

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



Efecto de la concentración de nanopartículas de plata (Ag) en un bioempaque a base de quitosano sobre la vida útil del queso de leche de cabra (*Capra hircus*).

TESIS

Para optar el título profesional de ingeniero agroindustrial

Autora: Milagros de Fátima Jiménez Silvera

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



Efecto de la concentración de nanopartículas de plata (Ag) en un bioempaque a base de quitosano sobre la vida útil del queso de leche de cabra (*Capra hircus*).

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Carlos Alberto Cánepa La Cotera

Ing. Dorian Yasser Aguirre Campos

Mg. Víctor Santos Guzmán Tripul

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



Efecto de la concentración de nanopartículas de plata (Ag) en un bioempaque a base de quitosano sobre la vida útil del queso de leche de cabra (*Capra hircus*).

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma.

Br. Milagros de Fátima Jiménez Silvera (Autor)

Dr. Ing. Gerardo Juan F. Cruz Cerro (Asesor)

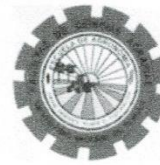
Ing. John H. Rimaycuna Ramírez (Co-Asesor)

Mblgo. Rubén Hernán Alfaro Aguilera (Co-Asesor)

Tumbes, 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGROINDUSTRIAS
CAMPUS UNIVERSITARIO S/N "LA CRUZ"
SECRETARÍA ACADÉMICA
TUMBES - PERÚ



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

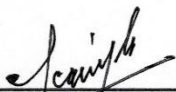
En Tumbes, al NOVENO día del mes de SEPTIEMBRE de dos mil veinte, se reunieron en sesión virtual, los integrantes del jurado designados según Resolución Decanal N° 0148-2017/UNTUMBES-FCA (09-08-2017) que aprueba el proyecto de tesis y ratifica a los miembros del jurado, con el objeto de evaluar la sustentación de la tesis denominada: **"Efecto de la concentración de nanopartículas de plata (Ag) en un bioempaque a base de quitosano sobre la vida útil del queso de leche de cabra (*Capra hircus*)"** para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial.

A las ONCE horas con DIEZ minutos y, de acuerdo a lo estipulado en el reglamento respectivo, el presidente del jurado dio por iniciado el acto.

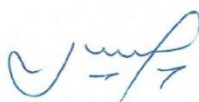
Luego de la exposición del trabajo, la formulación de preguntas y la deliberación del jurado lo declararon APROBADA por UNANIMIDAD con el calificativo de SOBRESALIENTE.

Por lo tanto, la Bachiller **JIMÉNEZ SILVERA MILAGROS DE FÁTIMA**, está apta para que el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Tumbes, le expida el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial de conformidad con lo estipulado en el Artículo 90° del Estatuto de la Universidad Nacional de Tumbes y a lo normado en el Reglamento de Grados y Títulos.

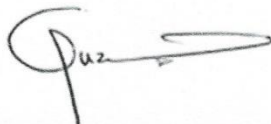
Siendo las DOCE horas con VEINTISIETE minutos, el presidente del jurado dio por concluido el presente acto académico y para mayor constancia de lo actuado firman en señal de conformidad todos los integrantes de este jurado, presentes en el acto de sustentación.



Dr. CARLOS A. CANEPA LA COTERA
Presidente



Ing. DORIAN YASSER AGUIRRE CAMPOS
Secretario



Mg. VÍCTOR SANTOS GUZMÁN TRIPUL
Vocal

DEDICATORIA

Dios por darme la vida, brindarme sabiduría, salud y hacer posible la ejecución de esta investigación. Por haberme dado una familia hermosa y encontrar buenos amigos que me han ayudado y dado buenos consejos.

A mis amados padres y hermana, por el apoyo incondicional, el esfuerzo, consejos y amor que me han brindado para concluir mis estudios satisfactoriamente, permitiéndome así formarme profesionalmente. Esto es para ustedes, porque sin ustedes no lo hubiera logrado.

A mis maestros, y a mi querida universidad, por inculcarme que el estudio es primordial para cumplir todas las metas trazadas, por sus enseñanzas transmitidas y consejos que hicieron posible el buen desempeño en este trabajo de investigación.

A mis queridos amigos, Yliana y Pool quienes ayudaron directa e indirectamente en la ejecución de esta tesis. Y a Wagner quien fue el ingrediente perfecto para poder alcanzar esta muy merecida victoria en la vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Tumbes quien financió la presente tesis a través del proyecto **"Recubrimientos basados en quitosano de alto peso molecular derivado de pluma de pota (*Dosidicus gigas*), nanopartículas de quitosano y ZnO para inhibir los microorganismos que atacan la fruta de exportación en el Norte del Perú y su efecto sobre la vida útil"**.

También quiero agradecer al docente, Dr. Ing. Gerardo J. Francisco Cruz Cerro, por darme la oportunidad de participar en el proyecto y ser parte de su grupo de tesis, por su acertada dirección, encaminándome así satisfactoriamente en el desarrollo y culminación de mi tesis y al Ing. John H. Rimaycuna Ramírez, por haberme ayudado y compartido conocimientos valiosos durante la ejecución y redacción de mi tesis.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	14
II. REVISION DE LA LITERATURA.....	16
III.MATERIALES Y METODOS	23
3.1. Materiales y equipos.....	23
3.1.1. Materiales.....	23
3.1.2. Equipos	24
3.2. Métodos de investigación.	26
3.2.1. Síntesis de nanopartículas de plata.	26
3.2.2. Preparación de películas compuestas – bioempaques.	27
3.2.3. Caracterización de AgNPs en una solución coloidal mixta	29
3.2.4. Caracterización de películas compuestas.....	29
3.2.5. Aplicación de las películas sobre el queso de cabra.....	32
3.2.6. Análisis fisicoquímico del queso de cabra.	33
3.2.7. Análisis microbiológico del queso de cabra.	34
IV.RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	43
4.1. Peso promedio del espejo de plata (Ag).....	43
4.2. Caracterización de la solución coloidal de quitosano + AgNPs.....	44
4.2.1. Apariencia de las soluciones coloidales.....	44
4.2.2. Espectrofotometría Uv –Vis.....	44
4.3. Propiedades fisicoquímicas de los bioempaques.	47
4.4. Propiedades Estructurales de los bioempaques	53
4.4.1. Análisis de difracción de rayos X (DRX)	53
4.5. Análisis realizados al queso de cabra envuelto en bioempaques hechos a base de quitosano y nanopartículas de plata.	54
4.5.1. Análisis fisicoquímico del queso de cabra.	54
4.5.2. Análisis microbiológico del queso	59
V. CONCLUSIONES.....	70
VI. RECOMENDACIONES.....	72
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
VIII. ANEXOS	74

INDICE DE TABLAS

Cuadro 1: Simbología de las películas elaboradas.....	28
Cuadro 2: Datos iniciales para las condiciones de la	31
Cuadro 3: Descripción de los tratamientos aplicados a las muestras de queso de cabra.....	33
Cuadro 4: Peso promedio del espejo de plata.....	43
Cuadro 5: Porcentaje de AgNPs en bioempaque.....	43
Cuadro 6: Pico de absorción máxima.....	45
Cuadro 7: Posición de los picos de absorción de AgNPs de diferente tamaño en el espectro UV-Vis.	46
Cuadro 8: Resultados del análisis de AgNPs por espectroscopia UV-Vis y tamaño de partículas aproximados.	46
Cuadro 9: Propiedades físicas de las películas compuestas	47
Cuadro 10: Parámetros fisicoquímicos en función a los días de evaluación del queso de cabra con los diferentes tratamientos	55
Cuadro 11: Recuento microbiológico para cada parámetro microbiológico.	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Método Horizontal para el recuento de <i>Coliformes totales</i>	41
Figura 2 Espectro UV-Vis de nanopartículas de plata sintetizadas.....	45
Figura 3 Comparación de porcentajes de humedad	47
Figura 4 Comparación de porcentajes de solubilidad.	49
Figura 5 Espesor de las películas.	50
Figura 6 Permeabilidad al vapor de agua de las películas	51
Figura 7 Espectro de difracción de rayos-X de nanopartículas de plata en las películas.....	53
Figura 8 Comparación del porcentaje de pH en función a los días de evaluación del queso de cabra con los diferentes tratamientos.	56
Figura 9 Comparación del porcentaje de humedad en función a los días de evaluación del queso de cabra con los diferentes tratamientos.	57
Figura 10 Comparación del porcentaje de acidez titulable en función a los días de evaluación del queso de cabra con los diferentes tratamientos.....	58
Figura 11 Comparación de recuento de mesófilos viables en función a la aplicación diferentes tratamientos y los días de evaluación del queso de cabra. .	62
Figura 12 Comparación de recuento de hongos y levaduras en función a la aplicación diferentes tratamientos y los días de evaluación del queso de cabra. .	63
Figura 13 Comparación de recuento de pseudomonas en función a la aplicación diferentes tratamientos y los días de evaluación del queso de cabra.	65
Figura 14 Características físicas visuales del queso de cabra con diferentes tratamientos en el día 21 de evaluación.	67
Figura 15 Características visuales del queso fresco almacenado con los tratamientos patrón en el día 21.	67

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Norma Técnica Peruana. Queso fresco.	85
ANEXO 2: Síntesis de nanopartículas mediante el reactivo de Tollens.	86
ANEXO 3: Preparación de películas compuestas.	87
ANEXO 4 Caracterización de la solución coloidal de quitosano + nanopartículas de plata.	89
ANEXO 5: Caracterización de las películas de QP – AgNPs.....	89
ANEXO 6 Aplicación de las películas sobre el queso de leche de cabra.	91
ANEXO 7: Análisis fisicoquímico del queso de cabra envuelto con película con diferentes tratamientos.....	92
ANEXO 8: Análisis microbiológico del queso de cabra envuelto con película con diferentes tratamientos.....	93
ANEXO 9: Peso promedio de plata (Ag)	95
ANEXO 10: Espectro UV-Vis nanopartículas de plata sintetizadas.	95
ANEXO 11: Recuento de diferentes microorganismos en función a la aplicación diferentes tratamientos y los días de evaluación del queso de cabra.....	98

RESUMEN

“Efecto de la concentración de nanopartículas de plata (Ag) en un bioempaque a base de quitosano sobre la vida útil del queso de leche de cabra (*Capra hircus*)”

Autora: Milagros de Fátima Jiménez Silvera

Las nanopartículas metálicas se han utilizado recientemente en diferentes aplicaciones biotecnológicas; entre ellas, el empaque de alimentos para alargar su vida útil. En la industria alimentaria existen microorganismos que pueden llegar al consumidor y ocasionar daños en la salud pública; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Speudomonas*, mohos y levaduras, son algunos microorganismos frecuentemente encontrados en el queso hecho a base de leche de cabra, siendo estos y otros, los causantes de la disminución de la vida útil y de la calidad del mismo. Por ende, es necesario encontrar métodos que permitan controlar el crecimiento microbiológico y mantener las características organolépticas sobre todo en condiciones de almacenamiento previo a su consumo. En este trabajo se describe la síntesis de nanopartículas de plata mediante la combinación del método de Tollens y el sonoquímico, las cuales fueron impregnadas en quitosano, para posteriormente elaborar los bioempaques mediante el método de casting, obteniendo de esta forma películas con 3 concentraciones de AgNPs (0.001, 0.003 y 0.004 % en película). Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas se caracterizaron usando espectroscopia ultravioleta visible (UV – vis) y difracción de rayos X (DRX). Las muestras de queso de cabra fueron envueltas con los bioempaques, almacenadas a 4°C y evaluados en el día 7, 14 y 21. Estas evaluaciones fueron fisicoquímicos y microbiológicos, observando que a mayor concentración de AgNPs la humedad se mantiene dentro de los parámetros de la Norma Técnica Peruana para queso fresco. En cuanto a los análisis microbiológicos, los resultados permitieron determinar que al incrementar la concentración de AgNPs el recuento de microorganismos es menor, lo cual indica el potencial de aplicación de estas nanopartículas como agentes

antimicrobianos para combatir microorganismos responsables de la disminución de la vida útil del producto.

Palabras claves: Nanopartículas de plata; método de Tollens; método sonoquímico; queso de cabra; quitosano; bioempaque.

ABSTRACT

"Effect of the concentration of silver nanoparticles (Ag) in a bio-packaging based on chitosan on the shelf life of goat's milk cheese (*Capra hircus*).

Author: Milagros de Fátima Jiménez Silvera

Metal nanoparticles have recently been used in different biotechnological applications; among them, food packaging to extend its shelf life. In the food industry there are a number of microorganisms that can reach the consumer and cause damage to public health; *E. coli*, *Coliformes*, *S. aureus*, *Speudomonas*, molds and yeasts, are some microorganisms frequently found in cheese made from goat's milk, these and others causing the decrease in shelf life and quality. Therefore, it is necessary to find methods that control microbiological growth and maintain organoleptic characteristics, especially in storage conditions prior to consumption. This work describes the synthesis of silver nanoparticles by combining the Tollens method and the sonochemical one, which were impregnated in chitosan, to later elaborate the bio-packages by the casting method, thus obtaining films with 3 concentrations of AgNPs. (0.001, 0.003 and 0.004% on film). The physicochemical properties of the nanoparticles were characterized using ultraviolet visible spectroscopy (UV-vis) and X-ray diffraction (XRD). The goat cheese samples were wrapped with bio-packages, stored at 4 ° C and evaluated on days 7, 14 and 21. These evaluations were physicochemical and microbiological, observing that at a higher concentration of AgNPs the humidity remains within the parameters of the Peruvian Technical Standard for fresh cheese. Regarding the microbiological analyzes, the results allowed determining that by increasing the concentration of AgNPs the count of microorganisms is lower, which indicates the potential of applying these nanoparticles as antimicrobial agents to combat microorganisms responsible for the decrease in the useful life of the product.

Key words: Silver nanoparticles; Tollens method; sonochemical method; goat cheese; chitosan; biopackaging.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la nanotecnología es muy importante en el desarrollo científico e industrial, ya que al tratar la materia en escala nanométrica, esta presenta propiedades diferentes a la que posee a nivel macroscópica (Sanchez, 2017). En la agroindustria las aplicaciones de esta tecnología están orientadas al procesamiento, empaquetamiento y monitoreo de los alimentos (Delgado, 2009; Sozer y Kokini, 2009). Es así como hoy ya empleamos el término nanofood o nanoalimentos para hacer referencia a “todo producto alimenticio en donde la nanotecnología ha intervenido en cualquiera de las etapas de su producción, procesamiento, transporte y almacenamiento” (Chau, Wu y Yen, 2007).

Delgado(2009) menciona que una solución para prolongar la vida de los alimentos incluyen empaques poliméricos nanoestructurados; de este modo se habla de nanoaplicaciones, como por ejemplo la incorporación de nanopartículas de plata. Las AgNPs poseen propiedades antimicrobianas con grandes expectativas comerciales como conservante de alimentos o aditivo antihumedad (Watson, 2007, p.12). La actividad bactericida de las AgNPs puede ser mejorada con la combinación de polímeros como el quitosano (Cardoso, 2016).

El desarrollo de empaques antimicrobianos es de gran importancia debido al potencial para proveer calidad y seguridad alimentaria. El objetivo de la incorporación de antimicrobianos en los materiales de empaque es evitar el crecimiento de microorganismos en la superficie de los alimentos y por lo tanto mantener la calidad de los productos alimenticios por mucho más tiempo. Lo anterior puede reducir en gran medida la adición de grandes cantidades de químicos en el propio alimento (Sorrentino, Gorrasi y Vittoria, 2007).

Ante la demanda creciente de quesos hechos a base de leche de cabra a nivel nacional, la costa peruana tiene un gran potencial y mayor posibilidad de hacer de estas regiones más competitivas en temas de producción de queso de cabra y aprovechar las oportunidades comerciales en el mercado nacional y extranjero.

En la región de Tumbes, los quesos de cabra no se encuentran de manera industrializada, es decir, elaborados por alguna empresa que lo venda bajo ciertas normas de higiene o un registro sanitario. Su elaboración se realiza de manera artesanal por personas que en su mayoría solo tienen conocimientos empíricos, su producto no presenta un registro sanitario y sus condiciones de elaboración son inciertas, por lo cual no se garantiza su inocuidad. La comercialización se lleva a cabo por los propios productores quienes realizan la venta de manera informal, cubren los quesos con papel y los colocan en pequeños baldes expuestos a la intemperie y sin medidas de protección, ni aplicación de una cadena de frío para asegurar su conservación, lo cual pone en riesgo sus características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas.

En la presente investigación se sintetizaron nanopartículas de plata mediante la combinación del método de Tollens y el sonoquímico, convirtiéndose de esta forma en un método breve y práctico para la producción de estas. El objetivo fue determinar el efecto de la concentración de nanopartículas de plata (Ag) en un bioempaquete a base de quitosano sobre la vida útil del queso de cabra (*Capra hircus*).

II. REVISION DE LA LITERATURA

“La nanotecnología es entendida como la capacidad de observar, manipular y controlar las propiedades de la materia a escala manométrica” (Delgado, 2009). De forma similar, la Royal Society (2004) define a “las nanotecnologías como el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas para controlar la forma y el tamaño a escala manométrica”, mientras que la American Society for Testing and Materials (ASTM, 2018) la define como “el campo que mide, manipula o incorpora materiales con una o varias de sus dimensiones comprendidas entre 1 y 100 nm”.

La nanotecnología aplicada a la industria alimentaria y agroindustria está teniendo un gran avance en los últimos años, poniendo énfasis en los beneficios que confiere la nanotecnología en el procesamiento, almacenamiento y monitoreo de alimentos (Santiago, 2014; Sozer y Kokini, 2009). En este tipo de industria, es el mercado asiático el más receptivo en el uso de nanotecnología; en Estados Unidos los consumidores se encuentran en término medio respecto a su aceptación (Santiago, 2014); mientras que en Latinoamérica la aplicación de nanotecnología es incipiente, y en Perú desde hace un poco más de una década se iniciaron investigaciones con apoyo de la cooperación internacional, lográndose hasta la actualidad el incremento de grupos de investigación (Santiago, 2012).

Las nanopartículas metálicas (NPM) son agregados ultrafinos de materia que van desde pocos hasta cientos de nanómetros. Estas pueden ser amorfas o cristalinas con propiedades conductoras o aislantes dependiendo de su composición (Skwarczynski y Toth, 2017). El procedimiento y las condiciones de síntesis de los nanomateriales influyen directamente en su forma y tamaño (Aguilar, 2009).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) están clasificadas como nanopartículas metálicas (NPM), las cuales son de gran interés por su fuerte actividad antimicrobiana, la cual es la principal característica para el desarrollo de productos con incorporación de AgNPs en diversos materiales (Haider y Kang, 2015). La principal propiedad de las AgNPs es la mayor área superficial específica comparada con la plata a granel, lo que proporciona a éstas, más sitios activos y

energía superficial superior, representando un aumento en la capacidad antimicrobiana (Liu y Jiang, 2015). Otra propiedad interesante es la propiedad óptica, ya que las nanopartículas en disolución coloidal o soportada en sólidos absorben longitudes de onda visibles, dando lugar a los colores que abarcan el espectro visible (Escobar, 2015). Por ello, la espectroscopía UV-vis es una técnica que se utiliza para caracterizar las AgNPs, ya que permite saber si el proceso de síntesis ha concluido con la formación de nanopartículas. Es así como la aparición de un pico de absorción máxima entre los 390 y 430 nm es un indicador de la presencia de nanopartículas de plata (Kapoor, 1998; Kalaivani, 2018; Flores, 2014). Otra técnica muy usada en la caracterización de AgNPs es la aplicación de difracción de rayos X (DRX) la cual “permite medir el estado de oxidación del elemento metálico y determinar las energías de enlace de la plata reducida, pudiéndose observar la efectividad del método de reducción seguido para la formación de AgNPs” (Iturbe, Nestor, Mendieta y Borja, 2015).

En la actualidad existen diversos métodos para sintetizar nanopartículas de plata, Por lo cual, el presente trabajo de investigación propone la combinación de los principios del método de Tollens y la síntesis sonoquímica. El método de Tollens es un proceso simple y aplicado desde hace varias décadas para obtener AgNPs con un tamaño de partícula controlado (Pinto, Martin, Hernandez y Martin, 2015), produce películas de nanopartículas de plata (50-200 nm), hidrosoles de plata (20-50 nm) (Iravani, Korbekandi, Mirmohammadi y Zolfaghari, 2014). La reacción involucra la reducción de una solución amoniacal de Ag, utilizando agentes reductores tales como: el formaldehído, la glucosa, la galactosa, la maltosa y la lactosa, entre otros que en presencia de un compuesto con un grupo aldehído forma un espejo de Ag. (Flores, 2014). Por otro lado “la síntesis sonoquímica, consiste en la aceleración de reacciones químicas a través de ondas de ultrasonidos” (Mendez, 2009). La aplicación de ultrasonido en la formación de nanopartículas de plata ha venido teniendo apogeo “debido a que es posible obtener nuevas propiedades usando viejos y reconocidos materiales tan solo con reducir su tamaño de partícula” (Riley, 2002).

“Oliver (2007), menciona que actualmente es de gran interés la elaboración de materiales con implantes de nanopartículas metálicas en películas delgadas de

polímeros para posteriormente ser usados como semiconductores, bioempaques, recubrimientos bactericidas, catalizadores, etc” (Pinto, Martin, Hernández, Martin, 2015). Los bioempaques o empaques biodegradables son materiales de embalaje que ayudan a proteger los productos en su disposición final. Están fabricados a base de biopolímeros, de fácil degradación y amigables con el medio ambiente. (Federación de empresas de transporte de mercancías de Zaragoza [FETRAZ], 2019). Se puede utilizar películas biodegradables compuestas para el desarrollo de bioempaques para alimentos y de esta forma mejorar sus propiedades organolépticas e incrementar la vida útil, a la vez que se reduce el uso de materiales de embalaje descartables y no degradables (Guilbert, 1986).

“Zamudio y Flores (2008) menciona que existen diversas técnicas para la elaboración de películas, sin embargo la utilizada a nivel de investigación académica es el método de casting, también llamado vaciado en placa o gelatinización térmica” (Navarro, 2016). La técnica de casting consiste en formar películas a partir de una solución que contenga polímeros y agua, posteriormente se vierte la solución en placas, y finalmente esta solución se seca a determinadas condiciones de temperatura y humedad relativa, para finalmente retirar las películas de las placas (Navarro, 2016).

Evaluar las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las películas compuestas o en este caso bioempaques, es de gran importancia para el desarrollo de esta investigación. Por ello, determinar la solubilidad en agua es una propiedad importante respecto a la protección de los alimentos donde la actividad de agua del medio es alta o donde la película es sometida al contacto con agua durante el empaquetamiento (Guilbert Gontard, y Cuq, 1992). El contenido de humedad influye directamente en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las películas durante el procesamiento y almacenamiento (Slade y Levine, 1993). Por medio de la determinación del espesor es posible evaluar la homogeneidad de una película sobre este parámetro (Navarro, 2016). Mientras que la migración de vapor de agua es uno de los principales factores de alteración de la calidad sensorial y de la estabilidad del almacenamiento (Chen, 1995). Por ello la importancia de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) radica en que las películas crean una barrera al paso de moléculas de vapor de agua, lo cual ayuda a reducir considerablemente

la pérdida de peso del alimento (Mehyar y Han, 2004) y a disminuir la transferencia de humedad entre el producto y el medio (Qiu-Ping y Wen-Shui, 2008).

“Nishimura et al. (1991), señala que el quitosano como polímero para la elaboración de bioempaques, constituye un excelente medio para el control de los cambios fisiológicos, morfológicos y fisicoquímicos de los alimentos, mientras que Argüelles, García y Peniche (1989) indican que las películas formadas con quitosano tienen excelentes propiedades mecánicas” (Navarro, 2016).

En la elaboración de películas compuestas, los plastificantes se añaden a los polímeros para mejorar la fluidez, de esta forma el proceso se hace más fácil y se reduce la fragilidad (Vanegas, 2014). Un plastificante muy usado en la elaboración de películas es alcohol polivinílico, el cual es un polímero sintético cristalino soluble en agua (Bonilla, Fortunati, Atarés, 2014). Es así como Vanegas, (2014) en su investigación, obtuvo películas biodegradables a partir de mezclas de quitosano, alcohol polivinílico como plastificante y ácido tánico como reticulante. Las películas obtenidas fueron evaluadas en sus propiedades físicas, mecánicas, microbiológicas y biodegradables, concluyendo que sus propiedades están altamente influenciadas por las condiciones de elaboración como, secado, almacenamiento y por la cantidad de agente plastificante y reticulante. Por otro lado, Cruz et al. (2019) también elaboró películas compuestas con quitosano y alcohol polivinílico, pero además adicionaron diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre (0, 0, 0.05, 0.10, 0.15 y 0.20% CuO en la solución mixta quitosano + PVA) las cuales fueron probadas en bacterias aisladas de carne de cabra y queso. Como resultado obtuvieron que todos los compuestos sintetizados presentaron inhibición contra bacterias y que, en la mayoría de las cepas probadas, la zona de inhibición aumentó a medida que la concentración de NP en el compuesto aumentaba.

El queso de cabra es un producto de alto valor nutricional, asociado a la alta digestibilidad y asimilación; esto se debe a que la leche de cabra, de la cual se produce este tipo de queso posee mayor porcentaje de ácidos grasos de cadena corta (butírico, caproico, cáprico y caprílico) que le confieren al queso sabores diferentes, además de poseer mayor cantidad de vitamina A, potasio, cobre, calcio,

fósforo y magnesio en comparación a la de leche de vaca, haciéndolo un producto atractivo para los consumidores (Vega et al., 2004), citado por (Duran et al., 2010). Sin embargo “la composición de la leche de cabra puede variar por múltiples factores, entre ellos, tipo de alimentación, sistema productivo, medioambiente, manejo, etapa de lactancia e, inclusive, estado sanitario del ganado caprino” (Mejía, Noguera y Posada, 2008).

“Man y Jones (2000) mencionan que la vida útil es un periodo en el que bajo circunstancias definidas, se produce una tolerable disminución de la calidad del producto. La calidad hace referencia a características químicas, microbiológicas, sensoriales y nutricionales, mediante el cual en el instante en que alguno de los parámetros es considerados inaceptables, se deduce que el producto llegó al final de su vida útil” (Valdez, 2014). En la investigación realizada por Bardales (2019), se determinó el periodo de vida útil en queso crema elaborado a partir de leche de cabra por el método de pruebas aceleradas, de ello se concluyó que el tiempo de vida útil estimado del producto almacenado en condiciones de refrigeración (4°C) fue de 11 días, y que la principal causa de su deterioro fue microbiológica.

Las características del queso fresco (pH, humedad y nutrientes) hace que sea un sustrato adecuado para el crecimiento bacteriano por su alto contenido proteico, otros factores que influyen es la contaminación durante la manipulación del producto terminado y/o durante la elaboración del mismo (Barrientos, 2015). La flora microbiana varía en cada queso; ello depende del tipo, de la carga microbiana inicial de la leche, la eficiencia de pasteurización y la manipulación tanto en el proceso como en la comercialización. Entre los microorganismos que pueden generar un riesgo para el consumidor y que puede presentar el queso fresco son: *Staphylococcus aureus*, *Coliformes*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* y presencia de hongos y levaduras. (Barrientos, 2015).

El hallazgo de *E. coli* y coliformes en queso o en cualquier otro alimento indica que no es seguro para el consumo humano, ya que se puede suponer que hay enteropatógenos a causa de contaminación fecal (Fox, 2003). Por otro lado, “los mohos y levaduras son los agentes alterantes de un número importante de

alimentos, entre ellos el queso. Los hongos representan un peligro potencial de producción de micotoxinas. (ICMSF, 2000)” citado por (Tandazo,2016).

“Los *Staphylococcus aureus* son bacterias resistentes al cambio de temperatura y pueden causar desde diarrea hasta una intoxicación severa a quien ingiere la leche o sus derivados. (Bonilla, Cervantes y López, 2011)” citado por (Solórzano, Márquez, López, Martínez y Guerrero, 2018). Esta bacteria vive con frecuencia en la membrana de la mucosa nasal y en la ubre de las vacas; además, la elevada actividad de agua, el pH ácido y la alta concentración de sal que poseen los quesos favorece el crecimiento de este microorganismo (Torkar y Tejer, 2006) citado por Mechán et al. (2019).

Las *Pseudomonas* son bacterias psicrótrofas, con una temperatura optima de crecimiento entre 25 – 30 °C, pero que pueden crecer a bajas temperaturas entre -5 y 5°C; también son consideradas como degradadoras debido a la producción de enzimas extracelulares. La *Pseudomona fluorescens* es la especie más común y potencialmente alterante en la leche y sus derivados. Deeth, Khusniati, Datta y Wallace (2002) citado por Burbano (2018). Otro microorganismo que perjudica la vida útil e inocuidad del queso es la *Salmonella spp*, de la cual se ha reportado que su prevalencia en la leche y sus derivados no pasteurizados se debe a las malas prácticas de manipulación durante el ordeño, aguas contaminadas y heces de los animales (Bayona, 2012); en Perú se confirma la calidad del queso fresco al observar la ausencia de este microorganismo (Guzman, Mayorga y Mejía, 2015).

Cristóbal y Maúrtua (2003), en su estudio sobre la carga microbiana en muestras de queso fresco que se distribuían en mercados minoristas de Lima, observaron que en su mayoría, los resultados estuvieron por encima de los valores máximos permitidos por las Normas Técnicas Peruanas (NTP) para los diferentes microorganismos de estudio. Encontrando cantidades de $7,13 \times 10^6$ UFC/g para bacterias aerobias mesófilas, $9,33 \times 10^2$ NMP/g para coliformes totales, $8,33 \times 10^2$ NMP/g para coliformes fecales, $2,63 \times 10^2$ NMP/g para *E. coli* y $3,13 \times 10^5$ UFC/g para *Staphylococcus aureus*; por lo cual concluyeron que la elevada carga microbiana en las muestras de queso analizadas refleja deficiencias higiénicas en la manipulación.

Flores (2014) investigó el efecto antimicrobiano de las AgNPs en *Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus* obteniendo resultados que le permitieron concluir que las Ag NPs poseen una alta capacidad bactericida, ya que se produce una mortandad del 99,9 % con sólo pequeñas dosis de las mismas.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales y equipos

3.1.1. Materiales

a. Materias primas

- Queso de cabra

b. Reactivos e insumos

- Quitosano
- Nitrato de plata
- Hidróxido de sodio
- Glucosa
- Amoníaco
- Ácido acético
- Acetato de polivinilo o PVA
- Silica gel

c. Materiales de laboratorio

- Acrílicos de 25 x 25 cm.
- Placas Petri.
- Pipetas de 1, 5 y 10ml.
- Tubos de ensayo de 160 x 10 mm,
- Matraces 100, 250, 500 y 1000 ml
- Pro-pipetas
- Frascos de dilución con tapa rosca de 250 y 500 ml.
- Pizeta.
- Vaso de precipitación.
- Fiolas de 100 y 250ml.
- Probetas de 100, 250 y 500 ml.
- Termómetro.

- Espátula.
- Crisoles de porcelana
- Micropipetas.
- Papel gomado
- Bolsas autosellables
- Papel aluminio

d. Materiales de escritorio.

- Agenda
- Cuaderno
- Lapiceros
- Plumón indeleble
- Sobres manila
- Hojas boom
- Folder manila

3.1.2. Equipos

a. Balanza analítica

Marca: Sartorius

Modelo: Quintix®.

b. Espectrofotometro uv – vis de doble haz

Marca: PerkinElmer

Modelo: Lambda 365

c. Sonicator

Marca: Branson

d. Refrigeradora

Marca: Samsung

e. Estufa

Marca: KertLab

Modelo: ODHG-9023^a

f. Estufa

Marca: Binder

Modelo BI0496

g. Micrómetro digital

Marca: Mitutoyo

Modelo: IP 65 Coolant Proof

h. Camara de flujo laminar

Marca: Labotec

Modelo: bbs-ddc

i. Autoclave

Marca: Labotec

Modelo: XY9.DY.250B50

j. Baño María

Marca: Labotec

Modelo: DKZ-2

k. PH Metro

Marca: Adwa-AD-1020

l. Agitador magnético

Marca: CIMAREC

Modelo: Thermo Scientific™

m. Agitadores magnéticos

- Marca: ARE Heating

Modelo: Velp Scientific

3.2. Métodos de investigación.

3.2.1. Síntesis de nanopartículas de plata.

Se obtuvieron nanopartículas de plata aplicando la combinación del método de Tollens (ver anexo n° 02), y el método sonoquímico (Ver Anexo n°03).

Para aplicar el método de Tollens se necesitó una solución (A) de AgNO_3 al 6% p/v, una solución activadora (B) de NaOH al 6% p/v, una dilución (C) de NH_4OH al 2N y una solución (D) de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) al 11.4 % p/v.

Se realizaron 3 diferentes concentraciones de nanopartículas de plata, las cuales se determinaron por método gravimétrico con la ayuda de una balanza analítica. Para ello, se inició pesando 3 vasos de precipitación de 250 ml, los cuales estuvieron totalmente vacíos, limpios, secos y rotulados (C1, C2 y C3).

- a. Para la concentración 1:** En el vaso de precipitación de 250 ml rotulado con (C1) se agregó 1 ml de la solución (A) y 2 gotas de la solución (B), formándose de esta manera un precipitado en el fondo del recipiente. Posteriormente se agregó NH_4OH al 2N hasta disolver totalmente el precipitado, al cual se le agregó 2 ml de la solución (D),
- b. Para la concentración 2:** En el vaso de precipitación de 250 ml rotulado con (C2) se agregó 2 ml de la solución (A) y 4 gotas de la solución (B), formándose de esta manera un precipitado en el fondo del recipiente. Posteriormente se agregó NH_4OH al 2N, hasta disolver totalmente el precipitado, al cual se le agregó 4 ml de la solución (D).
- c. Para la concentración 3:** En el vaso de precipitación de 250 ml rotulado con (C3) se agregó 3 ml de la solución (A) y 6 gotas de

la solución (B), formándose de esta manera un precipitado en el fondo del recipiente. Posteriormente se agregó NH_4OH al 2N, hasta disolver totalmente el precipitado, al cual se agregó 6 ml de la solución (D).

En los tres casos, se agitó e inmediatamente se colocaron los vasos de precipitación en agua hirviendo por el tiempo de 1 minuto, formándose así un espejo de plata en el fondo de cada vaso. El líquido sobrante fue eliminado y se enjuagó con agua destilada, posteriormente se volteó y se dejó en esa posición hasta que el agua haya discurrido totalmente. Se prosiguió a pesar los vasos y determinar la cantidad de plata existente.

Para poder aplicar la síntesis mediante ultrasonido se preparó una solución de quitosano comercial (1% p/v) disolviendo el polímero en una solución de ácido acético a una concentración de 1% v/v. Se utilizó un agitador magnético a una temperatura de 60-65°C y 6000 rpm por un periodo de tiempo de aproximadamente 2 horas o hasta que el quitosano se haya disuelto totalmente.

Se agregó 194.4 ml de solución de quitosano a cada uno de los vasos de precipitación que contenían el espejo de plata (C1, C2 y C3) para luego llevarlo a baño de ultrasonido durante 7 h a 60°C.

3.2.2. Preparación de películas compuestas – bioempaques.

Se elaboraron películas compuestas por el método de *Casting* (vertido en placa/ gelatinización térmica), tomando en cuenta la metodología recomendada por Navarro (2016).

Se preparó una solución de PVA al 1% p/v, con la ayuda de un agitador magnético a 1000 rpm, temperatura de 100 °C y por el

periodo de tiempo de 1 hora. La solución fue conservada en refrigeración hasta su uso.

En un vaso de precipitación de 500 ml se vertieron 194.4 ml de solución de quitosano al 1% p/v impregnado de AgNPs, 55.6 ml de solución de PVA al 1% p/v y 27.8 ml de agua destilada, equivaliendo al 70%, 20% y 10% del total de la solución respectivamente. Se mezcló con ayuda de un agitador magnético a 900 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se colocó a refrigeración por un periodo de 1 hora para eliminar las burbujas que se formaron por la agitación.

La mezcla homogénea se dispersó sobre moldes de acrílicos cuadrados de 25 cm x 25 cm previamente esterilizados, para lo cual fueron puestos en la estufa a 60°C durante 23 horas. Transcurrido este tiempo, se retiraron de las placas de la estufa, y se procedió a extraer las diversas películas; cada una fue guardada en papel gomado y puestas en bolsas autosellables.

Las películas conformadas por el 70 % de Quitosano +AgNPs, 20% de PVA y 10% de Agua destilada obtenidas se codificaron de la siguiente manera:

Cuadro 1: Simbología de las películas elaboradas

SIMBOLOGIA	COMPOSICION
PVA - Q C ₀	PVA / Agua destilada / Quitosano
PVA - Q C ₁	PVA / Agua destilada / Quitosano + Ag NPs (0.001% peso en la solución mixta)
PVA - Q C ₂	PVA / Agua destilada / Quitosano + Ag NPs (0.003% peso en la solución mixta)
PVA - Q C ₃	PVA / Agua destilada / Quitosano + Ag NPs (0.004% peso en la solución mixta)

Fuente: Elaboración propia.

3.2.3. Caracterización de AgNPs en una solución coloidal mixta

a. Evaluación de las propiedades ópticas mediante Espectroscopia UV-vis.

Para realizar el análisis de las muestras, se colocaron las diferentes soluciones de quitosano + Ag NPs en la cubeta de espectrometría. Los espectros de absorción óptica de las soluciones coloidales de nanopartículas fueron obtenidos en un rango de longitud de onda de 300-800nm, empleando un espectrofotómetro.

3.2.4. Caracterización de películas compuestas.

a. Humedad

El porcentaje de humedad en las películas se determinó midiendo su pérdida de peso, para ello se cortó las películas en láminas de 2 x 2 cm y se pesaron en una balanza analítica. Este análisis se realizó por duplicada, colocando las películas en una estufa a 100°C durante 24 horas para llegar al peso constante. El porcentaje de humedad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{[(\text{Peso inicial seco} - \text{Peso final seco})]}{\text{Peso inicial seco}}] \times 100 \dots (1)$$

b. Solubilidad

Se cortaron pedazos de cada película con dimensiones de 2 cm x 3 cm y se pesaron en una balanza analítica con una precisión de 0.0001 g. Cada pedazo se colocó en un vaso de precipitación de 100 ml y se les agregó 80 ml de agua destilada. Las muestras de películas se mantuvieron en constante agitación (200 - 300 rpm) por 1 h a temperatura ambiente (29°C), asegurándose de

que estas se mantuvieran todo el tiempo inmersas bajo el agua. Todas estas muestras fueron filtradas y secadas en la estufa a temperatura de 100 °C, durante 24 horas hasta llegar al peso constante, finalmente se pesaron y se registraron los datos obtenidos. El análisis se realizó por duplicada y el porcentaje de solubilidad se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ solubilidad} = \frac{[(\text{Peso inicial seco} - \text{Peso final seco})]}{\text{Peso inicial seco}}] \times 100 \dots (2)$$

$$\text{peso inicial seco} = m. \text{ inicial} - m. \text{ inicial} \left(\frac{\%H}{100} \right)$$

c. Espesor.

El espesor se determinó utilizando un micrómetro digital de 0.001mm de sensibilidad. Se realizaron 10 mediciones en lugares al zar de la película y se prosiguió con el cálculo del promedio de dichas mediciones.

d. Permeabilidad al vapor de agua.

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) en las películas se determinó tomando como referencia la metodología aplicada por Navarro (2016), quien empleó el método desecante, con la utilización de sílica gel. Se colocaron 2 gramos de sílica gel en varios tubos de ensayo de 13 cm de altura y 1 mm de diámetro. Las películas fueron cortadas en cuadrados de 3.5 cm y se colocaron en la boca del tubo sellándolos herméticamente con parafina y los espacios sobrantes de la película con papel aluminio. Posteriormente los tubos fueron pesados y colocados en un desecador equilibrado con un ambiente de una humedad relativa (HR) de 80% y a una temperatura de 25.6°C. Se esperó 1 h hasta que las muestras

llegaran al equilibrio. Los datos iniciales para las condiciones de la cámara húmeda fueron los siguientes:

Cuadro 2: Datos iniciales para las condiciones de la cámara húmeda

T de ensayo °C	Pw a T ensayo MPa	Pw a T ensayo kPa	HR ₁ %	HR ₂ %	Diámetro tubo, m	Área expuesta, m ²
25.6°C	0.0032954 MPa	3.2954 KPa	0	80	0.015 m	0.00017672 m ²

Fuente: Elaboración propia

Las muestras fueron pesadas 6 veces durante 26 horas. Los cambios de peso se registraron en función del tiempo con una tendencia lineal cuya pendiente (g/h) representa la cantidad de vapor transmitido por unidad de tiempo.

Para la determinación de este análisis se aplicó la siguiente ecuación:

$$WVP = \frac{WVTR \times e}{p_w \times (HR_2 - HR_1)} \dots (3)$$

En donde:

WVT=Permeabilidad del vapor de agua (g /hmMPa)

WVTR=Pendiente de la curva (g/h) sobre área expuesta de la lámina (g/hm²)

p_w=Presión de vapor de agua a la temperatura de ensayo (20°C) (MPa)

HR₂=Humedad relativa de la cámara. (69%)

HR₁=Humedad relativa del interior de la celda (0%)

e=Espesor (m)

e. Análisis de difracción de rayos X.

El análisis de difracción de rayos x se llevó a cabo utilizando in difractómetro Bruker D8 Advance operado a 40 kV y 40 mA, con radiación de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). El intervalo analizado 2θ fue de entre $5\text{--}80^\circ$.

3.2.5. Aplicación de las películas sobre el queso de cabra

Se esterilizaron las películas aplicando radiación ultravioleta en la cámara de flujo laminar durante 10 minutos para cada lado.

Se cortó aproximadamente 25 g de queso de cabra para cada muestra procurando mantener una forma cuadrada; estas fueron envueltas de manera cuidadosa y guardadas en un recipiente hermético para luego ser colocadas en una refrigeradora a una temperatura de 4°C y HR de 85%.

La preparación de la muestra para su análisis microbiológico y fisicoquímico se realizó de manera higiénica, utilizando materiales estériles y con la ayuda de la cámara de flujo laminar se proporcionó un ambiente esterilizado para el desarrollo del mismo.

Las muestras de mayor interés de estudio a nivel estadístico fueron las de PVA-Q C1, PVA-Q C2 y PVA-Q C3, ya que con ellas se pudo determinar la existencia o no de efectos significativos en la concentración de las nanopartículas de plata (Ag) en un bioempaque a base de quitosano sobre la vida útil del queso de cabra (*Capra hircus*); el PVA-QC0 fue la muestra patrón, y el TP fue la muestra testigo, la cual sirvió como un comparativo a los empaques usados en la comercialización de quesos.

Cuadro 3: Descripción de los tratamientos aplicados a las muestras de queso de cabra.

	TRATAMIENTOS				
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
Queso de cabra	PVA - Q C ₁	PVA - Q C ₂	PVA - Q C ₃	PVA - Q C ₀	Parafina (TP)

Fuente: Elaboración propia

3.2.6. Análisis fisicoquímico del queso de cabra.

Se creyó conveniente analizar fisicoquímicamente las muestras cada 7 días por un periodo de 21 días para determinar el efecto de los diferentes tratamientos aplicados sobre el queso de cabra en función el tiempo, dichos análisis son los que se detallan a continuación:

- a. Determinación del pH:** Se colocó 50 ml de agua destilada y 10 g de queso molido en un vaso de precipitado, se procedió a mezclarlo mediante la utilización de un agitador magnético por 15 min a 1000 rpm y con la ayuda de un potenciómetro previamente calibrado se determinó el pH de la mezcla.

- b. Determinación de acidez:** El grado de acidez de las muestras de queso fue determinado por el método de valoración ácido - base o también llamado titulación ácido - base, como lo reportado por Garrido (2014). En un matraz aforado de 100 ml se colocaron 10 g de queso previamente molido y se añadió agua destilada hasta alcanzar los 100 ml, se mezcló en un agitador magnético por 15 minutos a 1000 rpm y posteriormente se filtró la solución con papel filtro. Con una pipeta se tomaron 50 ml y se colocaron en un vaso de precipitación; a esta solución se le adicionaron 5 gotas de fenoltaldehina al 1 % como indicador.

Se llenó una bureta con una solución de NaOH a 0,1 N y se adicionó gota a gota sobre la muestra en forma de solución agitando lentamente. Cuando se notó un color rosa sobre la solución, se terminó la titulación y se procedió a tomar la lectura de la bureta y obtener el gasto de NaOH a 0.1 N.

El cálculo de la acidez titulable se efectuó mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ de Acidez} = \frac{A \times N \times C}{M} \times 100 \dots (4)$$

Donde:

A : Cantidad en ml de NaOH usado.

N : Normalidad del NaOH.

C : Peso equivalente expresado en gramos del ácido (ácido láctico = 0,009).

D : Peso de la muestra.

- c. Determinación de humedad:** Para determinar el % de humedad de las muestras de queso se pesaron en la balanza analítica capsulas de porcelana debidamente rotuladas y se colocaron 5 gr de cada muestra de queso. Se introdujeron dichas capsulas en una estufa a 105°C durante 5.5 horas, después de ello se retiraron y dejaron enfriar, para posteriormente pesarlo nuevamente.

3.2.7. Análisis microbiológico del queso de cabra.

Las pruebas se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Tumbes. La decisión de llevar a cabo estas pruebas fue en referencia a la Norma Técnica Peruana (NTP) para productos lácteos (Ver anexo 01). Las evaluaciones fueron llevadas a cabo cada 7 días por un periodo de 21 días.

Se determinó el recuento total de hongos y levaduras, *Salmonella* sp, bacterias heterótrofas, *Pseudomonas*, *Coliformes totales* y *E. coli*., sin embargo, la prueba de *Staphylococcus aureus* no pudo ser realizada por falta de reactivos. Los procedimientos se detallan a continuación:

a. Preparación de la muestra: La preparación de la muestra para su análisis microbiológico se realizó de manera higiénica evitando en todo momento la contaminación cruzada, utilizando materiales estériles y con la ayuda de una cámara de flujo laminar proporcionó un ambiente inocuo para el desarrollo de los análisis microbiológicos.

b. Preparación de las diluciones decimales: Se tomó 25 g de muestra de queso de cabra de cada tratamiento y se colocó en 225 ml de una solución de agua peptonada (diluyente), posteriormente se homogenizó por cinco minutos, obteniéndose de esta manera la dilución 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-n} .

A partir de esta dilución, se prepararon diluciones decimales sucesivas, se tomó 1 ml de la primera dilución de la muestra madre y se depositó en un tubo de ensayo de 9 ml del diluyente (agua peptonada estéril), de esta forma se obtuvo la dilución 10^{-1} , de esta dilución se tomó 1 mL y se depositó en otro tubo de ensayo de 9 ml del diluyente (agua peptonada estéril), este último se convirtió en la dilución 10^{-2} , así sucesivamente.

c. Siembra por inmersión o placa vertida: Se colocó el inóculo de la muestra en una placa Petri estéril y sobre la misma se vertió el medio de cultivo estéril requerido en el análisis.

d. Aislamiento de microorganismos: Se realizó análisis del recuento total de hongos y levaduras, *Escherichia coli*,

Salmonella sp, bacterias heterótrofas, *Pseudomonas* y *Coliformes totales*.

d.1 Salmonella sp.

- **Método:** Horizontal para el recuento de *Salmonella sp*. (ISO 6579).
- **Preparación de la muestra madre:** Primero se utilizó en general como diluyente agua peptonada estéril. Se agregó 225 mL de agua peptonada y se adicionó 25 g de muestra de queso de cabra. Luego la muestra madre se incubó por 24 horas a 37° C.
- **Preparación de caldo Rappaport:** Luego de las 24 horas, se preparó caldo Rappaport, 9 mL en 1 tubos por muestra autoclavando a 121 ° C por 15 minutos. Se adicionó 1 mL de muestra madre y se incubó a 37° C por 24 horas en baño María.
- **Preparación de agar SS (Agar para *Salmonella* y *Shigella*):** Se preparó agar agar SS (Agar para *Salmonella* y *Shigella*) en un matraz, 63 g de este agar en un litro de agua desmineralizada, autoclavando a 121° C por 15 minutos.
- **Siembra en Agar SS (Agar para *Salmonella* y *Shigella*):** Después de 24 horas de preparar el caldo de Rappaport, se sembró en placas Petri con agar SS (Agar para *Salmonella* y *Shigella*) por duplicado por muestra.

El caldo Rappaport se sembró mediante estrías, utilizando mediante el asa de siembra. Se incubó a 37° C por 24 horas

en la estufa y se determinó las unidades formadoras de colonias (UFC).

d.2. Mohos y Levaduras.

- **Método:** Método de Horizontal para los recuentos de Hongos y Levaduras (ISO 7954).
- **Preparación de la muestra madre:** Se utilizó en general como diluyente agua peptonada estéril. A 225 ml de agua peptonada se adicionó 25 g de muestra de queso de cabra, obteniendo de esa forma la dilución 10^{-1} .
- **Preparación de las diluciones:** La dilución fue en tubos de ensayo con agua peptonada estéril como ya se explicó en el procedimiento b. Preparación de las diluciones decimales.
- **Preparación del Agar Sabouraud:** Se preparó agar Sabouraud en un matraz. Se agregó 65 g de este agar en un litro de agua desmineralizada, autoclavando a 121° C por 15 minutos.
- **Preparación de Inóculos para determinar el crecimiento de mohos y levaduras.**

1°: Se inoculó 1 ml de muestra madre y de las diluciones en las placas Petri estériles por duplicado, se rellenó con el Agar Sabouraud y se homogenizó las placas haciendo movimientos no bruscos y se dejó que el agar se solidifique en 15 minutos aproximadamente, posterior a ello se cubrió con parafina.

2°: Se incubó a temperatura ambiente por 3-5 días, y luego se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC).

d.3. Aerobios Mesófilos - Heterótrofos.

- **Método:** Método de Horizontal para los recuentos de Aerobios Mesófilos – Heterótrofos (DIGESA, 2001).
- **Preparación de la muestra madre:** Se utilizó en general como diluyente agua peptonada estéril. A 225 ml de agua peptonada se adicionó 25 g de muestra de queso de cabra.
- **Preparación de las diluciones:** La dilución fue en tubos de ensayo con agua peptonada estéril como ya se explicó en el procedimiento b. Preparación de las diluciones decimales.
- **Preparación de Plate Count Agar (PCA):** Se preparó agar Plate Count Agar (PCA) en un matraz, 22.5 g de este agar en un litro de agua desmineralizada autoclavando a 121° C por 15 minutos.
- **Preparación de Inóculos para determinar el crecimiento Aerobios Mesófilos - Heterótrofos.**

1°: Se inoculó 1 ml de muestra madre y de las diluciones en las placas Petri estériles por duplicado, se rellenó con el Plate Count Agar (PCA) y se homogenizó las placas haciendo movimientos no bruscos y se dejó que el agar se solidifique en 15 minutos aproximadamente, se cubrió con parafina.

2°: Se incubó a temperatura 37° C por 24-48 horas. Se calculó las UFC/g de la muestra.

d.4. *Pseudomonas*.

- **Método:** Método horizontal para recuento de pseudomonas (DIGESA 2001).
- **Preparación de la muestra madre:** Se utilizó en general como diluyente agua peptonada estéril. A 225 ml de agua peptonada se adicionó 25 g de muestra de queso de cabra.
- **Preparación de las diluciones:** La dilución fue en tubos de ensayo con agua Peptonada estéril como ya se explicó en el procedimiento b: Preparación de las diluciones decimales.
- **Preparación de Agar Cetrimida:** Se preparó agar Cetrimida en un matraz, con 45.3 g de este agar en un litro de agua desmineralizada, se llevó a autoclave a 121° C por 15 minutos.
- **Preparación de Inóculos para determinar el crecimiento *Pseudomonas*.**

1°: Se inoculó 1 ml de muestra madre y de las diluciones en las placas Petri estériles por duplicado. Se rellenó con el agar cetrimida y se homogenizó las placas haciendo movimientos no bruscos, posterior a ello se dejó que el agar se solidifique en 15 minutos aproximadamente y se cubrió de parafina.

2°: Se incubó a temperatura 37° C por 24-48 horas, y luego se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC7g).

d.5. *Coliformes totales.*

- **Método:** Método de Colorimetría para los recuentos de *Coliformes totales* (DIGESA 2001).
- **Preparación de la muestra madre:** Se utilizó en general como diluyente agua peptonada estéril. A 225 ml de agua peptonada se adicionó 25 g de muestra de queso de cabra.
- **Preparación de las diluciones:** La dilución fue en tubos de ensayo con agua peptonada estéril como ya se explicó en el procedimiento b. Preparación de las diluciones decimales.
- **Preparación de Caldo Lauril Sulfato:** Se preparó Caldo Lauril Sulfato en tubos de ensayo, con 35.6 g de este caldo en un litro de agua desmineralizada, se llevó a autoclave a 121° C por 15 minutos.
- **Preparación de Inóculos para determinar el crecimiento *Coliformes totales.***

1°: Se extrajo 1 ml de las diluciones de las aguas peptonadas estériles, y se inoculó en tubos de ensayo con 9 ml de caldo Lauril Sulfato estéril con campanas de Durham y se homogenizó los tubos de ensayo haciendo movimientos no bruscos.

2º: Se incubó a temperatura 37° C por 24-48 horas en baño María. Se determinó el Número más probable (NMP).

3º: Para la lectura de tubos positivos se hace en una tabla de NMP/100 ml.

4º: Para que un tubo sea positivo debe tener gas en las campanas de Durham y ser turbio, estas son las 2 condiciones del contrario será un tubo negativo.

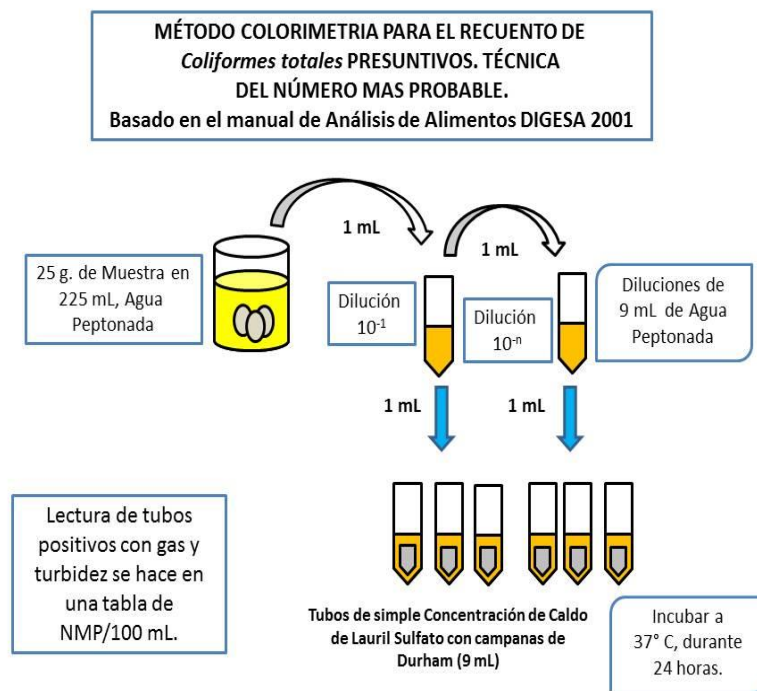


Figura 1 Método Horizontal para el recuento de *Coliformes totales*.

Referencia: DIGESA, 2001.

3.2.8. Análisis estadístico:

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% proponiendo las siguientes hipótesis:

H₀ = No existe efecto significativo de la concentración de nanopartículas de plata (Ag) en un bioempaquete a base de quitosano sobre la vida útil del queso de cabra (*Capra hircus*).

H_a = Existe efecto significativo de la concentración de nanopartículas de plata (Ag) en un bioempaquete a base de quitosano sobre la vida útil del queso de cabra (*Capra hircus*).

Se utilizó el diseño completamente al azar (DCA). Los factores de esta investigación son: Tratamientos de interés (combinaciones de quitosano, PVA con diferentes concentraciones de AgNPs), un tratamiento control (quitosano + PVA) y testigo (parafina). En total el experimento involucra 5 tratamientos.

Las unidades experimentales fueron quesos frescos a base de leche de cabra empaquetados con diferentes tratamientos. Se evaluó como variables fisicoquímicas: El porcentaje de pH, humedad y acidez titulable; y como variables microbiológicas: el recuento de unidades formadoras de colonias de aerobios mesófilos, *Pseudomonas*, *Salmonella sp*, hongos y levaduras; y número más probable de *Coliformes totales* durante los días 7, 14 y 21.

Al aplicar el análisis de varianza (ANOVA) y encontrar diferencias significativas, se procedió a realizar comparaciones de medias aplicando la prueba de Tukey con un grado de confianza de 95%. Los análisis fueron realizados en el programa estadístico infostat versión libre y Excel 2013 para Windows 8.1

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Peso promedio del espejo de plata (Ag).

El cuadro 4 muestra los resultados de los pesos promedio de plata (Ag) en las diversas concentraciones realizadas.

Cuadro 4: Peso promedio del espejo de plata.

Tratamientos	Promedio de peso	Desvió
PVA-QC1	0.00491 a	±0.000869
PVA-QC2	0.01060 b	±0.000430
PVA-QC3	0.01300 c	±0.000591

Fuente: Elaboración propia.

Estadísticamente, mediante ANOVA se determinó que el peso de la plata en forma de espejo dentro de los vasos de precipitación es un parámetro significativo ($p < 0.05$) y la prueba de Tukey indicó que todas las muestras son significativamente diferentes entre sí.

Se deduce que los bioempaques hechos a base de una solución mixta de PVA, Quitosano, AgNPs y agua destilada, cuyo volumen total fue 277.8 ml, contuvo 0.001 % p/v de AgNPs para el tratamiento 1 (PVA-QC1); 0.003 % p/v de AgNPs para el tratamiento 2 (PVA-QC2) y 0.004 % p/v de AgNPs para el tratamiento 3 (PVA-QC3), tal como se detalla en el cuadro 5.

Cuadro 5: Porcentaje de AgNPs en bioempaque.

Tratamientos	Porcentaje de AgNPs en bioempaque
PVA-QC1	0.001%
PVA-QC2	0.003%
PVA-QC3	0.004%

Fuente: Elaboración propia.

4.2. Caracterización de la solución coloidal de quitosano + AgNPs.

4.2.1. Apariencia de las soluciones coloidales.

La coloración de los sistemas coloidales obtenidos fue de color amarillo - café. Los sistemas coloidales además presentaron estabilidad parcial ya que después de varios días recién se pudo observar precipitados en el fondo de los vasos.

El aspecto físico de las soluciones permite suponer que efectivamente existió una reacción química de reducción como se da en el caso de los reportes de AgNO_3 empleado como precursor en la investigación de Izaguirre (2010) y por lo reportado por Dubey (2010), donde resulta un cambio de color de marrón-amarillo, y rosa-rojo, en el desarrollo de nanopartículas de plata y oro respectivamente, utilizando un solvente obtenido a partir de Rosa rugosa.

4.2.2 Espectrofotometría UV –Vis.

Los resultados obtenidos en el cuadro 6 muestran un espectro típico de absorción UV-vis obtenido para un sistema coloidal de quitosano más nanopartículas de plata. Los espectros analizados presentaron su máxima absorbancia UV-vis en un rango de longitud de onda de 390 – 405 nm en todos los experimentos (ver anexo 10).

Los valores reportados en esta investigación están comprendidos entre el valor de la banda de absorción máxima que obtuvo Escobar (2015) usando nitrato de plata como sal precursora y borohidruro de sodio como agente reductor, cuya banda de absorción máxima fue alcanzada a 394,2 nm.

Según Kadir, Lakowicz y Geddes (2005) los valores medios de absorbancia máxima obtenidos para la síntesis de nanopartículas

de plata se encuentran dentro del rango 350 – 450 nm. Es por ello que en esta investigación, la técnica de espectrofotometría UV-Vis permitió corroborar la presencia de nanopartículas de plata en las síntesis llevadas a cabo para cada tratamiento.

Cuadro 6: Pico de absorción máxima

Tratamiento	Pico de absorción máxima	Absorbancia
PVA – QC1	396 ±0.000	0.66286 ±0.697
PVA – QC2	397.5 ±2.121	0.63298 ±0.626
PVA – QC3	399 ±2.828	0.48106 ±0.338

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 2 se observa claramente la forma de los picos de absorción para cada tipo de síntesis, en este caso se observan picos simétricos y estrechos. Según Escobar (2015) cuando se presenta estos tipos de picos la distribución de tamaño de nanopartículas es uniforme, es decir, son mono dispersas.

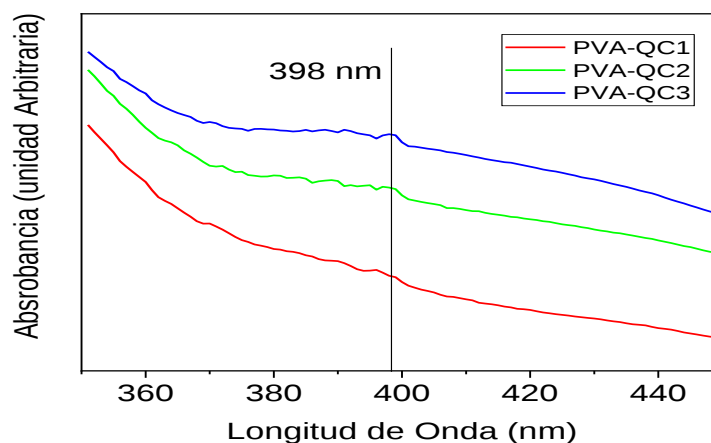


Figura 2 Espectro UV-Vis de nanopartículas de plata sintetizadas.

Estos datos también permiten determinar el tamaño de partícula basado en el valor del pico de absorción máxima, según el cuadro 7 reportado por Pradeep (2012).

Cuadro 7: Posición de los picos de absorción de AgNPs de diferente tamaño en el espectro UV-Vis.

Tamaño de partícula (nm)	Posición del pico (nm)
10 – 14	<400
35 – 50	430
60 – 80	438

Fuente: Pradeep 2012

En el cuadro 8 se muestra un resumen de los datos del análisis de las nanopartículas de plata por espectroscopia UV-Vis. Mediante el Tratamiento 1 (PVA - QC1), el Tratamiento 2 (PVA – QC2) y el Tratamiento 3 (PVA – QC3), el pico de absorción máxima promedio es 396, 397.5 y 399 nm respectivamente lo que corresponde a nanopartículas cuyo tamaño está en el rango de 10 a 14 nm. El tamaño real de las nanopartículas se puede comprobar con microscopía de barrido electrónico (SEM), sin embargo, según Escobar (2015) el análisis espectroscópico es una prueba preliminar para conocer la distribución y tamaño de las nanopartículas sintetizadas.

Cuadro 8: Resultados del análisis de AgNPs por espectroscopia UV-Vis y tamaño de partículas aproximados.

Métodos de síntesis	Posición del pico de absorción máxima (nm)	Tamaño aprox. De partículas (nm)
PVA - QC1	396	10- 14
PVA - QC2	397.5	10 - 14
PVA - QC3	399	10 - 14

Fuente: Elaboración propia.

4.3. Propiedades fisicoquímicas de los bioempaques (películas compuestas).

En el siguiente cuadro, se resume los resultados obtenidos del análisis de las propiedades fisicoquímicas de las películas compuestas. Estas películas contienen: 70% de quitosano con diferentes concentraciones de AgNPs, 20% de PVA y 10% de H₂O destilada.

Cuadro 9: Propiedades físicas de las películas compuestas

Película	%H	% Sol.	$\bar{e}$ (μm) PVA	WVP (g/hmMPa)
PVA - Q C1	15.95 $\pm$ 0.46 a	14.74 $\pm$ 0.83 b	0.021 a	0.001066774 a
PVA - Q C2	9.99 $\pm$ 0.40 b	21.59 $\pm$ 0.11 a	0.013 b	0.000669758 b
PVA - Q C3	9.61 $\pm$ 0.50 b	21.87 $\pm$ 0.43 a	0.012 b	0.000643928 b

Fuente: Elaboración propia.

“El contenido de humedad de un material se define como la cantidad de agua contenida por unidad de peso de sólido seco o húmedo” (Martines y Lira, 2010). En la figura 3, se observa el registro de valores de contenido de humedad más altos cuando la concentración de AgNPs es menor en las películas de quitosano – PVA. Se deduce que las películas a porcentajes menores de AgNPs permitirán que sus moléculas absorban o interactúen fácilmente con las moléculas de agua.

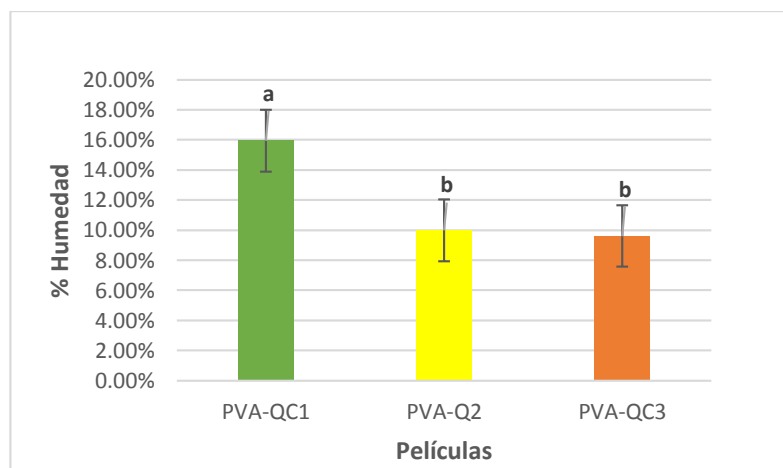


Figura 3 Comparación de porcentajes de humedad

Los resultados analizados en el ANOVA utilizando el diseño completamente al azar indicaron que existe un efecto significativo entre los bioempaques con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata respecto al contenido de humedad, ya que en este caso el valor de F calculada fue menor al del valor crítico para F. El P valor fue 0.03 ($p < 0.05$) aceptándose la hipótesis alterna con un 95% de confiabilidad.

La prueba Tukey indicó que la película PVA - QC1 es significativamente diferente a las películas PVA – QC2 y PVA – QC3 pero no existe diferencia significativa entre las películas PVA - QC2 y PVA - QC3.

Navarro (2016) registró valores similares a los de esta investigación obteniendo contenidos de humedad más altos cuando la concentración de almidón es menor en las películas quitosano-almidón. Puesto que, a mayor contenido de sólidos, menor será el contenido de agua. Otros resultados similares fueron los reportados por Sánchez, García y Pinzón (2012) quienes obtuvieron una mayor humedad en las películas con una concentración de 3% p/p con relación a las que contenían 4% p/p, estas películas contenían almidón de yuca, glicerol y quitosano.

Sin embargo, nuestros resultados difieren con los encontrados por Ibargüen, et al., (2015) quien elaboró películas comestibles a base de gel de *Aloe vera* y encontró que al agregar componentes que presentan una gran hidrofilia, la absorción de agua aumenta y por ende su contenido de humedad.

La figura 4 muestra el comportamiento de la solubilidad, la cual “involucra la penetración de las moléculas de agua en la matriz polimérica, esto es seguido por la disrupción de las fuerzas de Van de Walls entre las cadenas poliméricas” (Turhan y Sahbaz, 2004).

Estadísticamente la variable del uso de concentración de nanopartículas de plata en las películas es un parámetro significativo en la prueba de ANOVA, y mediante la prueba de Tukey se indicó que la película PVA -

QC1 es significativamente diferente a las películas PVA – QC2 y PVA – QC3 pero no existe diferencia significativa entre las películas PVA - QC2 y PVA - QC3.

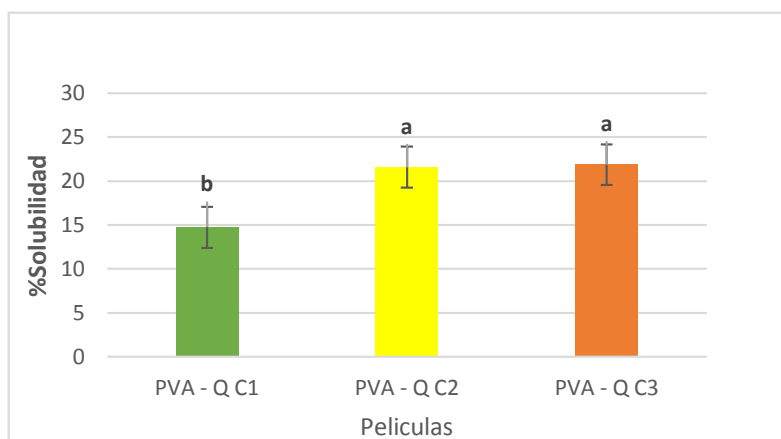


Figura 4 Comparación de porcentajes de solubilidad.

La solubilidad al ser un parámetro significativamente diferente en este trabajo, confirma lo encontrado por Morin (2010), el cual sustenta que los componentes de las películas están directamente relacionados con la solubilidad, haciendo referencia a la hidrofiliicidad o hidrofobicidad de su estructura. Con ello se deduce que, a mayor porcentaje de nanopartículas de plata, mayor será la solubilidad en agua.

Chudasama (2010) sintetizó nanopartículas de plata hidrofóbicas uniformes, las cuales se prepararon por reducción lenta y controlada de AgNO_3 usando oleilamina, sin embargo, posteriormente desarrolló un mecanismo de transferencia de fase fácil para producir nanopartículas de plata hidrofílicas usando pluronic F-127. El menciona que la naturaleza hidrofílica de nanopartículas es un criterio esencial para su aplicabilidad biológica.

La estabilidad de las películas hechas a base de quitosano, PVA y diferentes concentraciones de nanopartículas de plata se vio comprometida al aplicarlas sobre las muestras de queso, ya que fue difícil su retiro debido a que se fragmentaban y quedaban adheridas en él. Esto coincide con lo expresado por Ayquipa (2018), quien menciona que “una película con alto porcentaje de solubilidad se verá comprometida su estabilidad si se quiere

aplicar en alimentos más húmedos o si el ambiente donde se almacenará es de alta humedad relativa”. De forma similar Sothornvit (2000) expone que a mayor solubilidad menor será la resistencia al agua, lo cual hará que esta propiedad afecte la aplicación futura de los bioempaques, es por ello que se recomienda que una película aplicada a alimentos con alto contenido de humedad sea insoluble.

En la Figura 5, se muestran los resultados de los valores del espesor correspondiente a los tratamientos con las 3 formulaciones evaluadas en la presente tesis. Estos son el promedio de 10 mediciones hechas a cada película, donde se puede apreciar claramente que su espesor no fue uniforme, esto se puede corroborar con el análisis de varianza observando que el espesor es un parámetro significativamente diferente en esta prueba y en vista a las diferencias encontradas se realizó la comparación con ayuda de la prueba de Tukey en donde se indicó que la película PVA - QC1 es significativamente diferente a las películas PVA – QC2 y PVA – QC3 pero no existe diferencia significativa entre las películas PVA - QC2 y PVA - QC3.

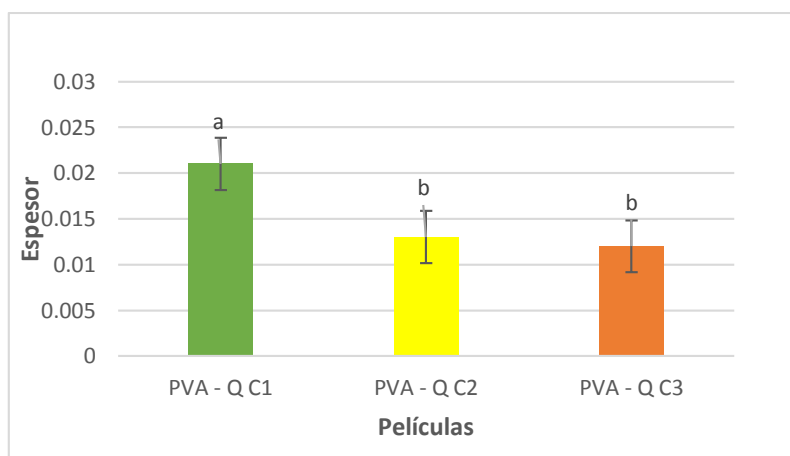


Figura 5 Espesor de las películas.

El espesor de las películas es un parámetro importante, ya que afecta directamente las propiedades biológicas y la vida útil del queso cubierto.

Las películas elaboradas en este trabajo de investigación mostraron que, a menor concentración de nanopartículas de plata, mayor es la humedad, al igual que el espesor, siendo directamente proporcionales. Morales (2011), menciona que “el efecto del espesor a cambios en la estructura del recubrimiento es ocasionados por el hinchamiento que provoca el agua en el polímero”.

Por otro lado Kroachta, Baldwin y Nisperos (1994) indican que “la eficacia del bioempaquet depende principalmente del control de la difusión de los componentes de la película, la cual se ve afectada por el espesor”. Es así como al aumentar el espesor del recubrimiento, se incrementa la resistencia a la transferencia de masa a través de ella, y por ende, también la presión parcial de vapor de agua de equilibrio en la superficie (Mchugh, Avena, Bustillos y Krochta, 1993).

La principal área de aplicación de las películas con nanopartículas de plata preparados en este trabajo es para la elaboración de bioempaques para conservar queso fresco hecho a base de leche de cabra; por lo tanto, los análisis de permeabilidad al vapor de agua resultan importantes a fin de evaluar las propiedades barreras de las películas. La Figura 6 muestra los datos obtenidos de las medidas de transmisión al vapor de agua de las películas con diferentes concentraciones de plata.

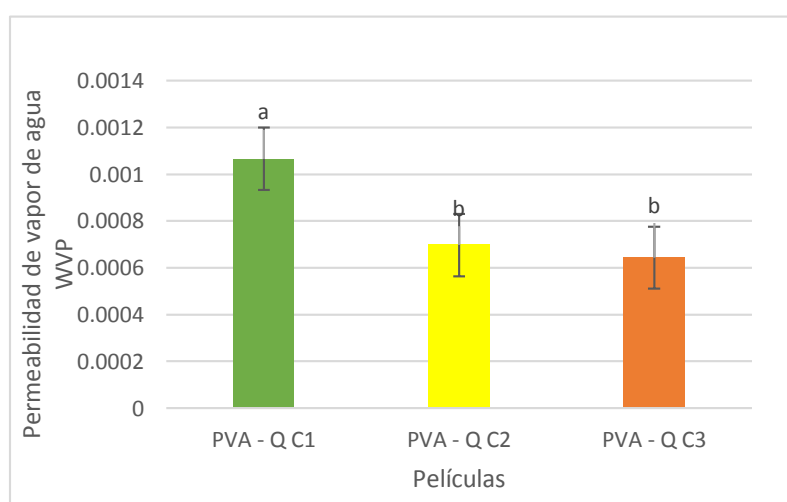


Figura 6 Permeabilidad al vapor de agua de las películas

En esta investigación a nivel estadístico la concentración de nanopartículas de plata en las películas tanto en el espesor como en la permeabilidad al vapor de agua, resultaron ser pruebas significativas, demostrando que a mayor espesor mayor es la permeabilidad al vapor de agua en la película, pudiendo concluir que ambos influyen uno del otro. Datos similares fueron los obtenidos por Gennadios, Weller y Gooding (1994) quienes han encontrado una relación dependiente positiva entre la permeabilidad al vapor de agua y al espesor de las películas.

Las películas que contienen menor concentración de AgNPs, presentan un valor mayor de espesor y de permeabilidad al vapor de agua como se puede observar en las figuras 6 y 7. Similares análisis declararon Navarro (2016), Bertan (2003) y Sobral, Menegalli, Hubinger, y Roques (2001), quienes en sus investigaciones comprobaron que el aumento de la permeabilidad va en función al aumento del espesor.

Tamayo (2012), en su investigación registró una reducción similar al incrementar la concentración de nanopartículas de plata resultando que, para los nanocompuestos de plata, los valores de permeabilidad disminuyen con el incremento de la cantidad de nanopartículas presentes. Así mismo Tamayo (2012), afirma que la disminución de la permeabilidad de los nanocompuestos de plata respecto al polietileno podría estar relacionado a la ubicación específica de las nanopartículas en las zonas amorfas del polímero o cavidades defectuosas, cuyo volumen es mayor que los sitios cristalinos del polímero. En este caso las nanopartículas actuarían como "relleno" en este tipo de intersticios, influyendo en la permeabilidad de las películas. Un nanocompuesto de estas características es ideal como material de envase para la conservación de frutas y verduras donde la permeabilidad de vapor de agua debe ser baja a fin de conservar la frescura y calidad sensorial de este tipo de alimentos.

4.4. Propiedades Estructurales de los bioempaques

4.4.1. Análisis de difracción de rayos X (DRX)

Con objeto de determinar la presencia de nanopartículas de plata en los bioempaques hechos a base de quitosano, se realizaron espectros de difracción de rayos-X. Los patrones de difracción característicos de quitosano y plata se muestran en la Figura N° 7.

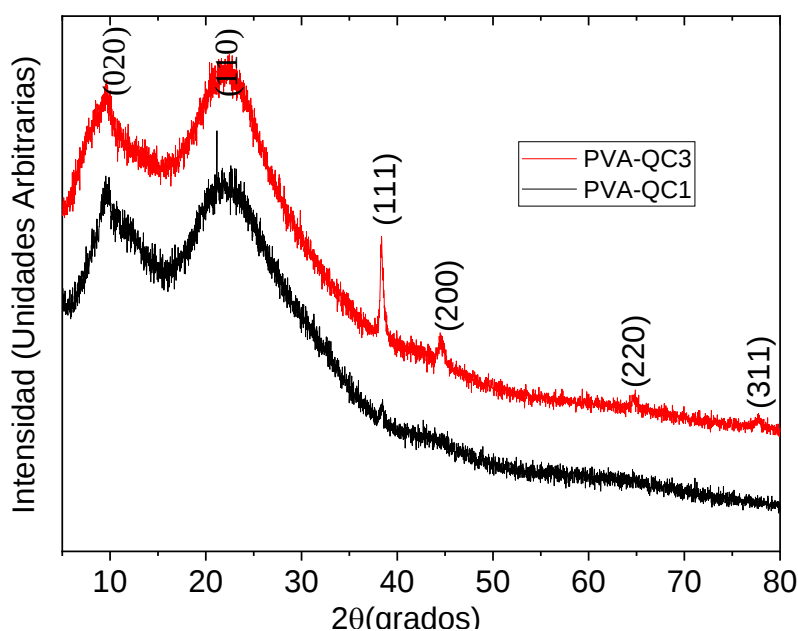


Figura 7 Espectro de difracción de rayos-X de nanopartículas de plata en las películas.

En los espectros de las películas PVA-QC1 y PVA-QC3, se observan seis señales características en ángulo 2θ de 10 °, 21°, 38,2 °, 44,2 °, 65 y 78 °, correspondientes a los planos (020), (110) para quitosano y (111), (200), (220) y (311) para nanopartículas de plata respectivamente. Además, se puede notar que el espectro se intensifica con el aumento del porcentaje en peso de las nanopartículas en los bioempaques.

Valores similares correspondientes a los planos de nanopartículas de plata los obtuvieron Kalaivani R., et al. (2018) en donde los números de reflexiones de Bragg con valores de 2θ de 38.53, 44.67, 65.08 y 78.06 correspondientes a (111), (200), (220) y (311) indicaron que

había presencia de AgNPs, y que estas eran de estructura esférica y de naturaleza cristalina. Otra investigación similar fue la realizada por Tamayo (2012) quien en su tesis doctoral confirma la presencia de polietileno y nanopartículas de plata en el nanocompósito observando en el espectro seis señales características en ángulo 2θ de $21,4^\circ$, $24,2^\circ$, $38,2^\circ$, $44,2^\circ$, $64,5^\circ$ y $77,4^\circ$, correspondientes a los planos (110), (200) para polietileno y (111), (200), (220) y (311) para nanopartículas de plata metálica, respectivamente.

Escobar et al. (2014) menciona que un biopolímero de quitosano semicristalino presenta dos picos característicos; para un pico principal a $2\theta = 19,5^\circ$ y un pico secundario en $2\theta = 10^\circ$, al igual que Parentena, Gonzales, Celiz, Valbuena y Colina (2015) quienes en los espectros distinguieron los picos en el plano de reflexión (020) en torno a 2θ entre $9,7^\circ$ y $9,8^\circ$ y en el plano de reflexión (110) en torno a 2θ entre $19,8^\circ$ y $20,5^\circ$.

4.5. Análisis realizados al queso de cabra envuelto en bioempaques hechos a base de quitosano y nanopartículas de plata.

Se realizó la determinación de las variables fisicoquímicas y microbiológicas del queso de cabra envuelto en bioempaques.

4.5.1. Análisis fisicoquímico del queso de cabra.

Para la caracterización fisicoquímica de las muestras de queso se determinó el pH, el porcentaje de humedad y la acidez titulable en función a los días de evaluación. Los valores son promedios de 2 réplicas $\pm$ la desviación estándar.

Cuadro 10: Parámetros fisicoquímicos en función a los días de evaluación del queso de cabra con los diferentes tratamientos

TRATAMIENTOS	DIAS	PH	%HUMEDAD	%ACIDEZ TITULABLE
PVA-QC0	0	7.18±0.26 b	48.71±0.29 c	0.095±0.07 a
	7	6.70±0.22 ab (*)	47.93±0.17 c	0.104±0.07 a
	14	6.67±0.02 ab (*)	44.60±3.05 bc(*)	0.108±0.14 a
	21	6.27±0.02 a	39.89±0.75 a	0.117±0.14 a
PVA-QC1	0	7.18±0.26 b	48.71±0.29 c	0.095 ±0.07 a
	7	6.75±0.27 ab (*)	46.45±2.13 c	0.104±0.07 a
	14	6.72±0.05 ab (*)	44.87±0.93 bc(*)	0.113±0.07 a
	21	6.37±0.02 a	41.97±1.25 ab (*)	0.117±0.14 a
PVA-QC2	0	7.18±0.26 b	48.71±0.29 c	0.095±0.07 a
	7	6.67±0.11 ab (*)	47.06±1.11 c	0.106±0.03 a
	14	6.51±0.02 ab (*)	47.00±1.19 c	0.113±0.07 a
	21	6.29±0.01 a	46.90±0.13 c	0.119±0.03 a
PVA-QC3	0	7.18±0.26 b	48.71±0.29 c	0.095±0.07 a
	7	6.79±0.29 ab (*)	48.16±0.26 c	0.104±0.07 a
	14	6.77±0.04 ab (*)	47.20±1.12 c	0.108±0.14 a
	21	6.32±0.12 a	47.18±0.30 c	0.113±0.07 a
TP	0	7.18±0.26 b	48.71±0.29 c	0.095±0.07 a
	7	6.53±0.01 ab (*)	46.77±0.55 c	0.113±0.07 a
	14	6.51±0.01 ab (*)	45.54±1.31 bc(*)	0.117±0.14 a
	21	6.09±0.00 a	44.93±0.80 bc(*)	0.122±0.07 a

Fuente: Elaboración propia.

(*) Promedios unidos por letras minúsculas iguales, en sentido vertical indican diferencias estadísticamente no significativas entre los tratamientos según la prueba de Tukey (p -valor $\geq 0,05$).

a. Determinación de pH

El comportamiento del pH de los quesos de cabra almacenados a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en función al tiempo se muestra en la figura 8. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en el tipo de tratamiento aplicado, ni en la interacción de este con el tiempo de almacenamiento.

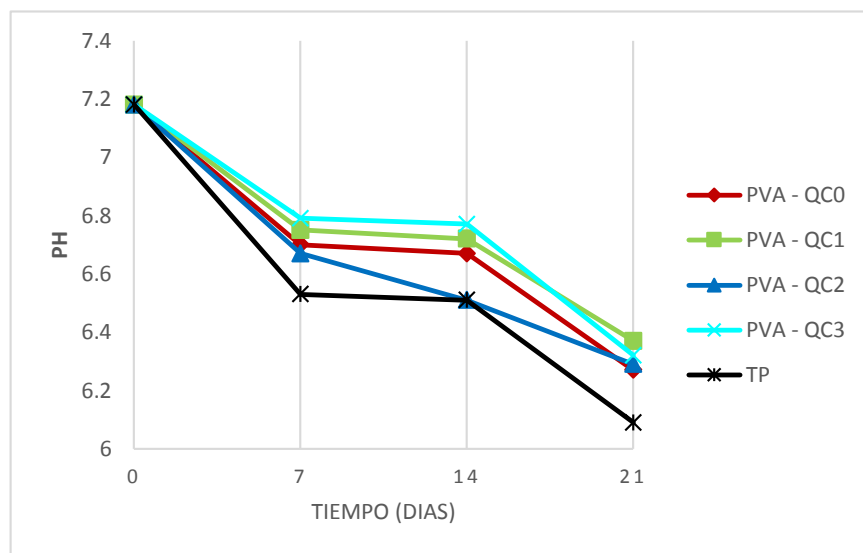


Figura 8 Comparación del porcentaje de pH en función a los días de evaluación del queso de cabra con los diferentes tratamientos.

En la figura 8 se observa que el pH descendió con el tiempo, lo cual según Lurueña-Martínez (2010) puede ser explicado por “el aumento de la concentración de ácido láctico, como resultado de la fermentación de lactosa por la acción de bacterias ácido lácticas”.

En el día 0 se obtuvo un valor medio de pH de 7,18 para los 5 tratamientos, y para el día 21 los valores medios de pH fueron PVA-QC0 = 6.27; PVA-QC1 = 6.37; PVA-QC2 = 6.29; PVA-QC3 = 6.32 y para TP = 6.09, siendo el descenso más pronunciado para el TP, seguido por el PVA-QC0. Dichos resultados se encuentran ligeramente por debajo del valor pH medio de 6,75 determinado para quesos frescos de leche de cabra (Martín, 1988). No obstante, Garrido (2014) expuso valores que oscilaron en un intervalo de 4,52 hasta 6,55 en quesos de leche de cabras criadas en la región de Piura. Esta diferencia puede ser atribuida a la raza del animal y tipo de alimentación.

b. Determinación de la Humedad

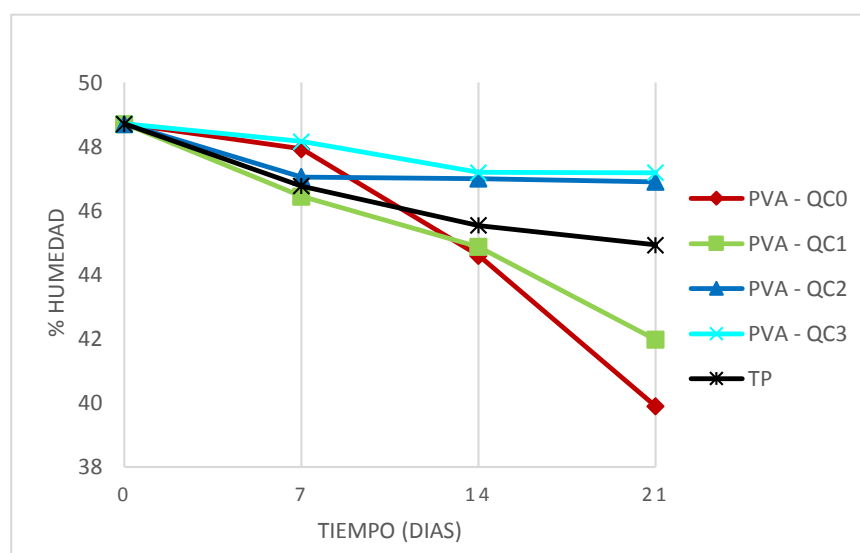


Figura 9 Comparación del porcentaje de humedad en función a los días de evaluación del queso de cabra con los diferentes tratamientos.

El contenido de humedad en los quesos almacenados a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ se presenta en la figura 9. Estadísticamente el tiempo y el tipo de bioempaque por separados influyen significativamente ($p < 0,05$) en la humedad del queso. Así mismo la interacción de ambos en combinaciones también muestra resultados u efectos que influyen en el experimento. La prueba de Tukey indicó que todas las medias en función de los días de almacenamiento fueron diferentes, mientras que en función al tipo de empaque el PVA-QC0 es significativamente diferentes a PVA-QC2 y PVA-QC3, pero no con PVA-QC1 y TP.

Para el día 7 todos los tratamientos conformaron un grupo homogéneo significativo; el día 14 el tratamiento PVA-QC1 no tuvo diferencias significativas PVA-QC0, el TP, pero si con PVA-QC2 y PVA-QC3. Para el día 21, PVA-QC0 no fue significativamente diferente con PVA-QC1 pero si con PVA-QC2 y PVA-QC3, y a su vez PVA-QC1 no fue significativamente con TP.

El queso comenzó con la humedad de 48.71 % para todas las muestras, en el día 7 el queso con menor contenido de humedad fue para tratamiento PVA-QC1 con 46.44%, sin embargo el día 14 y 21, los quesos envueltos con el bioempaque PVA - QC0 obtuvieron los menores porcentajes de humedad, 44.60% y 39.89% respectivamente. En el día 21 se observó una disminución en los valores de todos los tratamientos, no obstante, los que perdieron menos humedad fueron los quesos envueltos con los bioempaques PVA - QC2 y PVA - QC3.

Según INDECOPI (2004). Los quesos frescos deben presentar una humedad mayor al 46% Siendo solo los tratamientos PVA - QC2 y PVA - QC3 los que mantuvieron este parámetro hasta el día 21.

c. Determinación de la acidez

El comportamiento de la acidez (% ácido láctico) en el tiempo se presenta en la figura 10.

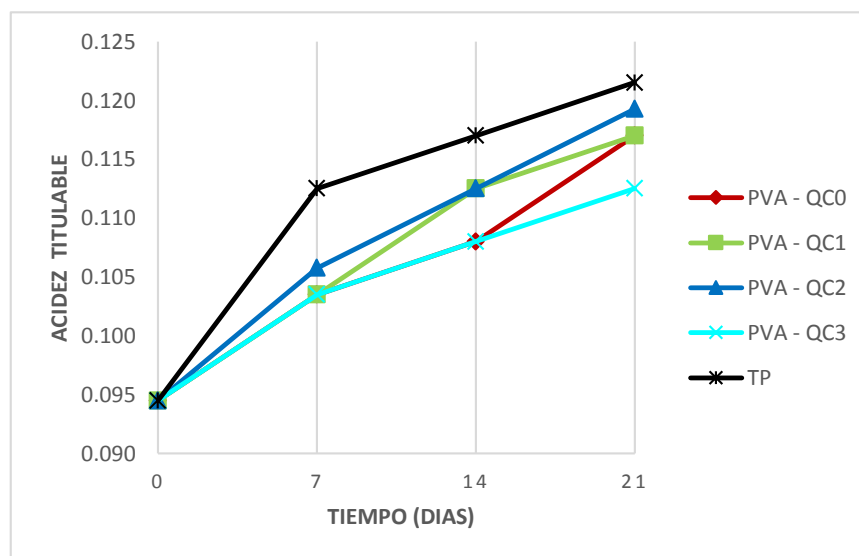


Figura 10 Comparación del porcentaje de acidez titulable en función a los días de evaluación del queso de cabra con los diferentes tratamientos

Estadísticamente no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en el tipo de tratamiento aplicado, ni en la interacción de este con el tiempo de almacenamiento.

En cuestión al tiempo, solo para el día 14 no existió diferencia estadísticamente significativa, lo contrario ocurrió los días 7 y 21, en el cual los 5 tratamientos fueron diferentes entre sí. El aumento de la acidez fue directamente proporcional al tiempo, mayor para el TP y menor para el PVA-QC3.

Mago (2015) menciona que, al elevarse la acidez disminuye el pH, y así mismo otras características como la cohesividad, ya que la elevada acidez (menor pH) debilita los enlaces de la proteína, debido a que las cargas negativas en las moléculas de caseína se incrementan con el aumento de la acidez y la disminución del pH.

El valor medio de acidez titulable para el día 0 fue de 0,095 % para todos los tratamientos, y para el día 21 los valores medios fueron PVA-QC0 = 0.117; PVA-QC1 = 0.117; PVA-QC2 = 0.119; PVA-QC3 = 0.113 y para TP = 0.122. Los resultados de PVA-QC2 y PVA-QC3 coinciden con los que obtuvieron Duran, Sánchez, Palmero, Chaparro y Sánchez (2010) cuyos valores de acidez titulable en quesos de leche de cabra oscilaron entre 0,19 y 0,28.

4.5.2. Análisis microbiológico del queso

En el cuadro 11 se muestran los resultados de las pruebas microbiológicas efectuadas en el queso hecho a base de leche de cabra aplicando los diferentes tratamientos. Es preciso mencionar que en el siguiente cuadro se muestra el promedio de 2 repeticiones hechas por cada tratamiento en los diferentes días de muestreo. Los datos obtenidos como UFC/g o UFC/ml siguen una distribución

asimétrica, por lo que es necesaria una normalización previa a fin de realizar el tratamiento estadístico pertinente. Para ello se transformaron los datos UFC/g a logaritmo en base 10, ($\log_{10}$ UFC/g).

Los resultados fueron contrastados con estándares de las Normas Técnicas Peruanas, otras normas y diversos estudios. Los ensayos microbiológicos realizados fueron: Recuento de unidades formadoras de colonias de aerobios mesófilos, *Pseudomonas*, *Salmonella sp*, hongos y levaduras; y número más probable de *coliformes totales*.

Cuadro 11: Recuento microbiológico para cada parámetro microbiológico.

TRATAMIENTOS	DIAS	Hongos y levaduras(Log UFC/g)	Mesófilos viables (Log UFC/g)	Pseudomonas (Log UFC/g)	Salmonella sp (Log UFC/g)	Coliformes totales NMP/g
PVA-QC0	0	4.19±0.57 f	4.00±0.34 h	2.81±0.57 ghi	Ausencia	<3
	7	4.92±0.02 ef	4.81±0.15 efg	3.37±0.57 fghi	Ausencia	<3
	14	5.88±0.05 bcd	5.77±0.05 cd	4.34±0.50 cdef	Ausencia	<3
	21	6.88±0.02 a	6.88±0.07 ab	5.31±0.57 ab	Ausencia	<3
PVA-QC1	0	4.19±0.57 f	4.00±0.34 h	2.80±0.57 ghi	Ausencia	<3
	7	4.88±0.07 ef	4.84±0.16 efg	2.76±0.7 hi	Ausencia	<3
	14	5.77±0.08 bcde	5.93±0.02 cd	3.85±0.08 cdef	Ausencia	<3
	21	6.81±0.03 a	6.79±0.08 ab	4.81±0.15 abc	Ausencia	<3
PVA-QC2	0	4.19±0.57 f	4.00±0.34 h	2.80±0.57 ghi	Ausencia	<3
	7	4.58±0.24 f	4.73±0.10 fg	2.73±0.10 hi	Ausencia	<3
	14	5.65±0.05 cde	5.76±0.07 cd	3.81±0.08 def	Ausencia	<3
	21	6.65±0.05 ab	6.79±0.16 ab	4.68±0.16 abcd	Ausencia	<3
PVA-QC3	0	4.19±0.57 f	4.00±0.34 h	2.80±0.57 ghi	Ausencia	<3
	7	4.44±0.36 f	4.43±0.08 gh	2.56±0.10 i	Ausencia	<3
	14	5.53±0.07 de	5.46±0.12 de	3.73±0.10 defg	Ausencia	<3
	21	6.53±0.07 abc	6.40±0.31 bc	4.52±0.17 bcde	Ausencia	<3
TP	0	4.19±0.57 f	4.00±0.34 h	2.80±0.57 ghi	Ausencia	<3
	7	5.52±0.57 de	5.37±0.43 def	3.69±0.10 efg	Ausencia	<3
	14	6.19±0.32 abcd	6.25±0.51 bc	4.63±0.04 bcde	Ausencia	<3
	21	6.97±0.02 a	7.13±0.30 a	5.64±0.13 a	Ausencia	<3

Fuente: Elaboración propia.

a. Mesófilos viables

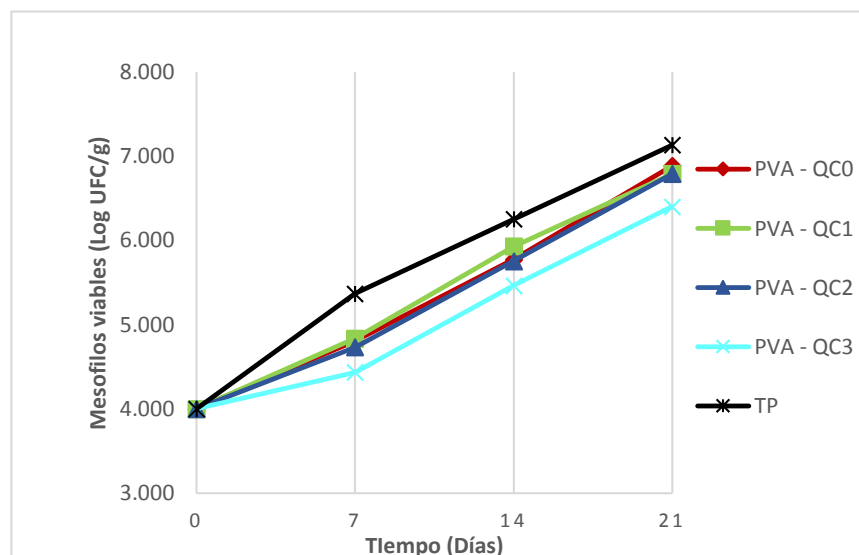


Figura 11 Comparación de recuento de mesófilos viables en función a la aplicación diferentes tratamientos y los días de evaluación del queso de cabra.

El recuento de colonias aerobias mesófilas expuesto en el cuadro 11, y graficada en la figura 11, muestra que el queso de cabra, durante el primer día de evaluación presentó en promedio una carga bacteriana inicial de 1.25×10^4 UFC/g, siendo este valor inferior al límite máximo establecido por ICMSF (2006) que es 10^5 UFC/g. Dicha carga se mantuvo inferior al límite para todos los tratamientos hasta el día 7, mientras que en el día 14 solo el tratamiento TP superó el límite; posterior a ello, durante el siguiente día de evaluación todas las muestras fueron mayores a 10^5 UFC/g.

El análisis de varianza demostró que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en el tipo de tratamiento aplicado, el tiempo y en la interacción de ambos. La prueba de Tukey indicó que todas las medias en función de los días de almacenamiento fueron diferentes; mientras que en función al tipo de tratamiento, TP fue significativamente diferente al resto de tratamientos,

PVA-QC1 fue diferente a PVA-QC3, pero no a PVA-QC0 y PVA-QC2. Mientras que entre PVA-QC2 y PVA-QC3 no fueron diferentes entre sí.

En general, se obtuvo menor cantidad de mesófilos viables con la aplicación del bioempaquet PVA-QC3, y mayor cantidad con el tratamiento TP.

Peláez (1985) menciona que recuentos altos de aerobios mesófilos puede deberse a la contaminación excesiva de la leche, una mala pasteurización o una recontaminación después del proceso térmico. Sin embargo, en alimentos perecibles que fueron correctamente manipulados durante su producción, se puede llegar a encontrar elevados recuentos de mesófilos viables si estos son almacenados por un prolongado período de tiempo, en estos casos se deduce que el recuento no se encuentra elevado por los procedimientos de higiene del producto, sino por su vida útil (ANMAT, 2004).

b. Hongos y levaduras

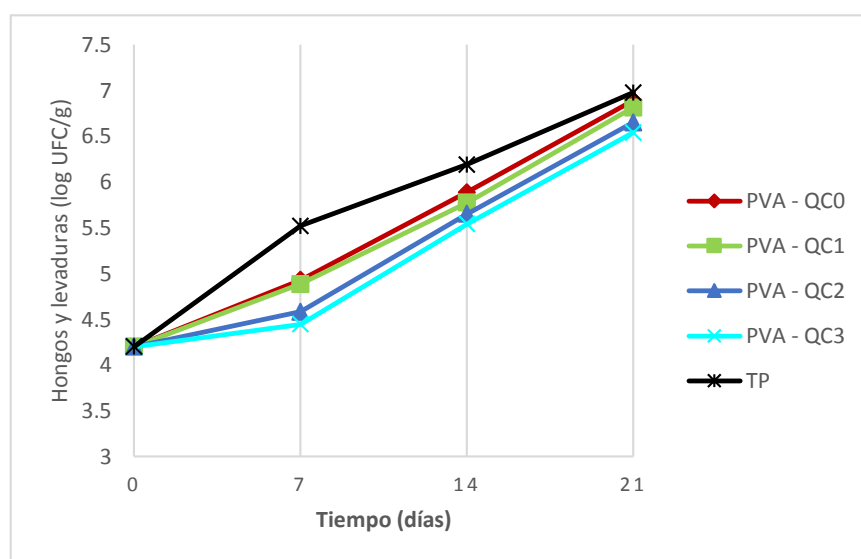


Figura 12 Comparación de recuento de hongos y levaduras en función a la aplicación diferentes tratamientos y los días de evaluación del queso de cabra.

En el cuadro 11, y la figura 12 se muestran los niveles promedio de hongos y levaduras expresado en Log UFC/g. El promedio inicial de la muestra de estudio fue de 4.19 Log UFC/g, siendo este valor superior al límite máximo para queso fresco establecido por la norma NOM-121-SSA1-1994 que es de 2.7 Log UFC/g. Después de ello todas las muestras de queso incrementaron la cantidad de hongos y levaduras.

Según Medina, et al. (2014) aluden que la contaminación de los productos lácteos, especialmente en quesos es causada por mohos y levaduras presentes en el entorno de las fábricas de queso, al igual que las paredes, el aire, equipos, agua, leche, salmuera, entre otros.

A pesar de que en la normativa peruana no se encuentren plasmados los límites máximos para hongos y levaduras, su evaluación es importante, debido a que algunas especies de levaduras y hongos pueden acarrear problemas sensoriales en los quesos y la posible generación de micotoxinas; pudiendo convertirse en pérdidas económicas y un riesgo para la salud pública (Carrero y López, 2012).

Los resultados analizados en el ANOVA indicaron que existe un efecto significativo ($p < 0.05$) en el tipo de empaque utilizado, el tiempo y la interacción entre ambos. La prueba Tukey indicó que la película TP es significativamente diferente a las películas PVA – QC2 y PVA – QC3, sin embargo no existe diferencia significativa entre las películas PVA – QC0 y PVA – QC1. Mientras que PVA – QC0 no es significativamente diferente ($p > 0.05$) con PVA – QC1, PVA - QC2 y PVA - QC3.

Todas las medias en función al tiempo resultaron ser significativamente diferente; mientras que para cada día de estudio el mejor tratamiento fue el PVA – QC3, mientras con el TP se obtuvo un mayor incremento de hongos y levaduras.

Villamizar y Monroy (2015) en su investigación, almacenó frutas previamente desinfectadas, a temperatura de refrigeración y envueltas con bolsas de polietileno modificadas con una solución de AgNPs; logrando inhibir de 3 a 4 unidades logarítmicas de microorganismos, ejerciendo mayor efecto microbicida sobre levaduras y mohos, seguido de bacterias Gram Negativas y último lugar, las bacterias Gram Positivas.

c. Pseudomonas

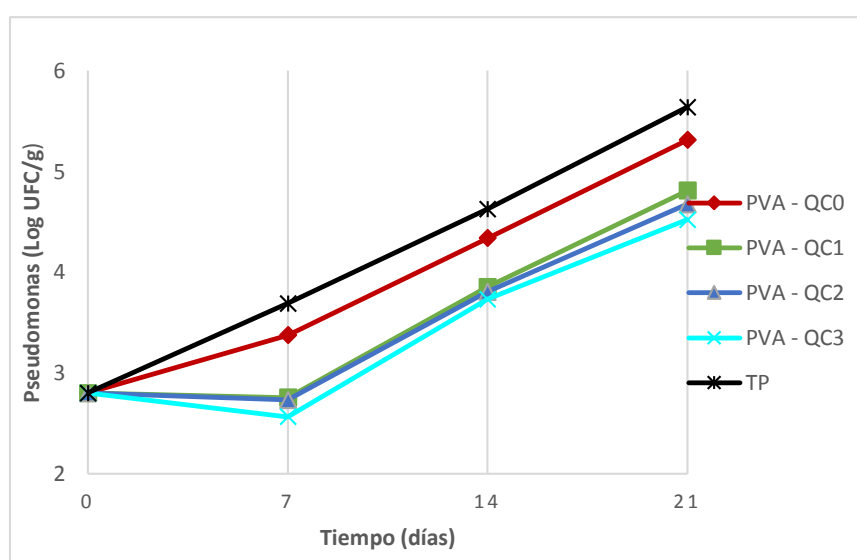


Figura 13 Comparación de recuento de pseudomonas en función a la aplicación diferentes tratamientos y los días de evaluación del queso de cabra.

Los resultados analizados en el ANOVA indicaron que existe un efecto significativo ($p < 0.05$) en el tipo de empaque utilizado, el tiempo y la interacción entre ambos. La prueba Tukey utilizada para observar la diferencia entre los empaques, indicó que la película TP no fue significativamente diferente con PVA-QC0, sin embargo estos dos son significativamente diferente a las películas PVA – QC1, PVA – QC2 y PVA – QC3.

En función al tiempo el test de Tukey indicó que el día inicial de evaluación y el día 7 no son significativamente diferentes entre sí, sin embargo, sí lo son con los días 14 y 21.

A pesar de no haber diferencia significativa entre el día inicial de evaluación y el día 7, cabe recalcar que los valores promedio de PVA – QC1 (2.76 Log UFC/g), PVA – QC2 (2.73 Log UFC/g), y PVA – QC3 (2.56± Log UFC/g), disminuyeron en función a la prueba inicial cuyo valor fue 2.81 Log UFC/g. De lo cual se puede indicar que la aplicación de nanopartículas de plata en el bioempaquetado reduce el recuento de *Pseudomonas* durante los primeros días de almacenamiento a temperatura de 4°C

Sin embargo, durante el resto de días se observó un crecimiento en función del tiempo, pero aun así el tratamiento PVA-QC3, fue quien mantuvo la mayor diferencia en retrasar el crecimiento de *Pseudomonas* en comparación a los diferentes tratamientos.

Por otro lado, los quesos frescos a base de leche de cabra que tuvieron cantidades mayores a 4.81 Log UFC/g en el día 21, especialmente en el tratamiento control (PVA-QC0), el tratamiento con parafina (TP) y el tratamiento (PVA-QC1), presentaron cambios en sus cualidades organolépticas, como se puede observar en la figura 14 y 15. Estos datos concuerdan con la investigación de Gonzales et al. (2007) quienes señalan que, la vida útil de producto disminuye al aumentar los recuentos de bacterias psicotrofas; y que en el caso de los productos lácteos se presentan más cambios de características sensoriales al presentar recuentos microbianos de *Pseudomonas* mayores a 7×10^4 UFC/g equivalente a 4.84 Log UFC/g.

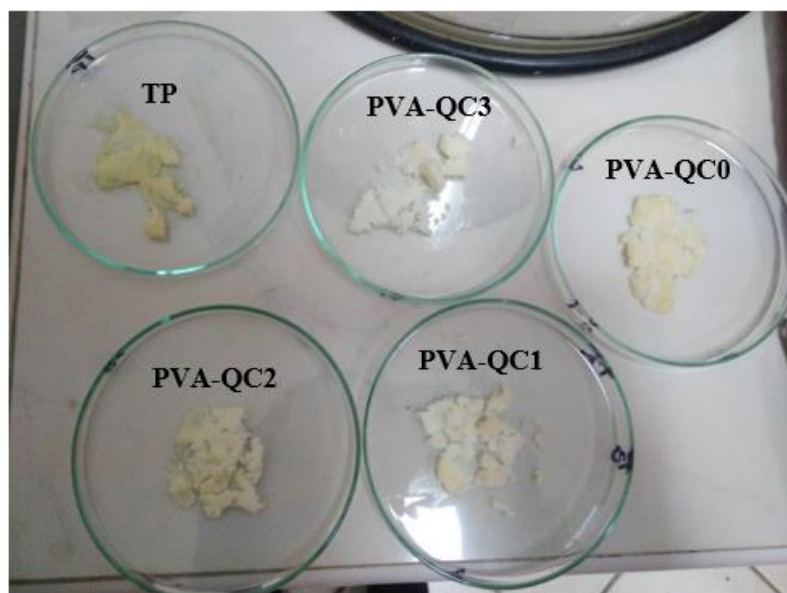


Figura 14 Características físicas visuales del queso de cabra con diferentes tratamientos en el día 21 de evaluación.

Otro resultado similar fue los obtenidos por (Burbano, 2018) quien preparó quesos utilizando la combinación de diferentes cantidades de nisina y EDTA contra la proliferación de bacterias del género *Pseudomona*, cuyo tratamiento control y tratamiento 1 (Nisina 25 mg + EDTA 75mg/l) presentaron cambios en las cualidades organolépticas al obtener cantidades por encima de 4,83 Log UFC/g durante el día 12 de evaluación.

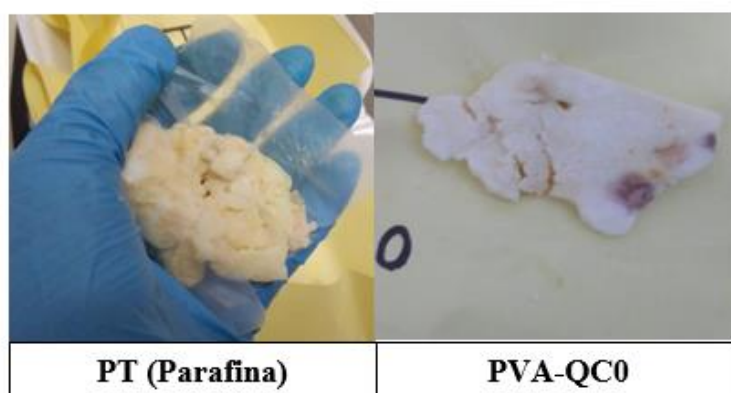


Figura 15 Características visuales del queso fresco almacenado con el tratamiento patrón y testigo en el día 21.

En la figura 15, se observa que los quesos presentaron daños, como por ejemplo formación de mucosidad, consistencia blanda, aparición

de coloración amarillenta fosforescente y pigmentaciones marrones y negras en quesos con tratamiento PT (Parafina) y PVA-QC0 en el día 21 de evaluación, indicando a simple vista la presencia de *Pseudomonas*. Resultados similares obtuvieron Gonzales, López, Nova y Restrepo (2007), encontrando defectos en la apariencia y textura de quesos producidos por *Pseudomonas fluorescens*.

d. *Salmonella sp*

Los resultados de las muestras procesadas para esta investigación no manifiestan presencia de *Salmonella sp*, indicando que está dentro del rango establecido por la NTP 202.087 (ausencia/ 25g de *Salmonella sp.*), por lo que este producto está libre de estos patógenos.

Aunque en esta evaluación realizada al queso hecho a base de leche de cabra no se detectó presencia de *Salmonella sp* en el análisis inicial ni a los posteriores, fueron (Asmat y Asmat, 2019) quienes evidenciaron que al aumentar el volumen de solución de NPsAg en sus placas de estudio se produce mayor inhibición del crecimiento de *Salmonella typhi*, esto debido a consideraciones importantes como el mecanismo de acción que es propio de la NP y la formación de un gradiente de concentración, el mismo que permite que la NP difunda desde el cilindro en que se encuentra hasta el medio que lo rodea (bacterias en crecimiento).

Flores (2017), mediante una concentración de 25.8 mg/L de AgNPs sintetizadas obtuvo una inhibición del crecimiento bacteriano hasta el 90% para *E. coli*, 65 % para *Salmonella* y 63 % para *S. aureus*; mientras que con una concentración de 7.93 mg/L de AgNPs comerciales inhibió el 91 % en *Salmonella* y el 100% del crecimiento de *E. coli* y *S.aureus*.

e. Coliformes totales

La NTP 202.087 con respecto a *Coliformes* establece como límite máximo permisible en queso fresco la cantidad de 10^3 UFC/g. En esta investigación los resultados de las muestras iniciales de queso de cabra indican que se encuentran exentos de contaminación, con valores negativos en todos los tubos de ensayo, obteniendo $<3\text{NMP/g}$ en la tabla para cálculo de NMP.

Resultados similares fueron los obtenidos por Romero (2015) quien después de realizar un estudio a todo el proceso productivo, y posteriormente realizar el acompañamiento con un profesional en alimentos y capacitar a los trabajadores obtuvo: coliformes fecales (3NMP/g), ausencia de *Salmonella* y ausencia de *Listeria monocytogenes*. Por lo tanto se deduce que los quesos que se utilizaron en esta investigación fueron procesados y manipulados de forma apropiada.

Esto difiere de los resultados obtenidos por Rodríguez (2019), quien obtuvo un promedio de $69,39 \times 10^3$ NMP/g en quesos comercializados en el distrito de Conchaque, provincia de Huancabamba, región de Piura; siendo este resultado muy superior respecto a lo establecido en la normativa peruana. Cabe mencionar que malas condiciones higiénicas durante la elaboración o manipulación generan resultados positivos de *Coliformes totales*, *Coliformes termotolerantes* y *E.coli* en leche y subproductos (Vásquez et al. 2018).

Al tener resultados negativos para *Coliformes totales*, fue lo mismo para *Coliformes termotolerantes*, por lo cual no se pudo evidenciar el efecto que tiene las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata sobre estos. Sin embargo, Ramírez (2017) obtuvo una reducción de coliformes totales en aguas residuales del 99.99% utilizando 1.852 g de AgNPs con un diámetro promedio de 257nm.

V. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar nanopartículas de plata mediante la combinación del método de Tollens, y el método sonoquímico. El método utilizado para síntesis es relativamente sencillo en contraste de otros en la literatura revisada, asimismo el tiempo de proceso fue breve, lo que permite que se convierta en un método rápido y práctico.

Los espectros UV-vis analizados presentaron su máxima absorbancia UV-vis en un rango de longitud de onda de 390 – 405 nm en todos los experimentos, demostrándose la existencia de nanopartículas de plata. Mientras que con DRX se observan en los espectros seis señales características en ángulo 2θ de 10° , 21° , $38,2^\circ$, $44,2^\circ$, 65° y 78° , correspondientes a los planos (020), (110) para quitosano y (111), (200), (220) y (311) para nanopartículas de plata respectivamente. Además se notó que el espectro se intensifica con el aumento del porcentaje en peso de las nanopartículas, en los bioempaques.

Se elaboraron bioempaques a base de quitosano, PVA y diferentes concentraciones de AgNPs; de los cuales se obtuvieron contenidos de humedad más elevados cuando la concentración de AgNPs es menor, es decir, que a mayor contenido de sólidos, menor será el contenido de agua. En cuanto al porcentaje de solubilidad, este aumentó al incrementar el contenido de AgNPs, por lo tanto el porcentaje de AgNPs en las películas influye en su capacidad de disolverse en agua. Respecto al espesor y la permeabilidad al vapor, estos disminuyeron al aumentar la cantidad de AgNPs creándose una influencia directa; es decir, que ambos influyen uno del otro.

La humedad del queso fresco a base de leche de cabra, es un índice importante de vida útil y calidad del alimento, siendo los tratamientos con mayor porcentaje de nanopartículas (PVA-QC2 y PVA-QC3), quienes

mantuvieron humedad mayor a 46%, tal y como lo estipula la Norma Técnica Peruana. En cuanto al % de acidez titulable y pH se mostraron inversamente proporcionales entre si y no presentaron diferencias significativas con respecto al efecto de nanopartículas de plata en el bioempaque.

Los resultados en cuanto a la inhibición del crecimiento de microorganismos como *mesófilos viables*, *pseudomonas*, mohos y levaduras muestran que las nanopartículas de plata presentaron un efecto antibacteriano y antifúngico importante, y que a mayor cantidad de AgNPs contenidas en el bioempaque mayor es la inhibición. Este efecto se vio coadyuvado por el proceso de desinfección con rayos ultravioleta aplicado a la materia prima antes de ser empaquetado y la aplicación de bajas temperaturas.

Los ensayos en queso a base de leche de cabra envueltos en bioempaques PVA-QC3 permitieron determinar que las AgNPs ejercen un efecto inhibitorio de 1 a 2 unidades logarítmicas en comparación a la muestra patrón usando parafina (tratamiento 5). Sin embargo, conforme transcurren los días, los microorganismos siguen creciendo a pesar de que las nanopartículas de plata y el quitosano seguían presentes.

VI. RECOMENDACIONES.

Para tener un mejor control en el tamaño y cantidad de nanopartículas de plata es necesario establecer condiciones que involucren la optimización de parámetros como: Temperatura, una adecuada relación entre el agente reductor y agente precursor, y tiempo de reacción.

El análisis espectroscópico es una prueba preliminar para conocer la distribución y tamaño de las nanopartículas sintetizadas, sin embargo el tamaño real de las nanopartículas se puede comprobar con microscopía de barrido electrónico (SEM).

Se recomienda utilizar concentraciones mayores a las usadas en el presente trabajo, ya que el efecto antibacteriano o antifúngico aumenta al incrementar la concentración de nanopartículas de plata.

En esta investigación no se pudo determinar la capacidad inhibidora de los bioempaques con AgNPs respecto a *Salmonella sp.* y *E. coli*, ya que la muestra inicial resultó libre de dichos microorganismos. Por lo cual resultaría más enriquecedora la compra de quesos en mercados de abastos o centros de producción que no cumplan con los principios generales de higiene, ya que de esta forma se podrá evaluar la inhibición de estos microorganismos y más.

Una variable microbiológica de gran importancia en la determinación de vida útil del queso hecho a base de leche de cabra es el recuento de *Staphylococcus aureus*, el cual no pudo ser realizado en esta investigación por falta de reactivos. Por ende se recomienda realizarlo en posteriores investigaciones.

La potencial toxicidad de las AgNPs tanto en humanos como en otros seres vivos amerita realizar investigaciones nuevas y más complejas que permitan encarar una evaluación riesgo/beneficio de los productos que se

fabrican con AgNPs. Si bien la utilización de dichos productos continúa en aumento, persisten aún varias interrogantes en este campo. Por lo cual es necesario realizar modificaciones a los bioempaques de forma más tecnificada con la finalidad de evitar la posible migración de nanopartículas que se pudo haber dado en los quesos almacenados. Así mismo, es necesario realizar los estudios sobre la migración de las AgNPs a los alimentos y su toxicidad.

La solubilidad cumplió un papel muy importante en la estabilidad del bioempaque por lo cual será necesario realizar cambios en su formulación si se desea aplicar en alimentos con un elevado porcentaje de humedad.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, M. (2009) Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides* (Trabajo de grado) Instituto Politécnico Nacional, México.
- American Society for Testing and Materials (ASTM, 2018). E 2456-06 Terminology for Nanotechnology. ASTM International, West Conshohocken, USA. <https://www.astm.org/Standards/E2456.htm>
- ANMAT. (2004). Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos. Instituto Nacional de Alimentos. Comisión Nacional de Alimentos – CONAL. Argentina.
- Asmat, E; Asmat. S. (2019) Efecto de las nanopartículas de plata sobre *Salmonella typhi* y *Streptococcus pyogenes* in vitro. (Trabajo de grado) Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- AYQUIPA, E., 2018 Caracterización física de películas comestibles obtenidas de mucílago de cáscara de Tuna (*Opuntia* spp) y almidón de cáscara de papa (*Solanum tuberosum*). Tesis de grado. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Abancay, Perú.
- Bardales, Y. (2019). Determinación del periodo de vida útil en queso crema elaborado a partir de leche de cabra por el método de pruebas aceleradas (Trabajo de grado) Universidad Nacional de Piura, Piura, Perú.
- Barrientos, E. (2015). Calidad higiénico - sanitaria del Queso fresco comercializado en La provincia del Callao – cercado durante el periodo otoño e Invierno del 2014 (Trabajo de grado) Universidad Nacional del Callao, Callao, Perú.
- Bayona, M. (2012). Prevalencia de salmonella y enteroparásitos en alimentos y manipuladores de alimentos de ventas ambulantes y restaurantes en un sector del norte de Bogotá, Colombia. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 15(2), 267-274. Retrieved July 29, 2020, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000200003&lng=en&tlng=.
- Bertan, L.C.; 2003. Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco. Dissertação

(Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Bonilla, J.; E. Fortunati, L. y Atarés, A (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol–chitosan biodegradable films. Food Hydrocoll, (35).
- Burbano,P. (2018). Desarrollo de una metodología que evite la proliferación de bacterias del genero pseudomonas en queso fresco. (Trabajo de grado). Ecuador. Recuperado de: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8997/1/UDLA-EC-TIAG-2018-08.pdf>
- Cardoso, P. (2016) Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. Rev. Hosp. Niños (B. Aires) 58(206) p. 23
- Carrero, M. y López-Molinello, A. (2012). Aislamiento e identificación preliminar de hongos contaminantes en queso Paipa del municipio de Paipa, Boyacá. Vitae, 19, 1, S114-S116.
- Chau, C.F.; Wu, S. H. and Yen, G.C. (2007). The development of regulations for food nanotechnology. Trend in food science and technology, 18,269-280.
- Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. Journal of Dairy Science, Savoy, v.78, n.11, p.2563.
- Chudasama, B., Vala, AK, Andhariya, N., Mehta, RV y Upadhyay, RV (2010). Nanopartículas de plata altamente resistentes a bacterias: síntesis y actividades antibacterianas. Revista de investigación de nanopartículas, 12 (5), 1677-1685. doi: 10.1007 / s11051-009-9845-1
- Cristóbal, Maúrtua (2003). Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de Lactobacillus spp. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health; 14(3): p. 158-164.
- Cruz, G. J. F., Rimaycuna, J., Alfaro, R., Tripul, V. S., Solis, R. L., Gómez, M. M., ... Solis, J. L. (2019). Antimicrobial activity of chitosan composites against bacterial strains isolated from goat meat and cheese. Journal of Physics: Conference Series, 1173, 012005. Recuperado en: scihub.tw/10.1088/1742-6596/1173/1/012005.

- Delgado, G. (2009). Nanotecnología y producción de alimentos: impactos económicos, sociales y ambientales. *Estudios sociales* (Hermosillo, Son.), 17(34), 185-205. Recuperado en 18 de julio de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-45572009000200007&lng=es&tlng=es.
- Dubey, S. P., Lahtinen, M., & Sillanpää, M. (2010). Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 364(1-3), 34–41. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.04.023
- Duran, Luis, Sánchez, Cecilia, Palmero, Johny, Chaparro, Luis, Garcia, Tonny, & Sánchez, Edward. (2010). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra en Carora, estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 28(4), 467-476. Recuperado en 28 de noviembre de 2019, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079872692010000400003&lng=es&tlng=es
- Duran, Luis, Sánchez, Cecilia, Palmero, Johny, Chaparro, Luis, Garcia, Tonny, & Sánchez, Edward. (2010). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra en Carora, estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 28(4), 467-476. Recuperado en 28 de noviembre de 2019, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079872692010000400003&lng=es&tlng=es
- Escobar Sierra, Diana Marcela, Castro Ramírez, Alex Mauricio y Vergara Castrillón, Natalia Andrea. (2014) Determinación de la relación entre la proporción del grupo amino y el grado de desacetilación del quitosano. *Revista de ciencias*, 18 (1), 73-88. Consultado el 3 de mayo de 2020, en http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-19352014000100006&lng=en&tlng=en.
- Escobar, V. (2015). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM). Tesis de grado. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

- Federacion de empresas de transporte de mercancías de Zaragoza [FETRAZ] (2019) Bioempaques: ¿Qué son y cuáles son sus ventajas? [Entrada de blog].
- Flores, Y. (2014) "Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida" Trabajo de tesis doctoral. Universidad Nacional De La Plata. La Plata, Bolivia.
- Flores, M. (2017) Efecto bactericida de nanopartículas de plata y desinfectantes sobre bacterias multirresistentes (Tesis de maestria) Universidad Autónoma del Estado De México, México.
- Fox, P. F. (2003). Biochemistry of Cheese Ripening. In: Roginski, H. Fuquay, J., Fox, P. Encyclopedia of Dairy Science. (Ed). Elsevier. London. pp 320 – 326.
- Garrido, R. (2014) "Elaboración de queso fresco tipo mezcla (leche de cabra y leche de vaca) y determinación de sus características físico-químicas y sensoriales" (Tesis de grado). Universidad Nacional de Piura. Piura, Perú.
- Gennadios, A., Welles, C.L. y Gooding, C.H. (1994). Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hidrofilic edible films. Journal of food engineering, 21, 395-409.
- Gonzales, S., Lopez, N., Novoa, C. y Restrepo, L. (2007). Influencia de la bacteria pseudomonas fluorescens en la leche, sobre las características sensoriales del queso doble crema. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/viewFile/10697/14257>
- Gonzales, S., Lopez, N., Novoa, C. y Restrepo, L. (2007). Influencia de la bacteria pseudomonas fluorescens en la leche, sobre las características sensoriales del queso doble crema. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/viewFile/10697/14257>
- Guilbert, S. 1986. Technology and application of edible protective films. p. 371–394. In: Mathlouthi, M. (ed.). Food Packaging and Preservation. Elsevier. Appl. Sci. Publ., New York.
- Guilbert, S. Gontard, N. y Cuq, J.L. (1992). Edible wheat gluten film: influence of the main process variables on film properties using response surface

- methodology. *Journal of Food Science*. v. 57, 1:190-199.
- Guzmán L., Mayorga N., Mejía C. (2015) Evaluación de parámetros físicos, químicos y microbiológicos del queso fresco prensado producido en la región Junín, Perú. *Apuntes de Ciencia & Sociedad*. Recuperado en 29 de julio de 2020, de <http://journals.continental.edu.pe/index.php/apuntes/article/view/336/343>
- Haider, A., y Kang, I. (2015). "Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: A comprehensive review". *Advances in Materials Science and Engineering*.
- Ibargüen A.O, Magda, I y Pinzón, F (2015) "Elaboracion y caracterizacion de peliculas comestibles a base de gel de aloe vera (Aloe barbadnsis Miller L)" *Alimentos Hoy Revista de la Asociacion Colombiana de Ciencia y Tecnologia de Alimentos* 23:(36)133-149.
- ICMSF. 2006. *Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos*. Principios y aplicaciones específicas. University of Toronto Press.
- INDECOPI. 2004. *Norma Técnica Peruana (NTP 202.087:2004). Leche y Productos Lácteos. Queso Fresco*. Lima, Perú.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., y Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385–406.
- Iturbe, J. L., Nestor, A. V., Mendieta, V. S., & Borja, M. A. (2015). "Obtención y caracterización de nanopartículas de plata soportadas en fibra de algodón".
- Izaguirre, M. (2010) *Obtencion de nanoparticulas de Ag, mediante dos direntes metodos quimicos (Trabajo de grado)* Instituto Politecnico Nacional. Altamira, Tamaulipas.
- Kadir, A., Lakowicz & Geddes C.D. (2005). Rapid deposition of triangular silver nanoplates on planar surfaces: application to metal-enhanced fluorescence, *J. Phys. Chem. B.*, 109, pp 6247 – 6251.
- Kalaivani, R.; Maruthupandy M.; Muneeswaran, T.; Hameedha A.; Beevi; M. Anand C.M. ; Ramakritinan, A.K. (2018) Síntesis de nanopartículas de plata mediadas por quitosano (Ag NP) para posibles aplicaciones antimicrobianas Volumen 2, Número 1 ,30 – 35 <https://doi.org/10.1016/j.flm.2018.04.002>.

- Kapoor, S. (1998). Preparation, Characterization, and Surface Modification of Silver Particles. *Langmuir*, 14(5), 1021–1025. Recuperado de sci-hub.tw/10.1021/la9705827.
- Kroachta, M.J., Baldwin, A.E. y Nisperos – Carriedo, M. (1994). Edible coating and films to improve food quality. Chapter 1. Edible films coating: Characteristics, formation, definitions, and testing methods. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, E.U.A. 1-21.
- Liu, J. & Jiang, G. (2015). *Silver Nanoparticles in the Environment*, 1º edición, Springer International Publications, Suiza, pp 2 – 4.
- Lurueña-Martínez, Miguel Ángel (2010). Efecto de la raza y del recuento de células somáticas sobre la calidad del queso de oveja. Tesis Doctoral. Departamento de Construcción y Agronomía, Escuela Politécnica Superior de Zamora, Universidad de Salamanca, Zamora, España.
- Mago Y., Sanabria N, Cova A, Alvarado C., Duran, L. (2015) Maduración de Queso de Cabra con Cepa Autóctona de *Leuconostoc mesenteroides* Aislada de Queso Artesanal. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*, vol. 56, núm. , pp. 3-9 Universidad Central de Venezuela. Venezuela.
- Martín Hernández, C. (1988). Estudio de las características físico- químicas de quesos de cabra fresco y semicurado. Influencia de la congelación. Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid.
- Martines, E., Lira, L. (2010). “Análisis y aplicación de las expresiones del contenido de humedad en sólidos”. In Simposio de metrología (pp. 27-29).
- Mchugh, T.H., Avena , R. y Krochta, J.M. (1993) Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects *journal of food science*, 58 (4).899-903.
- Medina,Z., León, Y., Delmonte, M. , Fernández, P. , Silva, R. y Salcedo,A. (2014) Mohos y levaduras en queso artesanal semiduro expandido en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. *CIENCIA* 22(4), 197 - 204, Maracaibo, Venezuela.
- Mejía, O; Noguera, R y Posada, S. (2008). Composición de la leche de cabra y factores nutricionales que afectan el contenido de sus componentes Recuperado en <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/124/1/7.%2093-110.pdf>.

- Mendez, M. A. (2009). "Síntesis y Caracterización De Nanopartículas De Plata: Efecto Sobre Colletotrichum Gloesporioides", 90.
- Merchán Castellanos, N., Pineda Gómez, L., Cárdenas Parra, A., González Neiza, N., Otálora Rodríguez, M., & Sánchez Neira, Y. (2019). Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016. *Revista Cubana De Higiene Y Epidemiología*, 56(1). Recuperado de <http://www.revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/view/171/260>
- Merchán Castellanos, N., Pineda Gómez, L., Cárdenas Parra, A., González Neiza, N., Otálora Rodríguez, M., & Sánchez Neira, Y. (2019). Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016. *Revista Cubana De Higiene Y Epidemiología*, 56(1). Recuperado de <http://www.revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/view/171/260>
- Meyhar, G. E. y Han, J. H. 2004. Physical and mechanical properties of high-amylose rice and pea starch films as affected by relative humidity and plasticizer. *Journal of Food Science*. 69(9): 449-454.
- Morales, M.A.(2011) Generalidades y aplicación de películas y recubrimientos comestibles en la cadena hortofrutícola. (Tesis de grado). Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" . Buenavista, Mexico.
- Morin, A.C. E. 2010. Elaboración y caracterización de películas comestibles a base de almidón de maíz ceroso y mucílago de nopal (opuntia ficus) usando la tecnología de extrusión termoplástica. Universidad Autónoma de Querétaro. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. México.
- Navarro, M. (2016). Influencia de la fuente y concentración de almidón sobre las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las películas quitosano-almidón combinadas con glicerol para su uso en la agroindustria (Trabajo de grado) Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú.
- NOM-121-SSA1-1994, bienes y servicios. Quesos; frescos madurados y procesados. Especificaciones sanitarias
- Perentena, L., González, C., Celis, B., Valbuena, A. & Colina, M. (2015). Síntesis de bases de Schiff derivadas de Quitosano por reacción con p₂-dimetilamino benzaldehído y 4-hidroxi-3-metxibenzaldehído. *Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales*, 16,1, 1-27.

- Pinto, G., Martin, M., Hernandez, J. y Martin, M.T. (2015). El reactivo de Tollens: de la identificación de aldehídos a su uso en nanotecnología, aspectos historicos y aplicaciones didacticas. Bsrcelona, España: RSEQ.
- Pinto, G., Martin, M., Hernandez, J. y Martin, M.T. (2015). El reactivo de Tollens: de la identificación de aldehídos a su uso en nanotecnología, aspectos historicos y aplicaciones didacticas. Bsrcelona, España: RSEQ.
- Pradeep, T. (2012). A Textbook of Nanoscience and Nanotechnology, 1° edición, McGraw Hill, Nueva Deli, pp 887 – 893.
- Qiu-Ping, Z., y Wen-Shui, X. (2008). Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava starch/gelatin blend plasticized with glycerol. Food Technology & Biotechnology 46(3):262-269.
- Ramirez, C. (2017). Aplicación de las nanopartículas de plata para la disminución de coliformes totales presentes en las aguas residuales Trapiche – Carabaylo. [Tesis de grado, Universidad Cesar Vallejo]. http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/43160/Ramirez_FCM.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Riley, D.J., (2002). Electrochemistry in nanoparticle science. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 7: p. 186 192.
- Rodriguez, A. (2019). Determinación de coliformes totales en queso fresco comercializado en el distrito de canchaque – provincia Huancabamba – Piura – 2019. [Trabajo de grado, Universidad Nacional de Piura]. <http://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/2077>
- Romero, L. (2015). Evaluación fisicoquímica y microbiológica del proceso de elaboración del queso doble crema en una fábrica de lácteos del municipio de Belén. [Trabajo de Pregrado, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja]. <http://repositorio.uptc.edu.co/jspui/handle/001/1426>
- Royal Society, The (2004) Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties. Reino Unido.
- Saltos Solórzano, Julio Vinicio, Márquez Bravo, Yesenia Johana, López Apolinario, Ana Isabel, Martínez Abreu, Judit, & Guerrero Proaño, Diego German. (2018). La implementación de procedimientos estandarizados en la prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos. Conteo microbiológico del Staphylococcus aureus en quesos frescos. Revista Médica Electrónica, 40(2), 371-382. Recuperado en 17 de agosto de 2020,

de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242018000200013&lng=es&tlng=es.

- Sanchez, M. (2017). Nanopartículas de plata: preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos. (Tesis de maestría), Universidad Nacional de Educación a distancia. Recuperado de <http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ>
- Sánchez, Tatiana; García, Omar y Pinzón, Magda. 2012. Elaboración y caracterización de películas de almidón de yuca (manihot esculenta) variedad Ica cultivada en el departamento de Quindío. *Vitae*, 19 (1):S426-S429
- Santiago, J. (2012). La Nanotecnología en el Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 78(3), 159-160. Recuperado en 10 de marzo de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2012000300001&lng=es&tlng=es.
- Santiago, J. (2014). Nanotecnología y alimentos funcionales. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(3), 155. Recuperado en 20 de febrero de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2014000300001&lng=es&tlng=es.
- Skwarczynski, Mariusz & Toth, Istvan. (2017). *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development*. Amsterdam: Elsevier.
- Slade, L. y Levine, H., (1993). Water relationships in starch transitions. *Carbohydrate Polymers*. 21: 105-131.
- Sobral, P. J. A.; Menegalli, F. C.; Hubinger, M.D. y Roques, M.A. (2001) Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of genlatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15, 423- 432.
- Solórzano J., Márquez Y., López A, Martínez J., y Guerrero Diego German. (2018). Implementation of standardized procedures to prevent diseases transmitted by foodstuffs. Microbiological count of *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. *Revista Médica Electrónica*, 40(2), 371-382. Recuperado en 29 de julio de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242018000200013&lng=es&tlng=en.

- Sorrentino, A.;Gorrasi, G. y Vittoria V. (2009). Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. Trends in food science and technology, 18,84-95.
- Sothornvit, R., & Krochta, J. M. (2000). Water Vapor Permeability and Solubility of Films from Hydrolyzed Whey Protein. Journal of Food Science, 65(4), 700-703. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16075.x>.
- Sozer, N. y Kokini, J. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. Trends in biotechnology, 27 (2), 82-89. Springer International Publications, Suiza, pp 2 – 4.
- Tamayo,L.A.,(2012) Incorporación de nanopartículas de plata y cobre en matrices poliméricas de polietileno y desarrollo de películas poliméricas con actividad antibacteriana .(Tesis de doctorado), Universidad de Santiago de Chile. Chile.
- Tandazo, Y. (2016) Vida en anaquel de carne de cabra capra hircus sp. Utilizando quitosano combinado con carbón activado obtenidos de residuos agroindustriales (Trabajo de grado) Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú
- Turhan, K., & Sahbaz, F. 2004. Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. J. Food Eng 61, 459.
- Valdez, K. (2014). Estimación de la vida útil de productos snacks procesados en la empresa procesos Velsac. SAC mediante análisis fisicoquímicos y sensoriales [Trabajo de grado, Universidad Nacional Callao].[http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/UNAC/414/Krystel Cecilia_Tesis_tituloprofesional_2014.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/UNAC/414/Krystel_Cecilia_Tesis_tituloprofesional_2014.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
- Vanegas, M. (2014) Obtención de películas biodegradables a partir de mezclas de quitosano de cáscaras de camarón y agentes plastificantes (Trabajo de grado) Universidad central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Vásquez A, Víctor, SalhuanaG, José Gerardo, Jiménez D, Luis A, & Abanto Ríos, Leidyn M. (2018). Evaluación de la calidad bacteriológica de quesos frescos en Cajamarca. Ecología Aplicada, 17(1), 45-51. <https://dx.doi.org/10.21704/rea.v17i1.1172>.
- Villamizar, R. y Monroy L. (2015). Uso de Nanopartículas de plata en el control de microorganismos patógenos presentes en alimentos. LIMENTECH CIENCIA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA ISSN 1692-7125. Volumen 13,

No. 1, p.54-59, Facultad de Ingenierías y Arquitectura. Universidad de Pamplona-Colombia

Watson, E. (2007) "Nanoparticles in Food Warning" en Food Manufacture. Londres, Reino Unido. 1 de Junio.
En: http://www.foodmanufacture.co.uk/news/fullstory.php/aid/4902/Nanoparticles_in_food_warning.html.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Norma Técnica Peruana para queso fresco.

CAPÍTULO VI QUESO FRESCO

Artículo 18.- Especificaciones técnicas

Físicoquímicas

Característica	Unidad	Elaborado a base de leche entera	Elaborado a base de leche parcialmente descremada	Elaborado a base de leche descremada
Materia grasa láctea en el extracto seco	g/100g	≥ 40	≥ 15	< 15
Humedad	g/100g	≥ 46	≥ 46	≥ 46

Artículo 19.- Especificaciones sanitarias

El queso fresco debe cumplir con las especificaciones de calidad sanitaria e inocuidad que establece el Ministerio de Salud, según lo siguiente:

19.1 Microbiológicos

Agente Microbiano	Unidad	Categoría	Clase	n	c	Límite	
						m	M
Coliformes	UFC/g	5	3	5	2	5×10^2	10^3
<i>Salmonella sp.</i>	P o A/25g	10	2	5	0	Ausencia	---
<i>Escherichia coli</i>	NMP/g	6	3	5	1	3	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/g	7	3	5	2	10	10^2
<i>Listeria monocytogenes</i>	P o A/25g	10	2	5	0	Ausencia	---

Notas: Categoría: Grado de riesgo que representa los microorganismos en relación a las condiciones previsibles de manipulación y consumo del alimento.

Clase: Es la clasificación que se da a los planes de muestreo por atributos, que pueden ser de dos o tres.

P = Presencia, A = Ausencia

ANEXO 2: Síntesis de nanopartículas mediante el método de Tollens.

- a. Preparación de las soluciones de nitrato de plata, glucosa, Hidróxido de sodio e hidróxido de amonio.



- b. Mezcla de las soluciones.



- c. Reacción térmica (formación del espejo de plata)

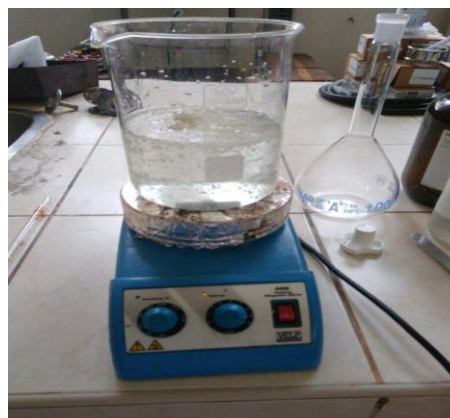


d. Análisis de pesos de los vasos con los diferentes tratamientos (T1, T2 y T3).



ANEXO 3: Preparación de películas compuestas.

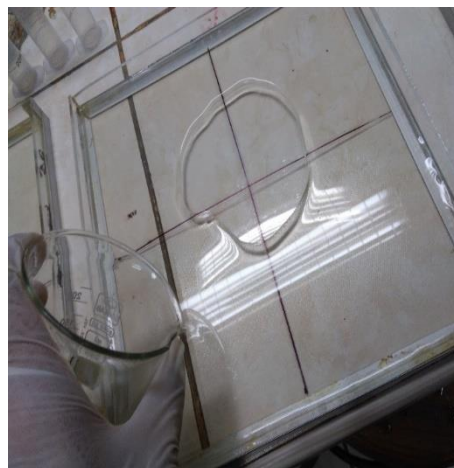
a. Preparación de solución de quitosano (1% p/v)



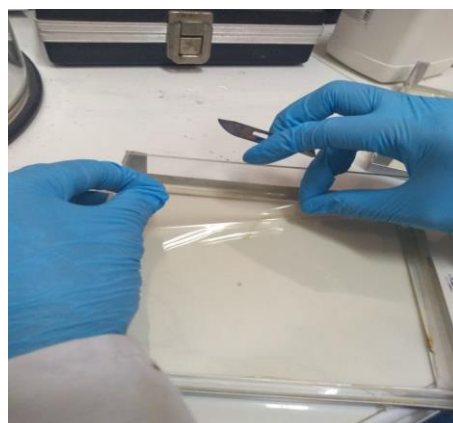
b. Impregnación y estabilidad de nanopartículas en sistemas coloidales (quitosano).



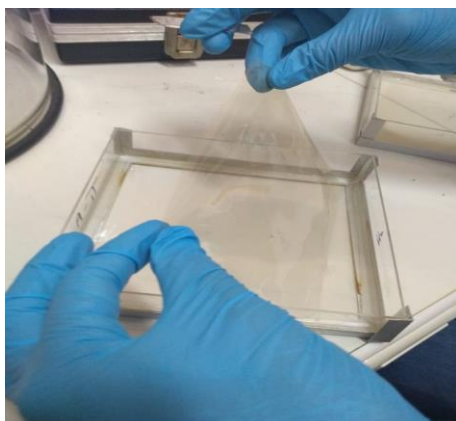
c. Aplicación del método de casting



d. Secado de películas en estufa.



e. Extracción de las películas, las cuales fueron puestas en papel gomado.



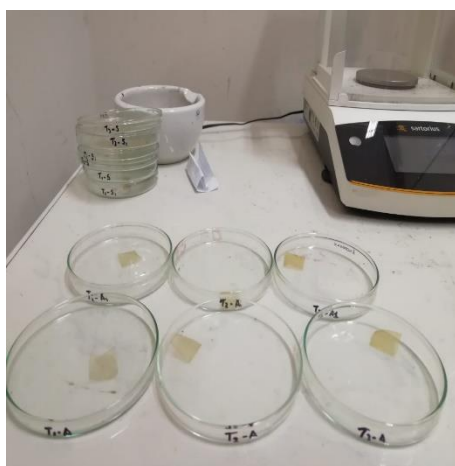
ANEXO 4: Caracterización de la solución coloidal de quitosano + nanopartículas de plata.

a. Evaluación de las propiedades ópticas (Espectroscopia UV-vis).



ANEXO 5: Caracterización de las películas de QP – AgNPs.

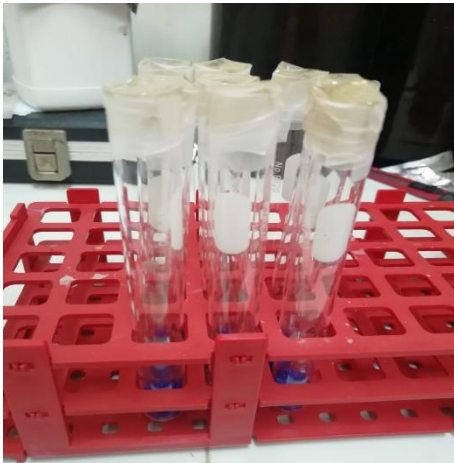
a. Medición de humedad



b. Medición de solubilidad



c. Determinación de permeabilidad al vapor

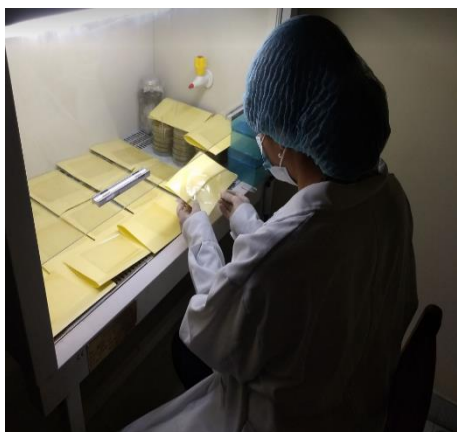


ANEXO 6: Aplicación de las películas sobre el queso de leche de cabra.

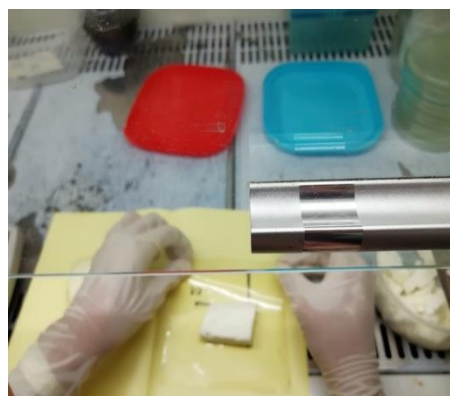
a. Muestra



b. Esterilización de las películas mediante rayos UV



c. Empaquetamiento del queso

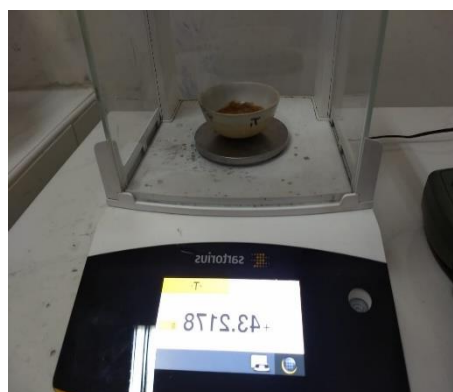


ANEXO 7: Análisis fisicoquímico del queso de cabra envuelto con película con diferentes tratamientos.

a. Determinación de pH del queso



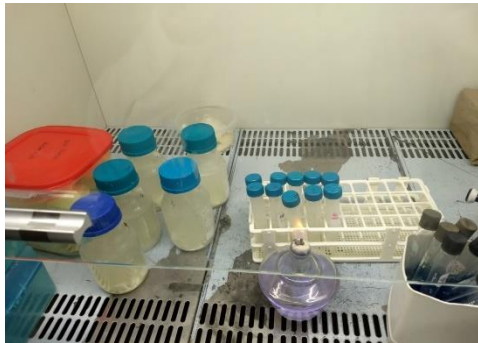
b. Mezcla de las soluciones.



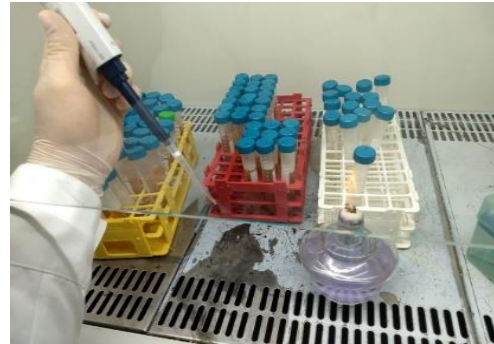
c. Determinación de Acidez titulable del queso



ANEXO 8: Análisis microbiológico del queso de cabra envuelto con película con diferentes tratamientos.



- a. 225 mL de muestra madre (agua peptonada estéril) adicionarle 25 gramos de muestra a analizar y agitar.



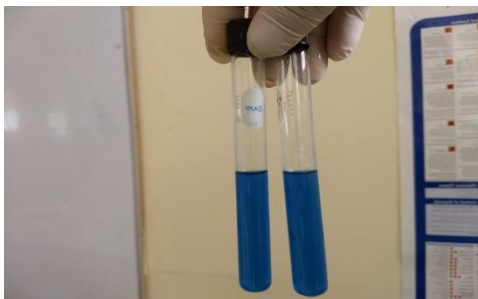
- b. Diluyendo las concentraciones de muestra homogenizada por duplicado con la micropipeta para los análisis a realizar.



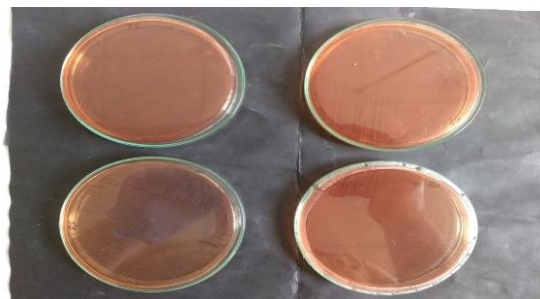
- c. Placas con agar de las cuales se ha agregado a la muestra, homogenizándose el vertimiento y se dejó enfriar e incubar según la metodología.



- d. Incubación en estufa las placas según la temperatura requerida en la metodología



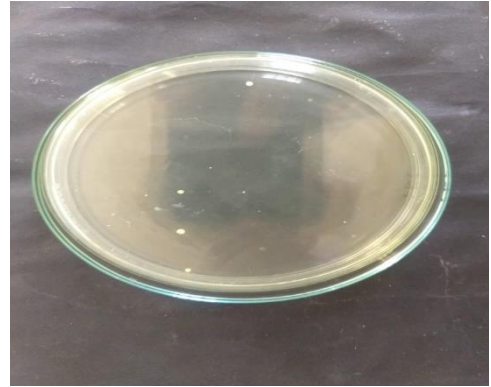
- e. Medio de cultivo, caldo Rappaport para la evaluación de *Salmonella* sp.



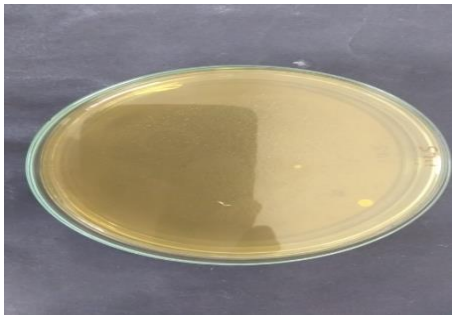
- f. Placas con Agar SS (*Salmonella*, *Shigella* Agar), donde no se observa el crecimiento microbiológico.



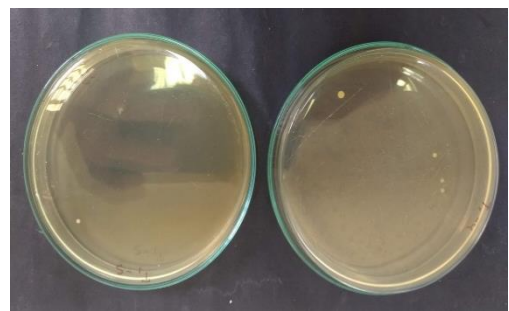
- g. Incubación en baño María los tubos de ensayo según la temperatura requerida en la metodología.



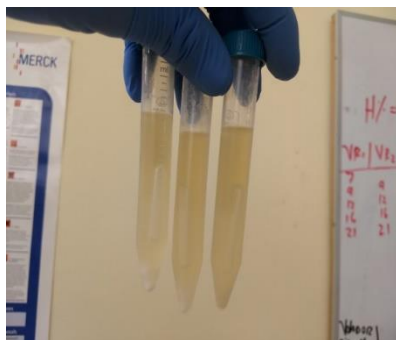
- h. Placa con agar PCA, en la cual se observa crecimiento microbiológico de *Aerobios - mesófilos - Viables*.



- i. Placa con Agar Sabouraud, en la cual se observa crecimiento de hongos y levaduras.



- Placas con Agar Cetrimida en la cual se observa crecimiento de *Pseudomonas*



- Lectura de tubos incubados con Caldo Lauril Sulfato para la evaluación de *Coliformes totales*.

ANEXO 9: Peso promedio de plata (Ag)

TRATAMIENTOS	PESO DEL VASO (g)	PESO DEL VASO CON ESPEJO DE PLATA (g)	PESO DE ESPEJO DE PLATA (g)	PROMEDIO DE PESO	DESVÍO
PVA-QC1	108.88520	108.89010	0.00490	0.00491	±0.000869
	111.7479	111.751	0.00310		
	111.7516	111.756	0.00440		
	110.0126	110.0159	0.00330		
	111.7501	111.75501	0.00491		
PVA-QC2	110.0607	110.0714	0.01070	0.01060	±0.000430
	109.2064	109.217	0.01060		
	108.4313	108.4428	0.01150		
	105.4492	105.4604	0.01120		
	108.436	108.4465	0.01050		
PVA-QC3	110.0129	110.0259	0.01300	0.01300	±0.000591
	109.2075	109.2201	0.01260		
	110.0612	110.075	0.01380		
	108.4114	108.4239	0.01250		
	109.2564	109.27	0.012		

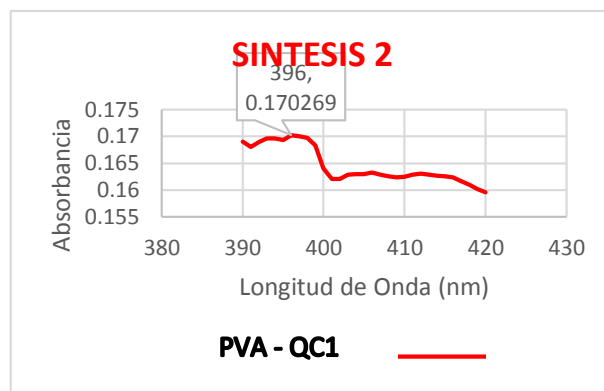
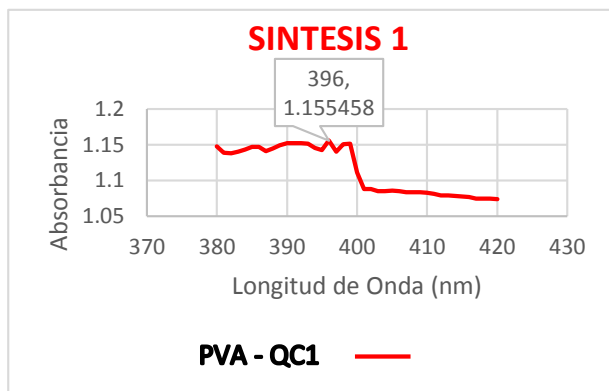
Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 10: Espectro UV-Vis nanopartículas de plata sintetizadas.

a. Espectros UV-Vis obtenidos en las síntesis realizadas por el Tratamiento 1 (PVA – QC1)

SINTESIS	PICO DE ABSORCION MAXIMA	ABSORBANCIA
1	396	0.170269
2	396	1.155458
Promedio	396	0.6628635
Desviación estándar	±0.000	±0.697

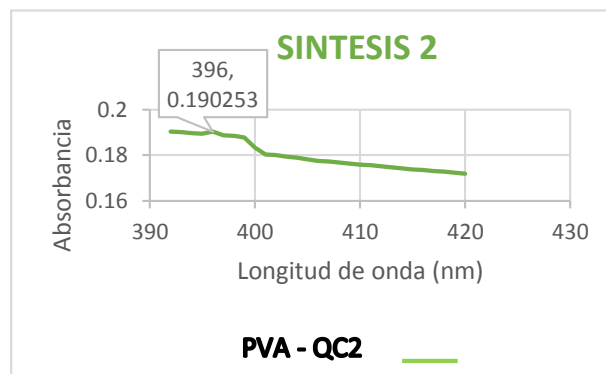
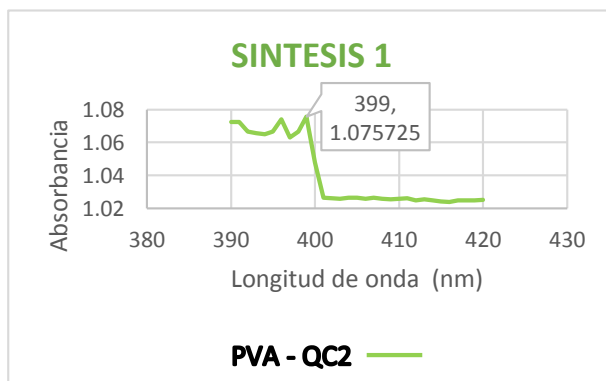
Fuente: Elaboración propia



a. Espectros UV-Vis obtenidos en las síntesis realizadas por el Tratamiento 2 (PVA – QC2)

SINTESIS	PICO DE ABSORCION	
	MAXIMA	ABSORBANCIA
1	399	1.075725
2	396	0.190253
Promedio	397.5	0.632989
Desviación estándar	±2.121	±0.626

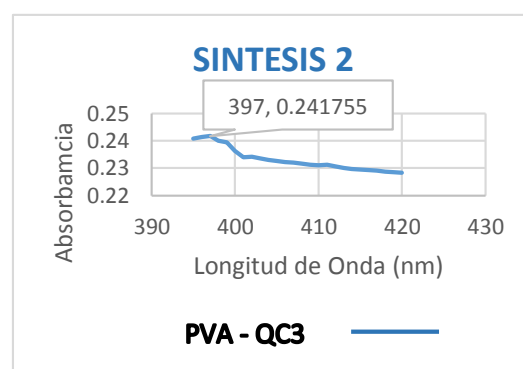
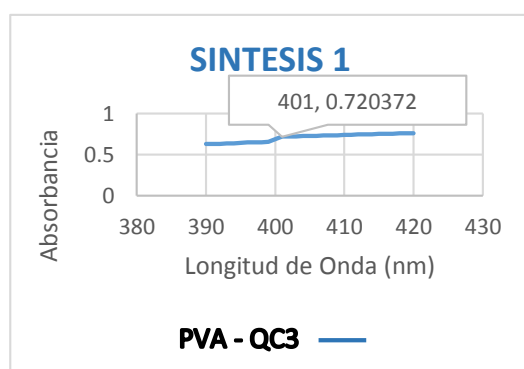
Fuente: Elaboración propia.



b. Espectros UV-Vis obtenidos en las síntesis realizadas por el Tratamiento 3 (PVA – QC3).

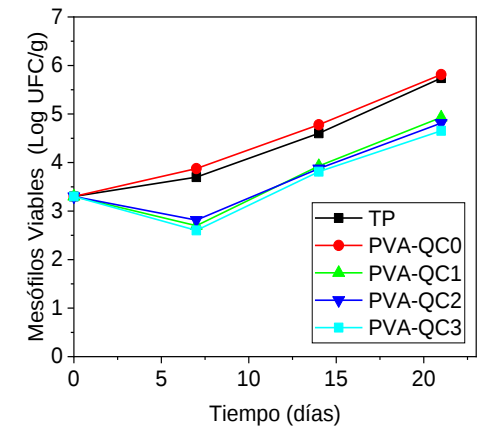
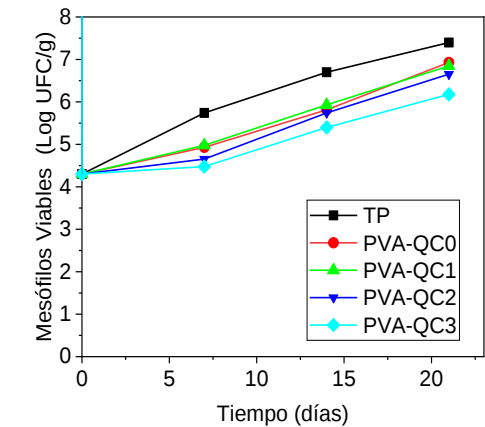
SÍNTESIS	PICO DE ABSORCIÓN MÁXIMA	ABSORBANCIA
1	401	0.720372
2	397	0.241755
Promedio	399	0.4810635
Desviación estándar	± 2.828	± 0.338

Fuente: Elaboración propia.

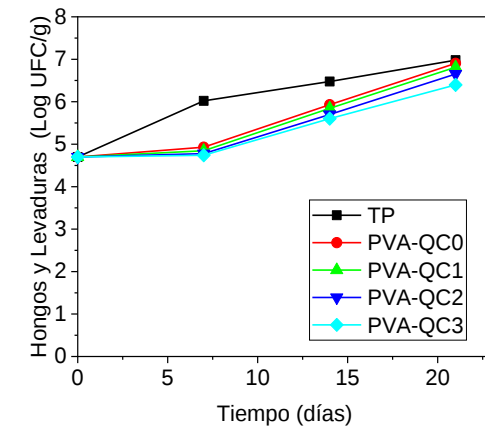
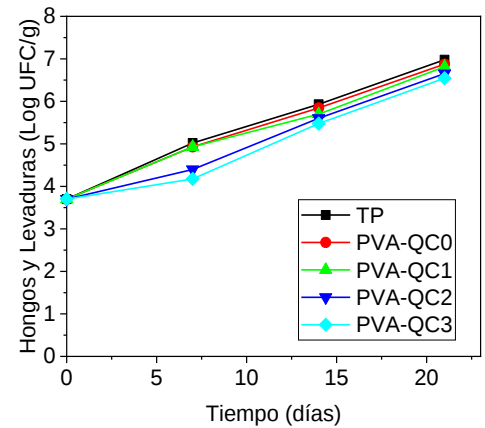


ANEXO 11: Recuento de diferentes microorganismos en función a la aplicación diferentes tratamientos y los días de evaluación del queso de cabra.

a. Mesófilos viables



b. Hongos y levaduras



c. Pseudomonas

