



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**



**ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS**

Efecto de las nanopartículas a base de quitosano sobre la carga bacteriana de los quesos suizos producidos en Cajamarca – Perú 2022

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

Presentado por:

**BACH. IVAN LLANOS YOPLA**

**ASESOR:**

Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

**COASESOR:**

M. Sc. Héctor Almanzor Chinchay Espino

M. Sc. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

**CAJAMARCA – PERÚ**

**2022**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

Ciudad Universitaria -1Q -115- Av. Atahualpa N° 1050-Cajamarca -

☎ 076-599227 anexo 1272



La Directora de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de Cajamarca, Doctora Martha Vicenta Abanto Villar que suscribe, deja

## **CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD**

Que, la tesis titulada **EFFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS A BASE DE QUITOSANO SOBRE LA CARGA BACTERIANA DE LOS QUESOS SUIZOS PRODUCIDOS EN CAJAMARCA - PERÚ 2022**, presentada por el Bachiller en Ciencias Biológicas **IVAN LLANOS YOPLA**, ha sido revisada en el Software Antiplagio **TURNITIN** de la Universidad Nacional de Cajamarca el 8 de marzo del 2024 a las 9:33 p.m., obteniendo un puntaje de 10% de similitud, considerado dentro de los parámetros requeridos.

Teniendo como Asesor al Docente **Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto** Co asesores: **M.Cs. Héctor Almanzor Chinchay Espino** y **M.Cs. Omar Daniel Daniel Pairazamán Quiroz**, adscritos al Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Cajamarca.

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que considere convenientes.

Cajamarca, 11 de marzo del 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
*Dr. Martha Vicenta Abanto Villar*  
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

COPYRIGHT©

**IVAN LLANOS YOPLA**

Todos los derechos reservados

iii

## FICHA CATALOGRÁFICA

Llanos, I. 2023. **Efecto de las nanopartículas a base de quitosano sobre la carga bacteriana de los quesos suizos producidos en Cajamarca – Perú 2022/** Ivan Llanos Yopla.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co – asesores: M. Cs. Héctor Almanzor Chinchay Espino / M. Cs. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo  
UNC - 2024

**Efecto de las nanopartículas a base de quitosano sobre la carga bacteriana de los  
quesos suizos producidos en Cajamarca – Perú 2022**

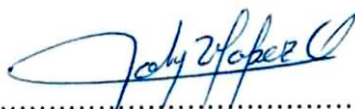
**AUTOR:** Bach. Ivan Llanos Yopla

**ASESOR:** Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

**CO-ASESORES:** M. Cs. Héctor Almanzor Chinchay Espino / M. Cs. Omar Daniel  
Pairazamán Quiroz

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo  
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

**JURADO EVALUADOR**



.....  
**PRÉSIDENTE**

M. Cs. John López Orbegozo



.....  
**SECRETARIA (O)**

Dr. Luis García Izquierdo



.....  
**VOCAL**

Dr. Demetrio Cieza Yrigoín

Cajamarca 2024, Perú



Universidad Nacional de Cajamarca

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de Febrero de 1962

Facultad de Ciencias de la Salud

Av. Atahualpa 1050

Teléfono/ Fax 36-5845



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 5 p.m. del 14 de Febrero del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 1E-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: "Efecto de las nanopartículas a base de quitosano sobre la carga bacteriana de los quesos suizos producidos en Cajamarca - Perú 2022"

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

IVAN LLANOS YOPLA

Siendo las 6:17 p.m. del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: MUY BUENO, con el calificativo de: 17, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra A.P.T.O. para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.**

Miembros Jurado Evaluador		Firma
Nombres y Apellidos		
Presidente:	<u>John López Orbefoso</u>	<u>[Firma]</u>
Secretario(a):	<u>Lucas Gilberto García Izquierdo</u>	<u>[Firma]</u>
Vocal:	<u>Demetrio Cieza Yrigoin</u>	<u>[Firma]</u>
Accesitaria:	<u>—</u>	<u>—</u>
Asesor (a):	<u>Marco Antonio Rivera Jacinto</u>	<u>[Firma]</u>
Asesor (a):	<u>Hector Almanzar Chimelay Espino</u>	<u>NO ASISTIO</u>

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)

REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)

DESAPROBADO (10 a menos)

**A:**

La gratitud de esta investigación va dirigida hacia Dios y mi familia. A Dios por ser mi guía en este sendero y a mi familia, porque en los momentos más difíciles estuvieron como soporte y mostraron amor incondicional; además, resaltar el agradecimiento a mi abuelita por enseñarme que con cariño, esfuerzo y disciplina se puede conseguir lo soñado; aunque ella ya no podrá leer este trabajo.

## **Agradecimiento:**

Agradezco a mis profesores, en especial a aquellos que, pese a las muchas limitaciones y obstáculos presentados en el camino, supieron transmitir los conocimientos necesarios para mi desarrollo profesional, afrontando con ingenio y perseverancia los innumerables retos enmarcados en la tarea del educador.

Agradezco a mis asesores, el Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto, M. Sc. Héctor Almanzar Chinchay Espino y el M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz, por guiarme en el desarrollo de este trabajo, aportando con sus conocimientos y experiencia en lo necesario para su culminación.

Agradezco al M. Sc. Héctor Almanzor Chinchay Espino por los conocimientos impartidos en el curso de Bionanotecnología y el apoyo brindado durante el análisis de los resultados obtenidos en la caracterización de las nanopartículas.

Agradezco a la Mg. Fanny Valentina Samanamud Moreno de la Universidad Nacional de Trujillo, por brindarme la oportunidad de caracterizar las nanopartículas en las instalaciones del laboratorio a su cargo.

Agradezco al Instituto Nacional de Innovación Agraria por permitirme usar sus instalaciones en el Laboratorio de Biotecnología Animal para el desarrollo de este trabajo, así como al Dr. Marco Cabrera por la guía en el laboratorio.



## Tabla de contenido

<b>Resumen:</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract:</b> .....	<b>XI</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II:</b> .....	<b>3</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Antecedentes de la Investigación</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. Bases Teóricas:</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.1. Quitina:</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.2. Quitosano:</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2.3. Estructura del quitosano:</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2.4. Obtención de quitosano:</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2.5. Propiedades del quitosano:</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.6. Aplicaciones comerciales del quitosano:</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2.7. Nanopartículas:</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2.8. Método de Gelación Iónica o Gelificación ionotrópica:</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2.9. Quesos</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.10. Inocuidad Alimentaria</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.11. Enfermedad Transmitida por alimentos</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.12. Uso de Petrifilm para análisis de alimentos</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3. Definición de Términos:</b> .....	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>22</b>
<b>DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1. Nivel de Investigación:</b> .....	<b>22</b>

3.2.	Tipo y diseño de investigación: .....	22
3.2.1.	Tipo de investigación: .....	22
3.2.2.	Diseño de Investigación: .....	22
3.3.	Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos .....	22
3.3.1.	Síntesis de Nanopartículas a base de quitosano: .....	22
3.3.1.1.	Preparación de Ácido Acético Glacial al 1%: .....	22
3.3.1.2.	Preparación del Tripolifosfato de Sodio (TPP) al 1%: .....	22
3.3.1.3.	Preparación de la Solución de Quitosano: .....	22
3.3.1.4.	Preparación de la mezcla de soluciones de Quitosano y TPP al 1% .....	23
3.3.1.5.	Centrifugación, lavado y secado (Apéndice N° 04): .....	23
3.3.1.6.	Pruebas antibacterianas: .....	24
3.3.2.	Caracterización del gel: .....	25
3.3.2.1.	Caracterización del gel a base de quitosano obtenido por DLS: .....	25
CAPÍTULO IV .....		27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		27
4.1.	Resultados: .....	27
4.1.1.	Caracterización del gel a base de quitosano: .....	27
4.1.1.1.	Medición del gel mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS): .....	28
4.1.2.	Resultados microbiológicos: .....	30
4.1.2.1.	Recuento de las colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> : .....	30
4.1.2.2.	Recuento de las colonias de <i>Staphylococcus spp.</i> : .....	31
4.1.2.3.	Recuento de las colonias de Coliformes: .....	32
4.1.2.4.	Recuento de las colonias de Enterobacterias: .....	33
4.1.2.5.	Pruebas No Paramétricas: .....	34
4.1.2.6.	Pruebas post hoc: .....	35
4.2.	Discusión: .....	38
CAPÍTULO V .....		42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		42

<b>5.1. Conclusiones:</b> .....	<b>42</b>
<b>5.2. Recomendaciones:</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	<b>44</b>
<b>APÉNDICES:</b> .....	<b>52</b>
<b>Apéndice N° 1: Flujograma de la solución de ácido acético glacial al 1%. .....</b>	<b>52</b>
<b>Apéndice N° 2: Flujograma de la solución de tripolifosfato de sodio al 1%. .....</b>	<b>52</b>
<b>Apéndice N° 3: Flujograma de la solución de quitosano. ....</b>	<b>53</b>
<b>Apéndice N° 4: Flujograma de la mezcla de solución de quitosano y solución de tripolifosfato y centrifugación, lavado y secado del gel. ....</b>	<b>54</b>
<b>Apéndice N° 5: Preparación del NaOH al 10 N. ....</b>	<b>55</b>
<b>Apéndice N° 6: Homogenización de la solución de quitosano usando el agitador magnético. ....</b>	<b>55</b>
<b>Apéndice N° 7: Medición del pH de la solución de quitosano. ....</b>	<b>56</b>
<b>Apéndice N° 8: Cadena de frío para agregar la solución de TPP en la solución de quitosano. ....</b>	<b>56</b>
<b>Apéndice N° 9: Adición del TPP gota a gota sobre la solución de quitosano. ....</b>	<b>57</b>
<b>Apéndice N° 10: Formación de estructuras en forma de películas en la solución por la reacción del quitosano y el TPP. ....</b>	<b>57</b>
<b>Apéndice N° 11: Homogenización de la solución lechosa en el agitador magnético. ....</b>	<b>58</b>
<b>Apéndice N° 12: Distribución de la solución lechosa en tubos falcon. ....</b>	<b>58</b>
<b>Apéndice N° 13: Uso de la centrifuga refrigerada. ....</b>	<b>59</b>
<b>Apéndice N° 14: Obtención del sedimento luego de la centrifugación. ....</b>	<b>59</b>
<b>Apéndice N° 15: Uso del vórtex para redispersar las nanopartículas. ....</b>	<b>60</b>
<b>Apéndice N° 16: Secado de los sedimentos en el horno. ....</b>	<b>60</b>
<b>Apéndice N° 17: Obtención de las nanopartículas de quitosano en diferentes concentraciones en forma de gel. ....</b>	<b>61</b>
<b>Apéndice N° 18: Medición del tamaño de las nanopartículas en el equipo de Dispersión de Luz Dinámica (DLS). ....</b>	<b>61</b>

<b>Apéndice N° 19: Uso del caldo citratado para reducir la capa de grasa del queso suizo.....</b>	<b>62</b>
<b>Apéndice N° 20: Distribución del gel de quitosano en diferentes concentraciones para realizar los diferentes tratamientos. ....</b>	<b>62</b>
<b>Apéndice N° 21: Resultados microbiológicos luego de incubar las placas petrifilm. ....</b>	<b>63</b>
<b>Apéndice N° 22: Batería de placas petrifilm para <i>Stapylococcus spp.</i>, <i>S. aureus</i>, <i>E. coli</i>, Coliformes, Enterobacterias y Aerobios mesófilos viables. ....</b>	<b>63</b>
<b>Apéndice N° 23: El crecimiento de las colonias rojo - violetas en las placas petrifilm STX, indica que son <i>S. aureus</i>, las colonias verdes son <i>Staphylococcus spp.</i> .....</b>	<b>64</b>
<b>Apéndice N° 24: El crecimiento de las colonias azules con burbuja en las placas petrifilm EC, indica que son <i>E. coli</i>, las colonias rojas con burbuja indican coliformes. ....</b>	<b>644</b>
<b>Apéndice N° 25: El crecimiento de las colonias rojas con presencia de gas, rojas con zonas amarillas en las placas petrifilm EB, indica que son Enterobacterias. ....</b>	<b>655</b>
<b>Apéndice N° 26: El crecimiento de las colonias rojas en las placas petrifilm AC, indica que son aerobios mesófilos viables. ....</b>	<b>655</b>
<b>ANEXOS:.....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo N° 1: Quitosano de bajo peso molecular usado .....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo N° 2: Tablas de resultados microbiológicos del primer compósito de quesos suizos. ....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo N° 3: Tablas de resultados microbiológicos del segundo compósito de quesos suizos. ....</b>	<b>69</b>
<b>Anexo N° 4: Tablas de resultados microbiológicos del tercer compósito de quesos suizos. ....</b>	<b>71</b>
<b>Anexo N° 5: Tablas de resultados microbiológicos de recuentos promedios de los compósitos de quesos suizos.....</b>	<b>73</b>
<b>Anexo N° 6: Reporte Turnitin.....</b>	<b>75</b>

### **Lista de Abreviaciones:**

**TPP:** Tripolifosfato de Sodio.

**MYPES:** Micro y pequeña empresa.

**A<sub>w</sub>:** Actividad de agua

**AAG:** Ácido acético glacial.

**AI:** Agua Inyectable.

**QT:** Quitosano.

**SQT:** Solución homogénea de quitosano + Ácido acético glacial al 1%

**SLQ:** Solución lechosa de quitosano homogénea (SQT + TPP 1%).

**GQ:** Gel de quitosano.

**NPs:** Nanopartículas.

**RPM:** Revoluciones Por Minuto.

**DLS:** Dispersión de Luz Dinámica (Dynamic Light Scattering).

## **Glosario:**

**Biopolímero:** Macromoléculas producidas por los organismos vivos, que son sintetizadas por enzimas para formar moléculas de alto peso molecular.

**Biomaterial:** Sustancia que se amolda de manera solitaria o formando un sistema complejo para asociarse con las interacciones de los componentes de los seres vivos, y poder dirigir los procedimientos terapéuticos destinados o procedimientos de diagnóstico.

**Nanopartícula:** Una nanopartícula es un material formado dentro de la escala nanométrica con la finalidad de potenciar sus características, asociándolas a otros materiales o solo formándolos de manera preliminar.

**Petrifilm:** Placas listas para usarse en el método microbiológico, diseñadas para ofrecer ahorro de tiempo, incremento de productividad, fiabilidad y eficiencia.

## **Efecto de las nanopartículas a base de quitosano sobre la carga bacteriana de los quesos suizos producidos en Cajamarca – Perú 2022.**

### **Resumen:**

En esta investigación se sintetizó nanopartículas a base del biopolímero quitosano mediante el método de gelación iónica y se determinó su efecto sobre la carga bacteriana de quesos suizos producidos en Cajamarca. Se obtuvo tres concentraciones (0,5%; 0,6% y 0,7%) de nanopartículas, cada una caracterizada por su tamaño hidrodinámico, y se evaluó el efecto de estas frente a la carga bacteriana presente en los quesos. Para el estudio se recolectó aleatoriamente quesos de diferentes zonas de venta de la ciudad, una unidad de cada punto hasta completar 15 quesos. Estos fueron trasladados en cadena de frío al laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca para su análisis bacteriológico.

Para el análisis se hizo diluciones seriadas de la muestra, la dilución inicial consistió de 25 g de un compuesto de queso suizo disuelto en 225 mL de Caldo Citratado al 2%; seguidamente, se transfirió 10 mL de esta dilución a frascos con 90 mL de Agua Peptonada, y del mismo modo se obtuvo la dilución  $10^{-3}$ ; luego se agregó 15 mL de suspensión bacteriana en tubos con 50  $\mu$ L del gel de nanopartículas, se incubó los tubos durante 24 h y luego se inoculó en Petrifilm™ de 3M™. La evaluación por recuento de Unidades Formadoras de Colonias permitió determinar el efecto antibacteriano de las nanopartículas. Los resultados muestran que hubo una disminución significativa de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., enterobacterias y coliformes; pero no de bacterias aerobias mesófilas viables. Se concluye que las nanopartículas a base de quitosano tienen un efecto significativo en la reducción de la carga bacteriana de los quesos suizos de Cajamarca.

**Palabras clave:** Nanopartícula, compuesto, biopolímero.

**Abstract:**

In this research, nanoparticles based on the biopolymer chitosan were synthesized using the ionic gelation method and their effect on the bacterial load of Swiss cheeses produced in Cajamarca was determined. Three concentrations (0,5%; 0,6% and 0,7%) of nanoparticles were obtained, each characterized by its hydrodynamic size, and their effect on the bacterial load present in the cheeses was evaluated. For the study, cheeses were randomly collected from different sales areas of the city, one unit from each point until there were 15 cheeses. These were transferred in the cold chain to the Microbiology laboratory of the National University of Cajamarca for bacteriological analysis.

For the analysis, serial dilutions of the sample were made. The initial dilution consisted of 25 g of a Swiss cheese compound dissolved in 225 mL of 2% Citrated Broth; Next, 10 mL of this dilution was transferred to bottles with 90 mL of Peptone Water, and in the same way the  $10^{-3}$  dilution was obtained; Then, 15 mL of bacterial suspension was added to tubes with 50  $\mu$ L of the nanoparticle gel, the tubes were incubated for 24 h and then inoculated in 3M™ Petrifilm™. The evaluation by counting Colony Forming Units allowed us to determine the antibacterial effect of the nanoparticles. The results show that there was a significant decrease in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, enterobacteria and coliforms; but not viable mesophilic aerobic bacteria. It is concluded that chitosan-based nanoparticles have a significant effect on reducing the bacterial load of Swiss cheeses from Cajamarca.

**Keywords:** Nanoparticle, composite, biopolymer.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

En estos últimos años, el uso de los nanomateriales ha cobrado mucha relevancia dada su aplicación en distintos campos, incluyendo la industria alimentaria; esta industria mueve miles de dólares en la fabricación de alimentos, y el tratar de disminuir la carga microbiana y/o eliminar las bacterias patógenas es un proceso prioritario para obtener alimentos aceptables y seguros, es decir, que sean alimentos inocuos para el consumidor final. De acuerdo a lo mencionado, también implica utilizar métodos poco invasivos al alimento, pues, de otro modo, al incorporar algún elemento foráneo al alimento, este puede alterar o modificar las propiedades organolépticas del mismo.

Para la industria alimentaria es crucial la innovación, razón por la que, en la búsqueda de materiales que no alteren la composición de los alimentos, muchas investigaciones optan por aplicaciones biológicas, bioquímicas y biotecnológicas de compuestos orgánicos. Dentro de los compuestos orgánicos están la quitina y sus derivados; siendo la quitina la segunda molécula más abundante de la naturaleza, además, como uno de sus derivados, tenemos al quitosano, que desde hace algunos años atrás ya viene siendo estudiado por sus ventajas aplicativas en diferentes campos de la producción alimentaria y la salud. Entre las ventajas descritas para este biopolímero (el quitosano) están sus propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, su nula toxicidad, entre otros.

Una de las ventajas de la nanotecnología es: mejorar las características de los materiales a usar, pues, los materiales tienden a mejorar sus propiedades en una escala nanométrica. Además, al sintetizarse nanomateriales que tienen una base de biopolímeros brinda una ventaja por su biocompatibilidad, tal es el caso del quitosano. Existen diferentes métodos de obtención de nanopartículas, sin embargo, para fines de este trabajo se empleó el método de gelación iónica el cual varía de acuerdo a los reactivos y

condiciones del lugar dónde se sintetizan las nanopartículas, pues, la base del método está en la interacción electrostática entre los componentes que se vayan agregando hasta tener formadas las nanopartículas.

Debido a las ventajas que posee el quitosano como nanopartícula se ha empleado como agente para el transporte de materiales para proteínas, medicamentos, vacunas, entre otros; todos predominantemente en la industria farmacéutica. Así mismo, se ha demostrado que el quitosano tiene propiedades antibacterianas, propiedades que se pueden maximizar llevando el material a escala nanométrica; las propiedades antibacterianas anteriormente mencionadas son resaltantes en este trabajo, porque nos brinda un panorama a buscar una solución al problema de que los quesos producidos en Cajamarca tienen una elevada carga bacteriana.

Cajamarca es una de las regiones con la mayor producción de quesos a nivel nacional, debido principalmente a la alta producción de la materia prima, la leche, lo cual originó también la producción de diferentes tipos de quesos. Sin embargo, la gran mayoría de productores han constituido micro y pequeñas empresas (MYPES) que no cumplen con los principios generales de higiene (PGH) y/o las buenas prácticas de manufacturación (BPM), obteniendo productos no inocuos. La implementación de las PGH y BPM, para la mayoría de MYPES suele ser un reto; por ello, se busca herramientas que les ayuden con esas certificaciones, llegando a tener en los materiales a nanoescala una herramienta que los ayude a conseguir el fin deseado.

Por lo que, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas a base de quitosano sobre la carga bacteriana de los quesos suizos producidos en Cajamarca.

## CAPÍTULO II:

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la Investigación

A continuación, se describen algunas investigaciones en las que se demuestra que las nanopartículas son útiles para disminuir la carga bacteriana en los productos lácteos, uno de ellos, el queso.

En un estudio, realizado en China, se investigó el mecanismo antibacteriano de las microesferas de quitosano frente a *Escherichia coli*. Las microesferas tuvieron diámetro aproximado de 124 micrómetros y su actividad antibacteriana era directamente proporcional a la concentración de las microesferas de quitosano. Para visualizar el mecanismo antibacteriano utilizaron fluorescencia y el microscopio electrónico de barrido, en el primero se visualizó que las microesferas de quitosano llegaron a afectar a la membrana de las bacterias y las fotografías mostraron que *E. coli* se adhiere a las microesferas. Concluyeron que las microesferas de quitosano cambian la permeabilidad de la membrana y provocaron una fuga celular, y así corroboran su actividad antibacteriana (Kong *et al.*, 2008).

Posteriormente, un grupo de investigadores preparó nanopartículas de quitosano para enfrentarlas a un panel de microorganismo aislados de dos tipos de queso. Las nanopartículas de quitosano fueron preparados por gelificación iónica y la actividad antimicrobiana se determinó por la concentración mínima de inhibición, así mismo, las nanopartículas de quitosano fueron agregas con agua y ácido acético. Al final se concluyeron que las nanopartículas en ácido acético tuvieron mayor actividad antibacteriana. Además, las bacterias gram positivas no eran tan susceptibles como las negativas (O'Callaghan and Kerry, 2016).

Un estudio en Asia, frente a un problema de contaminación de quesos por la bacteria *Listeria monocytogenes*, un grupo de investigadores de la Universidad de Jiangsu en China, buscó inhibir la replicación de la bacteria utilizando “nanofibras de óxido de polietileno” las cuales contenían nanopartículas de quitosano y ácido poli g-glutámico cargadas con nisina. Evidenciaron una disminución de 5,52 Log UFC/mL (100%) a 4,85 Log UFC/mL (87,86%), es decir, una actividad antimicrobiana de 12,14%; además, la calidad sensorial del queso no se afectó y lo más importante es que la actividad antibacteriana contra la bacteria *L. monocytogenes* fue satisfactoria (Cui *et al.*, 2017).

Así mismo, en otro estudio en la Universidad de Jiangsu, el cual tenía como objetivo fabricar nanofibras incrustadas en gelatina con la combinación de las nanopartículas de quitosano y aceite de moringa para controlar dos microorganismos que contaminan los quesos, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. A pesar de que la actividad de liberación del aceite de moringa disminuyó y que la nanofibras sobrepasaron los 100 nm se obtuvo resultados muy positivos, concluyendo que la actividad de las nanofibras que poseen nanopartículas de quitosano y aceite de moringa presentaron actividad antibacteriana muy alta ambas bacterias, siendo este estudio de mucha ayuda para futuras investigaciones (Lin, Gu and Cui, 2019).

Por otro lado, un grupo de investigadores en Rusia elaboraron nanopartículas con cubierta antibacteriana, antioxidante y absorbente de rayos UV con el objetivo de aumentar y mejorar la vida útil del queso Ricotta, considerando que estos nanocompuestos no son tóxicos. El experimento se hizo sobre una matriz de quitosano el cual ayudó a la estabilidad de los nanocompuestos. Se demostró que la incorporación de nanopartículas de nuevo diseño poseen propiedades mecánicas y de barrera mejoradas, junto con un mayor nivel antibacteriano, antioxidante y actividad UV absorbente (Kritchenkov *et al.*, 2020).

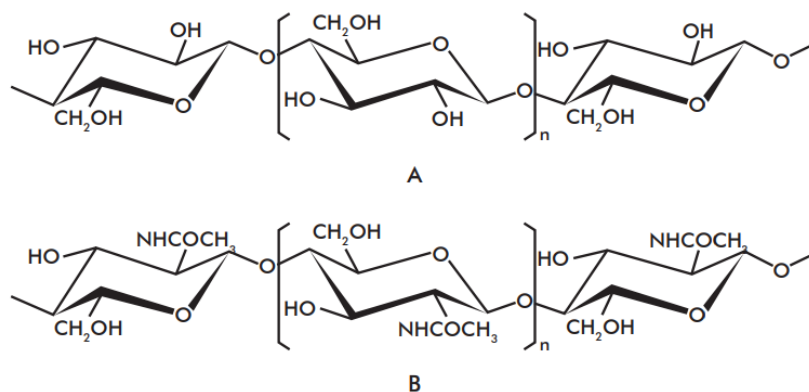
## **2.2. Bases Teóricas:**

### **2.2.1. Quitina:**

La quitina, un polisacárido natural, químicamente definida como poli (D-Glucosamina-N-acetil- $\beta$  1,4), de gran significancia; identificada por primera vez por Henri Braconnot, director del jardín botánico de Nancy, Francia, en 1811 (Finney and Siegel, 2008). Sin embargo, no fue hasta que, en 1823, Odier introdujo el término “quitina” que deriva del vocablo griego “chitón” que equivale a “cobertura”, “túnica” o “envoltura”. Además, en 1929 su estructura química fue dada a conocer por Albert Hofmann (Rudall and Kenchington, 1973).

La quitina es sintetizada por una gran cantidad de organismos (Rinaudo, 2006). Y de los polisacáridos en la naturaleza, la quitina se ubica en el segundo lugar por su abundancia, esto, debido a su gran capacidad de regeneración natural, por ello, se estima que  $1 \times 10^9$  tn del polisacárido se sintetiza y degrada anualmente en el planeta (Gooday, 1990).

En su forma pura, el biopolímero quitina es ligeramente cristalino, no posee olor, ni tampoco sabor y en su estructura, los azúcares y grupos aminos se unen por enlaces glicosídicos ( $\beta$  1,4); formando una cadena lineal (Kurita, 2001). Debida a su estructura, solo se disuelve en solventes específicos como: N,N Dimetilacetamida (DMAc), LiCl, hexafluoroacetona o hexafluoro-2-propanol (Austin, 1988). Además, al comparar la quitina con la celulosa son estructuralmente semejantes, con una diferencia marcada que está en el carbono número 2 (C2), pues la quitina tiene grupo acetamida en vez de un grupo hidroxilo (Figura 1) (Ramírez *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Estructura de Celulosa (A) y Quitina acetilada (B), para evidenciar su estructura similar (Ramírez *et al.*, 2010).

La quitina se debe clasificar según su pureza y color, sin embargo, la proteína y el pigmento residual pueden causar problemas para su uso posterior, especialmente para productos biomédicos (Rinaudo, 2006). Por lo que, la principal clasificación teniendo en cuenta sus alomorfos y gracias a la RMN (Espectroscopía de resonancia magnética nuclear) y la XRD (Difracción rayos X), se clasifica en: “ $\alpha$ ”, “ $\beta$ ” y “ $\gamma$ ” (Rudall, 1969), aunque este último parece una variación del alomorfo “ $\alpha$ ” (Atkins, 1985). La “ $\alpha$ ” quitina es la más abundante y se encuentra en paredes celulares de hongos y levaduras, en tendones y caparazones de los camarones y en la cutícula de los insectos (Olivera *et al.*, 1995); por otro lado, la “ $\beta$ ” quitina, es más inusual y se asocia con proteínas de los calamares y estructuras tubulares de gusanos pogonóforos; además la diatomea *Thalassiosira fluviatilis* produce “ $\beta$ ” quitina (Falk, Smith and McLachlan, 1966).

El quitosano, el derivado de quitina más importante en términos de aplicaciones, se obtiene por deacetilación parcial en condiciones alcalinas.

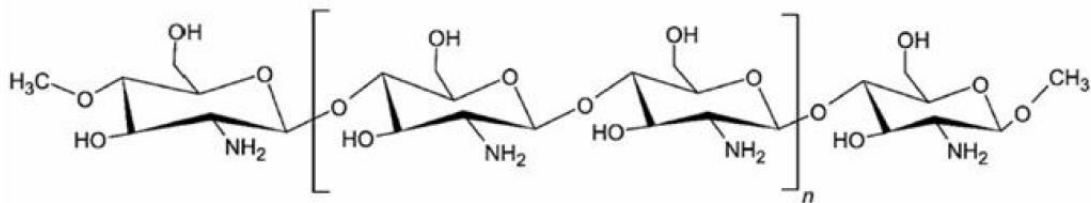
### 2.2.2. Quitosano:

Es un biopolímero natural no tóxico que se encuentra en la concha de crustáceos y se origina de la deacetilación de la quitina (Rudall, 1969), se considera increíblemente versátil debido a sus características químicas, físicas y funcionales. Las propiedades

ventajosas que presenta son su naturaleza catiónica, biodegradabilidad, buena capacidad de adsorción, biocompatibilidad, efecto de mejora de la permeabilidad, capacidades de formación de películas, características adhesivas, etc.(Agnihotri, Mallikarjuna and Aminabhavi, 2004).

### 2.2.3. Estructura del quitosano:

Es un polímero estructurado por moléculas de D-glucosamina, unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$  (1,4), formando una cadena lineal; en muchos casos con residuos de N - acetil - D - glucosamida (Navarro *et al.*, 2010), como se observa en la figura 2. Además, puede contener entre 6 - 9 % de nitrógeno y varios pesos moleculares, estados de pureza y propiedades físico-químicas (Mati-Baouche *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Cadena estructural del biopolímero quitosano.

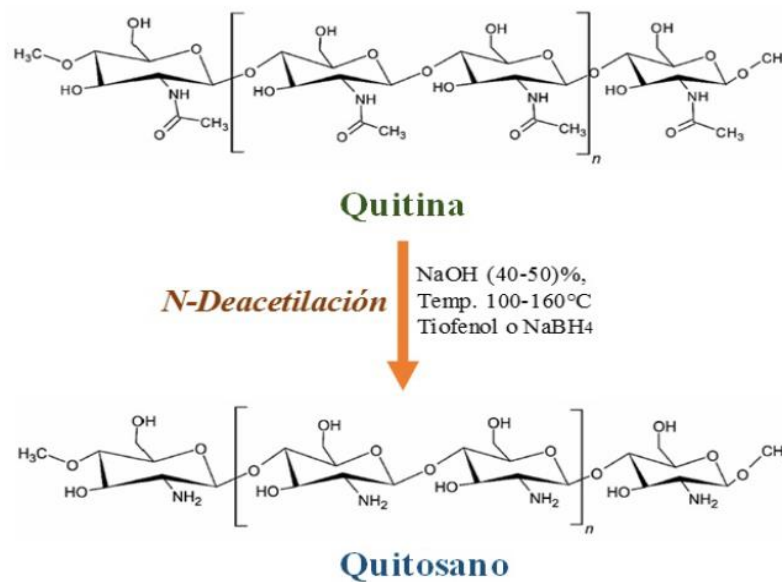
### 2.2.4. Obtención de quitosano:

El biopolímero quitosano se produce por la deacetilación alcalina de la quitina (Esposito *et al.*, 2013), además de ser una amina alifática primaria y ser un polisacárido catiónico, debido a sus cargas positivas (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) y su pH ácido (pH < 6,5) (Rinaudo, 2006). El quitosano puede ser protonado por ácidos como: fórmico, acético, láctico, málico y cítrico, debido a su bajo pH (Mati-Baouche *et al.*, 2014).

Para obtener quitosano, se puede derivar de quitina a quitosano, buscando protonar los grupos acetamidos de la quitina que tienen una acidez derivada de los iones acetato y grupos aminos (Reshad, Jishan and Chowdhury, 2021). El quitosano que se obtiene tiene

algunas propiedades como el aumento de su reactividad, disminución de su cristalinidad y solubilidad en medio ácido (Dutta, Duta and Tripathi, 2004). Las propiedades físico-químicas (viscosidad, flexibilidad, solubilidad) y biológicas (biodegradabilidad) se ven afectadas por el grado o nivel de deacetilación del quitosano, este grado es una correlación entre las unidades de N-Acetil-glucosamina y glucosamina. (Romero-Serrano and Pereira, 2020).

En el procedimiento de deacetilación ocurre una ruptura de los enlaces de la quitina en un medio estrictamente alcalino (KOH o NaOH), por ello las condiciones para obtener quitosano en el grado más alto son:  $T^{\circ} = 100^{\circ} - 160^{\circ} \text{C}$ , solución acuosa de NaOH 40-50% p/v y tiofenol, tal como se muestra en la Figura 3 (Yadav *et al.*, 2019).

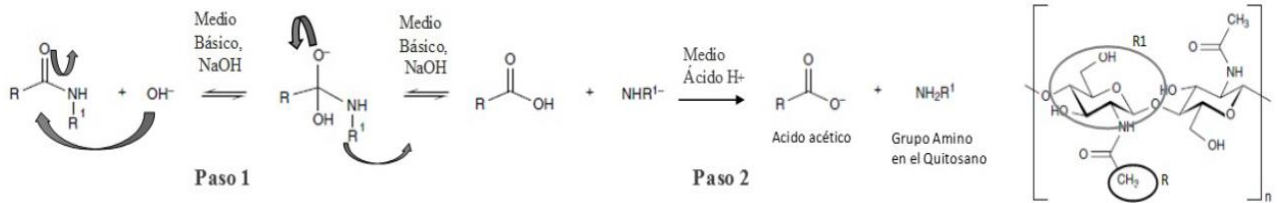


**Figura 3.** Deacetilación de quitina para obtener quitosano.

En el procedimiento químico ocurre una reacción de reemplazo o sustitución nucleofílica de dos sendas: La primera, el grupo hidroxilo se adiciona a la función amino, específicamente sobre el grupo carbonilo (Tolaimate *et al.*, 2003). En la segunda, se desprende el ácido acético para generar una amina y estabilizar la molécula. En resumen,



ocurre una ruptura química y se forman enlaces covalentes que modifican la molécula de quitina, tal como se muestra en la figura 4 (Muzzarelli and Muzzarelli, 2009).



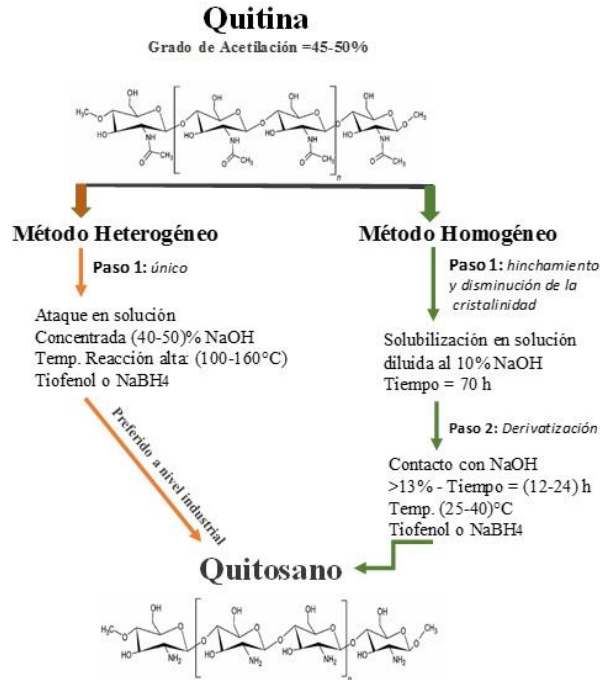
**Figura 4.** Proceso de N-Deacetilación – Reacción de sustitución nucleofílica de 2 pasos (Muzzarelli and Muzzarelli, 2009).

En la deacetilación de la quitina se conocen dos métodos que han sido descritos por Broussignac y Kurita (Ver Figura 5); siendo modificados, mejorados y comparados a través del tiempo con deacetilación específica de quitina “ $\alpha$ ” y “ $\beta$ ” (Tolaimate *et al.*, 2003).

**a) Método Homogéneo:** Este método se lleva a cabo a baja temperatura y tiene dos partes. La primera se define como solubilización de la quitina por  $\text{NaOH}$  durante 70 horas a una  $T^\circ$  ambiente; y la segunda parte, es el ingreso en contacto con un álcali por 12 a 24 horas con una  $T^\circ$  de  $25^\circ$  a  $40^\circ \text{C}$ .

**b) Método Heterogéneo:** Se parte de la quitina sólida en contacto con un álcali más concentrado y una elevada temperatura ( $100^\circ\text{C}$ - $160^\circ\text{C}$ ). Además, es el método para realizar la transformación a escala industrial (Yadav *et al.*, 2019).

La modificación de parámetros como tiempo de reacción,  $T^\circ$  y condiciones, hace que el producto tenga un buen grado de deacetilación, color, peso molecular, etc. Así mismo, el quitosano obtenido es insoluble en agua y solo soluble en algunos ácidos como acético, fórmico, láctico, etc. (Kurita, 2006).



**Figura 5.** Comparación de método homogéneo y heterogéneo del proceso de deacetilación (Romero-Serrano and Pereira, 2020).

### 2.2.5. Propiedades del quitosano:

- **Propiedades generales del Quitosano:**

El quitosano tiene propiedades biológicas muy importantes, tales como: biodegradabilidad, buena capacidad de adsorción, biocompatibilidad, efecto de mejora de la permeabilidad, capacidades de formación de películas, hemostático, fungistático, bacteriostático, espermicida, anticancerígeno, agente quelante, conductividad iónica, agente floculante, actividad antimicrobiana, actividad hipolipidémica, etc (Agnihotri, Mallikarjuna and Aminabhavi, 2004)(Rinaudo, 2006)(Saikia and Gogoi, 2015).

Por las propiedades anteriormente mencionadas, el quitosano en los últimos años ha sido de mucho interés en distintos campos, pero la industria farmacéutica fue la pionera en cuanto a utilizarlo en diferentes aplicaciones como se mencionan a continuación: antioxidante, antiácido, antibacteriano, tratamiento para úlceras, disminución de los

indicadores de ácido úrico en sangre, conductor de medicamentos, analgésico, orientador de dos puntos, control de la presión arterial, acción antitumoral, inhibe la caries dental, pérdida de peso (Reshad, Jishan and Chowdhury, 2021).

#### **2.2.6. Aplicaciones comerciales del quitosano:**

El quitosano, al margen de las aplicaciones biomédicas, se viene aplicando en diferentes campos, entre ellos la agricultura, la industria alimentaria, el tratamiento de aguas, la minería y el sector ambiental (Reshad, Jishan and Chowdhury, 2021).

En el campo de la agricultura se están buscando nuevas tecnologías, dentro de ellas se sabe que el quitosano puede aumentar el proceso de fotosíntesis en la planta y promueve el crecimiento de la planta, la absorción de nutrientes, la germinación y el brote (El Hadrami *et al.*, 2010). Este polímero se ha adecuado para aplicaciones agrícolas, especialmente en el tratamiento de semillas, como potenciador y también como sustancia bioplaguicida para combatir infecciones fúngicas debido a sus propiedades antifúngicas, propiedades que lo han hecho adecuado también para aplicaciones de horticultura. Esta propiedad permite que el quitosano controle enfermedades de las plantas en la cosecha. Cabe mencionar que se ha aplicado quitosano para elongar la vida útil de los productos como verduras y frutas (Bautista-Baños *et al.*, 2006).

Estudios reportan aplicaciones del quitosano en el tratamiento de aguas, debido a que absorbe iones de metales pesados como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , en diferentes formas, algunos de ellas en formas de perlas (Li and Bai, 2006). Así mismo, el quitosano se usa como agente antimicrobiano, porque las moléculas cargadas positivamente del quitosano interactúan con la membrana celular microbiana cargada negativamente y tienden a separar la membrana celular (Dai, Tanaka and Huang, 2011). En el campo de los

alimentos se emplea como agente floculante y adsorbente y las películas a base de quitosano se aplican en el recubrimiento de alimentos como preservante (Aider, 2010).

### **2.2.7. Nanopartículas:**

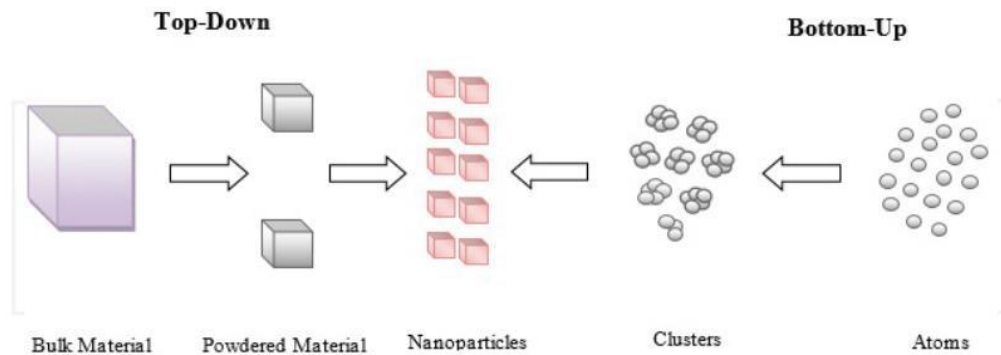
El prefijo griego “nano” equivale a “enano” cuya dimensión es de una millonésima parte de un milímetro ( $1 \times 10^{-9}$  m) (Mendoza and Rodríguez-López, 2017), las nanopartículas están hechas de polímeros naturales o artificiales que varían en tamaño entre 10 y 1000 nm (Kreuter, 2012).

Las propiedades de los materiales en nanoescala son diferentes por dos razones: la primera es que tienen un área de superficie mayor en comparación con la misma masa de material producido en una presentación más grande, lo que los lleva a afectar su propiedades químicas y físicas. La segunda razón, el comportamiento cuántico de la materia a nanoescala, afecta diferentes propiedades como el eléctrico, magnético y óptico (Dowling *et al.*, 2004).

Las nanopartículas a base de polímeros se indagan ampliamente por sus grandes aplicaciones en diversos campos, las nanopartículas pueden ser sintetizadas como nanoesferas o nanocápsulas, para ello, se tiene dos métodos para fabricar materiales a escala nanométrica, los cuáles son: “Arriba – abajo” (“top – down”) y el “Abajo -arriba” (“bottom - up”) (Ver figura 6) (Krishnaswamy and Orsat, 2017).

- **Top – down:** Se trabaja descomponiendo un material grande, mediante la molienda o grabado, obteniendo una nanoestructura. Esta técnica es confiable para obtener dispositivos complejos. Pero, presenta la desventaja de la imperfección del material cristalográfico, la poca estructura superficial, el requerir de mucha energía y generar desperdicios.

- **Bottom - up:** Se basa en el ensamblamiento de átomos hasta formar nanopartículas. A diferencia del primer método, aquí se forma nanopartículas con menos defectos y químicamente más estable. Dentro de este método tenemos 3 procedimientos como: Síntesis química, autoensamblaje y ensamble posicional.



**Figura 6.** Esquema de método de síntesis de nanopartículas, la imagen de izquierda a derecha el proceso de “Top – Down” y de derecha a izquierda “Bottom – up”

En cuanto a la síntesis de nanopartículas de quitosano se ha venido usando diferentes métodos, los cuales deben cumplir ciertos criterios como: tamaño, estabilidad química, térmica y del producto final; además de toxicidad excedente al obtener el producto final (Herrera Barros *et al.*, 2016). Dentro de los métodos usados tenemos a la emulsión “cross-linking”, la precipitación, el inverso de micelar, el de gelificación iónica, etc. (Agarwal *et al.*, 2015).

### 2.2.8. Método de Gelación Iónica o Gelificación ionotrópica:

La gelación iónica o gelificación ionotrópica es una técnica que nos ayuda a sintetizar materiales con un espesor menor a 1000  $\mu\text{m}$ . Esta técnica requiere materiales de recubrimiento como: proteínas, gomas, lípidos, celulosas, materiales inorgánicos (Patil, Chavanke and Wagh, 2012).

La técnica de gelificación iónica fue desarrollada por Pilar Calvo y colaboradores (Calvo *et al.*, 1997). En este método, las soluciones de polímeros y las soluciones de

polianiones se mezclan para formar nanopartículas, en la mezcla ocurre una interacción electrostática entre el grupo amino (cargado positivamente) y el grupo polianión (cargado negativamente), además se vuelve simple al trabajar en una condición simple y suave como el ambiente acuoso. Las nanopartículas se formarán con agitación mecánica a temperatura ambiente y se observará una fase de transición de líquido a gel (Agarwal *et al.*, 2015).

La gelación iónica presenta ventajas como que no utiliza altas temperaturas, además, al usar materiales de recubrimiento de bajo peso molecular, ayudan a que el producto final tenga una rápida liberación a través del gel (Ji *et al.*, 2019).

#### **2.2.8.1 Nanopartículas de quitosano mediante gelación - iónica**

Al disolver quitosano en ácido acético diluido, este último al estar diluido en agua genera iones acetato ( $CH_3COO^-$ ) e hidronio ( $H_3O^+$ ), luego al agregar el quitosano a la solución, el hidronio reacciona con el grupo amino ( $-NH^{+3}$ ) del quitosano, donde se obtiene quitosano protonado. Así mismo, se disuelve el Tripolifosfato de Sodio (TPP), obteniéndose iones hidroxilo ( $OH^-$ ) e iones fosfóricos ( $P_3O_{10}^{-5}$ ), iones que compiten para unirse de manera aleatoria al grupo amino ( $-NH^{+3}$ ) del quitosano; posteriormente, se agrega al quitosano gota a gota. El quitosano posee estructura lineal y al entrar en contacto con el TPP pierden su linealidad y pueden aparecer en bucles con o sin enredos. El grado de enredo depende del peso molecular del quitosano usado (Kunjachan and Jose, 2010). Seguidamente, bajo agitación mecánica se forman nanopartículas a temperatura ambiente. El material sufre una transición de fase líquida a fase de gel debido a la interacción (Bhumkar and Pokharkar, 2006).

#### **2.2.9. Quesos**

El 43% de la producción de leche en el Perú es destinada para elaborar productos lácteos. La elaboración de los productos lácteos como el queso, son hechos por pequeños y medianos productores (MYPES) (Flüeler and Marbach, 2021).

El queso como producto lácteo aporta diversos nutrientes como: Vitamina D, potasio, calcio, fósforo y proteínas; pero, estos nutrientes varían de acuerdo al tipo de queso (Saldaña, 2015). En los últimos años, en el Perú, se ha incrementado el consumo de quesos, sin embargo aún no se ha podido superar en el consumo a países como Grecia, Francia, Estados Unidos, Argentina, etc. (Flüeler and Marbach, 2021).

#### **2.2.9.1 Clasificación del queso**

Los podemos clasificar por su elaboración, teniendo quesos frescos y maduros, los primeros solo llevan un proceso de fermentación de la leche, mientras que, los quesos maduros además de dejar fermentar la leche tienen un proceso llamado maduración, proceso que dura días o meses, tales como: queso tierno (< 21 días), queso oreado (entre 21 – 90 días), semicurado (entre 3 – 6 meses) y curado (más de 6 meses) (Martínez, 2017).

Los quesos se pueden clasificar por el contenido de grasa como: quesos magros (menor del 20%), semimagros (del 25 al 45%), grasos (entre 45% - 60%) y extra grasos (mayor a 60%), además poseen elevada humedad, un sabor blando y tiempo de vida corto en el expendio, por lo que se recomienda refrigerar (Saldaña, 2015).

#### **2.2.9.2 Composición de los quesos**

El queso al igual que la leche coinciden en muchas propiedades nutricionales, pero posee mayor grasa de origen animal; además, aporta elementos como fósforo y calcio que son importantes para las personas. A pesar que, los quesos no poseen el mismo valor nutricional, por su gran variedad, la gran mayoría de quesos proveen de minerales, vitaminas, proteínas, calcio y fósforo (Martínez, 2017).

Para obtener queso depende mucho de la concentración de la leche y el agua que se usa, pues el excedente que se deshecha, elimina elementos solubles y proteínas no coaguladas, además, el agua que retiene el queso es usada por los microorganismos para su proliferación y estos determinan algunos parámetros como: maduración, conservación, velocidad de fermentación, textura, color, etc.; finalmente, la caseína es determinante para formar compuestos aromáticos (Saldaña, 2015).

#### **2.2.9.3 Características sensoriales de los quesos**

Debido al alto valor proteico del queso, estos valores se ven influenciados por aspectos como: Composición de la leche, coagulación del queso y las etapas de almacenamiento. Lo anterior mencionado aplica principalmente para quesos maduros, ya que, el queso fresco tiene consistencia más suave debido a la humedad que posee y color blanco-amarillento (García Islas, 2006).

#### **2.2.9.4 Características Físico-químicas del queso**

Los quesos tienen una variabilidad sensorial debido a la alteración de las características mencionadas en la Tabla 1, las cuáles se clasifican en tres categorías: composición de la leche, cuajada (coagulación, desuerado) y almacenamiento (Saldaña, 2015).

#### **2.2.9.5 Características microbiológicas del queso**

El queso al tener ausencia de oxígeno, debido a su potencial óxido – reducción electronegativa, permite la proliferación de los microorganismos propios de la leche, incrementando el riesgo sanitario para el consumidor final. El indicador que más influye es el agua libre (*aw*) disponible, la cual es aprovechada por los microorganismos (Vásquez *et al.*, 2012). Por ende, durante el análisis de la calidad microbiológica se considera como indicador la presencia de aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* sp.; cada uno de



estos microorganismos tiene un parámetro de acuerdo a la norma técnica peruana (Ver tabla 2) (Ministerio de Salud, 2008).

**Tabla 1.** Propiedades Físico-químicas del queso (Saldaña, 2015).

Propiedad	Medición
pH	5,4
Humedad (%)	45
Rendimiento (%)	11
Grasas (%)	20,5
Sólidos totales (%)	46,6
Cenizas (%)	3,5
Temperatura de congelación (°C)	-0,55
Tensión superficial (N/m)	50

**Tabla 2.** Criterios microbiológicos establecidos por la Norma Técnica Peruana (Ministerio de Salud, 2008).

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Coliformes	5	3	5	2	$5 \times 10^2$	$10^3$
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	5	2	10	$10^2$
<i>Escherichia coli</i>	6	3	5	1	3	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia/ 25g	...
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/ 25g	...

## **2.2.10. Inocuidad Alimentaria**

### **2.2.10.1 Definición:**

Se define como el grupo de condiciones y medidas necesarias durante la producción, almacenamiento, distribución y preparación de alimentos que al momento de ser ingeridos por las personas no sean un riesgo para la salud. (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, 2018).

### **2.2.10.2 Inocuidad alimentaria en el mundo**

Los alimentos insalubres representan una amenaza para la salud del consumidor, es por ello que se trabaja para mejorar la fabricación y las demás fases, pues esto beneficiaría de manera global, ya que los consumidores afectados principalmente poseen recursos limitados y suelen vivir en zonas rurales (Peralta, 2020).

Los alimentos contaminados aumentan el índice de desnutrición, un claro ejemplo es que los alimentos básicos son casi indispensables en los países en vías de desarrollo, pero no lo son las frutas, verduras y otros alimentos de fuente animal. En el 2019, aproximadamente 750 millones de personas, estuvieron en riesgo de un alimento contaminado, la estadística se agrava con la pandemia de COVID-19 pues se tenía un índice elevado de personas desnutridos en el mundo (FAO, 2020).

En Latinoamérica, el país azteca, México, ha agregado acciones preventivas para que se pueda expender alimentos inocuos. Las norma castiga a los establecimientos, empresas de productos alimentarios, actividades, equipos, transporte y personas que representen riesgo o daño a la salud de la población en general, a través de prácticas de repercusión personal y colectiva a través de la modificación de su Ley General de Salud y la formulación e implantación del Programa Nacional de Salud (Juan-López, 1994).

### **2.2.10.3 Inocuidad de alimentos en Perú**

En el Perú, se debe garantizar a la población el consumo de alimentos y bebidas, ya que, deben ser aptas y no deben generar daño alguno a la salud, los parámetros se indican en la “Norma Sanitaria que establece los Criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo humano” (Ministerio de Salud, 2008).

### **2.2.11. Enfermedad Transmitida por alimentos**

Las infecciones alimentarias son de carácter infeccioso o toxigénico, los agentes patógenos pueden causar diarrea grave o infecciones debilitantes, estos agentes suelen ser: parásitos, bacterias, virus o sustancias químicas presentes en los alimentos. Las enfermedades transmitidas por los alimentos en el peor de los casos ocasiona la muerte (Organización Mundial de la Salud - OMS, 2015).

Las bacterias como: *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli enterohemorrágica*, son los patógenos más comunes de enfermedades transmitidas por alimentarios. En el primer patógeno, la enfermedad salmonelosis se asocia a alimentos como carne de aves, huevos u otras carnes de origen animal; así mismo, la infección alimentaria causada por *Campylobacter* es causada por el consumo de leche cruda, carne de ave cruda o poco cocida, mientras que, *E. coli enterohemorrágica* se asocia con el consumo de leche no pasteurizada, carne poco cocinada, fruta y hortalizas frescas (Minsalud, 2015).

Así mismo, patógenos como *L. monocytogenes* son muy peligrosos para personas con inmunidad disminuida, mujeres embarazadas, niños y ancianos; además, se lo encuentra en alimentos procesados y en productos lácteos comunes como quesos, los cuales son un buen sustrato para el crecimiento de esta bacteria, ya que contienen proteínas, lactosa y oligoelementos (Lobacz, Zulewska and Kowalik, 2016). A pesar de que la infección por esta bacteria no es muy común, las consecuencias pueden llegar a ser mortales.

*S. aureus*, es una bacteria que con frecuencia se encuentra en la piel y mucosas de los humanos, por lo tanto, puede llegar a los alimentos y contaminarlos a través de quienes tienen una inadecuada manipulación de los alimentos; pues cuando la bacteria está sobre el índice de  $10^5$  UFC/g en el alimento, puede contener enterotoxinas y producir intoxicación alimentaria. Como se mencionó, la presencia de *S. aureus* en un alimento se asocia a una inapropiada manipulación o al empleo de materias primas contaminadas, además, la intoxicación alimentaria por estafilococos no es resultado de la ingestión de la bacteria, sino de su toxina (Bryan, 1982) (Alonso and Poveda, 2008).

La carga microbiana en un alimento influye mucho en la salud del consumidor, pues, si la carga microbiana es elevada originará una infección en la persona, dañando la salud de los consumidores; sin embargo, algunos patógenos como *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. solo necesitan estar presentes en los alimentos para producir un cuadro severo a la salud de la persona o incluso, pueden llevar a la muerte.

#### **2.2.12. Uso de Petrifilm para análisis de alimentos**

Los análisis de alimentos están destinados a la detección de microorganismos patógenos o alterantes, los métodos tradicionales para analizar alimentos involucran preparación de material, esterilización, periodos de incubación muy largos y tiempo de la persona que está a cargo, a raíz de que en algunas ocasiones es necesario dar resultados un poco más rápido, se ha desarrollado métodos técnicas de recuento rápido y efectivo que involucren la menor cantidad de pasos posibles, es así como tenemos las placas de petrifilms, que de manera general nos brinda resultados en tres pasos: Inoculación, incubación y recuento. Además, las placas petrifilms nos ayudan al recuento de bacterias en específico, por ello se tiene: placas petrifilm para aerobios mesófilos viables, Enterobacterias, *E. coli*/Coliformes, *Staphylococcus aureus*, entre otros, que son confiables para quién los usa (Alonso and Poveda, 2008).

### 2.3. Definición de Términos:

- **Nanotecnología:**

Fabricación y estudio del comportamiento de materiales a escala nanométrica.

- **Biocompatibilidad:**

Acoplamiento de un elemento médico foráneo con los tejidos o sistemas del organismo, además de no ser tóxico o perjudicial y sobre todo no causar un rechazo del sistema inmune.

- **Biodegradación:**

Procedimiento por el cual la materia orgánica se transforma parcial o totalmente en: Energía,  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$  y nueva biomasa por microorganismos (bacterias y hongos).

- **Nanopartículas:**

Partículas que tienen un tamaño de 1 a 100 nm, además de encontrarse en 3 dimensiones.

- **Quitosano:**

Biopolímero natural que deriva de la quitina mediante deacetilación.

- **Inocuidad Alimentaria:**

Alimentos que no afecten a la salud del consumidor.

- **Enfermedades Transmitida por Alimentos:**

Enfermedad ocasionada por microorganismos, parásitos o por sustancias tóxicas que estos producen.

## CAPÍTULO III

### DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

#### **3.1. Nivel de Investigación:**

Relacional.

#### **3.2. Tipo y diseño de investigación:**

##### **3.2.1. Tipo de investigación:**

Básica.

##### **3.2.2. Diseño de Investigación:**

Experimental.

#### **3.3. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos**

##### **3.3.1. Síntesis de Nanopartículas a base de quitosano:**

###### **3.3.1.1. Preparación de Ácido Acético Glacial al 1%:**

Un mL de ácido acético glacial se diluyó en 99 mL de agua inyectable previamente refrigerada; la dilución se preparó en una fiola de 100 mL de capacidad, seguidamente se sometió a agitación a 600 RPM durante 10 min (Apéndice N° 01).

###### **3.3.1.2. Preparación del Tripolifosfato de Sodio (TPP) al 1%:**

Se mezcló 1 g Tripolifosfato de Sodio con 99 mL agua inyectable previamente refrigerada; la solución se preparó en una fiola de 100 mL de capacidad. Seguidamente, la mezcla se sometió a agitación a 600 RPM durante 10 min (Apéndice N° 02).

###### **3.3.1.3. Preparación de la Solución de Quitosano:**

Se preparó diferentes concentraciones de quitosano (0,5%, 0,6% y 0,7%), para ello se disolvió quitosano en AAG al 1%; luego la solución se homogenizó por agitación a 600 RPM durante 24 h. La solución homogénea de quitosano (SQT) se mantuvo a una

temperatura menor a 7° C y a pH entre 4,6 y 4,7; cuando el pH fue menor se usó NaOH al 10 N para llevar la solución a los valores mencionados. (Apéndice N° 03).

#### **3.3.1.4. Preparación de la mezcla de soluciones de Quitosano y TPP al 1%**

A la solución de quitosano con AAG al 1% previamente preparada (SQT), se le agregó gota a gota la solución de TPP al 1%, por cada 5 mL de SQT se agregó 1 mL de solución de TPP al 1%, en un ambiente de dónde la temperatura debió mantenerse menor a 7 °C hasta observar una solución lechosa (SLQ). Seguidamente, la SLQ se agitó a 600 RPM durante 30 min para obtener una solución homogénea (Apéndice N° 04).

#### **3.3.1.5. Centrifugación, lavado y secado (Apéndice N° 04):**

- **Primera centrifugación:**

La solución lechosa (SLQ) se pasó a tubos Falcon de 50 mL de volumen, sin embargo, solo se ocupó 45 mL de volumen en cada tubo. Se centrifugó a 7500 RPM durante 40 min a una temperatura de 7 °C.

- **Primer lavado:**

Al terminar la primera centrifugación se retiraron los tubos Falcon y se desechó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en agua destilada y se aplicó un vórtex. Se usó el vórtex por 2 min a una velocidad de 7000 RPM, luego se procedió a generar fricción (fuerza mecánica) del tubo Falcon con un objeto contundente durante 30 s, se llevó al vórtex nuevamente con la misma velocidad durante 1 min, todo lo anterior, para redispersar las partículas; el mismo procedimiento se realizó para todos los tubos.

- **Segunda centrifugación:**

Luego de redispersar las partículas en el vórtex, se procedió a centrifugar nuevamente durante 40 minutos a 7500 RPM bajo 7 °C de temperatura.

- **Segundo lavado:**

Terminada la segunda centrifugación se retiraron los tubos Falcon y se desechó el sobrenadante; el sedimento se resuspendió en agua destilada y se llevó el tubo al vórtex durante 2 min a una velocidad de 7000 RPM, luego se procedió a generar fricción del tubo Falcon con un objeto contundente durante 30 s, se llevó al vórtex nuevamente con la misma velocidad, durante 1 min; el mismo procedimiento se realizó para todos los tubos.

- **Tercera centrifugación:**

Luego de redispersar las partículas en el vórtex, se procedió a centrifugar por última vez durante 30 min a 7500 RPM a 7 °C. Una vez que el equipo terminó de centrifugar, se procedió a sacar los tubos y desechar el sobrenadante para el siguiente paso.

- **Secado:**

El material semiconsistente obtenido en el paso anterior se llevó al horno, a una temperatura constante (50° – 55° C) durante 18 – 20 h. Una vez que el tiempo se cumplió se recogió los tubos Falcon, en los cuáles se obtuvo el gel de quitosano (GQ), este gel está listo para su caracterización y uso.

### **3.3.1.6. Pruebas antibacterianas:**

- **Obtención de muestras:**

Se colectó muestras de queso suizo, de manera aleatoria y en grupos de 5, de diferentes puntos de venta en la ciudad de Cajamarca. Los quesos se transportaron en cadena de frío lo antes posible al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca para los ensayos respectivos.

- **Preparación de materiales:**



Se procedió a limpiar, desinfectar y esterilizar los materiales a usar. Una vez que el lugar estaba limpio y desinfectado se procedió a desempacar los quesos que se colectaron dividiéndolos en 3 grupos de 5 cada grupo. Seguidamente, se realizó un compósito del primer grupo para su análisis.

Se pesó 25 g del compósito y se transfirió a 225 mL de Caldo Citratado al 2%; obteniendo así la dilución  $10^{-1}$ ; seguidamente, de la dilución  $10^{-1}$  se extrajo 10 mL de solución y se inoculó en un tubo con 90 mL de agua peptonada estéril (APE), siendo nuestra dilución  $10^{-2}$ , posteriormente de la dilución  $10^{-2}$ , se extrajo 10 mL de solución y se inoculó en un tubo con 90 mL de agua peptonada estéril (APE), obteniendo la dilución  $10^{-3}$ .

De la última dilución, se extrajo 15 mL de suspensión bacteriana y se transfirió a 4 tubos estériles (3 tubos con el gel y 1 control). Seguidamente, se separó el tubo control y a cada tubo, por separado, se le agregó el gel de quitosano (GQ) previamente preparado a diferentes concentraciones (GQ 0,5%, GQ 0,6% y GQ 0,7%), los cuáles se incubaron a  $35^{\circ}$  -  $37^{\circ}$  °C durante 24 horas.

Seguidamente, de cada tubo, se procedió a realizar la siembra en placas petrifilm (Staph Express, Enterobacterias, *E. coli* / Coliformes y Cuenta Aerobia), cada siembra se realizó por triplicado. Consecutivamente, se llevaron las placas petrifilm inoculadas a incubar durante 24 horas a  $35^{\circ}$  °C –  $37^{\circ}$  °C. Finalmente, luego del tiempo indicado se realizó las lecturas de acuerdo a las indicaciones de cada placa petrifilm.

El mismo procedimiento se repitió para los siguiente dos compósitos que se trabajaron.

### **3.3.2. Caracterización del gel:**

#### **3.3.2.1. Caracterización del gel a base de quitosano obtenido por DLS:**

El tamaño de las nanopartículas de quitosano se estimó usando la técnica de escaneo por dispersión de luz dinámica (DLS) a partir de un radio hidrodinámico que nos brinda la técnica. Se agregó una alícuota de 700  $\mu\text{m}$ , de la suspensión de nanopartículas dentro del equipo, en el portamuestra, con las siguientes condiciones: T°: 23° C, índice de refracción: 1,333, Ángulo de detección: 173°.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Resultados:

##### 4.1.1. Resultados del análisis microbiológico

A continuación, en las siguientes tablas, se mostrará los resultados promedios de los recuentos bacterianos, desde el compuesto control que de acuerdo al recuento de UFC/g nos brinda un panorama para determinar si los tratamientos aplicados han disminuido y/o eliminado la carga bacteriana de los quesos.

**Tabla 3:** Recuento promedio en UFC/g del compuesto control antes de los tratamientos.

Recuento promedio del Compósito – Control						
PRODUCTO	Coliformes	<i>E. coli</i>	Aerobios	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>S. aureus</i>	Enterobacterias
	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g
PROMEDIO	42077.78	433.33	MNPC	34733.33	32666.67	30255.56

**Tabla 4:** Recuento promedio en UFC/g del compuesto aplicando el tratamiento 1 (Gel de quitosano a 0,5%).

Recuento promedio del Compósito – Tratamiento 1						
PRODUCTO	Coliformes	<i>E. coli</i>	Aerobios	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>S. aureus</i>	Enterobacterias
	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g
PROMEDIO	3344.44	AUSENCIA	2111.11	5622.22	8322.22	333.33

**Tabla 5:** Recuento promedio en UFC/g del compósito aplicando el tratamiento 2 (Gel de quitosano a 0,6%).

<b>Recuento promedio del Compósito – Tratamiento 2</b>						
<b>PRODUCTO</b>	<b>Coliformes</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b>Aerobios</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b>Enterobacterias</b>
	<b>UFC/g</b>	<b>UFC/g</b>	<b>UFC/g</b>	<b>UFC/g</b>	<b>UFC/g</b>	<b>UFC/g</b>
<b>PROMEDIO</b>	2055.55	AUSENCIA	3966.67	2277.78	7855.56	355.56

**Tabla 6:** Recuento promedio en UFC/g del compósito aplicando el tratamiento 3 (Gel de quitosano a 0,7%).

<b>Recuento promedio del Compósito – Tratamiento 3</b>						
<b>PRODUCTO</b>	<b>Coliformes</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b>Aerobios</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b>Enterobacterias</b>
	<b>UFC/g</b>	<b>UFC/g</b>	<b>UFC/g</b>	<b>UFC/g</b>	<b>UFC/g</b>	<b>UFC/g</b>
<b>PROMEDIO</b>	744.44	AUSENCIA	733.33	5033.33	5811.11	277.78

#### **4.1.2. Caracterización del gel a base de quitosano:**

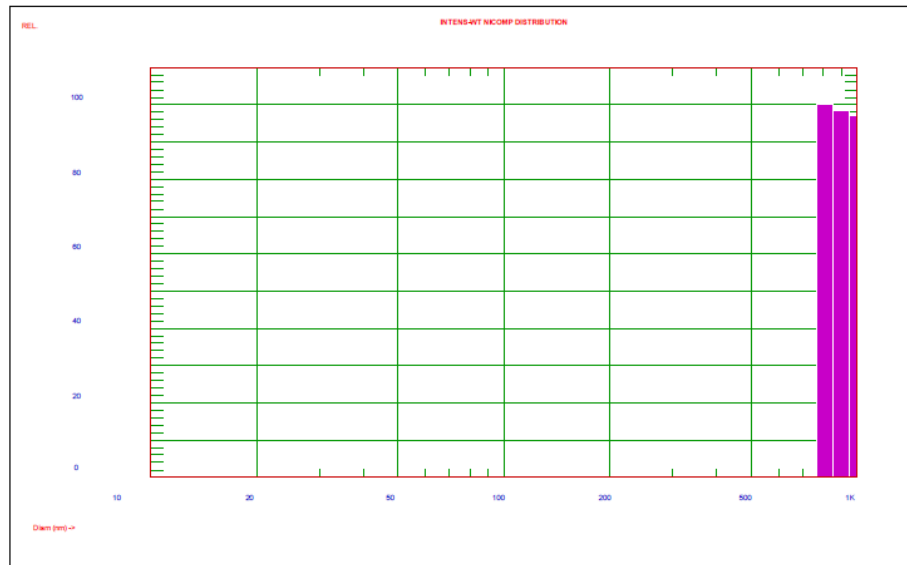
##### **4.1.2.1. Medición del gel mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS):**

Una vez obtenidos los geles a diferentes concentraciones, se procedió a hacer una suspensión con las nanopartículas y así medir el tamaño de las partículas mediante la técnica de DLS

**Tabla 7:** Medición en DLS de las partículas del gel a base de quitosano a diferentes concentraciones.

<b>Concentración del gel</b>	<b>0,5%</b>	<b>0,6%</b>	<b>0,7%</b>
<b>Tamaño hidrodinámico(nm)</b>	903,0	902,5	902,3

Peak #1: Mean Diam.= 903.0 nm, S.Dev.= 97.0 nm (10.7%) Intens.= 100.0 %

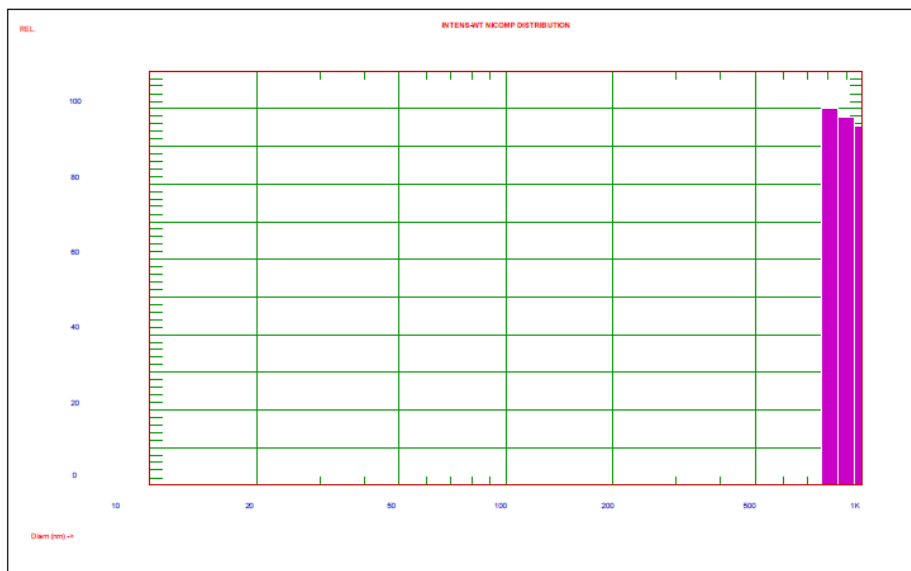


Run\_Sample

Mean Diameter = 903.0 nm Fit Error = 227.582 Residual = 127.477

**Figura 7:** Medición en DLS de las partículas del gel a base de quitosano en una concentración de 0,5%

Peak #1: Mean Diam.= 902.5 nm, S.Dev.= 97.5 nm (10.8%) Intens.= 100.0 %

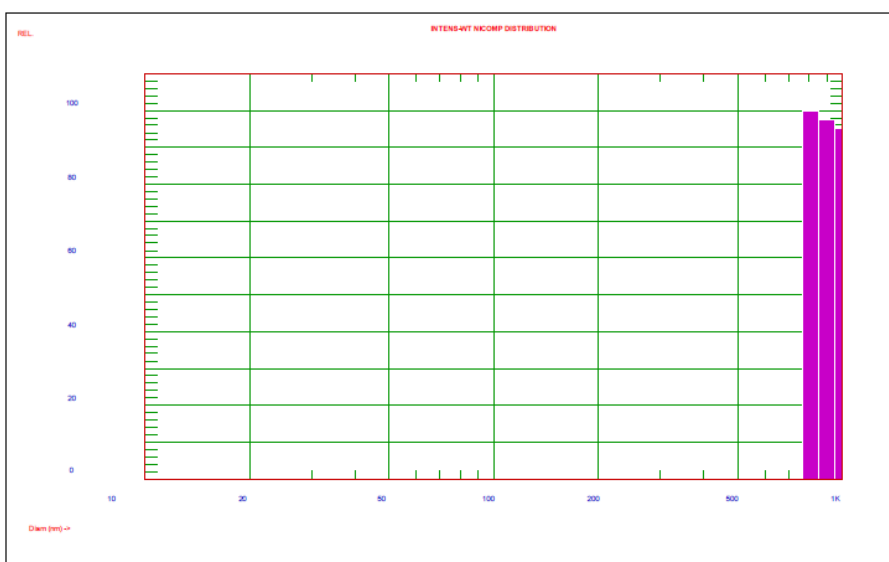


Run\_Sample

Mean Diameter = 902.5 nm Fit Error = 350.428 Residual = 125.602

**Figura 8:** Medición en DLS de las partículas del gel a base de quitosano en una concentración de 0,6%

Peak #1: Mean Diam. = 902.3 nm, S.Dev. = 97.7 nm (10.8%) Intens. = 100.0 %



test.552

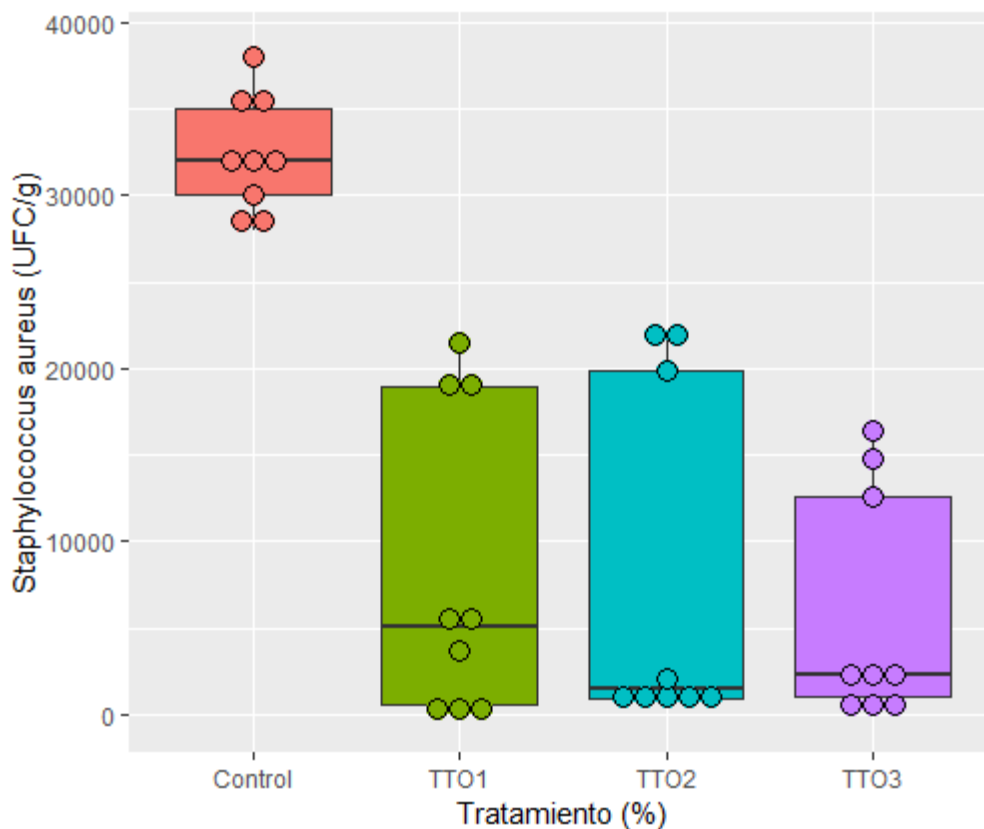
Mean Diameter = 902.3 nm Fit Error = 309.887 Residual = 125.716

**Figura 9:** Medición en DLS de las partículas del gel a base de quitosano en una concentración de 0,7%.

#### 4.1.3. Resultados microbiológicos:

##### 4.1.3.1. Recuento de las colonias de *Staphylococcus aureus*:

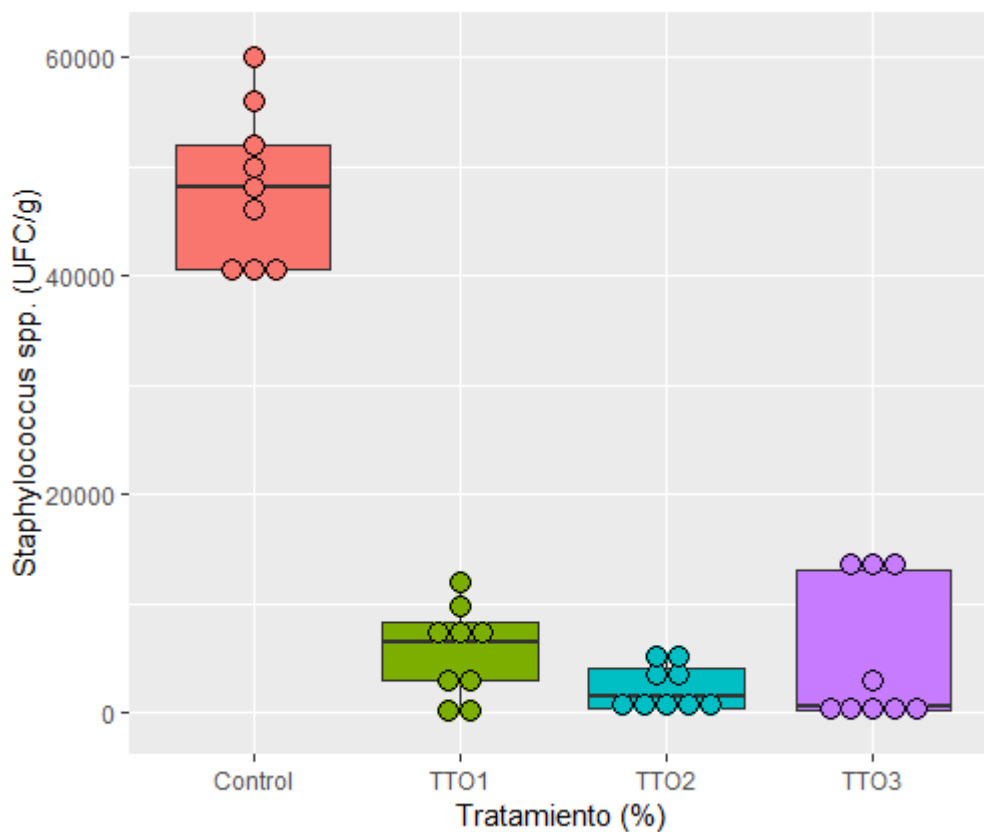
Se realizó un recuento promedio de las colonias violetas que crecieron en la placa petrifilm STX, tanto para el control como para los tratamientos para aplicar el diagrama de caja y bigotes.



**Figura 10:** Diagrama de cajas y bigotes que muestra en UFC (Unidades formadoras de colonias) de *Staphylococcus aureus* en el control y tres tratamientos con gel a base de quitosano a diferentes concentraciones (0,5%, 0,6%, 0,7%).

#### 4.1.3.2. Recuento de las colonias de *Staphylococcus spp.*:

Se realizó un recuento promedio de las colonias verdes que crecieron en la placa petrifilm STX, tanto para el control como para los tratamientos para aplicar el diagrama de caja y bigotes.

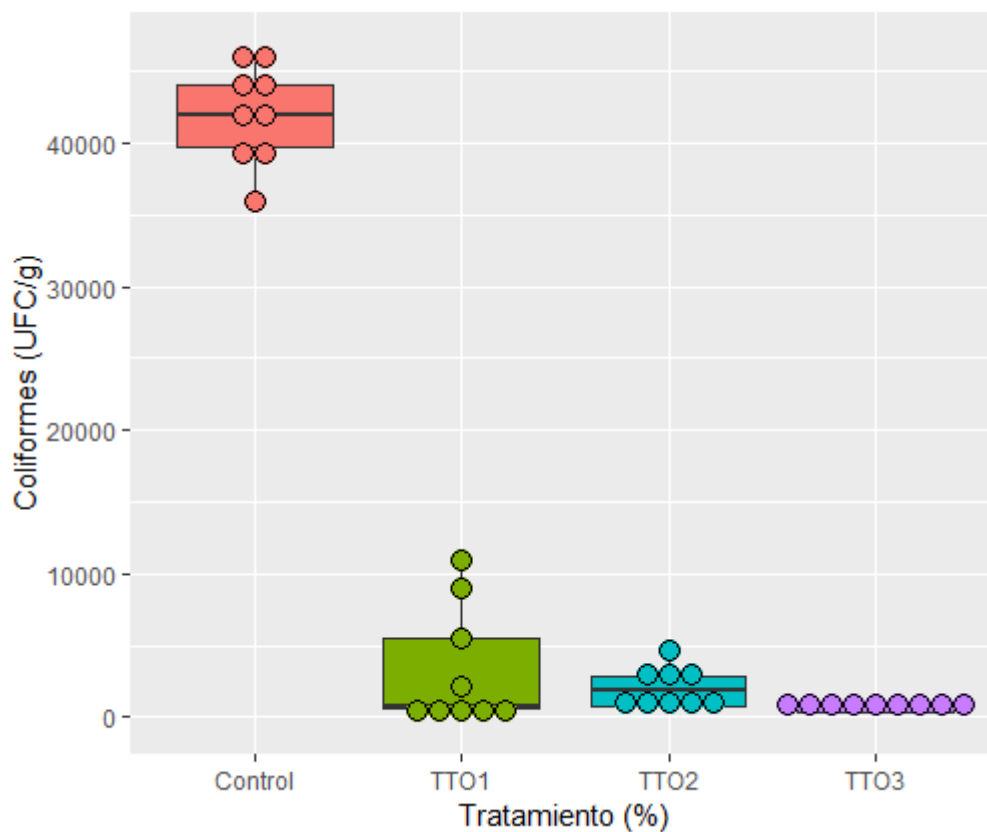


**Figura 11:** Diagrama de cajas y bigotes que muestra en UFC (Unidades formadoras de colonias) de *Staphylococcus spp.* en el control y tres tratamientos con gel a base a quitosano en diferentes concentraciones (0,5%, 0,6%, 0,7%).

#### 4.1.3.3. Recuento de las colonias de Coliformes:

Se realizó un recuento promedio de las colonias rojas con burbuja que crecieron en la placa petrifilm EC, tanto para el control como para los tratamientos para aplicar el diagrama de caja y bigotes.

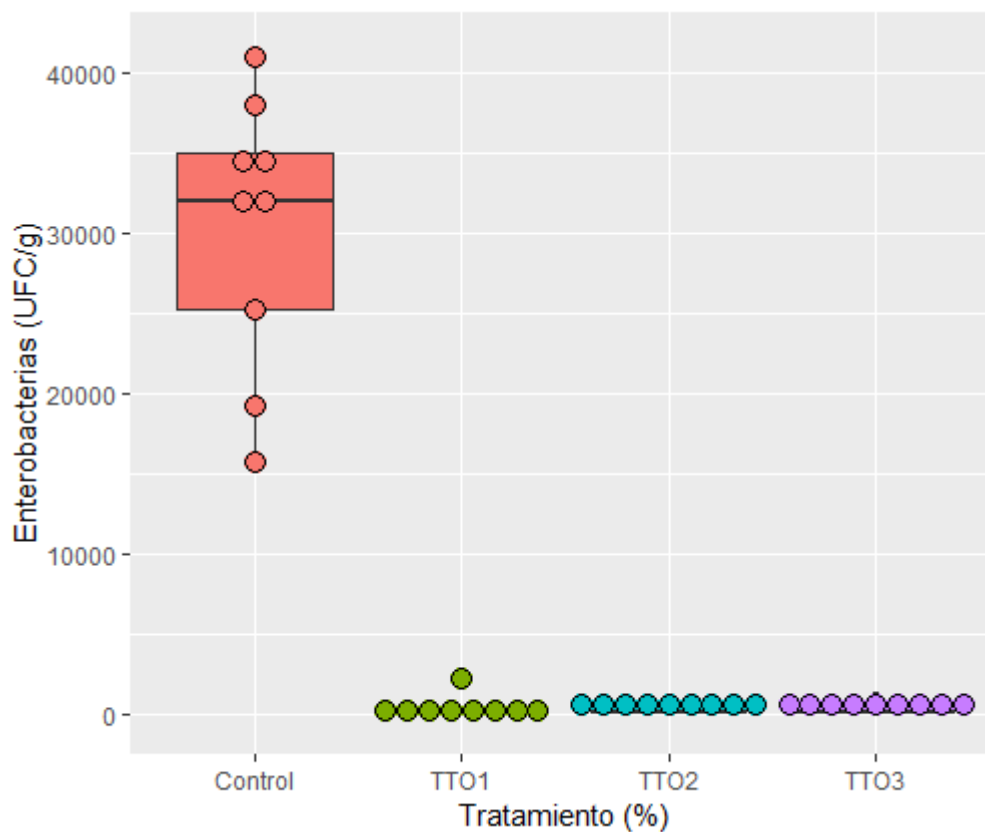




**Figura 12:** Diagrama de cajas y bigotes que muestra en UFC (Unidades formadoras de colonias) de Coliformes en el control y tres tratamientos con gel a base de quitosano a diferentes concentraciones (0,5%, 0,6%, 0,7%).

#### 4.1.3.4. Recuento de las colonias de Enterobacterias:

Se realizó un recuento promedio de las colonias rojas con gas, rojas con zona amarilla con burbuja que crecieron en la placa petrifilm EB, tanto para el control como para los tratamientos para aplicar el diagrama de caja y bigotes.



**Figura 13:** Diagrama de cajas y bigotes que muestra en UFC (Unidades formadoras de colonias) de Enterobacterias en el control y tres tratamientos con gel a base de quitosano a diferentes concentraciones (0,5%, 0,6%, 0,7%).

#### 4.1.3.5. Pruebas No Paramétricas:

Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis:

- **Kruskal-Wallis rank sum test - data:** Coliformes by Tratamiento

**Kruskal-Wallis chi-squared** = 21.822, df = 3, p-value = 7.102e-05; indica que sí hay significancia estadística

- **Kruskal-Wallis rank sum test - data:** *Staphylococcus.sp.* by Tratamiento

**Kruskal-Wallis chi-squared** = 20.5, **df** = 3, **p-value** = 0.0001337; indica que sí hay significancia estadística.

- **Kruskal-Wallis rank sum test - data:** *S. aureus* by Tratamiento

**Kruskal-Wallis chi-squared** = 19.845, **df** = 3, **p-value** = 0.0001828; indica que sí hay significancia estadística.

- **Kruskal-Wallis rank sum test - data:** Enterobacterias by Tratamiento

**Kruskal-Wallis chi-squared** = 21.818, **df** = 3, **p-value** = 7.119e-05; indica que sí hay significancia estadística.

- **Kruskal-Wallis rank sum test - data:** Aerobios by Tratamiento

**Kruskal-Wallis chi-squared** = 2.4151, **df** = 2, **p-value** = 0.2989; indica No hay significancia estadística

Luego de realizar la prueba no paramétrica se puede contrastar que el único tratamiento que no tiene significancia estadística es para aerobios mesófilos viables.

#### **4.1.3.6. Pruebas post hoc:**

Para poder determinar entre qué tratamientos podría haber diferencias estadísticas en cuanto a su efecto debemos hacer una prueba estadística adicional, en conjunto se llaman pruebas post hoc.

**Tabla 8:** Prueba post hoc del control y tratamientos para coliformes.

<b>Data de Coliformes: Control y Tratamientos</b>			
<b>DATA</b>	<b>CONTROL</b>	<b>TT01</b>	<b>TT02</b>
<b>TT01</b>	0,00081	-	-
<b>TT02</b>	0,00081	1, 00 00 0	-
<b>TT03</b>	0,00081	0, 37 09 6	0,05041

**Tabla 9.** Prueba post hoc del control y tratamientos para *Staphylococcus.spp.*

<b>Data de <i>Staphylococcus.sp.</i>: Control y Tratamientos</b>			
<b>DATA</b>	<b>CONTROL</b>	<b>TT01</b>	<b>TT02</b>
<b>TT01</b>	$8 e^{-04}$	-	-
<b>TT02</b>	$8 e^{-04}$	$2 e^{-01}$	-
<b>TT03</b>	$8 e^{-04}$	$1 e^{+00}$	$1 e^{+00}$

**Tabla 10.** Prueba post hoc del control y tratamientos para *Staphylococcus aureus.*

<b>Data de <i>Staphylococcus aureus</i>: Control y Tratamientos</b>			
<b>DATA</b>	<b>CONTROL</b>	<b>TT01</b>	<b>TT02</b>
<b>TT01</b>	0,0008	-	-
<b>TT02</b>	0,0008	0, 92 96	-
<b>TT03</b>	0,0008	0, 84 75	0, 92 96

**Tabla 11.** Prueba post hoc del control y tratamientos para Enterobacterias.

<b>Data de Enterobacterias: Control y Tratamientos</b>			
<b>DATA</b>	<b>CÒNTROL</b>	<b>TT01</b>	<b>TT02</b>
<b>TT01</b>	0,00071	-	-
<b>TT02</b>	0,00071	0, 82 01 4	-
<b>TT03</b>	0,00071	0, 82 49 7	0, 92273

**Tabla 12.** Prueba post hoc del control y tratamientos para Aerobios mesófilos viables.

<b>Data de Aerobios mesófilos viables.: Control y Tratamientos</b>		
<b>DATA</b>	<b>Control</b>	<b>TT02</b>
<b>TT01</b>	-	-
<b>TT02</b>	0,44	-
<b>TT03</b>	0,39	0,39

## 4.2. Discusión:

En la tabla 7 se muestran los resultados del tamaño hidrodinámico de las partículas medidas por DLS, siendo el menor tamaño de 902,3 nm a una concentración de quitosano de 0,7%, seguido por el tamaño de 902,5 nm a una concentración de quitosano de 0,6% y el mayor tamaño de 903 nm a una concentración de quitosano de 0,5%. A pesar de no tener menos de 100 nm, el tamaño hidrodinámico se mide con una capa de agua, por lo que el tamaño real sería menor y por ello se considera nanopartícula, de acuerdo a como se menciona en otro trabajo realizado (O'Callaghan and Kerry, 2016). Seguidamente, según Antoniou, el tamaño de las partículas a base de quitosano aumenta, a medida que crece la concentración de TPP, además, el peso molecular también influye en el tamaño final de las partículas, en el quitosano de bajo peso molecular, la concentración molar es mayor y por ello es mayor la tasa de difusión del quitosano (Antoniou *et al.*, 2015); por eso que, para este trabajo se utilizó quitosano de bajo peso molecular. Así mismo, se considera al pH como factor influyente en el tamaño de las partículas, pues, según Chang, el zeta potencial de la solución de quitosano aumenta, si el pH de la solución aumenta, obteniendo así partículas de mayor tamaño (Chang *et al.*, 2015). Es importante destacar, que la variación de tamaños que se observa en la tabla 7, a pesar de que todos han tenido las mismas condiciones, ha sido afectada por la distribución del quitosano en la solución, pues el quitosano de bajo peso molecular es de cadena lineal (Qun and Ajun, 2006).

De acuerdo a las tablas (de la tabla 3 hasta la 6) y los gráficos presentados en los resultados (del gráfico 10 al gráfico 13) se visualiza que hubo una disminución bacteriana en los tratamientos usados con las nanopartículas de quitosano, a comparación de los controles usados, esto es para *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus spp*, Coliformes y Enterobacterias. De acuerdo al trabajo realizado por Lifeng Qi y colaboradores,

determinaron que las nanopartículas de quitosano tienen una influencia antimicrobiana, sin embargo, todo dependerá del disolvente que se usa para obtener las nanopartículas, pues las nanopartículas que se disuelven en agua no tienen un efecto significativo a comparación de las que se disuelven en ácido acético (Qi *et al.*, 2004). En la investigación realizada se usó ácido acético y la actividad antibacteriana fue mayor en los tratamientos que en los controles realizados. Entonces, a partir de resultados anteriores, en los que se demuestra que cuando se usa un disolvente como medio ácido, las nanopartículas tienen una actividad antibacteriana mayor; el uso del ácido acético para la formación de las nanopartículas, contribuye a mejorar estabilidad y rendimiento antibacteriano, esto se debe a la protonación mejorada de las nanopartículas de quitosano (Fan *et al.*, 2012), lo cual nos conlleva a considerar que el aumento de la carga positiva aumenta el grado de interacción con la carga negativa de la superficie celular bacteriana lo que ocasiona, tener mayor actividad inhibitoria bacteriana (Shi *et al.*, 2006). Sin embargo, si el ácido acético y el quitosano, se usan de manera separada e individual, no se pueden lograr las mismas cualidades inhibitoras del quitosano y el ácido acético en combinación, por ello, queda clara la sinergia de estos dos componentes.

Además, las nanopartículas de quitosano tienen algunas características como la solubilidad en agua y la carga positiva, esto es muy probable que se deba a las fuerzas iónicas que ejerce el TPP sobre el quitosano (Käupera and Forresta, 2006). Seguidamente, Nasti y colaboradores recomiendan tener el pH de 4 - 6 para asegurar la estabilidad dentro de las dispersiones de nanopartículas (Nasti *et al.*, 2009). Así mismo, la temperatura (T°) a la que se almacena el quitosano también puede alterar su actividad antibacteriana, de acuerdo a Douglas de Britto, las bacterias *S. aureus*, *Salmonella entérica* y *E. coli* fueron inhibidas por la solución de quitosano almacenada a 4° C de manera más significativa que las del quitosano que no fue refrigerado (Goy, De Britto and Assis, 2009).

Por los resultados obtenidos en este trabajo, se encontró que la actividad antibacteriana de las nanopartículas de quitosano es más significativa si se trata de *E. coli*, Coliformes y Enterobacterias a comparación de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus spp.* Los resultados se contrastan con el trabajo realizado por Wen - Li Du y colaboradores, que observaron que las nanopartículas de quitosano en ácido acético exhibieron una mayor actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas que contra Gram positivas, concluyendo que la diferencia antibacteriana significativa estaba asociada con las diferentes características de las superficies celulares entre las especies Gram negativas y Gram positivas (Du *et al.*, 2009). Así mismo, O' Callaghan y Kerry en su trabajo, sintetizaron nanopartículas de quitosano y demostraron una actividad antibacteriana significativa contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (O' Callaghan and Kerry, 2014). Sin embargo, dentro de este rango nanométrico, no se descifró ninguna tendencia en términos de tamaño que afecte la eficacia antibacteriana, lo cual también fue confirmado por Du *et al.*, en su trabajo con nanopartículas cargadas con iones metálicos (Du *et al.*, 2009).

Se conoce por investigaciones anteriores, que las partículas tienden a aumentar su funcionalidad cuando reducen su tamaño al rango nanométrico, debido a la ruptura de la estructura secundaria causada por el proceso de gelificación iónica, por ende, el quitosano que es llevado a la escala nanométrica posee un área de superficie aumentada y una mayor carga catiónica, lo que permite una mayor afinidad para la interacción y una mayor probabilidad de penetración potencial (Qi *et al.*, 2004). Se describe también que el mecanismo de las nanopartículas de quitosano se debe a la poderosa interacción de cargas que se produce entre las nanopartículas de quitosano cargadas positivamente y la carga negativa en la superficie celular de las células bacterianas (Käupera and Forresta, 2006). Esta interacción da como resultado una estructura policatiónica que altera la estructura



celular, afectando las funciones normales de la membrana celular, como la permeabilidad, y permitiendo la liberación de contenidos intracelulares o inhibiendo el transporte de nutrientes a la célula e induciendo a la muerte bacteriana (Chung *et al.*, 2004).

En los resultados mostrados en este trabajo acerca de la capacidad antibacteriana de las nanopartículas de quitosano sobre *E. coli*, se observa que las nanopartículas inhiben de manera significativa a la bacteria gram negativa. De acuerdo a la teoría, la membrana externa de las bacterias gram negativas tienen relación con la presencia de las moléculas de lipopolisacárido (LPS), ya que los componentes lipídicos y el núcleo interno de estas moléculas contienen grupos aniónicos que contribuyen con la estabilidad de la capa LPS a través de interacciones electrostáticas con cationes divalentes como el  $Mg^{2+}$ , que proporcionan a la bacteria una superficie hidrofílica (Nikaido, 2013). Es por ello que, la membrana externa sirve como barrera contra macromoléculas y compuestos hidrofóbicos, razón porque las bacterias gram negativas son relativamente resistentes a antibióticos hidrofóbicos y fármacos tóxicos (Nikaido and Vaara, 1985).

Las bacterias se ven afectadas por el quitosano a nivel de membrana celular, pues, la membrana se ve alterada por la interacción electrostática del quitosano con las estructuras de la pared celular con cargas negativas (Fosfolípidos o proteínas) o los aminoácidos que se encuentran en la membrana externa de las bacterias gram positivas. La membrana externa de las bacterias gram positivas contienen peptidoglicanos y ácidos teicoicos (polímero polianiónico), que es una base para la actividad de las enzimas unidas a la superficie celular, a diferencia de las gram negativas que contiene un lipopolisacárido hidrofílico (Kong *et al.*, 2010), diferencia que hace que las bacterias gram negativas tengan protección contra macromoléculas, por ello la importancia de llevar el quitosano a una escala de menor tamaño.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones:

Se determinó que las nanopartículas a base de quitosano en la concentración de 0,7% tuvo un mayor efecto antibacteriano sobre *E. coli*, Coliformes, *S. aureus*, y *Staphylococcus spp.*, seguido por la concentración de 0,6% y finalmente en la concentración de 0,5%.

Se logró medir el tamaño de las nanopartículas a base de quitosano mediante la técnica de dispersión de luz dinámica, siendo las partículas más pequeñas con un tamaño promedio de 902,3 nm a la concentración de 0,7%; seguida por la concentración de 0,6% con un tamaño promedio de 902,5 nm y finalmente la concentración de 0,5% con un tamaño promedio de 903 nm.

## **5.2.Recomendaciones:**

Para mejorar la productividad de nanopartículas se recomienda usar equipos que puedan abarcar mayor cantidad de volumen y que se puedan usar en simultáneo (agitador magnético, centrífuga refrigerada, sonicador).

Al realizar el procedimiento de síntesis de nanopartículas se debe utilizar el uso de reactivos químicos de grado puro (TPP, NaOH, ácido acético), ya que la cantidad de residuos e interferencias en la reacción será mínima.

Es importante evaluar otros parámetros como la velocidad de reacción, índice de polidispersidad, potencial Z, densidad de la carga superficial de las moléculas de quitosano; los cuales podrían influir en la formación de nanopartículas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Agarwal, M. *et al.* (2015) ‘Chitosan Nanoparticles based Drug Delivery : an Update’, *International Journal of Advanced Multidisciplinary Research*, 2(4), pp. 1–13.
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N. and Aminabhavi, T. M. (2004) ‘Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery’, *Journal of Controlled Release*, 100(1), pp. 5–28. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.08.010.
- Aider, M. (2010) ‘Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review’, *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 43(6), pp. 837–842. doi: 10.1016/j.lwt.2010.01.021.
- Alonso, L. and Poveda, A. (2008) *Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas petrifilm.*, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. *Comercial Experimental*.
- Antoniou, J. *et al.* (2015) ‘Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles’, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Elsevier B.V., 465, pp. 137–146. doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.10.040.
- Atkins, E. (1985) ‘Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates’, *Journal of Biosciences*, 8(1–2), pp. 375–387. doi: 10.1007/BF02703990.
- Austin, P. R. (1988) ‘Chitin solutions and purification of chitin’, *Methods in Enzymology*, 161(C), pp. 403–407. doi: 10.1016/0076-6879(88)61046-9.
- Bautista-Baños, S. *et al.* (2006) ‘Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities’, *Crop Protection*, 25(2), pp. 108–118. doi: 10.1016/j.cropro.2005.03.010.
- Bhumkar, R. D. and Pokharkar, V. B. (2006) ‘Studies on effect of pH on cross-linking of Chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note’, *AAPS PharmSciTech*, 7(2),

pp. 2–7. doi: 10.1208/pt070250.

Bryan, F. L. (1982) ‘Diseases transmitted by food (A classification and summary)’, *Center for Diseases Control*, 2, p. 101.

Calvo, P. *et al.* (1997) ‘Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines’, *Pharmaceutical Research*, 14(10), p. 1431.

Chang, S. H. *et al.* (2015) ‘pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan’, *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 134, pp. 74–81. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.07.072.

Chung, Y. C. *et al.* (2004) ‘Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall’, *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(7), pp. 932–936.

Cui, H. *et al.* (2017) ‘Improving anti-listeria activity of cheese packaging via nanofiber containing nisin-loaded nanoparticles’, *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 81, pp. 233–242. doi: 10.1016/j.lwt.2017.04.003.

Dai, T., Tanaka, M. and Huang, Y. (2011) ‘Chitosan preparations for wound and burns: Antimicrobial and wound-healing effects’, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(7), pp. 857–880.

Dowling, A. *et al.* (2004) *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*, London The Royal Society and The Royal Academy of Engineering Report.

Du, W. L. *et al.* (2009) ‘Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions’, *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 75(3), pp. 385–389. doi: 10.1016/j.carbpol.2008.07.039.

Dutta, P. K., Duta, J. and Tripathi, V. S. (2004) ‘Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications’, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63(1), pp. 20–31.

- Esposito, G. *et al.* (2013) 'In vivo laser assisted microvascular repair and end-to-end anastomosis by means of indocyanine green-infused chitosan patches: A pilot study', *Lasers in Surgery and Medicine*, 45(5), pp. 318–325. doi: 10.1002/lsm.22145.
- Falk, M., Smith, D. G. and McLachlan, J. (1966) 'Studies on chitan fibers of the diatom *Thalassiosira fluviatilis*', *Canadian Journal of Chemistry*, 41(9096), pp. 2269–2281.
- Fan, W. *et al.* (2012) 'Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V., 90(1), pp. 21–27. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.09.042.
- FAO (2020) *Food Security and Nutrition in the World, IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing*.
- Finney, N. S. and Siegel, J. S. (2008) 'In Memoriam: Albert Hofmann (1906–2008)', *Chimia*, 62(5), p. 444. doi: 10.2533/chimia.2008.444.
- Flüeler, O. and Marbach, C. (2021) *Guía para la elaboración de quesos*, cedepas.
- Garcia Islas, B. (2006) "*Caracterización físico-química de diversos tipos de quesos elaborados en el valle de Tulancingo Hidalgo con el fin de proponer normas de calidad.*"
- Gooday, G. W. (1990) *The Ecology of Chitin Degradation*.
- Goy, R. C., De Britto, D. and Assis, O. B. G. (2009) 'A review of the antimicrobial activity of chitosan', *Polimeros*, 19(3), pp. 241–247. doi: 10.1590/S0104-14282009000300013.
- El Hadrami, A. *et al.* (2010) 'Chitosan in plant protection', *Marine Drugs*, 8(4), pp. 968–987. doi: 10.3390/md8040968.
- Herrera Barros, A. P. *et al.* (2016) 'Preparación de Nanopartículas de Quitosano modificadas con Alginato de Sodio con potencial para la liberación controlada de medicamentos', *Revista EIA*, 3(12), pp. 75–83. doi: 10.24050/reia.v12i2.965.
- Ji, R. *et al.* (2019) 'Extending viability of *Bifidobacterium longumin* chitosan-coated

alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology’, *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2019.01389.

Juan-López, M. (1994) ‘La regulación sanitaria en México y el Tratado de Libre Comercio.’, *Salud Publica de Mexico*. [Secretaría de Salubridad y Asistencia], 36(6), pp. 617–623. Available at: <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5799/6458> (Accessed: 4 August 2019).

Käupera, P. and Forresta, M. (2006) ‘Chitosan-based nanoparticles by ionotropic gelation’, *Bioencapsulation Research Group*, (Vivaflow 200), pp. 1–4.

Kong, M. *et al.* (2008) ‘Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*’, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(2), pp. 197–202. doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.04.003.

Kong, M. *et al.* (2010) ‘Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review’, *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 144(1), pp. 51–63. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012.

Kreuter, J. (2012) ‘Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs’, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), pp. 213–222. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.015.

Krishnaswamy, K. and Orsat, V. (2017) *Sustainable drug delivery systems through green nanotechnology*, *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-08-102985-5.00004-8.

Kritchenkov, A. S. *et al.* (2020) ‘Efficient reinforcement of chitosan-based coatings for Ricotta cheese with non-toxic, active, and smart nanoparticles’, *Progress in Organic Coatings*. Elsevier, 145(February), p. 105707. doi: 10.1016/j.porgcoat.2020.105707.

Kunjachan, S. and Jose, S. (2010) ‘Understanding the mechanism of ionic gelation for synthesis of chitosan nanoparticles using qualitative techniques’, *Asian Journal of*

*Pharmaceutics*, 4(2), pp. 148–153. doi: 10.4103/0973-8398.68467.

Kurita, K. (2001) ‘Controlled functionalization of the polysaccharide chitin’, *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 26, pp. 1921–1971.

Kurita, K. (2006) ‘Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans’, *Marine Biotechnology*, 8(3), pp. 203–226. doi: 10.1007/s10126-005-0097-5.

Li, N. and Bai, R. (2006) ‘Development of chitosan-based granular adsorbents for enhanced and selective adsorption performance in heavy metal removal’, *Water Science and Technology*, 54(10), pp. 103–113. doi: 10.2166/wst.2006.736.

Lin, L., Gu, Y. and Cui, H. (2019) ‘Moringa oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers for food packaging against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on cheese’, *Food Packaging and Shelf Life*. Elsevier, 19(August 2018), pp. 86–93. doi: 10.1016/j.fpsl.2018.12.005.

Lobacz, A., Zulewska, J. and Kowalik, J. (2016) ‘The analysis of the behaviour of *Listeria Monocytogenes* in fresh cheeses with various spices during storage’, *Procedia Food Science*. Elsevier BV, 7, pp. 80–84. doi: 10.1016/j.profoo.2016.02.092.

Martínez, C. C. D. (2017) *Quesos madurados: composición química, clasificación, características, formas de procesamiento y equipos y maquinarias*. Available at: [http://repositorio.une.edu.pe/bitstream/handle/UNE/3455/Quesos madurados%2C composición química.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.une.edu.pe/bitstream/handle/UNE/3455/Quesos%20madurados%20composici%3Fsequence=1&isAllowed=y).

Mati-Baouche, N. *et al.* (2014) ‘Chitosan as an adhesive’, *European Polymer Journal*. Elsevier Ltd, 60, pp. 198–212. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.09.008.

Mendoza, G. and Rodríguez-López, J. L. (2017) ‘La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso’, *Perfiles Latinoamericanos*, (29), pp. 161–186.

Ministerio de Salud (2008) ‘Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA’, *El Peruano*, pp. 7–22.



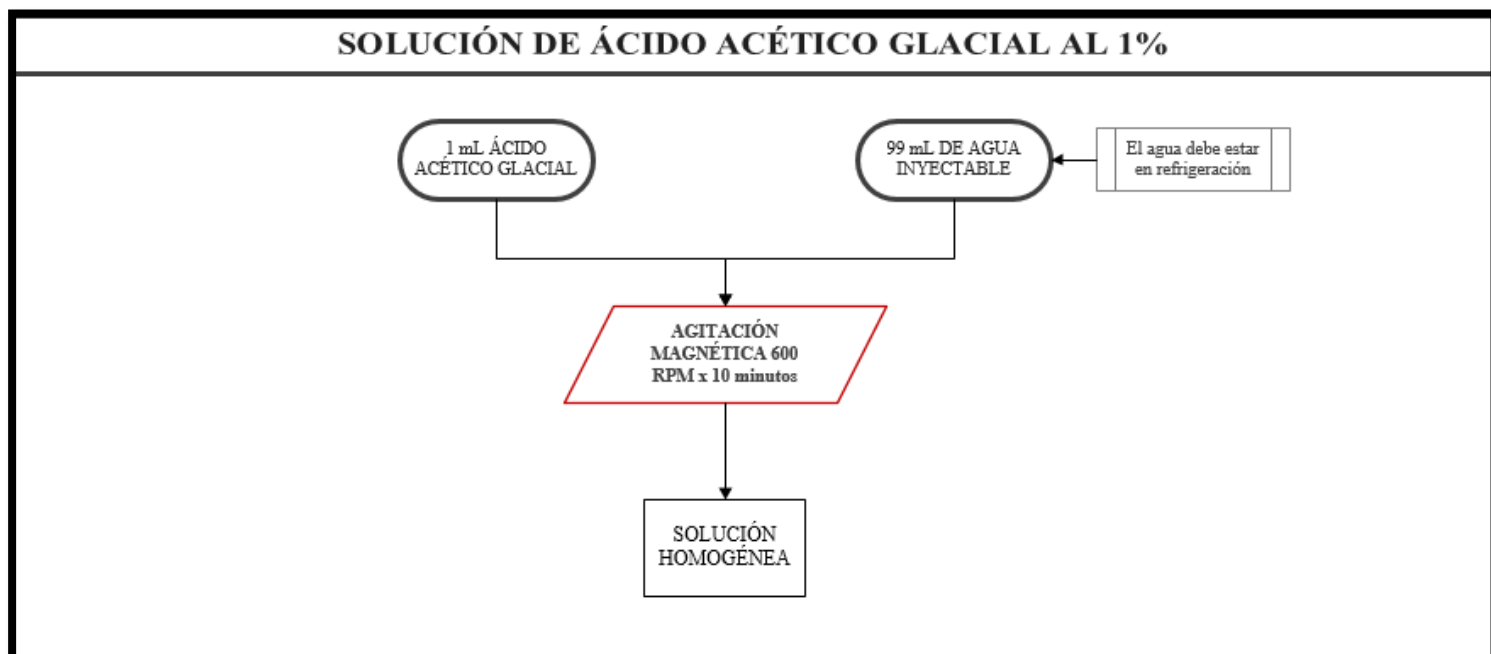
- Minsalud (2015) ‘¿Qué son las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)?’, in *La Salud es de Todos*, p. 8.
- Muzzarelli, R. A. A. and Muzzarelli, C. (2009) *Chitin and chitosan hydrogels, Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*. doi: 10.1533/9781845695873.849.
- Nasti, A. *et al.* (2009) ‘Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: Systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation’, *Pharmaceutical Research*, 26(8), pp. 1918–1930. doi: 10.1007/s11095-009-9908-0.
- Navarro, A. E. *et al.* (2010) ‘Síntesis y caracterización de quitosano cuaternario nativo y reticulado en polvo para su aplicación en la adsorción de aniones metálicos’, *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(4), pp. 313–321.
- Nikaido, H. (2013) ‘Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited’, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), pp. 593–656.
- Nikaido, H. and Vaara, M. (1985) ‘Molecular basis of bacterial outer membrane permeability’, *Microbiological Reviews*, 49(1), pp. 1–32. doi: 10.1128/membr.49.1.1-32.1985.
- O’ Callaghan, K. A. M. and Kerry, J. P. (2014) ‘Assessment of the antimicrobial activity of potentially active substances (nanoparticled and non-nanoparticled) against cheese-derived microorganisms’, *International Journal of Dairy Technology*, 67(4), pp. 483–489. doi: 10.1111/1471-0307.12160.
- O’Callaghan, K. A. M. and Kerry, J. P. (2016) ‘Preparation of low- and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms, Including cheese-derived cultures’, *Food Control*. Elsevier Ltd, 69, pp. 256–261. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.05.005.
- Olivera, B. M. *et al.* (1995) ‘Combinatorial peptide libraries in drug design: lessons from

- venomous cone snails', *Trends in Biotechnology*, 13(10), pp. 422–426. doi: 10.1016/S0167-7799(00)88996-9.
- Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (2018) 'Manual de Introducción a la Inocuidad de Alimentos', *Sereal Untuk*, 51(1), p. 51.
- Organización Mundial de la Salud - OMS (2015) *Inocuidad de los alimentos, Diciembre*. Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> (Accessed: 19 November 2020).
- Patil, P., Chavanke, D. and Wagh, M. (2012) 'A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelispheres', *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(SUPPL. 4), pp. 27–32.
- Peralta, F. (2020) 'Hambre y seguridad alimentaria', *Desarrollo Sostenible*. Available at: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/hunger/> (Accessed: 6 February 2023).
- Qi, L. *et al.* (2004) 'Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles', *Carbohydrate Research*, 339(16), pp. 2693–2700. doi: 10.1016/j.carres.2004.09.007.
- Qun, G. and Ajun, W. (2006) 'Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution', *Carbohydrate Polymers*, 64(1), pp. 29–36. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.10.026.
- Ramírez, M. *et al.* (2010) 'La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicación agrícola', *Biotecnología Aplicada*, 27, p. 8.
- Reshad, R. A. I., Jishan, T. A. and Chowdhury, N. N. (2021) 'Chitosan and its Broad Applications: A Brief Review', *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 12(4), p. em00779. doi: 10.29333/jcei/11268.
- Rinaudo, M. (2006) 'Chitin and chitosan: Properties and applications', *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), pp. 603–632. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.

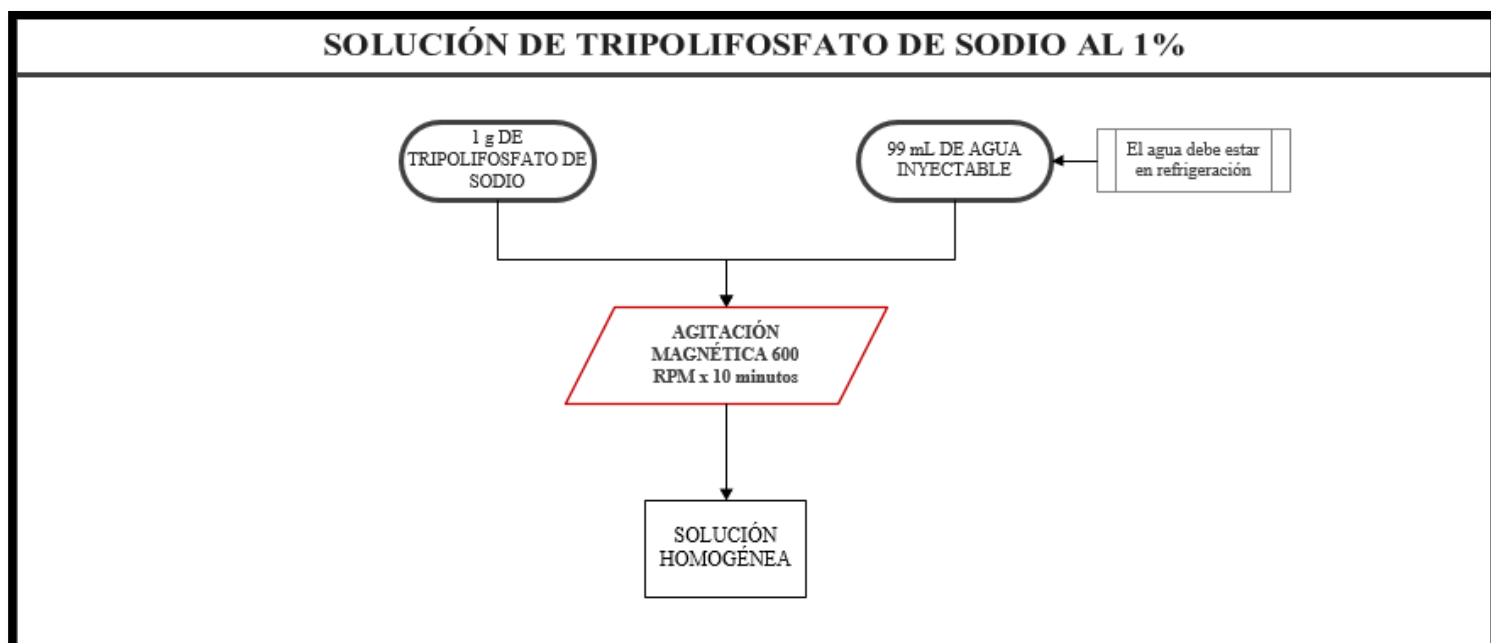
- Romero-Serrano, A. and Pereira, J. (2020) 'Review : Chitosan , a versatil biomaterial . State of the art from its obtaining to its multiple applications', *Revista de Ingeniería UC*, 27(2), pp. 118–135.
- Rudall, K. M. (1969) 'Chitin and Its Association with Other Molecules', *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*, 102(28), pp. 83–102.
- Rudall, K. M. and Kenchington, W. (1973) 'The chitin system', *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 48(4), pp. 597–633. doi: 10.1111/j.1469-185x.1973.tb01570.x.
- Saikia, C. and Gogoi, P. (2015) 'Chitosan: A promising biopolymer in drug delivery applications', *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, s4.
- Saldaña, C. A. Z. (2015) Influencia de la adición del componente proteico lácteo sobre el rendimiento, firmeza y aceptabilidad general en queso fresco.
- Shi, Z. *et al.* (2006) 'Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles', *Biomaterials*, 27(11), pp. 2440–2449. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.036.
- Tolaimate, A. *et al.* (2003) 'Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties', *Polymer*, 44(26), pp. 7939–7952. doi: 10.1016/j.polymer.2003.10.025.
- Vásquez, N. *et al.* (2012) 'Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco a nivel de distribuidores, estado Lara, Venezuela', *Zootecnia Tropical*, 30(3), pp. 217–223.
- Yadav, M. *et al.* (2019) 'Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials', *Bioresources and Bioprocessing*. Springer Berlin Heidelberg, 6(1), p. 20. doi: 10.1186/s40643-019-0243-y.

## APÉNDICES

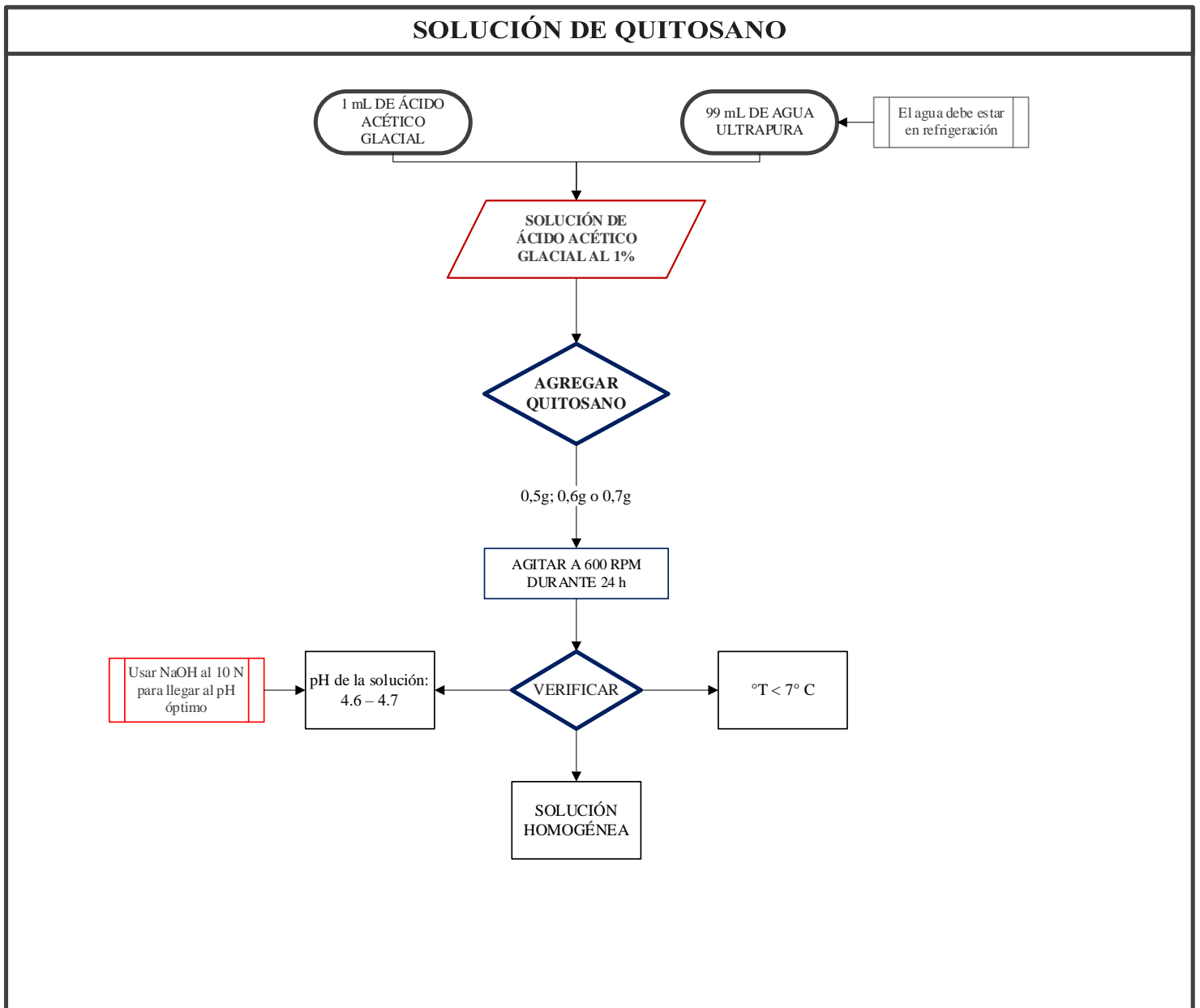
**Apéndice N° 1:** Flujograma de la solución de ácido acético glacial al 1%.



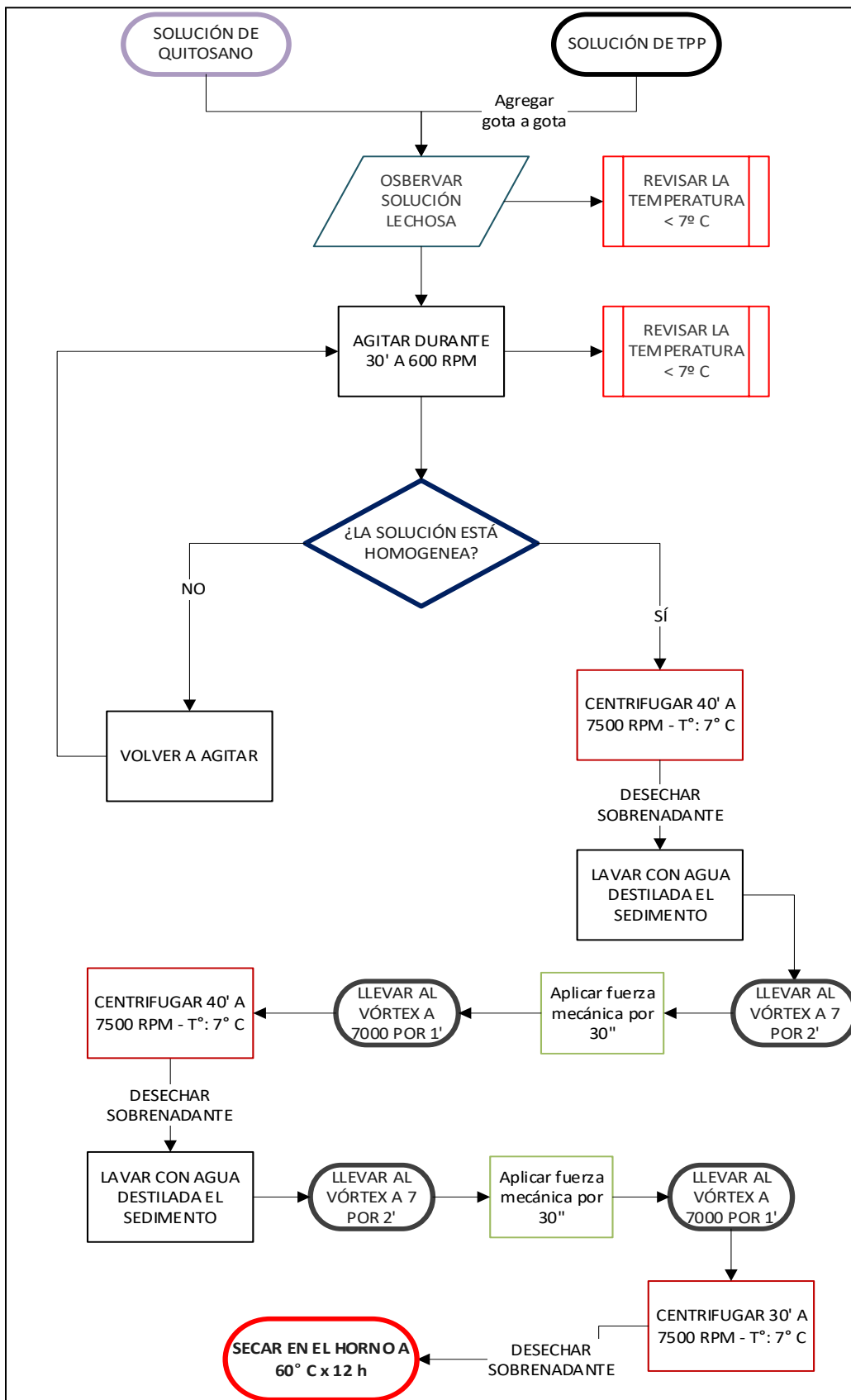
**Apéndice N° 2:** Flujograma de la solución de tripolifosfato de sodio al 1%.



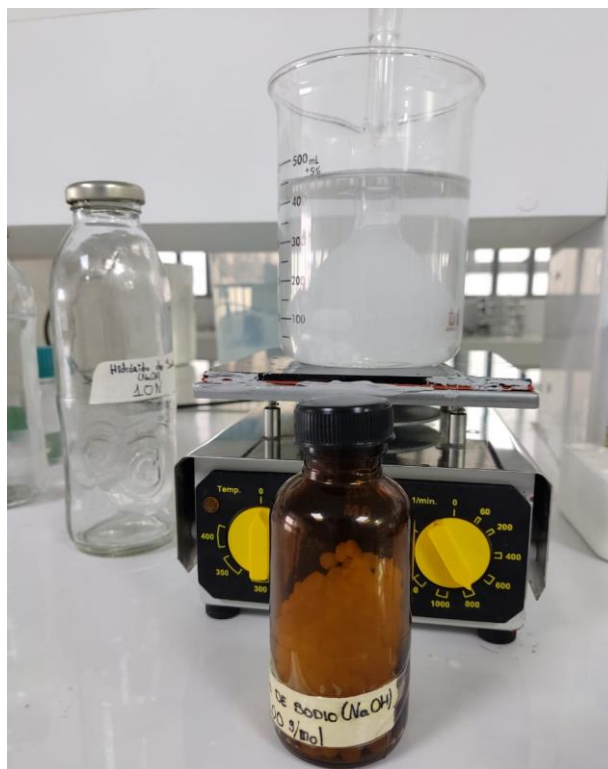
**Apéndice N° 3:** Flujoograma de la solución de quitosano.



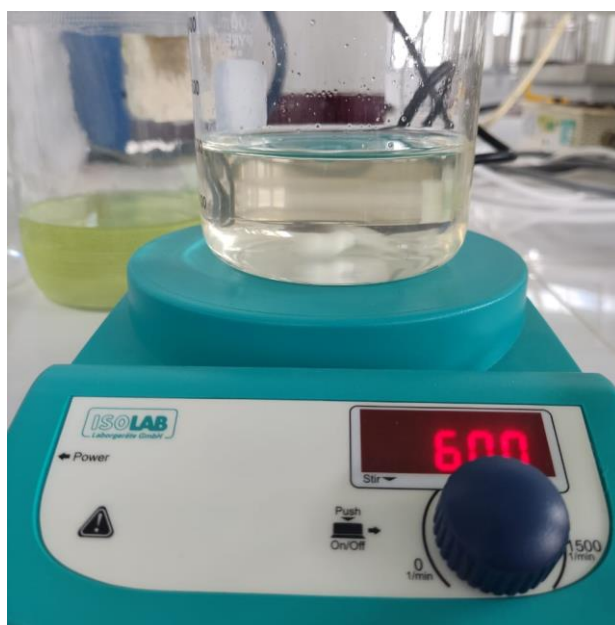
**Apéndice N° 4:** Flujograma de la mezcla de solución de quitosano y solución de tripolifosfato y centrifugación, lavado y secado del gel.



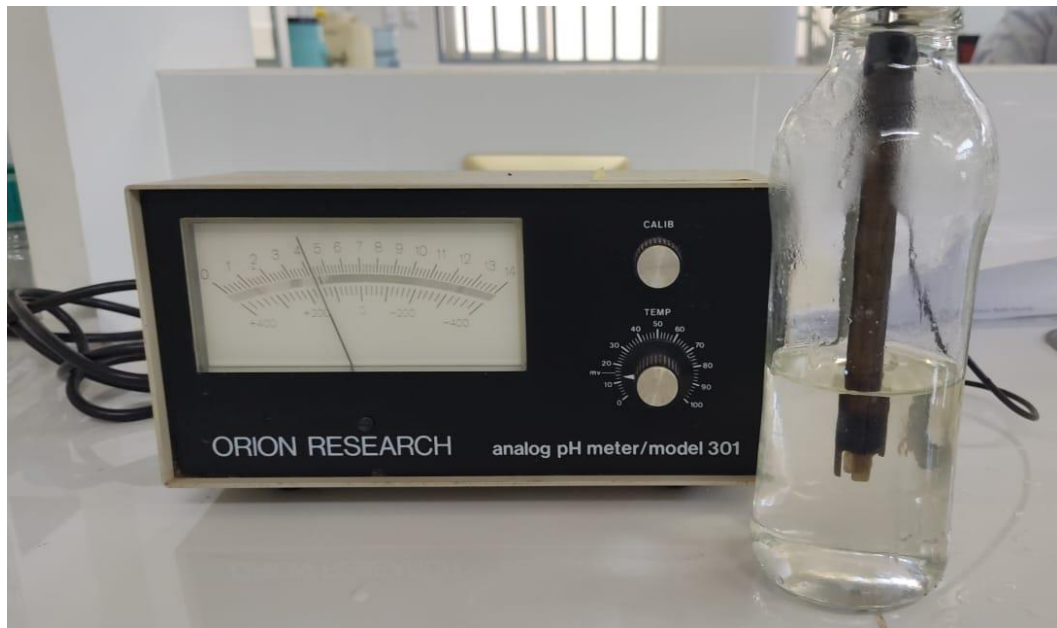
**Apéndice N° 5:** Preparación del NaOH al 10 N.



**Apéndice N° 6:** Homogenización de la solución de quitosano usando el agitador magnético.



**Apéndice N° 7:** Medición del pH de la solución de quitosano.

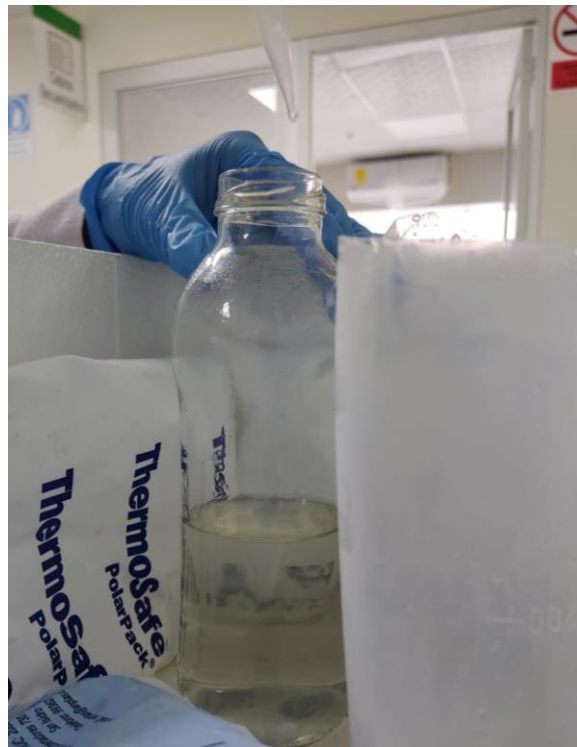


**Apéndice N° 8:** Cadena de frío para agregar la solución de TPP en la solución de quitosano.

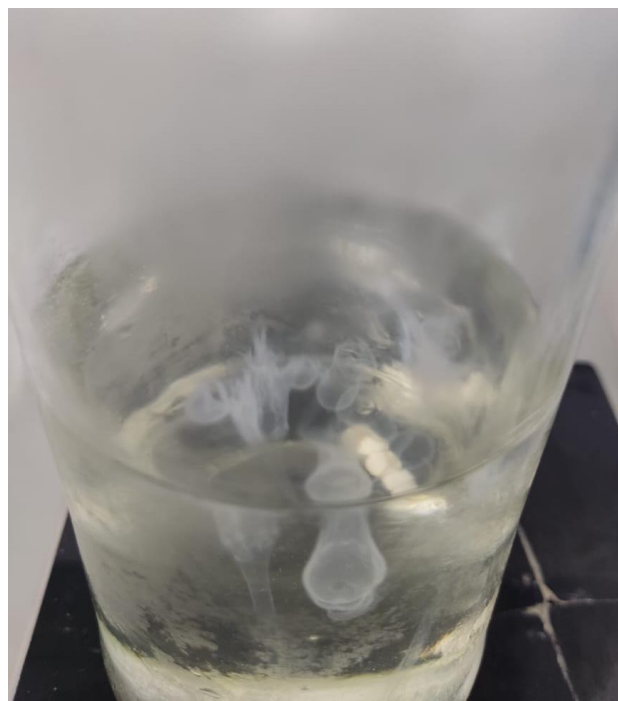




**Apéndice N° 9:** Adición del TPP gota a gota sobre la solución de quitosano.



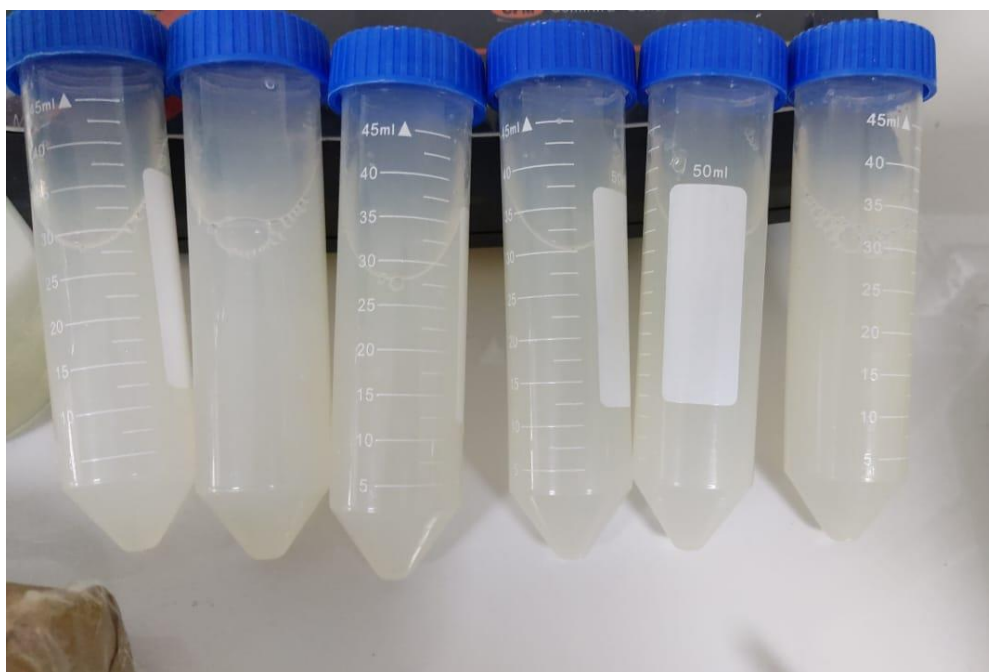
**Apéndice N° 10:** Formación de estructuras en forma de películas en la solución por la reacción del quitosano y el TPP.



**Apéndice N° 11:** Homogenización de la solución lechosa en el agitador magnético.



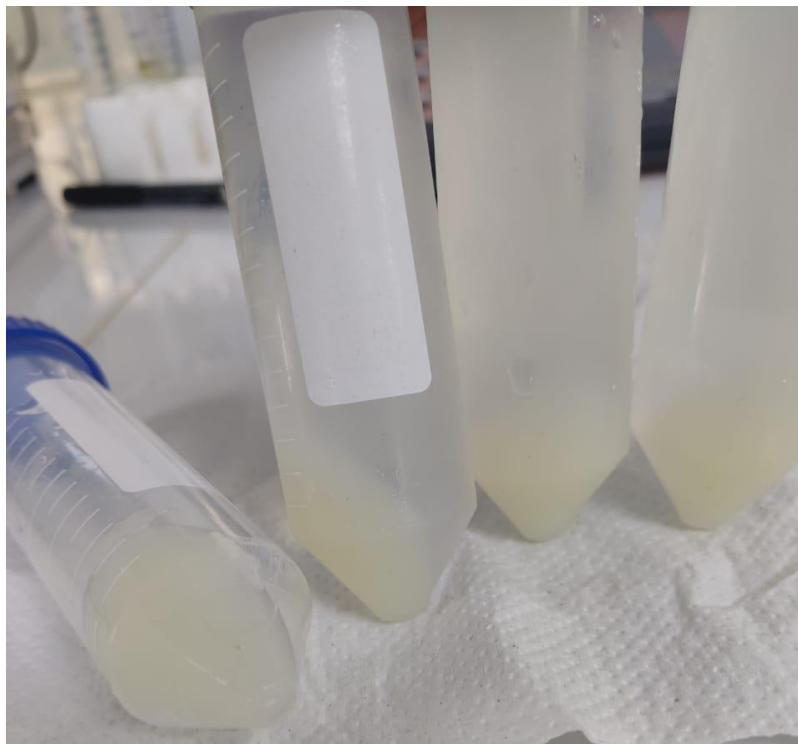
**Apéndice N° 12:** Distribución de la solución lechosa en tubos falcon.



**Apéndice N° 13: Uso de la centrifuga refrigerada.**



**Apéndice N° 14: Obtención del sedimento luego de la centrifugación.**



**Apéndice N° 15:** Uso del vórtex para redispersar las nanopartículas.



**Apéndice N° 16:** Secado de los sedimentos en el horno.



**Apéndice N° 17:** Obtención de las nanopartículas de quitosano en diferentes concentraciones en forma de gel.



**Apéndice N° 18:** Medición del tamaño de las nanopartículas en el equipo de Dispersión de Luz Dinámica (DLS).



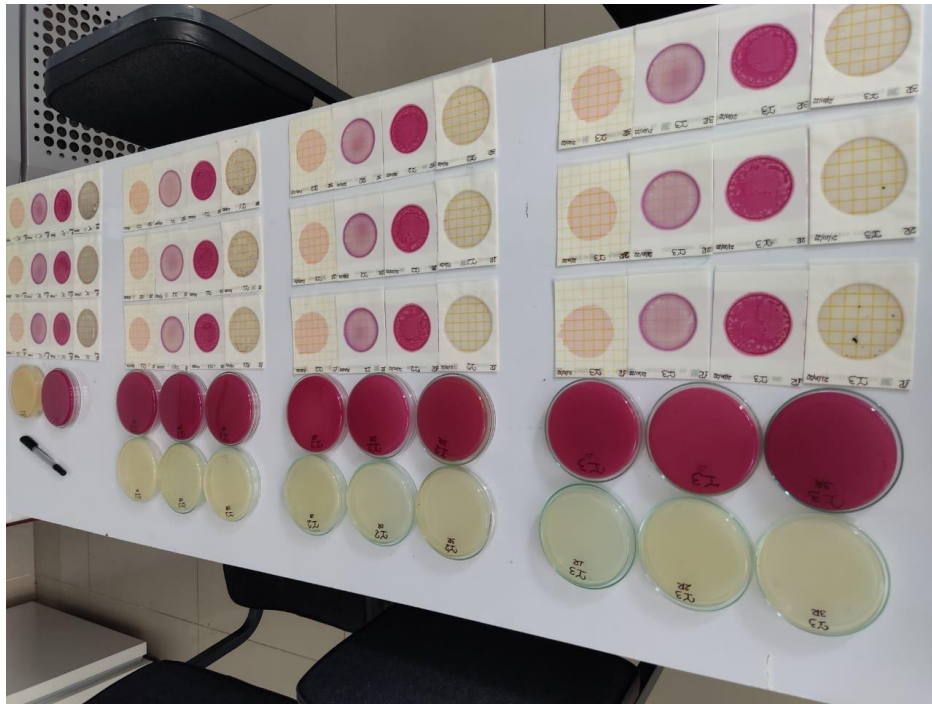
**Apéndice N° 19:** Uso del caldo citratado para reducir la capa de grasa del queso suizo.



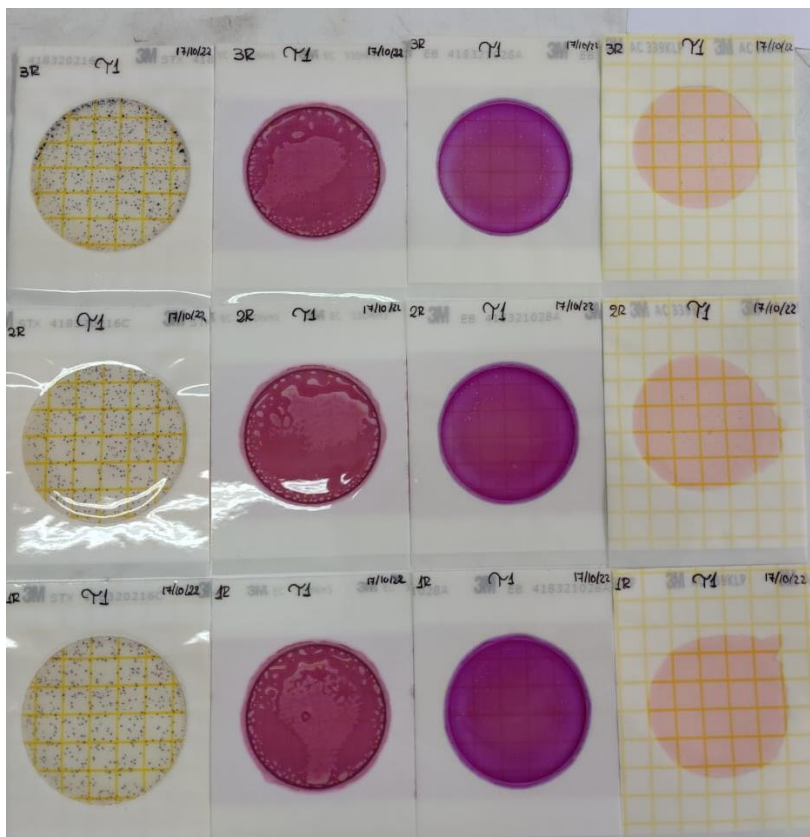
**Apéndice N° 20:** Distribución del gel de quitosano en diferentes concentraciones para realizar los diferentes tratamientos.



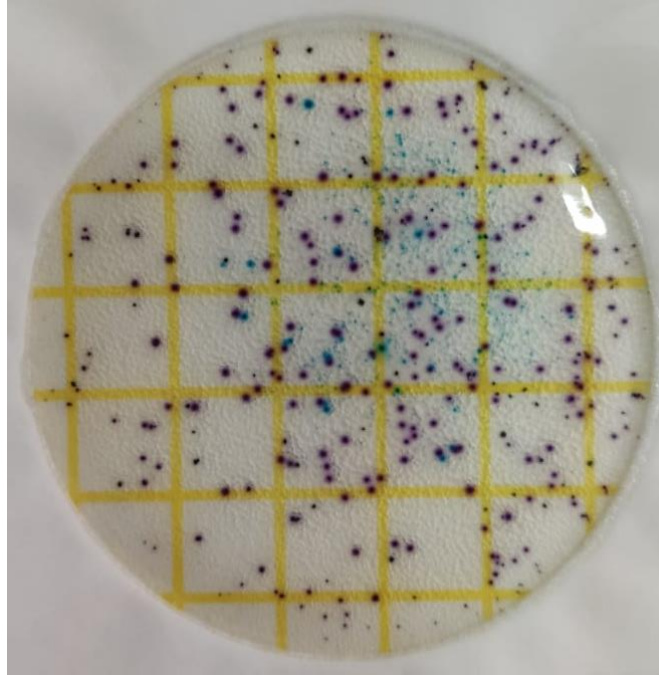
**Apéndice N° 21:** Resultados microbiológicos luego de incubar las placas petrifilm.



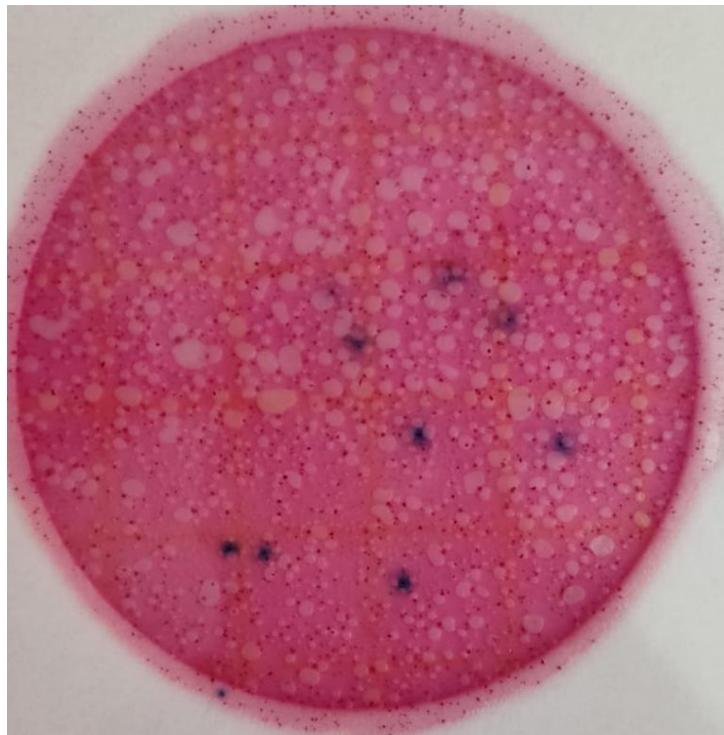
**Apéndice N° 22:** Batería de placas petrifilm para *Stapylococcus spp.*, *S. aureus*, *E. coli*, Coliformes, Enterobacterias y Aerobios mesófilos viables.



**Apéndice N° 23:** El crecimiento de las colonias rojo - violetas en las placas petrifilm STX, indica que son *S. aureus*, las colonias verdes son *Staphylococcus spp.*

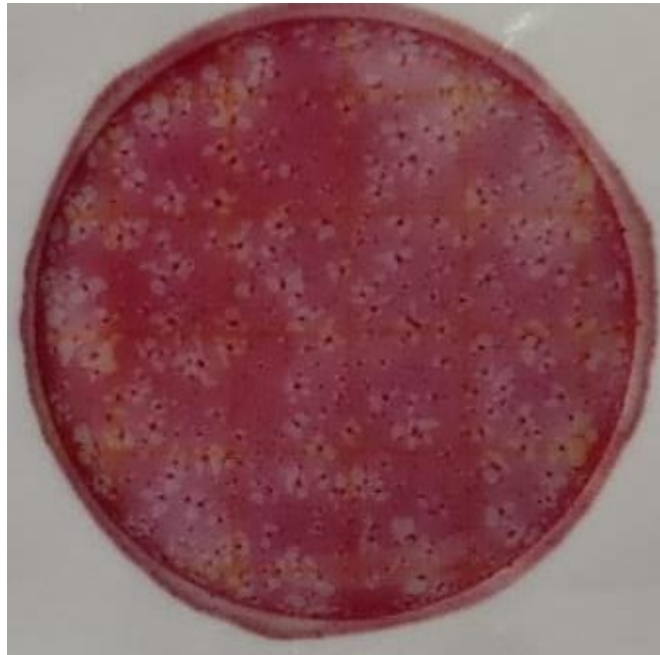


**Apéndice N° 24:** El crecimiento de las colonias azules con burbuja en las placas petrifilm EC, indica que son *E. coli*, las colonias rojas con burbuja indican coliformes.

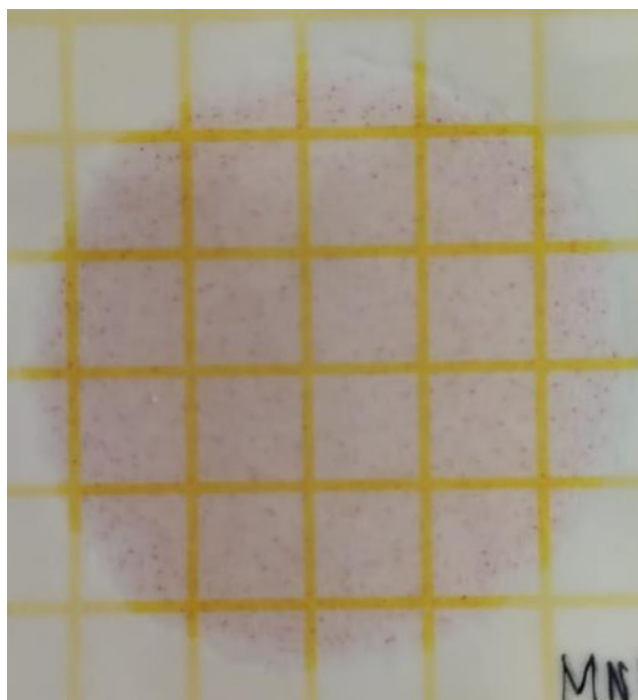




**Apéndice N° 25:** El crecimiento de las colonias rojas con presencia de gas, rojas con zonas amarillas en las placas petrifilm EB, indica que son Enterobacterias.

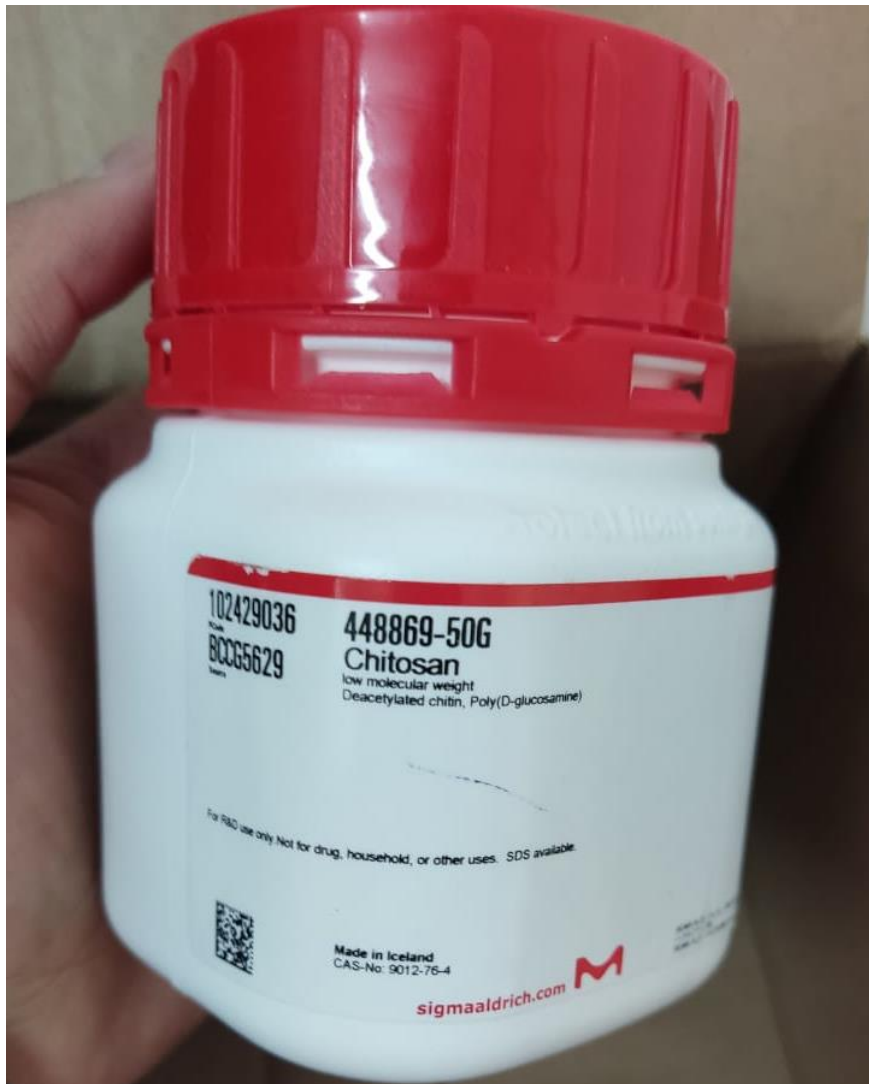


**Apéndice N° 26:** El crecimiento de las colonias rojas en las placas petrifilm AC, indica que son aerobios mesófilos viables.



## ANEXOS:

### Anexo N° 1: Quitosano de bajo peso molecular usado



**Anexo N° 2: Tablas de resultados microbiológicos del primer compósito de quesos suizos.**

**Tabla N° 13: Resultados microbiológico del control en el primer compósito de 5 quesos suizos.**

<b>COMPÓSITO 1 - 5 QUESOS SUIZOS - CONTROL</b>							
<b>FECHA DE ANÁLISIS</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
15/10/2022	CONTROL - 1R	42000.00	500.00	MNPC	100.00	32000.00	25300.00
15/10/2022	CONTROL - 2R	44000.00	300.00	MNPC	100.00	28000.00	15800.00
15/10/2022	CONTROL - 3R	46000.00	300.00	MNPC	400.00	30000.00	19200.00
<b>PROMEDIO</b>		44000.00	366.67	MNPC	200.00	30000.00	20100.00

MNPC: Muy Numeroso Para Contar

**Tabla N° 14: Resultados microbiológico del tratamiento 1 en el primer compósito de 5 quesos suizos.**

<b>COMPÓSITO 1 - 5 QUESOS SUIZOS - TRATAMIENTO 1</b>							
<b>FECHA DE ANÁLISIS</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
16/10/2022	T 1 - 1R	100.00	AUSENCIA	AUSENCIA	200.00	21500.00	AUSENCIA
16/10/2022	T 1 - 2R	200.00	AUSENCIA	3000.00	AUSENCIA	18900.00	AUSENCIA
16/10/2022	T 1 - 3R	2100.00	AUSENCIA	6700.00	6500.00	19200.00	2200.00
<b>PROMEDIO</b>		800.00	AUSENCIA	3233.33	2233.33	19866.67	733.33

**Tabla N° 15:** Resultados microbiológico del tratamiento 2 en el primer compuesto de 5 quesos suizos.

<b>COMPÓSITO 1 - 5 QUESOS SUIZOS - TRATAMIENTO 2</b>							
<b>FECHA DE ANÁLISIS</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
16/10/2022	T 2 - 1R	1800.00	AUSENCIA	7500.00	1400.00	19900.00	1100.00
16/10/2022	T 2 - 2R	1600.00	AUSENCIA	9200.00	5000.00	22000.00	800.00
16/10/2022	T 2 - 3R	2300.00	AUSENCIA	5200.00	5400.00	21900.00	700.00
<b>PROMEDIO</b>		1900.00	AUSENCIA	7300.00	3933.33	21266.67	866.67

**Tabla N° 16:** Resultados microbiológico del tratamiento 3 en el primer compuesto de 5 quesos suizos.

<b>COMPÓSITO 1 - 5 QUESOS SUIZOS - TRATAMIENTO 3</b>							
<b>FECHA DE ANÁLISIS</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
16/10/2022	T 3 - 1R	500.00	AUSENCIA	200.00	AUSENCIA	12600.00	AUSENCIA
16/10/2022	T 3 - 2R	300.00	AUSENCIA	1200.00	200.00	16400.00	900.00
16/10/2022	T 3 - 3R	700.00	AUSENCIA	800.00	3000.00	14800.00	1100.00
<b>PROMEDIO</b>		500.00	AUSENCIA	733.33	1066.66	14600.00	666.67

**Anexo N° 3: Tablas de resultados microbiológicos del segundo compuesto de quesos suizos.**

**Tabla N° 17:** Resultados microbiológico del control en el segundo compuesto de 5 quesos suizos.

<b>COMPÓSITO 2 - 5 QUESOS SUIZOS - CONTROL</b>							
<b>FECHA DE ANÁLISIS</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
18/10/2022	CONTROL - 1R	39700.00	500.00	MNPC	52000.00	38000.00	32000.00
18/10/2022	CONTROL - 2R	46000.00	1000.00	MNPC	60000.00	29000.00	38000.00
18/10/2022	CONTROL - 3R	42000.00	600.00	MNPC	56000.00	32000.00	41000.00
<b>PROMEDIO</b>		42566.67	700.00	MNPC	56000.00	33000.00	37000.00

MNPC: Muy Numeroso Para Contar

**Tabla N° 18:** Resultados microbiológico del tratamiento 1 en el segundo compuesto de 5 quesos suizos.

<b>COMPÓSITO 2 - 5 QUESOS SUIZOS - TRATAMIENTO 1</b>							
<b>FECHA DE ANÁLISIS</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
19/10/2022	Q 1 - 1R	800.00	AUSENCIA	1000.00	12000.00	500.00	100.00
19/10/2022	Q 1 - 2R	600.00	AUSENCIA	AUSENCIA	9800.00	AUSENCIA	100.00
19/10/2022	Q 1 - 3R	800.00	AUSENCIA	800.00	8200.00	AUSENCIA	AUSENCIA

<b>PROMEDIO</b>	733.33	AUSENCIA	600.00	10000.00	166.67	66.67
-----------------	--------	----------	--------	----------	--------	-------

**Tabla N° 19:** Resultados microbiológico del tratamiento 2 en el segundo compósito de 5 quesos suizos.

**COMPÓSITO 2 - 5 QUESOS SUIZOS - TRATAMIENTO 2**

<b>FECHA DE ANÁLISIS</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
19/10/2022	Q 2 - 1R	700.00	AUSENCIA	300.00	1100.00	2000.00	AUSENCIA
19/10/2022	Q 2 - 2R	400.00	AUSENCIA	1100.00	2800.00	1500.00	AUSENCIA
19/10/2022	Q 2 - 3R	500.00	AUSENCIA	500.00	4000.00	1300.00	AUSENCIA
<b>PROMEDIO</b>		533.33	AUSENCIA	633.33	2633.33	1600.00	AUSENCIA

**Tabla N° 20:** Resultados microbiológico del tratamiento 3 en el segundo compósito de 5 quesos suizos.

**COMPÓSITO 2 - 5 QUESOS SUIZOS - TRATAMIENTO 3**

<b>FECHA DE ANÁLISIS</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
19/10/2022	Q 3 - 1R	400.00	AUSENCIA	200.00	13800.00	2600.00	AUSENCIA
19/10/2022	Q 3 - 2R	300.00	AUSENCIA	1200.00	14000.00	2300.00	AUSENCIA

19/10/2022	Q 3 - 3R	600.00	AUSENCIA	800.00	13000.00	2000.00	AUSENCIA
<b>PROMEDIO</b>		433.33	AUSENCIA	733.33	13600.00	2300.00	AUSENCIA

**Anexo N° 4: Tablas de resultados microbiológicos del tercer compósito de quesos suizos.**

**Tabla N° 21:** Resultados microbiológico del control en el tercer compósito de 5 quesos suizos.

**COMPÓSITO 3 - 5 QUESOS SUIZOS - CONTROL**

FECHA DE ANÁLISIS	PRODUCTO	Coliformes UFC/g	<i>E. coli</i> UFC/g	Aerobios UFC/g	<i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g	<i>S. aureus</i> UFC/g	Enterobacterias UFC/g
20/10/2022	CONTROL - 1R	44000.00	300.00	MNPC	48000.00	36000.00	35000.00
20/10/2022	CONTROL - 2R	39000.00	300.00	MNPC	50000.00	32000.00	34000.00
20/10/2022	CONTROL - 3R	36000.00	100.00	MNPC	46000.00	35000.00	32000.00
<b>PROMEDIO</b>		39666.67	233.33	MNPC	48000.00	34333.33	33666.67

MNPC: Muy Numeroso Para Contar

**Tabla N° 22:** Resultados microbiológico del tratamiento 1 en el tercer compósito de 5 quesos suizos.

**COMPÓSITO 3 - 5 QUESOS SUIZOS - TRATAMIENTO 1**

FECHA DE ANÁLISIS	PRODUCTO	Coliformes UFC/g	<i>E. coli</i> UFC/g	Aerobios UFC/g	<i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g	<i>S. aureus</i> UFC/g	Enterobacterias UFC/g
21/10/2022	I 1 - 1R	5500.00	AUSENCIA	2500.00	2900.00	3700.00	100.00
21/10/2022	I 1 - 2R	11000.00	AUSENCIA	2000.00	3000.00	5100.00	300.00

21/10/2022	I 1 - 3R	9000.00	AUSENCIA	3000.00	8000.00	6000.00	200.00
<b>PROMEDIO</b>		8500.00	AUSENCIA	2500.00	4633.33	4933.33	200.00

**Tabla N° 23:** Resultados microbiológico del tratamiento 2 en el tercer compósito de 5 quesos suizos.

**COMPÓSITO 3 - 5 QUESOS SUIZOS - TRATAMIENTO 2**

FECHA DE ANÁLISIS	PRODUCTO	Coliformes UFC/g	<i>E. coli</i> UFC/g	Aerobios UFC/g	<i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g	<i>S. aureus</i> UFC/g	Enterobacterias UFC/g
21/10/2022	I 2 - 1R	4700.00	AUSENCIA	MNPC	200.00	500.00	400.00
21/10/2022	I 2 - 2R	3600.00	AUSENCIA	MNPC	400.00	700.00	100.00
21/10/2022	I 2 - 3R	2900.00	AUSENCIA	MNPC	200.00	900.00	100.00
<b>PROMEDIO</b>		3733.33	AUSENCIA	MNPC	266.67	700.00	200.00

MNPC: Muy Numeroso Para Contar

**Tabla N° 24:** Resultados microbiológico del tratamiento 3 en el tercer compósito de 5 quesos suizos.

**COMPÓSITO 3 - 5 QUESOS SUIZOS - TRATAMIENTO 3**

FECHA DE ANÁLISIS	PRODUCTO	Coliformes UFC/g	<i>E. coli</i> UFC/g	Aerobios UFC/g	<i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g	<i>S. aureus</i> UFC/g	Enterobacterias UFC/g
-------------------	----------	------------------	----------------------	----------------	---------------------------------	------------------------	-----------------------



21/10/2022	I 3 - 1R	1600.00	AUSENCIA	MNPC	500.00	1000.00	AUSENCIA
21/10/2022	I 3 - 2R	1000.00	AUSENCIA	MNPC	200.00	100.00	200.00
21/10/2022	I 3 - 3R	1300.00	AUSENCIA	MNPC	600.00	500.00	300.00
<b>PROMEDIO</b>		1300.00	AUSENCIA	MNPC	433.33	533.33	166.67

MNPC: Muy Numeroso Para Contar

**Anexo N° 5: Tablas de resultados microbiológicos de recuentos promedios de los compósitos de quesos suizos.**

**Tabla N° 25: Resultados microbiológicos promedio del compósito Control.**

<b>RESULTADOS PROMEDIO - COMPÓSITO – CONTROL</b>						
	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
	44000.00	366.67	MNPC	200.00	30000.00	20100.00
	42566.67	700.00	MNPC	56000.00	33000.00	37000.00
	39666.67	233.33	MNPC	48000.00	35000.00	33666.67
<b>PROMEDIO</b>	42077.78	433.33	MNPC	34733.33	32666.67	30255.56

**Tabla N° 26: Resultados microbiológicos promedio del compósito aplicando el tratamiento 1 (Gel a base de quitosano al 0,5%).**

<b>RESULTADOS PROMEDIO - COMPÓSITO - TRATAMIENTO 1</b>						
--	--	--	--	--	--	--

	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
	800.00	AUSENCIA	3233.33	2233.33	19866.67	733.33
	733.33	AUSENCIA	600.00	10000.00	166.67	66.67
	8500.00	AUSENCIA	2500.00	4633.33	4933.33	200.00
<b>PROMEDIO</b>	3344.44	AUSENCIA	2111.11	5622.22	8322.22	333.33

**Tabla N° 27:** Resultados microbiológicos promedio del compósito aplicando el tratamiento 2 (Gel a base de quitosano al 0,6%).

**RESULTADOS PROMEDIO - COMPÓSITO - TRATAMIENTO 2**

	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
	1900.00	AUSENCIA	7300.00	3933.33	21266.67	866.67
	533.33	AUSENCIA	633.33	2633.33	1600.00	AUSENCIA
	3733.33	AUSENCIA	MNPC	266.67	700.00	200.00
<b>PROMEDIO</b>	2055.55	AUSENCIA	3966.67	2277.78	7855.56	355.56

**Tabla N° 28:** Resultados microbiológicos promedio del compósito aplicando el tratamiento 3 (Gel a base de quitosano al 0,7%).

**RESULTADOS PROMEDIO - COMPÓSITO - TRATAMIENTO 3**

	<b>Coliformes UFC/g</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g</b>	<b>Aerobios UFC/g</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> UFC/g</b>	<b><i>S. aureus</i> UFC/g</b>	<b>Enterobacterias UFC/g</b>
	500.00	AUSENCIA	733.33	1066.66	14600.00	666.67
	433.33	AUSENCIA	733.33	13600.00	2300.00	AUSENCIA
	1300.00	AUSENCIA	MNPC	433.33	533.33	166.67
<b>PROMEDIO</b>	744.44	AUSENCIA	733.33	5033.33	5811.11	277.78

## Anexo N° 6: Reporte Turnitin



Identificación de reporte de similitud: oid:3117:338525822

NOMBRE DEL TRABAJO

2024\_UNC\_IVAN\_LLANOS\_73885989\_V2  
.pdf

AUTOR

Ivan Llanos Yopla

RECuento DE PALABRAS

9380 Words

RECuento DE CARACTERES

49759 Characters

RECuento DE PÁGINAS

44 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

593.8KB

FECHA DE ENTREGA

Mar 8, 2024 9:33 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Mar 8, 2024 9:33 PM GMT-5

### ● 10% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 9% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 6% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

### ● Excluir del Reporte de Similitud

- Fuentes excluidas manualmente
- Bloques de texto excluidos manualmente