

Figura 5.2 Diagrama de Pareto ajustado para Dureza.

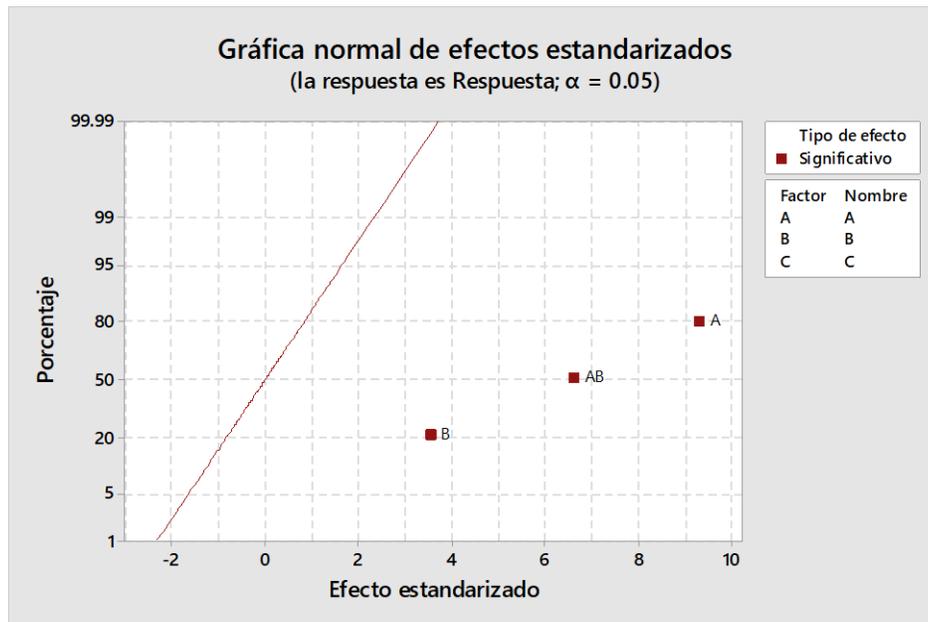


Resumen del modelo para el ajuste de interacciones:

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.876784	92.24%	90.30%	86.21%

Una vez ajustado el modelo se pueden notar las interacciones gráficamente, figura 5.3

Figura 5.3 Grafica de efectos para Dureza.



En la gráfica 5.3 se puede notar y confirmar como el factor A (cantidad de almidón) es el que tiene mayor efecto sobre la variable respuesta de dureza en el material, seguido de la interacción AB y factor B.

5.3 Resultados de mediciones de flexibilidad a las distintas formulaciones.

Las pruebas se realizaron por duplicado a cada una de las películas bioactivas, en la tabla 5.4 se indican los valores determinados.

Tabla 5.4 valores de estiramiento para pruebas de flexibilidad.

película bioactiva N°	Valores de estiramiento 1 (mm)	Valores de estiramiento 2 (mm)
1	4	3
2	1	2
3	4	3
4	2	3
5	3	2
6	2	3
7	5	4
8	5	6

En la tabla 5.5 se determinaron los valores totales de flexibilidad en cada combinación de tratamientos de acuerdo con el diseño experimental definido, siendo los factores del diseño experimental (A= cantidad de Almidón, B= cantidad de Glicerina, C=cantidad de Suero láctico), siendo n= 2 números de réplicas.

Tabla 5.5 Datos de Flexibilidad respecto a la combinación de tratamientos y el diseño experimental.

Combinación de tratamiento	Factores de diseño			Flexibilidad		Total
	A	B	C			
(1)	-1	-1	-1	4	3	7
a	1	-1	-1	1	2	3
b	-1	1	-1	4	5	9
ab	1	1	-1	2	3	5
c	-1	-1	1	3	2	5
ac	1	-1	1	2	3	5
bc	-1	1	1	5	4	9
abc	1	1	1	5	6	11

Los efectos principales se estimaron usando las ecuaciones 3.1 a 3.6 del marco teórico

Recopilando los resultados tenemos:

$$A = -0.75, B = 1.75, AB = 0.25; C = 0.75, AC = 0.75, ABC = 0.25$$

Los resultados indicaron que el factor B (cantidad de glicerina) es el que tiene una mayor magnitud de efecto sobre los resultados de flexibilidad en las películas bioactivas.

Haciendo uso del software Minitab se analizaron y corroboraron los resultados anteriores:

Diseño factorial completo: resumen del diseño

Factores: 3 Diseño de la base: 3; 8

Corridas: 16 Réplicas: 2

Bloques: 1 Puntos centrales (total): 0

Regresión factorial: Respuesta vs. A; B; C Análisis de Varianza (ANOVA).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	25.7500	3.6786	7.36	0.006
Lineal	3	16.7500	5.5833	11.17	0.003
A	1	2.2500	2.2500	4.50	0.067
B	1	12.2500	12.2500	24.50	0.001
C	1	2.2500	2.2500	4.50	0.067
Interacciones de 2 términos	3	8.7500	2.9167	5.83	0.021
A*B	1	0.2500	0.2500	0.50	0.500
A*C	1	6.2500	6.2500	12.50	0.008
B*C	1	2.2500	2.2500	4.50	0.067

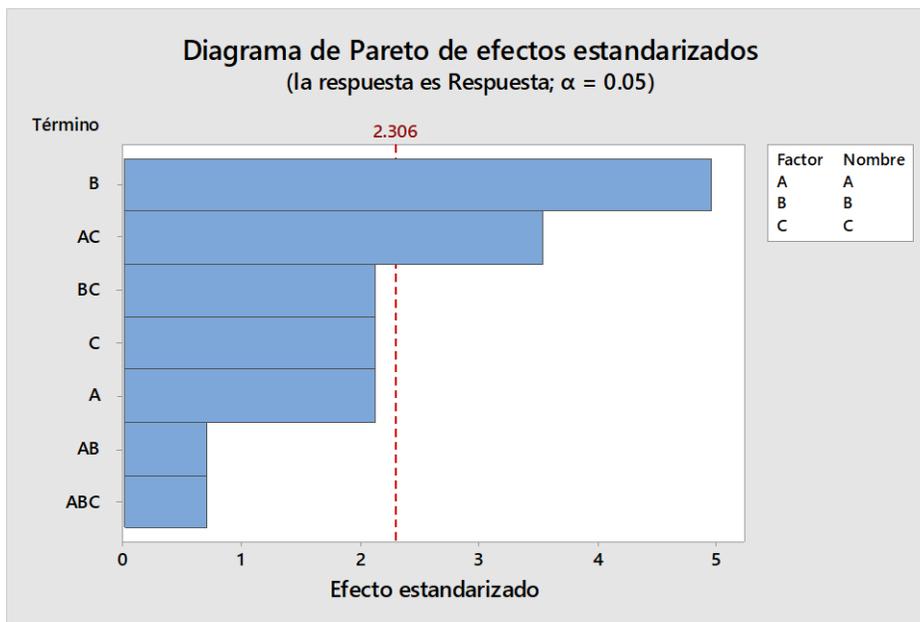
Interacciones de 3 términos	1	0.2500	0.2500	0.50	0.500
A*B*C	1	0.2500	0.2500	0.50	0.500
Error	8	4.0000	0.5000		
Total	15	29.7500			

Como se puede notar en la columna de los valores p los valores del factor B y la interacción AC son los valores que más se alejan a 0.05, resultando los factores significativos. Figura 5.4

Coefficientes codificados:

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		3.375	0.196	17.23	0.000	
A	-0.750	-0.375	0.196	-1.91	0.082	1.00
B	1.750	0.875	0.196	4.47	0.001	1.00
C	0.750	0.375	0.196	1.91	0.082	1.00
A*C	1.250	0.625	0.196	3.19	0.009	1.00

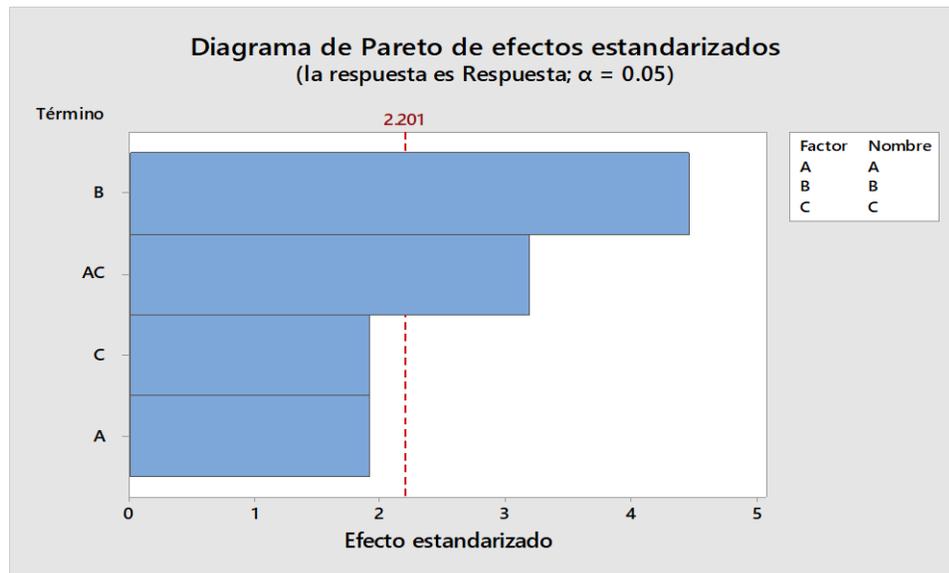
Figura 5.4 Diagrama de Pareto para el factor Flexibilidad.



En la gráfica el factor B y la interacción AC son los que representan un efecto significativo sobre la variable respuesta flexibilidad.

Ajustando los valores de las interacciones no significativas se tiene:

Figura 5.5 Diagrama de Pareto ajustado para Flexibilidad.

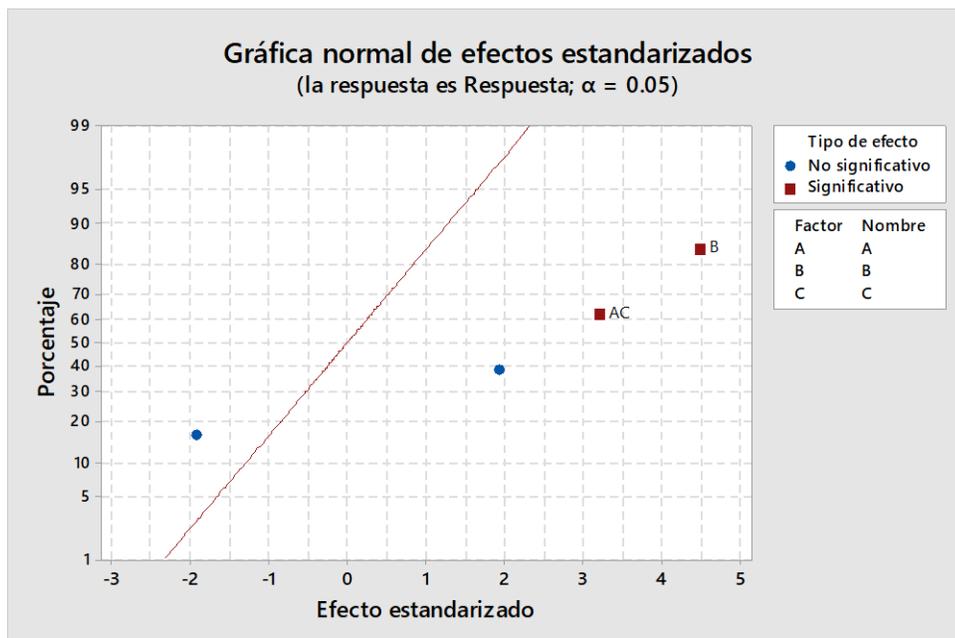


Una vez ajustado el modelo se puede apreciar el resumen del modelo: lo que se busca es que los valores de R se ajusten lo más posible y tengan valores próximos, tenemos:

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.783349	77.31%	69.06%	52.00%

Para conocer los factores que interactúan sobre la variable respuesta flexibilidad, se extrae la gráfica de efectos estandarizados, figura 5.6

Figura 5.6 Grafica de efectos para el factor Flexibilidad.



A como se nota y confirma en la gráfica el factor B (cantidad de Glicerina) es el factor más significativo sobre la variable respuesta flexibilidad. Seguido de la interacción de factores AC.

5.4 Resultados de actividad inhibitoria de las películas bioactivas por la técnica Kirby-Bauer.

Los datos de la caracterización obtenida, en los sueros lácticos fermentados, de pH y grados brix se resumen en las tablas 5.6-5.7

Tabla 5.6 Resultados grados brix y pH del suero Láctico.

1ra corrida				
Suero láctico	Grados Brix		pH	
	Inicial	Final	Inicial	Final
A1	5.3	5.2	5.12	3.88
A2	5.3	5.3	5.20	3.82
A3	5.3	5.1	5.32	3.89

Tabla 5.7 Resultados grados Brix y pH del suero Láctico.

2da corrida				
Suero láctico	Grados Brix		pH	
	Inicial	Final	Inicial	Final
A1	5.3	5.2	5.11	3.75
A2	10	9	5.50	3.88
A3	6.5	6.3	5.73	3.80

Hubo una ligera disminución de los grados Brix en todos los tratamientos de sueros fermentados, lo que indica un consumo de solidos presentes y disminución drástica del pH, indicadores de la actividad biológica presente en los sueros lácticos. El comportamiento grafico se ilustra en las figuras 10.4-10.9 del anexo.

Los halos obtenidos fueron medidos con una regla tomando los datos directamente sobre la superficie de las placas Petri, colocadas sobre un contador de colonias a contra luz para poder obtener una mejor vista y precisión en las medidas, figura 5.7.

Figura 5.7 Halos de inhibición, discos con suero A1 ambas corridas.



a. primera corrida



b. segunda corrida

Figura 5.8 Halo de inhibición, disco con suero A2, primera corrida.



Figura 5.9 Halo de inhibición, disco con suero A3, primera corrida



En la Tabla 5.8 se presentan los datos tomados de los halos de inhibición.

Tabla 5.8 Halos de Inhibición obtenidos con diferentes tipos de discos.

Discos	Inhibición (mm)			Interpretación
	Corrida uno	Corrida dos	Promedio (mm)	
DA1 (Inoculo = leche agria)	11	10	10.5	Sensible
DA2 (nutriente = melaza)	7	4	5.5	Resistente
DA3 (suero simple)	6	5	5.5	Resistente

Las medidas obtenidas en los halos de inhibición fueron satisfactorias, el suero A1 (inoculo) fue el mejor resultado, indicado en la tabla 5.8 la mayor medida en promedio de 10.5 mm de inhibición, lo que nos indica que los microorganismos del tipo E.coli son sensibles a los metabolitos presentes en el suero, que jugaron el papel de antibiótico ante las cepas de este género.

En la tabla 5.9 se resumen los valores de pH finales en las películas bioactivas, estos valores indican el grado de acidez con el que cuentan cada una de las formulaciones incorporadas con cada uno de los sueros clasificándolos como PA1, PA2 y PA3 (véase nomenclatura), correspondientes al tipo de suero que se incorporó.

Tabla 5.9 pH final en películas bioactivas incorporadas con suero fermentado.

Películas Bioactivas	pH
PA1	3.82
PA2	3.87
PA3	3.79

Para medir el pH se diluyó 0.08 gr de cada película PA1, PA2 y PA3 en 10ml de agua destilada y previamente acondicionada con Hidróxido de sodio hasta pH neutro. Figuras 5.10- 5.11.

Figura 5.10 acondicionamiento de agua destilada.

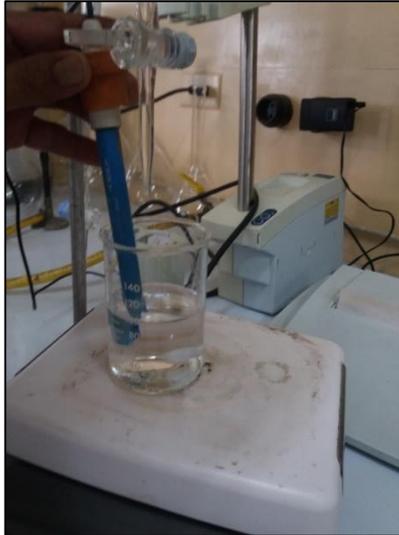


Figura 5.11 Dilución de películas en agua destilada pH neutro.



Las películas bioactiva PA2 y PA3 contenidas con un suero pH final 3.87 y 3.79 respectivamente no cumplieron una función inhibitoria satisfactoria, lo que indica que la razón de inhibición biológica de la PA1 es el inculo que se le agregó para su fermentación y el tipo de metabolito que se desarrolló en el suero lácteo.

5.5 Determinación del tiempo de biodegradación por envejecimiento.

Para esta prueba fue necesario elaborar dos películas bioactivas con la formula n° 8 más el suero A1 (suero simple + inóculo), considerando la formulas y suero más eficientes ante la inhibición de microorganismos patógenos como el E.coli.

Las películas bioactivas se colocaron sobre una base de compost comercial, se tomaron datos del tiempo y pesos iniciales secuenciales por un periodo de 30 días, tabla 5.10.

Tabla 5.10 Control de pérdida de peso en películas bioactivas.

Tiempo (días)	Peso película PE.1 (gr)	Peso película PE.2 (gr)
0	15.25	13.07
5	15.24	13.05
10	12.44	12.17
15	12.47	12.32
20	12.8	12.6
25	12.2	12.1
30	11.7	11.5

A continuación se colocó en una bandeja conteniendo las películas bioactivas sobre un techado, de esta forma simular la exposición a la intemperie, figura 5.12.

Figura 5.12 Películas bioactivas a la intemperie.



Se observó una disminución secuencial de peso en las películas bioactivas, lo que nos indica que las películas PE1 y PE2 perdieron peso en un mes de prueba. Si se mantuvieran las películas en dichas condiciones el tiempo estimado para su biodegradación total se determinó con la ecuación 5.1:

Ecuación 5.1 Tiempo estimado total de biodegradación

$$T = \frac{\text{Peso inicial película bioactiva}}{\text{Peso perdido en 1 mes}}$$

Para PE.1

$$\text{Peso perdido en 1 mes} = (\text{peso T0} - \text{peso T30}) = 15.25 - 11.7 = 3.55 \sim 4 \text{ gr}$$

Sustituyendo valores.

$$T = \frac{15.25 \text{ g}}{4.0 \text{ g/1mes}} = 3.81 \sim 4 \text{ meses}$$

Para PE.2.

$$T = \frac{\text{Peso inicial película bioactiva}}{\text{Peso perdido en 1 mes}}$$

$$\text{Peso perdido en 1 mes} = (\text{peso T0} - \text{peso T30}) = 13.07 - 11.5 = 1.57\text{gr} \sim 2 \text{ gr}$$

Sustituyendo valores.

$$T = \frac{13.07 \text{ gr}}{2 \text{ gr/1mes}} = 6.5 \sim 6 \text{ meses}$$

Los tiempos calculados nos indican que será necesario alrededor de 4 meses para la película bioactiva PE.1 y 6 meses para la película bioactiva PE.2 lograr su completa biodegradación. En las figuras 5.13-5.14 se puede apreciar el comportamiento gráfico de la pérdida de peso en cada película.

Figura 5.13 Control de peso en película PE.1

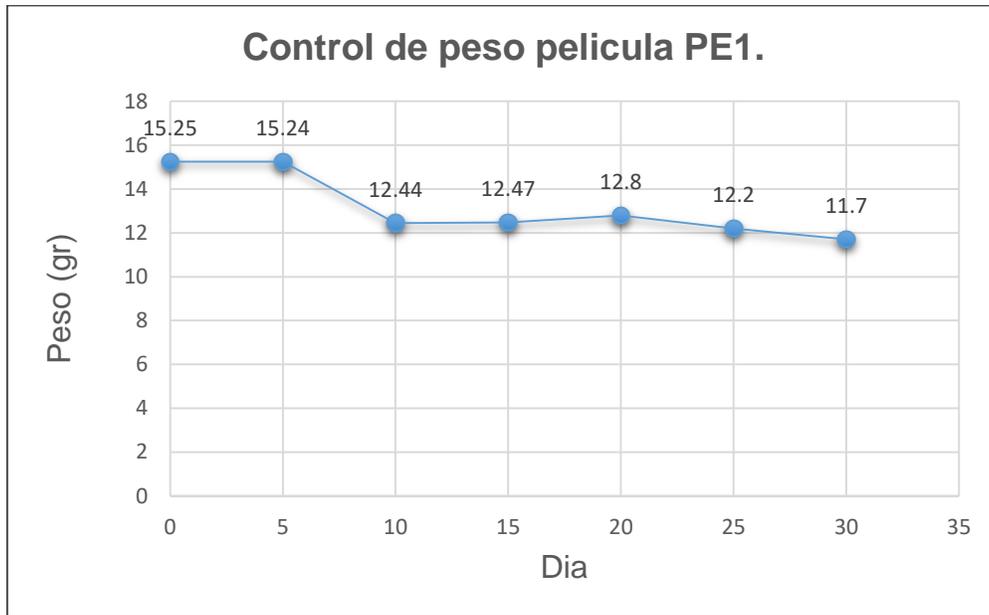
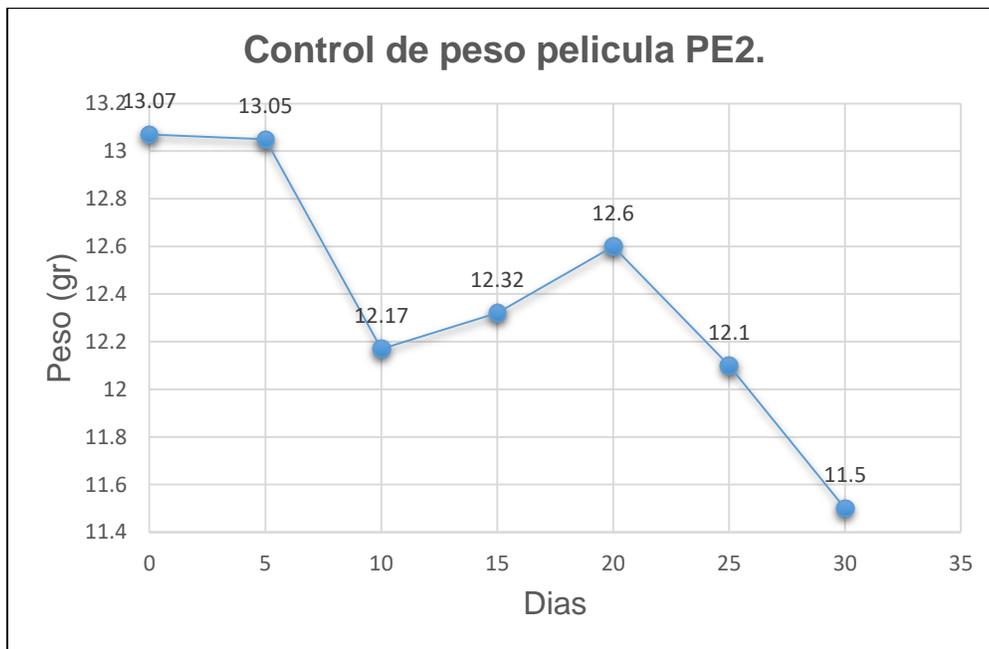


Figura 5.14 Control peso en película PE.2



En los días 15 a 20 ambas películas (PE.1 y PE.2) presentaron un ligero de aumento en peso, por precipitaciones, durante el mes de prueba hubo una precipitación en promedio de 1.3% y del 2% el día 20 de Marzo. (Weather Atlas, 2020).

V. Conclusiones.

- Se determinó la formulación base de la película bioactiva, resultando la formula número ocho del diseño experimental con las mejores características de Dureza y flexibilidad.
- Se determinó la actividad inhibitoria de la película bioactiva número ocho con la aplicación de la técnica kirby-Bauer, frente a un microorganismo del genero E.coli, obteniendo un mayor halo de inhibición con la incorporación del suero A1.
- El tiempo de biodegradación de la película bioactiva inhibitoria cumplió con los estándares requeridos por las normas europeas actuales, degradándose en un 90% de su peso inicial en los primeros 6 meses a la intemperie.

VII. Recomendaciones.

Para la realización de futuros estudios relacionados con la aplicación de películas bioactivas como inhibidoras microbianas, se notan las siguientes recomendaciones:

- Incorporar el metabolito obtenido a partir de suero láctico de esta investigación, en otras formulaciones de películas orgánicas y sintéticas con el fin de evaluar su acción inhibitoria.
- Tipificar los metabolitos obtenidos en las fermentaciones de suero lácteo que actúan como inhibidores del crecimiento microbiano ante un microorganismo conocido (E.coli).
- Realizar pruebas con el metabolito obtenido frente a otros tipos de microorganismos patógenos comunes en los alimentos y conocer el grado de resistencia.
- Determinar el tiempo de efectividad de la película bioactiva sobre un alimento, con el fin de conocer su vida útil.
- Realizar un estudio de factibilidad para la producción a mayor escala de la película bioactiva óptima de este estudio.

VIII. Nomenclatura.

Tipos de suero:

A1= (fermentado junto a un inóculo de leche agria comercial en porción 5% en peso).

A2= (fermentado con un 5% en peso de melaza).

A3= (suero simple).

Diseño experimental 2^K :

K= Cantidad de factores.

2 = número de niveles (+) (-).

S= desviación estándar.

Variables:

X= cantidad variante de materia utilizada.

A= Almidón.

B= Glicerina.

C=Suero.

DA1= disco inhibitorio con suero A1.

DA2= disco inhibitorio con suero A2.

DA3= disco inhibitorio con disco A3.

PA1= película bioactiva con suero A1.

PA2= película bioactiva con suero A2.

PA3= película bioactiva con suero A3.

PE.1= control peso película bioactiva número uno.

PE.2= control peso película bioactiva número dos.

T= tiempo total de biodegradación para películas bioactivas.

%P/P = composición porcentual relación peso/peso.

Variales magnitud de efecto Dureza:

(1)= 6.5

a= 11

b= 5.6

ab= 20.90

c = 11.4

ac = 11.6

bc= 6.9

abc = 19.5

Variables prueba magnitud de efecto flexibilidad:

(1)= 7

a= 3

b= 9

ab= 5

c = 5

ac = 5

bc= 9

abc= 11

IX. Referencias.

- Academic.edu. (11 de julio de 2020). *Diseño Factorial 2k*. Obtenido de <http://academic.uprm.edu/dgonzalez/6005/factoriales%20%20a%20la%20k.pdf>
- Ana Olmos, J. N. (24 de Agosto de 2010). *Procedimientos en microbiología clínica*. Obtenido de www.seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf
- Arevalo, N., & Katiushka. (1996). *Elaboracion de Plasticos Biodegradables a partir de poli sacaridos y su Estudio de Biodegradacion a Nivel de Laboratorio y Campo*. Monterrey,NL.Mexico.
- Aula.edu. (12 de julio de 2020). *Ensayos de dureza*. Obtenido de <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/centros-tic/21700290/helvia/aula/archivos/repositorio/0/11/html/dureza.html>
- Axelsson, (. s. (2011). Bacterias lacticas :impoprtancia en los alimentos y efectos en la salud. *ISSN200-07113*, 16.
- Bejarano, N. (6 de Mayo de 2018). *Estudio de las Propiedades Mecanicas de un Biopolimero a Partir del Contenido de Almidón de Cascara de Platano*. Obtenido de <http://bibliotecas.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/7578/MTbemanl.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Bernal, M., & Guzman., M. (1984). *El antiograma de discos Normalizacion de la Tecnica de Kirby-Bauer*. Bogoda: Biomedica.
- Biotech. (26 de Agosto de 2020). *Un envase con extracto de remolacha mejora la conservacion de los alimentos*. Obtenido de <http://biotech-spain.com/es/articulos/un-envase-con-extracto-de-remolacha-mejora-la-conservaci-n-de-los-alimentos/>
- Blog.nutrienda. (2 de Junio de 2020). *¿Pará que sirve el Benzoato de Sodio? Beneficios y propiedades*. Obtenido de <https://blog.nutrienda.com/benzoato-de-sodio/>
- Britania. (24 de Agosto de 2020). *Laboratorios britania S.A*. Obtenido de www.britanialab.com
- Calle, A., & Ximena. (2013). *Fabricacipon de Peliculas Biodegradables para productos carnicos,a partir de biopolimeros con mezclas de aceites esenciales antimicrobianos*. Cuenca-Ecuador.
- Chattererjee, (. s. (2011). *Producción de nisina por lactococcus lactis uq2 usando suero lácteo suplementa-*. Queretaro: CienciaUAQ.
- Cigna. (26 de Enero de 2020). *Infección por E. coli por los alimentos o el agua*. Obtenido de <https://www.cigna.com/individuals-families/health-wellness/hw-en-espanol/temas-de-salud/infeccion-por-e-coli-por-los-alimentos-o-el-agua-hw133795>
- Condalab. (29 de Septiembre de 2019). *Condalab*. Obtenido de www.condalab.com
- Curiosoando. (27 de julio de 2020). *¿Que son los metabolitos?* Obtenido de <https://curiosoando.com/que-son-los-metabolitos>

- Decologia.info. (01 de julio de 2019). *Contaminación Plástica, Definición, Causas, Efectos, Prevención Y Más*. Obtenido de <https://decologia.info/medio-ambiente/contaminacion-plastica/>
- EcuRed. (01 de julio de 2019). *Metabolito*. Obtenido de <https://www.ecured.cu/Metabolito>
- Eurolab laboratory services. (12 de Julio de 2020). *Flexibilidad Pruebas de Fuerza de Flexion*. Obtenido de <https://www.eurolab.com.tr/es/sektorel-test-ve-analizler/yapi-malzemeleri-testleri/esneklik-egilme-dayanimi-testleri>
- Garcia, A. (8 de Enero de 2015). Obtencion de un polimero biodegradable a partir de almidon de maiz. Santa Tecla, El Salvador, Salvador.
- Gladys, R. (2006). Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. . Medellin, Colombia.
- Gonzales, A. ..., & Velinda, C. (2017). Bacteriocinas de Bacterias Acido Lácticas: Mecanismos de Acción y Actividad Antimicrobiana Contra Patógenos en Quesos. *Inverciencia*, 340-346.
- Ingemecanica. (12 de Julio de 2020). *Medición de la Dureza de los Materiales*. Obtenido de https://ingemecanica.com/tutoriales/tabla_dureza.html
- Jose, M. (2009). Influencia del tiempo de almacenamiento en las propiedades estructurales de un almidón termoplástico de yuca (TPS). . Mexico.
- Larry M. Bush, M. F. (Abril de 2018). *Introducción a las bacterias*. Obtenido de <https://www.msmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-introducci%C3%B3n/introducci%C3%B3n-a-las-bacterias>
- Lopez, B. D. (2016). *Efecto de la aplicacion de pelicula de quitosano en el tiempo de vida util del tomate*. Managua, Nicaragua: UNI.
- Núñez, J. (Septiembre de 2017). *Determinación de la correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en*. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26334/1/BQ%20135.pdf>
- Packaging. (2020). Determinación de la biodegradabilidad y compostabilidad de los materiales plásticos. *Packaging*.
- R.Taroco, V. S. (27 de Mayo de 2020). *Metodos de estudios sensibilidad de antiogramas*. Obtenido de *Metodos de estudios sensibilidad de antiogramas*: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- Ramirez, (. s. (2007). bacterias lacticas:Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *ISSN*, 16.
- Revista de Psicología de la PUCP. (11 de Septiembre de 2003). *Magnitud del Efecto: Una guía para investigadores*. Obtenido de <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=prueba+magnitud+de+efecto>

- Rocasyminerales. (12 de julio de 2020). *DUREZA SHORE*. Obtenido de <https://www.rocasymnerales.net/dureza-shore/>
- Rojas, P., & Paula. (12 de 02 de 2013). *Evaluación de una Película Bioactiva Frente a una Mezcla de Cinco Cepas de Listeria monocytogenes en Salmon Ahumado en Frio*. Obtenido de <file:///C:/Users/usuario/Desktop/metodologia/obtencion%20componentes/biopelícula%20activa.pdf>
- Rosangeles, A. (2016). *Obtención de biopolímero plástico a partir del almidón de malanga por el método de polimerización*. Managua-Nicaragua.
- Scielo. (5 de Septiembre de 2012). *Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad*. Obtenido de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182013000400011
- Shirai, (. s. (2011). ISSN. *Bacterias ácido lácticas: importancia en los alimentos y efectos en la salud*, 16.
- Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM). (27 de Mayo de 2020). Obtenido de Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM).: <http://www.elempaque.com/temas/Biodegradabilidad-ambiental-en-materiales-plasticos,-concepto,-medicion,-uso-y-consecuencias+4084096?pagina=3>
- Tecnología de los plásticos. (3 de Agosto de 2020). *Tecnología de los plásticos-blog*. Obtenido de <https://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2011/06/propiedades-ambientales.html>
- Vicente, L. (2010). *Bioplásticos: Efectos e impactos sobre la gestión de envases*. España, Madrid.
- Weather Atlas. (2 de Octubre de 2020). *Previsión meteorológica y clima mensual*. Obtenido de <https://www.weather-atlas.com/es/nicaragua/managua-clima>
- WHO. (31 de Octubre de 2015). *Organización mundial de la salud*. Obtenido de Organización mundial de la salud.: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Woodward spanish. (12 de Julio de 2020). *Los materiales y sus propiedades*. Obtenido de <https://www.spanish.cl/ciencias-naturales/materiales-propiedades.htm#:~:text=Flexibilidad%20de%20los%20materiales,material%20que%20se%20dobla%20f%C3%A1cilmente>.

X. Anexos.

Tabla 10.1 Usos comunes del suero láctico.

Aplicaciones en	Algunos beneficios
Productos de panadería como croissants, tortas	Incrementar el valor nutricional, como emulsificante, reemplazar la adición de huevo, para dar cuerpo a la masa.
Productos lácteos como bebidas fermentadas y quesos.	Valor nutricional, emulsificante, gelificante, mejorar propiedades organolépticas, mejorar consistencia, cohesividad.
Bebidas como jugos de fruta, refrescos, bebidas achocolatadas, bebidas a base de leche	Valor nutricional, solubilidad, viscosidad, estabilidad coloidal.
Postres como barras de yogurt, helados	Propiedades emulsificantes, dar cuerpo y textura a los productos.
Confitería	Como emulsificante y para facilitar el batido
Productos cárnicos	Pre-emulsificante, gelificante, mejorar solubilidad
Alimentos nutricionales	Alimentos de mayor valor nutricional y bajo costo, alimentos para deportistas, para personas adulto mayor, formulas nutricionales especiales para mantener peso saludable o aumentar consumo de proteína, fórmulas infantiles, fórmulas especiales para alimentación hospitalaria.
Para concentrados de proteína	Para productos alimenticios especiales, suplementos nutricionales, productos de panadería y confitería. Contiene aproximadamente 25-89% de proteína, 4-52% de lactosa y 1-9% de grasa.
Para obtener aislados de proteína	Para suplementos de proteína, bebidas y productos altos en proteína, Contiene aproximadamente 90-95% de proteína, 0,5-1% de lactosa y 0,5-1% de grasa
Para obtener hidrolizados de proteína	Para fórmulas infantiles, productos para deportistas, productos nutricionales especiales. Contiene aproximadamente 80-90% de proteína, 0,5-1% de lactosa y 0,5-0,8% de grasa
Purificación de proteínas aisladas	α lactoalbuminas, β Lactoglobulinas, inmunoglobulinas, glicoproteínas como lactoferrina y lactoperoxidasa.
Fuente de compuesto bioactivos	Péptidos y proteínas con potencial antihipertensivo, actividad antimicrobial, antioxidante, incremento de la saciedad, etc.
Fuente de lactosa	Compuesto transportador en productos farmacéuticos, componente de fórmulas infantiles, materia prima para la producción de derivados de lactosa: lactulosa, GOS, lactitol, glucosa. Para bioconversión de lactosa: Alcohol, ácido lactito, biocombustible.
Fuente para extraer minerales	Calcio, fósforo.

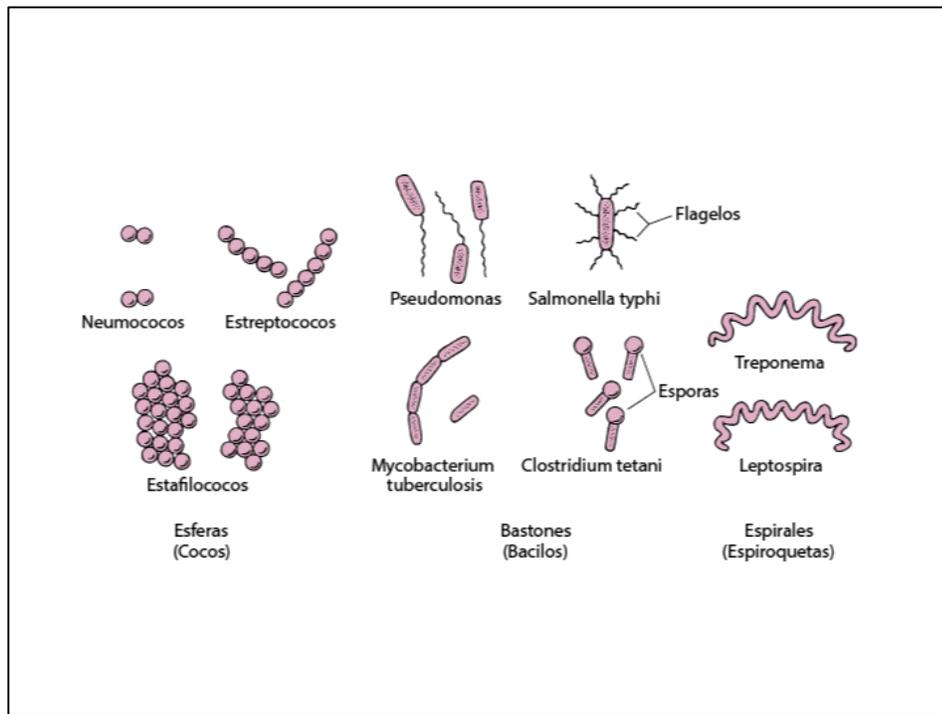
Fuente: (SciELO, 2012).

Tabla 10.2 Composición general del suero láctico y distribución proteica.

Componente	Observaciones
Lactosa	95% de la lactosa de la leche, en una proporción de (4,5-5,0 % p-v).). 46,0-52,0 g/L en lactosuero dulce y 44,0-46,0 de lactosuero ácido.
Proteína	En una proporción 0,8-1,0% p/v. Corresponde alrededor del 25% de las proteínas contenidas normalmente en la leche. 6,0g/l en lactosuero dulce y 6,0-8,0 g/l en lactosuero ácido. Alto contenido de aminoácidos (Leucina, isoleucina, licina, valina) vs proteínas de referencia, caseína, proteína de soya y proteína humana.
α-Lactoalbumina	30% del total del contenido proteico
β-Lactoglobulina	Es importante porque tiene propiedades emulsionantes y cumple una función importante al interactuar con compuestos como el retinol y los ácidos grasos.
Globulina	Corresponden a 10% del total de proteínas
Proteasas-peptonas	Corresponden a 10% del total de proteínas. Lactoferrinas, albúmina (idéntica a la albúmina sérica de la sangre), inmunoglobulinas, factores de crecimiento, glicoproteínas y enzimas (nucleasas, lactoperoxidasas, xantina oxidasa, lipasa estearasa, amilasa, fosfatasa ácida y alcalina, lisozima, aldolasa, catalasa, inhibidor de la tripsina, lactosa sintetasa, ceruloplasmina, sulfhidroxidasa y otras) Son proteínas de alto valor biológico al proporcionar aminoácidos esenciales para el organismo, entre ellos, triptófano, leucina, e isoleucina (21), (67), (68), (70).
Lípidos	0,5% y 8% de la materia grasa de la leche .
Vitaminas	Tiamina 0,38mg/ml; Riboflavina 1,2mg/ml; Acido nicotínico 0,85 mg/ml Ácido Pantoténico 3,4mg/ml; Piridoxina 0,42mg/ml; Cobalamina 0,03 mg/ml; Ácido ascórbico 2,2mg/ml
Minerales	8-10% del extracto seco. Calcio (0,4-0,6g/l en lactusero dulce y 1,2-1,6g/l) en lactosuero ácido), potasio, fosforo, sodio y magnesio.
Compuestos biológicamente activos y péptidos bioactivos	Para ejercer determinados efectos biológicos y fisiológicos. Con potencial antihipertensivo, actividad antimicrobiana, antioxidante, incremento de la saciedad, entre otros.

Fuente: (SciELO, 2012).

Figura 10.1 Clasificación de las bacterias por su forma.



Fuente: (Larry M. Bush, 2018)

Figura 10. 2 Uso de papel aluminio como molde.

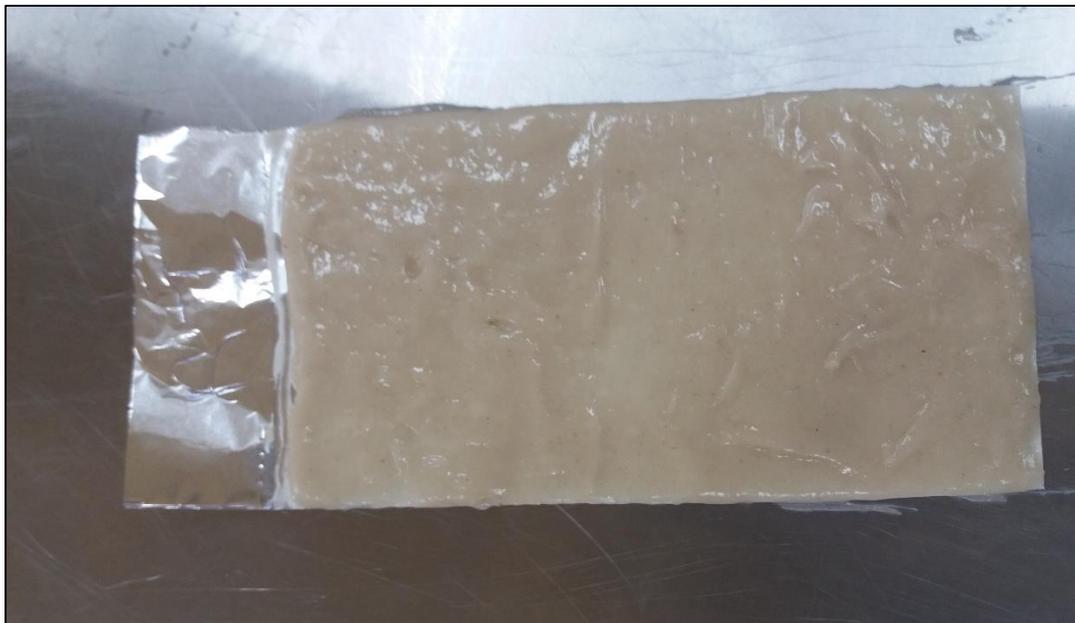


Figura 10.3 Moldeado en papel aluminio.



Figura 10.4 Control de pH suero A1.

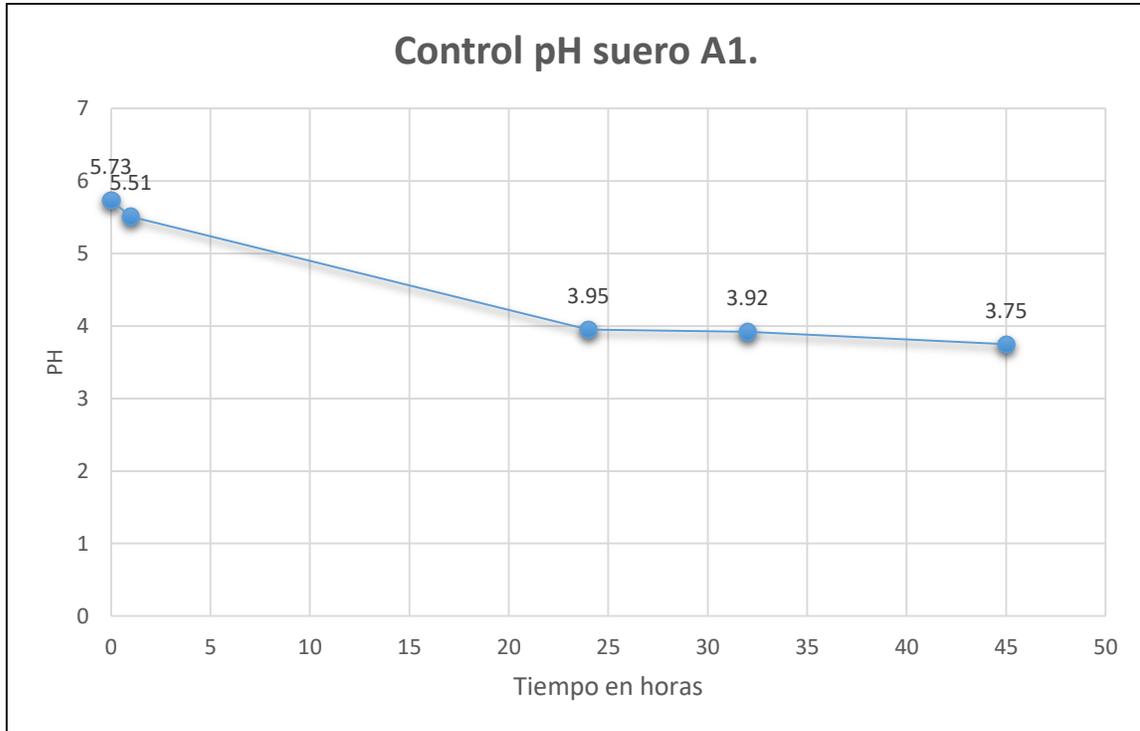


Figura 10.5 Control grados Brix suero A1.

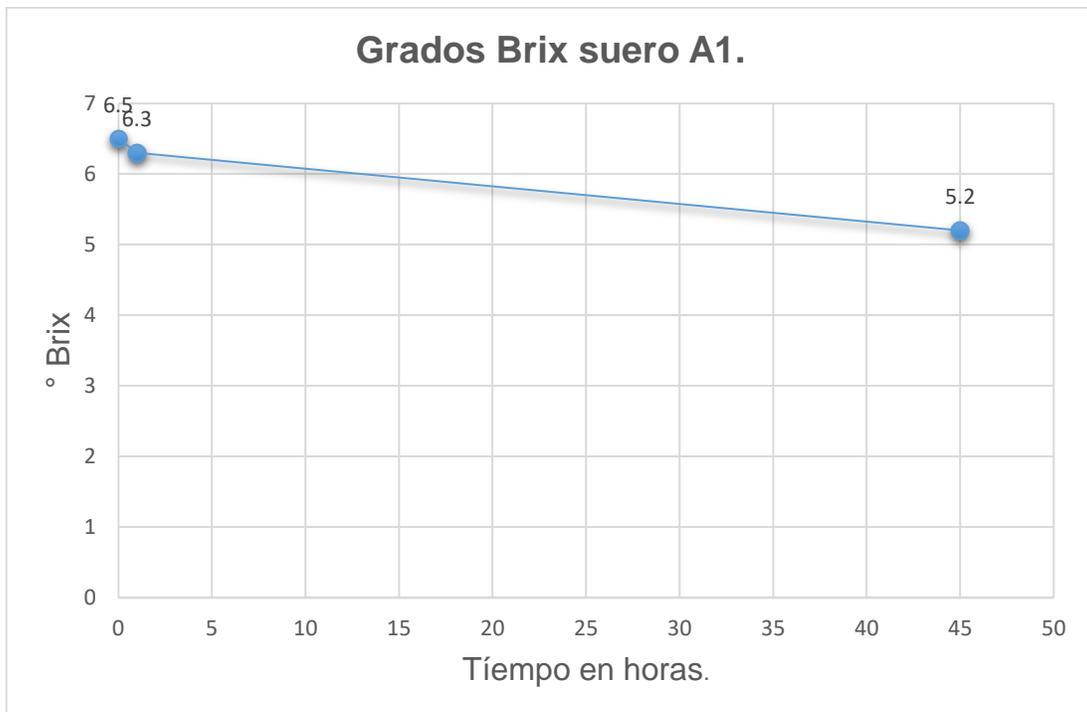


Figura 10.6 Control pH suero A2.

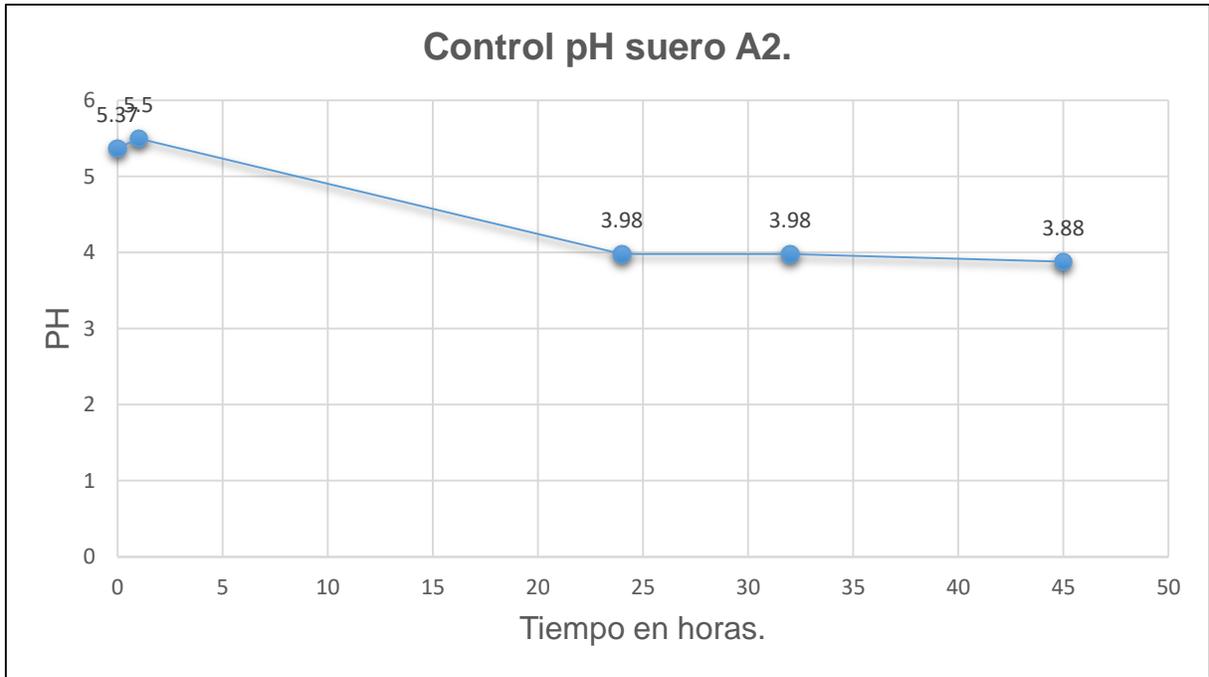


Figura 10.7 Control grados Brix suero A2.

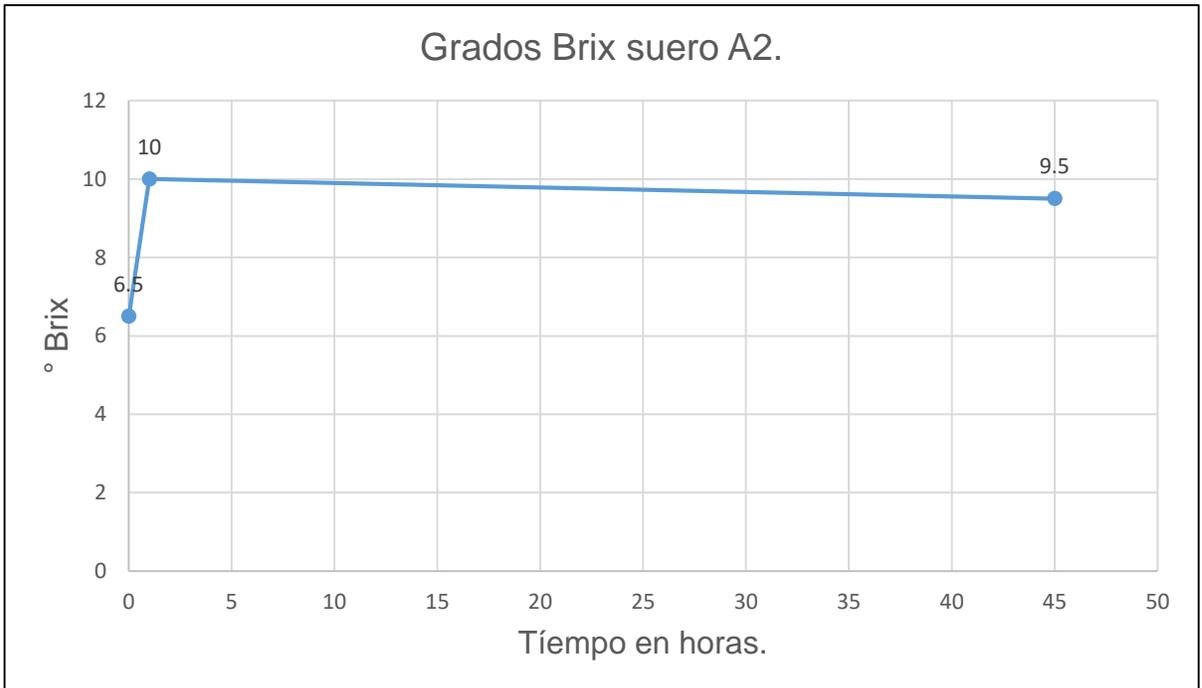


Figura 10.8 Control de pH suero A3.

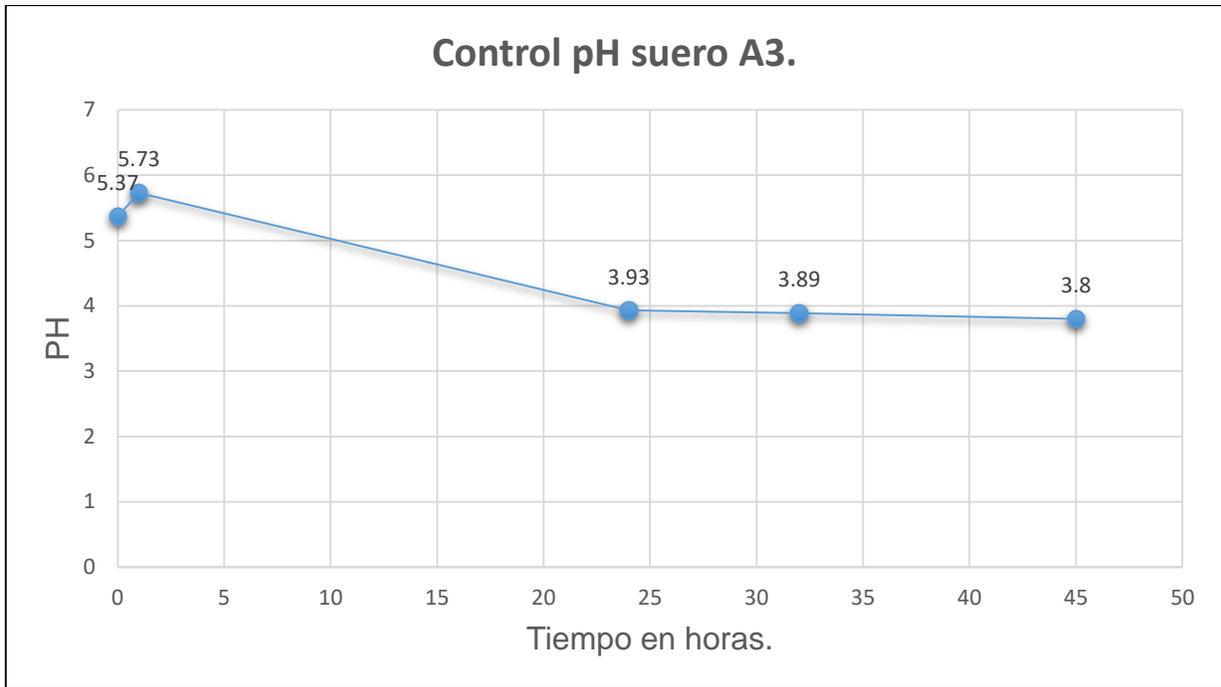


Figura 10.9 Control grados Brix suero A3.

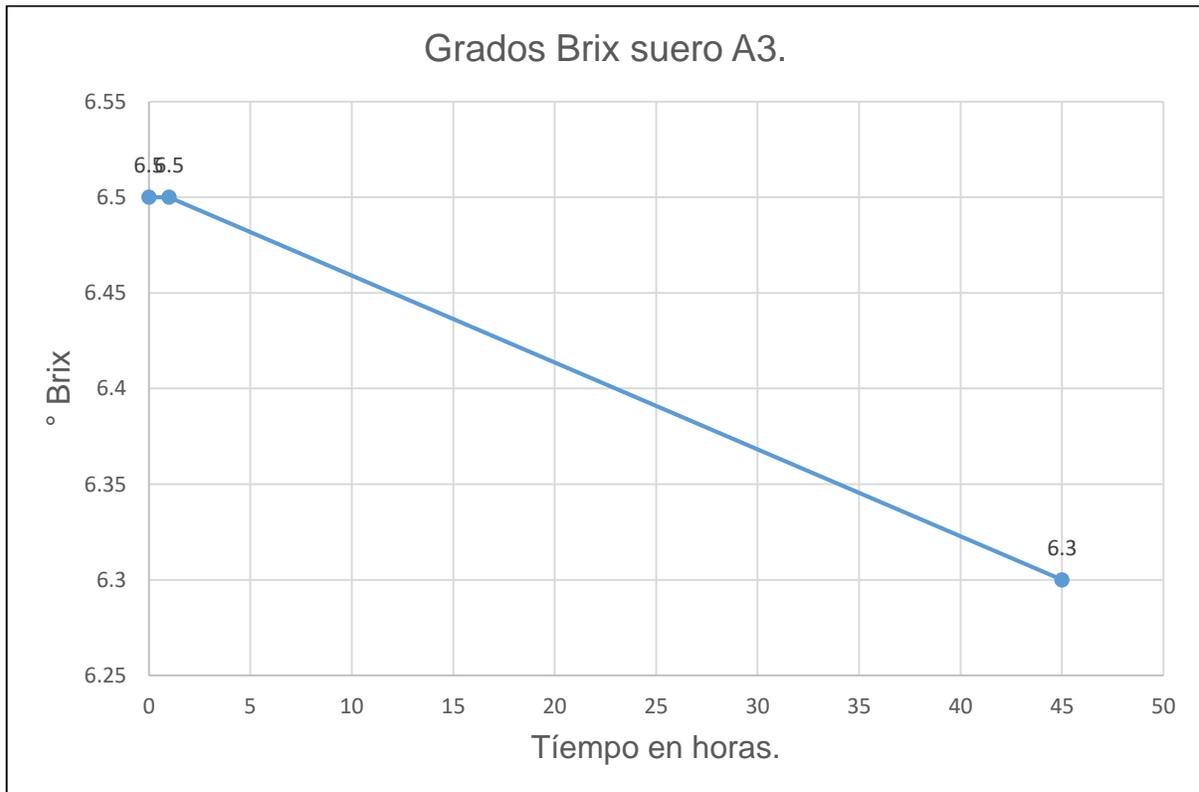


Figura 10.10 Selección de un horador con 6 mm de longitud.



a)



b)

Figura (a) juego de horadores. Figura (b) horador con 6 mm de longitud.