



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE ALIMENTOS

Efecto de las nano partículas de cobre sobre Coliformes totales y Escherichia coli en leche cruda como alternativa a la pasteurización

**SANCHEZ CABRERA GUSTAVO JAVIER
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**LAPO ENCALADA RAUL ADELMAR
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE ALIMENTOS

Efecto de las nano partículas de cobre sobre Coliformes totales y Escherichia coli en leche cruda como alternativa a la pasteurización

**SANCHEZ CABRERA GUSTAVO JAVIER
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**LAPO ENCALADA RAUL ADELMAR
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE ALIMENTOS

TRABAJOS EXPERIMENTALES

**Efecto de las nano partículas de cobre sobre Coliformes totales y
Escherichia coli en leche cruda como alternativa a la
pasteurización**

**SANCHEZ CABRERA GUSTAVO JAVIER
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**LAPO ENCALADA RAUL ADELMAR
INGENIERO EN ALIMENTOS**

ROMERO BONILLA HUGO ITALO

**MACHALA
2024**

Efecto de las nanopartículas de cobre sobre Coliformes totales y Escherichia coli en leche cruda como alternativa a la pasteurización

por Raul Adelman Lapo Encalada

Fecha de entrega: 10-ago-2024 12:27a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2429849154

Nombre del archivo: tesis_leche_Cu.pdf (853.2K)

Total de palabras: 9675

Total de caracteres: 49584

Efecto de las nanopartículas de cobre sobre Coliformes totales y Escherichia coli en leche cruda como alternativa a la pasteurización

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Escuela Politecnica Nacional Trabajo del estudiante	1%
2	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	1%
3	1library.co Fuente de Internet	1%
4	revistaecuatorianadecienciaanimal.com Fuente de Internet	<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 1 words

Excluir bibliografía

Activo

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, SANCHEZ CABRERA GUSTAVO JAVIER y LAPO ENCALADA RAUL ADELMAR, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado Efecto de las nano partículas de cobre sobre Coliformes totales y Escherichia coli en leche cruda como alternativa a la pasteurización, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

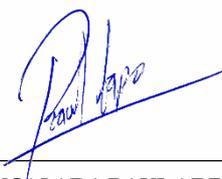
Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



SANCHEZ CABRERA GUSTAVO JAVIER

0706687902



LAPO ENCALADA RAUL ADELMAR

0707025524

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación se lo dedico a mis padres, por su amor incondicional, el constante apoyo y por ser el motor que me motiva a seguir adelante sin rendirme y ser capaz de cumplir mis objetivos. A mi familia, por su ánimo y comprensión durante este proceso. A todas esas personas que han creído en mí y me motivaron a seguir adelante y perseguir mis sueños.

Raul Adelmar Lapo Encalada

Dedico mi trabajo de tesis a Dios, a la Virgencita del Cisne, por darme la fuerza y valentía para romper todas las adversidades de la vida y culminar esta etapa, muy importante para mí, le dedico a mi familia en especial a mis dos tías, Marina Cabrera y Narcisa Sánchez, por darme todo el apoyo moral y económico, además a mi enamorada Thalía Cando por el apoyo incondicional que me brindo desde que empecé esta meta y por siempre darme los ánimos para no abandonar mis sueños.

Gustavo Javier Sánchez Cabrera

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios por siempre iluminar nuestro camino y darnos la fuerza necesaria para haber luchado todos estos años y lograr nuestra meta. Queremos expresar nuestra gratitud a nuestros padres y tíos por siempre apoyarnos de forma moral, económicamente y ser una parte fundamental de nuestra formación.

Agradecemos a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo de titulación. En primera instancia, agradecemos a nuestro tutor de tesis Dr. Hugo Romero Bonilla, por su apoyo en la investigación. A la Ing. Gabriela Jaramillo por su guía experta, paciencia y su apoyo constante a lo largo de este proceso. Los consejos y comentarios han sido fundamentales para darle forma a este trabajo. También agradecer a todos los docentes que nos brindaron sus valiosas sugerencias y nos permitieron usar sus laboratorios.

Agradecemos a nuestros amigos y familiares por su constante apoyo emocional y por comprender todas las horas que dedicamos a este proyecto. Su aliento y comprensión han sido una parte fundamental para mantenernos motivados.

A la Universidad Técnica de Machala, le expresamos nuestra gratitud por brindarnos los recursos necesarios y los conocimientos para llevar a cabo esta investigación.

Sin la ayuda y el apoyo de todas estas personas y entidades no se podría haber realizado este trabajo de titulación. Gracias a todos por creer en nosotros y ser parte de este logro.

Raúl Adelmor Lapo Encalada

Gustavo Javier Sánchez Cabrera

RESUMEN

Las nanopartículas de cobre en la industria agronómica, tiene una consideración sumamente importante, se conoce que la nanotecnología maneja varios tipos de materiales ya sean sintéticos, moleculares, a nivel atómico y naturales. Esta tecnología, dentro de la industria alimentaria tiene una gran acogida, acorde el tiempo y el avance de esta que ha realizado estudio de sus iones, que tienen un efecto virucida, fungicida y bactericida, por tal razón se está indagando cada vez más su aplicación como uso en diferentes alimentos. Uno de los metales considerados de importancia es el cobre (Cu) el cual en los seres vivos tiene beneficios pues ayuda en la formación de eritrocitos, ayuda al sistema inmunológico y cuida de los huesos, por ende, se lo considera como biocida.

El presente trabajo se basó en la investigación de comprobar el efecto de las nanopartículas de cobre en la inhibición de microorganismos en la leche cruda, como un posible tratamiento alternativo a la pasteurización, el estudio empleó la utilización del equipo NEC-400 el cual nos permite obtener agua ionizada.

Se empleó dos concentraciones en dos diferentes tratamientos, el tratamiento 1 se empleó 4 ppm y posterior a ello en el tratamiento 2, se elevó la concentración a 11 ppm de nanopartículas de cobre, para poder determinar el mejor tratamiento posible, frente a la inhibición de los microorganismos patógenos.

Se realizó los debidos análisis microbiológicos, para poder observar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de cobre, así también se realizó un análisis de control a muestras de leche sin aplicar el tratamiento para así comprobar si el efecto de los iones de cobre, se realizó el debido proceso bajo la Normativa Técnica Ecuatoriana INEN 9:2012, se le realizó una cuantificación de iones de cobre residual, para poder determinar la cantidad de ppm de nanopartículas finales en la leche y que estas estén en el margen permitido por la IDA.

Palabras claves: *Nanopartículas de cobre (NPs), leche cruda, inhibición, efecto.*

ABSTRACT

Copper nanoparticles in the agricultural industry are of extremely important consideration. It is known that nanotechnology handles various types of materials, whether synthetic, molecular, atomic or natural. This technology, within the food industry, has a great acceptance, in accordance with the time and progress of this industry, which has carried out studies of its ions, which have a virucidal, fungicidal and bactericidal effect. For this reason, its application is being increasingly investigated as a use in different foods. One of the metals considered important is copper (Cu), which has benefits in living beings because it helps in the formation of erythrocytes, helps the immune system and takes care of the bones, therefore, it is considered a biocide.

This work was based on the investigation of verifying the effect of copper nanoparticles in the inhibition of microorganisms in raw milk, as a possible alternative treatment to pasteurization. The study used the NEC-400 equipment which allows us to obtain ionized water. Two concentrations were used in two different treatments, treatment 1 used 4 ppm and after that in treatment 2, the concentration was raised to 11 ppm of copper nanoparticles, in order to determine the best possible treatment, against the inhibition of pathogenic microorganisms.

The appropriate microbiological analyses were carried out, in order to observe the antimicrobial effect of the copper nanoparticles, as well as a control analysis was carried out on milk samples without applying the treatment to check if the effect of the copper ions, the due process was carried out under the Ecuadorian Technical Regulation INEN 9:2012, a quantification of residual copper ions was carried out, in order to determine the amount of ppm of final nanoparticles in the milk and that these are within the margin allowed by the ADI.

Keywords: *Copper nanoparticles (NPs), raw milk, inhibition, effect.*

ÍNDICE

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTO	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
ÍNDICE	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
INTRODUCCIÓN	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
OBJETIVOS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS	13
HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN:	13
CAPITULO I	14
1. MARCO TEÓRICO	14
1.1 LECHE CRUDA	14
1.1.1 Generalidades de la leche cruda	14
1.1.2 Composición de la leche cruda de vaca.	14
1.1.3 Microbiología de la leche cruda	16
1.1.3.2 Coliformes en la leche cruda	17
1.1.4 Características Físicoquímicas de la leche cruda	18
1.2 LECHE POST TRATAMIENTO TÉRMICO	19
1.3 PRODUCCIÓN DE LECHE A NIVEL NACIONAL	19
1.4 NORMATIVA ECUATORIANA PARA LECHE CRUDA	20
1.5 GENERALIDADES DEL COBRE	20
1.5.1 Toxicidad del cobre	21

1.5.2 Antecedentes del consumo de cobre	21
1.5.3 Presencia de cobre en alimentos	22
1.6 NANOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	22
1.7 NANOPARTÍCULAS DE COBRE	23
1.7.1 Características de las nano partículas ionizadas de cobre	24
1.7.2 Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre	25
1.8 APLICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE COBRE EN LA LECHE.	26
1.9. RIESGOS POTENCIALES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE COBRE EN LA LECHE	27
1.10 REGULACIÓN Y NORMATIVA	27
CAPITULO II	28
2. METODOLOGÍA	28
2.1 MÉTODO DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE	28
2.1.1 Aplicación de iones de cobre en leche cruda	28
2.1.2 Cuantificación de iones cobre residuales	29
2.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS EN LA LECHE	29
2.3.1. Determinación de densidad relativa	31
2.3.2 Determinación acidez titulable	32
2.3.3. Determinación de contenido de grasa y proteínas	33
2.3.4 Análisis estadístico.	33
CAPITULO III	34
3. RESULTADO Y DISCUSIONES	34
3.1 TRATAMIENTO CON IONES DE COBRE	34
3.1.1 RESULTADO DE COBRE RESIDUAL.	34
3.3 EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE IONES COBRE SOBRE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS, <i>E. COLI</i> Y COLIFORMES TOTALES EN LA CALIDAD DE LA LECHE TRATADA	36
3.4 EFECTO DE LAS NPs DE COBRE SOBRE LA CALIDAD FISICOQUÍMICA DE LECHE	40
CAPÍTULO IV	41
4. CONCLUSIONES	41
5. RECOMENDACIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE LA LACTOSA.....	15
FIGURA 2. ÚLTIMAS GAMAS DE MODELOS DE SISTEMA NECON.	24
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL EFECTO ANTIBACTERIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS.	25
FIGURA 4. MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS	35
FIGURA 5. E. COLI Y COLIFORMES TOTALES.....	36
FIGURA 6. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS NPS DE COBRE EN EL RAM.....	36
FIGURA 7. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS NPS DE COBRE EN E. COLI Y COLIFORMES TOTALES.	37

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPOSICIÓN DE LA LECHE CRUDA DE VACA.	15
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE CRUDA	18
TABLA 3. PROMEDIO DE UFC/ML DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS, E. COLI Y COLIFORMES TOTALES EN LECHE CRUDA Y LECHE TRATADA CON NPS.	37

INTRODUCCIÓN

El principal rol que cumple el cobre (Cu) en los seres vivos, es que realiza numerosas actividades metabólicas dentro de nuestros organismos, dentro de los beneficios que presenta el cobre en el cuerpo humano está que ayuda en la formación de eritrocitos, ayuda al sistema inmunológicos y cuida de los huesos, por ende, es un metal empleado como biocida en medicina y en productos de cuidado personal, durante mucho tiempo por diferentes culturas. Es un metal que posee una gran capacidad antimicrobiana, el cual es complejo por su alto potencial de oxidación. Las nanopartículas de cobre por varias metodologías se las puede sintetizar, a medida que el tiempo avanza, ha surgido mucho interés de parte de las industrias por las nanopartículas. (Contreras Saenz, S., & Orjuela Barreto, M. Y. 2023 & Zarate, 2022)

El cobre es el elemento con mayor actividad antibacteriana, sus iones destruyen activamente los microorganismos en contacto con el metal, diversas investigaciones brindan un resultado favorable de las propiedades antibacterianas y antivirales de los iones de cobre, estas alteran el metabolismo de los virus y bacterias, los que hacen que no puedan alimentarse y destruyen su ADN. Han desempeñado un papel importante en la historia, dadas sus numerosas propiedades, como la buena conductividad eléctrica y térmica, la alta resistencia a la corrosión y la mayor maleabilidad (Montalvo,2019; Crisan, Teodora, M., & Lucian, 2021)

Hoy la industria alimentaria usa nanopartículas que varían desde cobre, plata, oro y zinc, las usan para la elaboración de películas de recubrimiento para envases, los cuales los materiales desarrollados mostraron mejores propiedades mecánicas, posee una capacidad antimicrobiana y antioxidante, lo que lo hace una excelente barrera contra la luz y el agua. (Olaran, 2021).

El objetivo de la investigación es emplear todos estos beneficios de los iones de cobre y evaluar al aplicar en la leche cruda, si existe una inhibición de los microorganismos mencionado, sin que este tratamiento no térmico afecte a la calidad fisicoquímica de la misma.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leche posee un alto valor nutricional, los cuales son, de suma importancia, porque generan un crecimiento físico y mejoran el desarrollo intelectual, el consumo mínimo es de 180 litros/persona/año, lo cual es recomendado por la (OMS) Organización Mundial de la Salud y la (FAO) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Flores,2019).

Para el buen desarrollo productivo del Ecuador, la industria láctea es una importante fuente de producción, esta actividad crea múltiples trabajos, por ende, según avanzan las tecnologías de preservación de alimentos, se innovan, el uso de procesos no térmicos los cuales se usan como medida alternativa la severidad ocasionada por los tratamientos térmicos a los productos alimenticios.

Se conoce que la pasteurización es el calentamiento de los líquidos, cuyo objetivo es reducir la carga microbiana patógena que pueda existir en él, al aplicar las altas temperaturas en la leche pueden perderse algunas propiedades organolépticas, por ende como medida alternativa al tratamiento establecido de la pasteurización en la leche y según diferentes artículos científicos donde aplican el tratamiento de iones de cobre en diferentes productos, se evidencia un resultado favorable al inhibir microorganismos, con dichos antecedentes previos se realizará la exploración del tratamiento no térmico en nuestro producto, de hacer efecto el tratamiento se puede garantizar que la leche tratada con nanopartículas de iones de cobre, se la puede emplear en subproductos derivados de la misma.

Brindar una solución alterna al pequeño productor, es el objetivo de indagar un tratamiento no térmico y alternativo al proceso ya conocido como la pasteurización, lo cual, al aplicar dosis efectivas, se puede inhibir microorganismos en la leche, los mismos que causas afecciones a las grandes producciones de medianos y grandes productores, el tratamiento de ser efectivo va a generar futuras fuentes de trabajo y dar la solución pertinente al problema de la contaminación del producto por microorganismos no deseados.

JUSTIFICACIÓN

La industria alimentaria a nivel global cada día desarrolla diferentes alimentos o realiza investigaciones de nuevos tratamientos para poder conservar y generar una extensión de la vida útil de los mismos, buscan diferentes tratamientos que no sean agresivos, como los ya tradicionales, por ende, se ha incrementado el estudio de nuevos tratamientos alternativos para la conservación e inhibición de microorganismos. El uso de la nanotecnología en los alimentos en nuestro trabajo tiene como objetivos fundamentales, mediante la experimentación previa ofrecer un tratamiento no térmico para la inhibición de microorganismo en la leche, mediante la aplicación directa en el producto y realizando un análisis microbiológico verificar el potencial de las nanopartículas de cobre sobre dichos microorganismos, enfocados en la inhibición de estos, sin afectar los beneficios que brinda la leche. A nivel global se ha incrementado el uso de alternativas a la pasteurización, ya que dicho tratamiento térmico, aplica temperaturas que no solo inhiben a los microorganismos, sino que, generan daños colaterales a otras propiedades de los alimentos. Nuestra investigación ofrece un tratamiento alternativo, es un camino nuevo en la exploración, donde se proyecta a futuro a seguir indagando sobre el uso de nanopartículas de cobre en la industria alimentaria.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de nanopartículas de iones de cobre sobre la reducción de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de leche cruda como un tratamiento alternativo no térmico a la pasteurización para asegurar la calidad e inocuidad de la leche cruda.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de las nanopartículas de iones de cobre sobre coliformes totales y *E. coli* en leche cruda para observar su posible efecto como un método alterno no térmico a la pasteurización.
- Analizar la influencia de las nanopartículas de iones de cobre sobre la leche tratada realizando los debidos análisis para asegurar la calidad fisicoquímica de la misma.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación: ¿Es posible que las nanopartículas de cobre inhiban el desarrollo de coliformes totales y *E. coli* en leche cruda sin afectar a su inocuidad y a la calidad fisicoquímica de la misma?

Hipótesis nula: Nanopartículas de cobre no inhiben el desarrollo coliforme totales y de *E. coli*.

Hipótesis alternativa: Nanopartículas de cobre inhiben el desarrollo de coliformes totales y *E. coli*.

Variable independiente: Concentración de nanopartículas de cobre (ppm)

Variables dependientes: pH, Densidad relativa, Contenido de grasa, Acidez titulable, Proteínas, coliformes totales y *Escherichia coli*.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Leche cruda

Se define como leche a un producto cuya composición es integral, es decir que no se encuentre adulterada ni alterada, que no contenga calostro. Su ordeño debe ser higiénico, libre de contaminación, debe ser frecuente y sea de forma completa e interrumpida y sea obtenida de un ganado sano y que cuente con una correcta alimentación, cuidando la calidad de la leche. Una leche de alta calidad aquella que posee un sabor agradable, olor característico a lácteo, de color blanquecino opalescente o ligeramente amarillo, con una composición química adecuada, que no posee contaminantes patógenos. (Pillco, 2023).

1.1.1 Generalidades de la leche cruda

Una vez ordeñada la leche debe pasar a enfriarse y almacenarse para su posterior distribución donde será procesada para el consumo, en la leche la calidad es un tema de gran importancia tanto a nivel nacional como internacional, la ingesta de leche cruda incluyendo a sus derivados pueden generar un riesgo, cuando no se siguen todas las medidas previamente establecidas con el fin de obtener un producto que sea inocuo para que así no perjudique la salud humana. (Hernández, Amaya, & Silvera, 2020)

1.1.2 Composición de la leche cruda de vaca.

Entre la composición de la leche cruda se encuentran 55 tipos de nutrientes que son esenciales, sin embargo, aunque posee varios tipos de vitaminas carece de hierro y vitamina D. Los nutrientes que tiene la leche cruda se ven influenciados por ciertos factores como: el tipo y la raza del ganado, la alimentación del mismo, periodo de lactancia, número de partos, genética. Se considera que una gran parte de las proteínas y de la grasa en la leche puede aportar varios nutrientes al consumidor final, de igual forma estos pueden mejorar el rendimiento y la calidad de gran parte de los derivados de la leche. (Pillco, 2023). En la tabla 1 se puede visualizar de forma específica la composición de la leche cruda de vaca.

Tabla 1. Composición de la leche cruda de vaca.

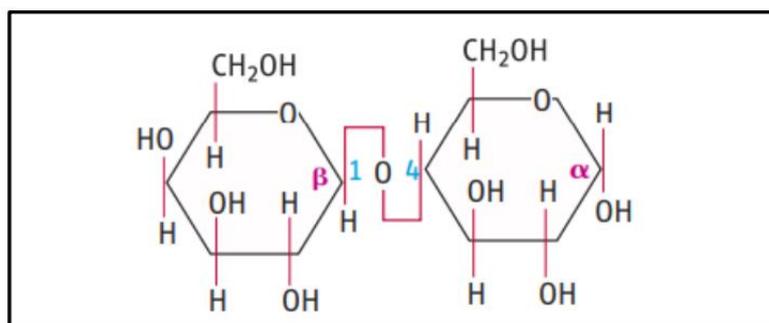
COMPOSICIÓN	LECHE DE VACA
Agua	70-80 %
Grasa	3,6 %
Solidos no grasos	9,0 %
Lactosa	4,7 %
Proteína	3,2 %
Ceniza	0,7 %

Fuente: Pillco Guamán, J. M. (2023). Evaluación de las características sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas de la leche cruda del criadero “Brown Swiss Jr”,

1.1.2.1 Hidratos de carbono en la leche

Los hidratos de carbono llegan a representar cerca de un 5 % total de la estructura de la leche, de este porcentaje la lactosa es la que se encuentra en una mayor cantidad, en la Figura 1 se puede visualizar la estructura de la lactosa, la cual es en su mayoría el hidrato de carbono con más presencia. La lactosa es un tipo de azúcar reductor, es decir que es un disacárido que en su composición contiene una molécula de D-glucosa y una D-galactosa, estas se unen a través de un enlace glucosídico. (Pilco,2023)

Figura 1. Estructura de la lactosa.



Fuente: Pillco Guamán, J. M. (2023). Evaluación de las características sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas de la leche cruda del criadero “Brown Swiss Jr”,

1.1.3 Microbiología de la leche cruda

La microbiológica se relaciona con la carga y variedad del microorganismo, también con la flora que produce enzimas termorresistentes y con la flora inocua debido a la mala higiene realizada durante el proceso de ordeño, el transporte y el almacenamiento de la leche. Otros factores son el manejo y el estado de sanidad de la vaca, específicamente de las glándulas mamarias (Martinez & Solano de la Cruz, 2022). En la leche cruda los microorganismos que con mayor frecuencia se asocian a ella generalmente son: *Enterococcus* spp, *Aerococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Acinetobacter* spp, *Bacillus* spp, *Enterobacter* spp, *Corynebacterium* spp, *Kocurias* spp, *Pseudomonas* spp, *Listeria* spp, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* (Quigley et al., 2013). Muñoz, Botín & Esparza, (2022) y Dávila & Hernández, (2006), mencionan que la leche al ser un alimento con características ideales para la proliferación de microorganismos catalogándolo como un medio idóneo universal para el cultivo.

1.1.3.1 Microorganismo mesófilos

Son un parámetro para saber las condiciones de higiene donde se encuentra el ganado, se relacionan con la falta de higiene que tiene la leche, considerando que una leche debería contener menos de 10 000 UFC/ml para ser considerada de buena calidad (Taverna, 2002). El Recuento total de bacterias no incluye a todos los microorganismos, hay muchas que no se incluyen debido a que sus rangos de temperatura para crecer son diferentes o simplemente se les inhibió el oxígeno. Este tipo de recuentos se hace para estimar la cantidad del microbiota total de microorganismos mesófilos sin llegar a especificar ningún tipo de germen (Gutiérrez, 2014).

La cantidad de microorganismos aerobios mesófilos que se encuentran en varios productos alimenticios se han convertido en una guía microbiológica de la calidad más usado en los alimentos. Nos ayuda a descifrar si la desinfección, limpieza y control de la temperatura en los procesos industriales, su transporte y su correspondiente almacenamiento se efectúan de la mejor forma, obteniendo información concreta sobre la alteración de los alimentos, su vida útil, la descongelación sin control o cualquier fallo en el manteniendo de la temperatura a la hora de refrigerar. En la mayoría de los alimentos industrializados o de consumo con muchos de estos microorganismos se deben rechazar

para el consumo, aunque no se consideran patógenos o alteren las características organolépticas del producto alimenticio. Una elevada cantidad de este tipo de microorganismo en un alimento puede significar una gran probabilidad de que se hayan dado las condiciones óptimas para el desarrollo de bacterias patógenas de origen humano o animal (Gutiérrez et al., 2014).

1.1.3.2 Coliformes en la leche cruda

Indican una serie de microorganismos de la familia Enterobacteriácea los cuales incluyen a bacterias del género *Escherichia coli*, *Enterobacter* y *Klebsiell* que son microorganismo gram negativo que generalmente son capsulados, son no esporulados que fermentan la lactosa y producen cuadros de mastitis que van de ligera a severamente agudo. La presencia de este tipo de bacterias indica un bajo control higiénico del ordeño que incluye la limpieza de la piel de los pezones, las manos y las pezoneras y la exposición de propia leche con el material fecal del animal (Vásquez, Martínez, Mancera, Ávila, & Vargas, 2007).

EPA (2002), indica que los coliformes no representan una amenaza en la salud, estos se determinan para poder indicar si existe alguna presencia o ausencia de algunas bacterias que puede o no ser un patógeno. En los alimentos la presencia de estos nos da un indicio de que los productos alimenticios pueden tener una contaminación con heces fecales ya sean de animal o humano. Los microorganismos que producen enfermedades son los patógenos y estos se encuentran en las heces pueden causar retortijones, diarrea, cefaleas, náuseas entre otros síntomas y pueden llegar a representar un peligro para la salud para niños, bebés y personas con sistemas inmunológicos gravemente comprometidos.

1.1.3.3 *Escherichia coli* en leche cruda.

Existen muchos indicadores para poder comprobar la calidad sanitaria que tiene un alimento, la detectar *E. coli*, es de suma importancia, su presencia significa que existe una contaminación indirecta o directa que procede de origen fecal, cabe recalcar que en la mayoría de los casos estas vienen acompañados de otro patógenos intestinales. (Guillen, Millán & Araque, 2014). Lo antes mencionado genera una pérdida en la producción lechera y así mismo existe una disminución en ventas, recalcando que incrementa el

riesgo de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAS) en el consumidor final. (Mariscal, Ibáñez, Gutiérrez, 2013). *E. coli* causa varias infecciones con una importante causa de mortalidad al rededor del mundo, siendo estas cepas capaces de provocar varios tipos de enfermedades que se dan por varios factores de virulencia, algunos de estos son: adhesina de la fimbria tipo 1 (fimH), fimbria P (papAH), cápsula polisacárida específica del grupo II (KpsMt II), proteína específica uropatógena (usp), sideróforo yersineabactina (fyuA), entre otros. (Pitout, 2012).

1.1.4 Características Fisicoquímicas de la leche cruda

Las propiedades físicas que posee la leche se la pueden evidenciar en la siguiente tabla:

Tabla 2. Características de la leche cruda

PARÁMETROS	INTERVALOS
Punto De Congelación	-0,53° C a -0,45° C
Punto De Ebullición	0,15° C a 100,17° C
Densidad	1,030 a 1,033 mg/l
Viscosidad	1,23 μPa.s
Calor Específico	0,93 J.kg
Índice De Refracción	1,35
Conductividad Eléctrica Específica	40 x 10 ⁻⁴ mhos/25° C a 50 x 10 ⁻⁵ mhos/25° C

Fuente: Características de la leche (Artica, 2014).

En cuanto a la leche entera de ganado bovino en su composición contiene un valor promedio de: 3,6% de proteínas, 4,60% de grasa, sólidos totales 14,1%, el calcio fluctúa entre 15% y 18%, fósforo entre 10% y 12% y agua entre 85,0 y 89,9% (De los Reyes et al., 2010). El porcentaje de lactosa en la leche es de un 5% siendo relativamente constante y su rango oscila entre 4,8% a 5,2%. La lactosa se compone por una proporción de moléculas que son: glucosa (14 mg/100 g) y galactosa (12 mg/100 g) (Cid, 2006) y según Astiasarán y Martínez (2003), la leche obtenida del ganado vacuno tiene en su composición aproximadamente un 0,03% de ácido láctico.

La leche tiene cantidades minúsculas de otros minerales, como cobre, hierro, cinc, yodo, manganeso, boro, estaño, titanio, vanadio, rubidio, silicio, litio, estroncio, cromo, bario, germanio, cobalto entre otros. Por otro lado, también tiene enzimas como Proteasa (galactasa), lipasa, amilasa, catalasa, reductasa, peroxidasa, fosfatasa, lactasa (Luquez, 2001).

1.2 Leche Post tratamiento térmico

La leche luego del proceso de ordeño circula al proceso de higienización y pasteurización, tratamiento que ayuda a conservarla, además de ello logra desactivar enzimas y causa la muerte entrópica de los microorganismos, no obstante, causan un deterioro tecnológico de gran magnitud sobre el valor biológico, proteínas, vitaminas y sobre las características organolépticas como el color, olor y sabor. Dicho perjuicio está relacionado directamente con la temperatura y el tiempo a la que se someta durante el tratamiento de calor, existen modificación tales como las miscelas de caseína y los glóbulos de grasa, los cuales son frágiles y su estabilidad es determinada por las fuerzas físicas de interacción molecular se ven afectadas por el calor. (Valdivia,2017)

1.3 Producción de leche a nivel nacional

En Ecuador la producción de leche produce una fuente de empleo a 1.3 millones de personas; siendo la gran mayoría de estos beneficiarios de pequeñas y medianas producciones los cuales aportan cerca del 65% del total de leche que se produce a nivel nacional, siendo el ordeño tipo manual el que más se usa, esto se debe al número de ganados que se disponen, presentando deficiencias en la parte higiénica a la hora de obtener la leche. De igual forma la gran parte de estos procesos industrializados se efectúan de forma artesanal (Puga, Meneses Cunama & Meneses Pineda, 2023). En 2021 la producción de leche se registró en 5,7 millones de litros; el 74,85 % se destinó a la venta líquida, el 16,39 % se procesó en otros productos alimenticios, el 6,76 % fue para terneros y el 2 % restante para alimentación en balde y para otros fines (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC], 2023).

1.4 Normativa Ecuatoriana para Leche cruda

La Normativa NTE INEN 9:2012 establece cuales son los requisitos que tiene que debe cumplir la leche cruda que se destinara al procesamiento, definiendo como leche cruda como aquel producto que se obtiene de la secreción mamaria de los animales bovinos lecheros y sanos, esta leche no debe haber sufrido ningún tratamiento térmico, salvo el enfriamiento para mantener conservada sus propiedades y no haya sufrido ninguna modificación o alteración en su composición.

Los requisitos específicos que establece la norma NTE INEN 9:2012 son: organolépticos los cuales incluyen color blanco opalescente o ligeramente amarillento, debe estar libre de olores extraños, olor suave característico a lácteo, debe tener un aspecto homogéneo que esté libre de materias extrañas; los requisitos físicos y químicos incluyen densidad relativa, proteínas, materia grasa, solidos totales, acidez titulable, solidos no grasos, punto de congelación, cenizas, entre otros; También están los límites máximos para contaminantes como el plomo y las aflatoxina M1; los requisitos microbiológicos que incluyen recuento de microorganismos aerobios mesófilos y recuento de células somáticas; y los requisitos complementarios los cuales incluyen el almacenamiento, envasado y el traslado de la leche cruda el cual se tiene que realizar según lo que indica el reglamento de leche y productos lácteos del ministerio de salud pública.

1.5 Generalidades del cobre

El cobre es un micronutriente el cual es necesario para la vida del ser humano, este cumple con funciones como la catálisis de enzimas en el sistema del metabolismo tisular, también efectúa una transferencia de electrónica e interactúa con el hierro en la síntesis de hemoglobina interfiriendo en la prevención de anemia. Este mineral también interfiere en la formación de huesos y mantiene a la vaina mielítica del sistema nervioso. Este se absorbe en el tracto gastrointestinal y son las proteínas lábiles del plasma las cuales se encargan de llevarlo a todos los tejidos. Las necesidades diarias de cobre se estiman en 2,0 mg o menos porque esta cantidad se puede adquirir fácilmente con una dieta equilibrada consumiendo alimentos ricos en cobre como nueces, riñón, mariscos e hígado. La máxima cantidad de cobre que se puede tolerar antes de producir hepatotoxicidad es de

10 mg, se recomienda que la ingesta de este mineral sea de 0,6 mg para infantes, 1,0 para niños y para adultos y adolescentes de 2,0 mg de ingesta diaria (Paulina Silva, 2012).

1.5.1 Toxicidad del cobre

De forma general la toxicidad del cobre es rara debido a que el ser humano regula su excreción por vía biliar, por lo tanto, una intoxicación se puede dar por una posible obstrucción en el ducto biliar con acúmulo hepático de cobre. Entre los síntomas que produce la toxicidad están náuseas, hemorragias gastrointestinales, diarrea, vómitos, anemia hemolítica y dolor en parte abdominal. Una ingesta excesiva de cobre puede llevar a una cirrosis hepática que se conoce como la enfermedad de Wilson (Turnlund, Shils, Shike, Ross, Caballero, Cousins, 2006). La exposición al cobre en dosis altas provoca efectos letales y una dosis baja puede llevar a efectos crónicos, ya que el cobre es altamente tóxico, esto es debido a que en su estado Cu^{+2} participa en reacciones que producen radicales de hidroxilo libres, peróxido de hidrógeno y además del anión superóxido. Estas reacciones atacan a las biomembranas mediante la peroxidación lipídica desestabilizando la estructura y afectando las funciones de la célula. Estas estructuras tienen la capacidad de oxidar a las proteínas y desnaturalizar el ADN y ARN, ocasionando daños que pueden llegar a producir enfermedades como Cáncer, envejecimiento en las células y enfermedades neurodegenerativas (Pizzino, Irrera, Cucinotta, Pallio, Mannino & Arcoraci, 2017).

1.5.2 Antecedentes del consumo de cobre

El cobre funciona como parte de una serie de metaloenzimas las cuales actúan como oxidasas que ayudan a reducir el oxígeno molecular. Este componente se involucra en la respiración de las células, la defensa antioxidante, formación de los tejidos colectivos, la biosíntesis de neurotransmisores, homeostasis del hierro, entre otras. El contenido de cobre puede afectarse por la cantidad de alimentos, por lo que es diferente para cada alimento exceptuando a los que no tienen cobre en su composición. La cantidad de cobre en los alimentos se puede calcular de forma inapropiada por el cada 100 Kcal, 100 gramos en el caso de los sólidos o 100 mililitros en el caso de los líquidos o RACC (cantidades de referencia normalmente consumidas) (Forouzesh, Forouzesh Fatemeh, Foroushani, Forouzesh & Zand, 2021).

1.5.3 Presencia de cobre en alimentos

El cobre es un alimento que forma parte de las necesidades de nuestra alimentación y es por esta razón que se debe consumir en cantidades determinadas por entidades reguladoras como FAO o la OMS. El ser humano no puede producir este mineral por lo que se ve obligado a consumirlo en diferentes tipos de alimentos y en el agua (Mehrani, Ebrahimzadeh, Asgharinezhad, & Moradi, 2019). El cobre puede variar según su origen, un ejemplo es en las industrias lácteas donde usan recipientes de cobre que aportaron cierta concentración de este mineral al alimento. Entre los alimentos con un elevado contenido de cobre son: los mariscos, los huevos, cereales, cacao, papas, legumbres, carnes, productos lácteos, entre otros. (Llontop, 2016).

1.6 Nanotecnología en la industria alimentaria

La nanotecnología como una ciencia como tal, se encarga del estudio y la manipulación de átomos a una escala nanométrica, entre ellas se encuentra su estudio en el área de alimentos. Es de suma importancia ya que incrementa el uso de nanoestructuras para dar un valor nutritivo, poder mejorar la textura, eliminar olores no deseados, gelatinizar productos, estabilizar espumas y además realizar emulsiones los cuales contengan nanotransportadores o los llamados nano materiales, los cuales mejoran la biodisponibilidad de las sustancias nutritivas, vitaminas, nutrientes, minerales o proteger con el uso de nano películas comestibles. (Mejia, 2019)

Las nanopartículas de cobre son de suma importancia en todas las industrias, lo cual permite controlar características de un material como: tamaño, forma y morfología, composición química y configuración molecular para mejorar o desarrollar nuevos procesos y propiedades del producto. A escala de industrias alimentarias se puede determinar tres categorías principales de aplicación de la nanotecnología que se debe tener conocimiento, como es la producción agrícola, aditivos alimentarios y funcionales. El uso de nanopartículas en productos alimenticios permite asimilar y digerir rápidamente los alimentos, lo que beneficiará la salud humana, cambiar la composición de los alimentos consumidos por una persona con la ayuda de nanopartículas le permitirá controlar el contenido de sustancias nocivas y beneficiosas que contiene. (Ojeda et al., 2019).

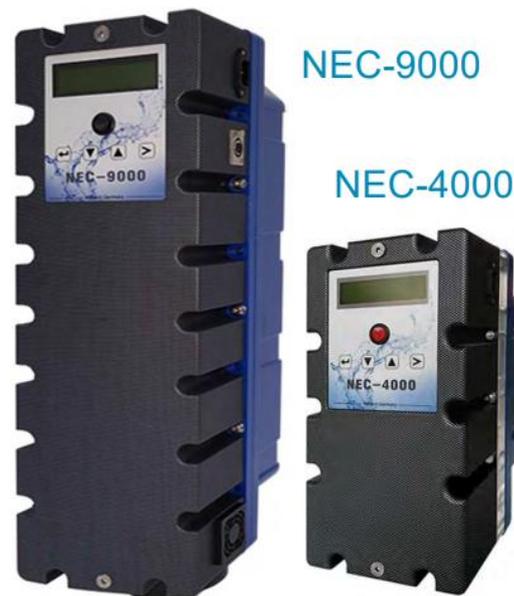
1.7 Nanopartículas de cobre

Las nanopartículas de cobre (NPsCu) son de alto interés, a medida que la innovación y el tiempo transcurre se ha evidenciado que sus propiedades se diferencian de las partículas de mayor tamaño cuántico, lo cual ha demostrado ser efectiva ante microorganismos en todo tipo de superficies, varias investigaciones compilan con resultados favorables las cuales se enfocan en su capacidad de poder inhibir microorganismos patógenos. (Guzmán et al., 2020; Gutiérrez y Cornejo, 2017).

En la industria alimentaria, las Nanopartículas de cobre destacan por su potente actividad antimicrobiana, se la emplea por ser anticancerígena y transportador de fármacos, por su gran aumento de la resistencia a ciertos antimicrobianos se la utiliza como microbicidas. (Pacheco, 2022; Calderón et al., 2022)

El sistema NECON erradica de manera eficiente bacterias, hongos, algas y biopelículas del agua y los sistemas de abastecimiento de agua, sin ser corrosivo, irritante o cáustico, es neutro en cuanto a sabor y olor y, de acuerdo con la OMS y las directrices nacionales, es seguro para los humanos incluso en exposición a largo plazo. El equipo NEC-4000 tal como se evidencia en la Figura 2 se usa para la técnica de NPsCu, lo que nos permite obtener agua ionizada, para ello se debe usar agua purificada como insumo, dotado por un microprocesador electrónico y electrodos que cede iones de cobre. Se debe tener en cuenta que debe haber una bomba de agua para facilitar el paso constante y uniforme de agua a través del equipo, de forma que el agua y resultante este ionizada a la concentración que se requiere. Por ende, el motivo de la investigación es verificar la utilización de la técnica en la leche cruda, observando si realiza una correcta inhibición de los microorganismos patógenos al igual que los realiza en el agua. (Cuenca & Medina, 2022; NECON GmbH ,2019).

Figura 2. Últimas gamas de modelos de sistema Necon.



Fuente: *NECON GmbH (2019).*

1.7.1 Características de las nano partículas ionizadas de cobre

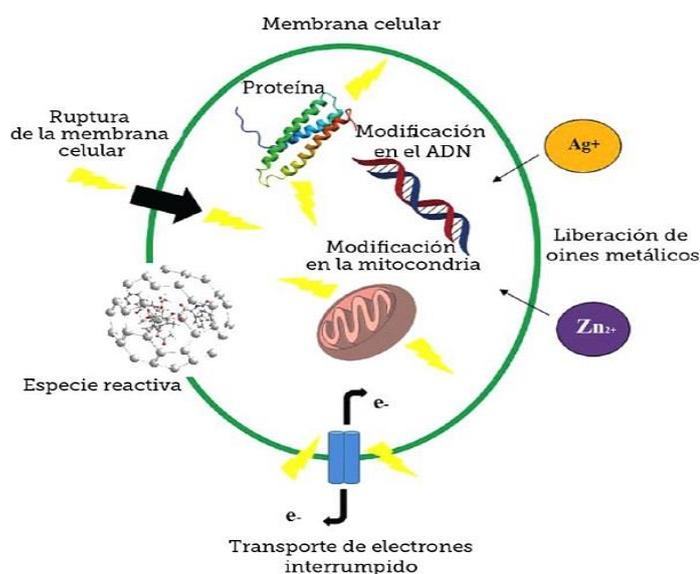
Las nanopartículas (NPs) de origen metálico y de óxido de metales han sido objetivo de estudios en la ciencia y la ingeniería debido a que poseen entre sus propiedades características ópticas, electrónicas, físicas y metálicas. Entre las características que poseen las NPs se tienen una alta relación del área superficial/volumen, esto favorece el incremento de la energía interfacial, su reactividad, la eficiencia para la absorción y su capacidad para ser funcionalizadas con otras moléculas de interés. Una de las características de las NPs metálicas son sus propiedades antimicrobianas. Las nanopartículas de cobre poseen dichas capacidades y, además, estas poseen un bajo costo y son de fácil obtención. Este tipo de nanopartículas han sido usadas para múltiples aplicaciones como en la fabricación de fungicidas y bactericidas (León, Orozco, & López, 2023).

1.7.2 Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre

A lo largo de la vida diaria múltiples bacterias siempre están presentes, algunas no representan un peligro para la salud, sino al contrario, benefician a las personas y al ecosistema. Las bacterias nos ayudan a preservar la vida, en el caso de las personas están pueden llegar a protegernos de varias enfermedades al competir con otros microorganismos de carácter infeccioso que intenten invadir el organismo, ayudan a sanar heridas, facilitan la digestión de los alimentos, aportan vitaminas y ayudan a fermentar de forma saludable alimentos como el yogurt, el vino o el queso (Britto, Cortez & Flores, 2022).

Sin embargo, así mismo un grupo de bacterias se las considerada patógenas, porque son capaces de perjudicar la salud, así mismo también existen algunos virus y hongos los cuales pueden causar daños a las personas, animales y plantas. Las nanopartículas metálicas han demostrado llegar a ser una gran alternativa para el control de estos microorganismos, debido a que pueden penetrar la pared celular de las bacterias causando muerte celular (Figura 3.) (Britto et al., 2022).

Figura 3. Representación esquemática del efecto antibacterial de las nanopartículas.



Fuente: Lira Saldivar R y colaboradores. Potencial de la nanotecnología en la agricultura, (2018)

Los estudios sobre la acción tóxica de las NPs que provocan la inhibición del desarrollo de bacterias y esto se puede atribuir a dos circunstancias: una es la capacidad que tiene la nanopartícula para adherirse a la membrana de la bacteria a través de una interacción de origen electrostático que causa una despolarización y una alteración de su integridad esto lleva a una filamentación de la célula; la otra es la internalización de las NPs a través de los poros que tiene la membrana bacteriana debido al tamaño minúsculo, esto produce una solubilidad en la mismas lo puede generar una formación de radicales libres, aplicando esto para aquellas especies que son reactivas de oxígeno y peroxidación de los lípidos. Esto puede llegar a causar un estrés oxidativo para la bacteria porque desestabiliza la estructura de la membrana, causa una interrupción en el transporte de electrones, oxida sus proteínas, provoca una degradación del DNA, destruye y perturba la mitocondria lo que lleva al microorganismo a su muerte (Sánchez, Pillaca, Landauro, Ramirez, Lovera, Bernaldo, Eca, & De la Cruz, 2016).

Las nanopartículas de cobre, se han determinado que cuentan con la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, varios autores destacan que el mecanismo de acción, tienen a presentar ciertos cambios, los cuales se debe a su tamaño y forma de la partícula, así también como influye la liberación de iones y la interacción de estos con la pared celular de las bacterias, cabe recalcar que dichas variaciones van a ser de gran significancia al momento de la inhibición de los mismos, para poder determinar el poder del mecanismo de acción de las nanopartículas de cobre, pero se debe tener en cuenta que una de las principales características de las nanopartículas de cobre es que presentan alta actividad antimicrobiana y que la liberación de sus iones se efectuó en periodo de largo plazo. (Sanchez, 2017)

1.8 Aplicación de las nanopartículas de cobre en la leche.

Las nanopartículas de cobre se las emplea por que ayudan a mejorar y conservar la calidad de la leche proporcionando propiedades antibacterianas y antifúngica, evitan la proliferación de bacterias y hongos, lo que además pueden prolongar la vida útil y mantener la calidad del mismo. (Garay & Jaramillo, 2022)

1.9. Riesgos potenciales de las nanopartículas de cobre en la leche

Existen diversos factores que se deben de tomar en consideración, como la toxicidad, las nanopartículas de cobre pueden ser tóxicas para las personas si son ingeridas en grandes cantidades o durante periodos prolongados, la cantidad de nanopartículas de cobre en la leche es de 1.0-1.07 mg/L día, la ingesta de nanopartículas de cobre en grandes cantidades puede causar efectos como daño hepático y renal. (Crisan, Teodora & Lucian, 2021).

1.10 Regulación y Normativa

La organización mundial de la salud (OMS) ha establecido diferentes directrices para la evaluación de la seguridad de los alimentos que contienen nanopartículas. La Unión Europea (UE) ha establecido regulaciones en alimentos, incluyendo la obligación de etiquetar los productos que contienen nanopartículas. En los Estados Unidos, la administración y medicamentos (FDA) es la encargada de regular el uso de nanopartículas en alimentos (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, 2016).

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Método de obtención de nanopartículas de cobre

Se emplea el equipo NEC-4000 para obtener las nanopartículas, dicho equipo permite obtener agua ionizada con el componente mencionado. El agua usada como componente principal es agua purificada. El NEC-4000 contiene entre sus componentes un microprocesador electrónico y electrodos de intercambio que nos sirven para ionizar el agua, estos se activan con un flujo de corriente continua (12 Amperes) que pasa a través de ellos y les permite ceder iones de cobre (la concentración de iones de cobres es directamente proporcional al flujo de corriente). En este proceso de obtención se mantuvo un flujo constante de agua de entrada, en la salida se mantuvo un flujo de agua pequeño para darle tiempo al electrodo a que cargue el agua con iones de cobre.

2.1.1 Aplicación de iones de cobre en leche cruda

Una vez obtenida el agua con una alta concentración de iones de cobre, se realizó un análisis del agua purificada ionizada para saber la concentración exacta. Para ello se envió una muestra de agua purificada tratada con NPS de cobre al laboratorio NEMALAB ubicado en la ciudad de Machala, parroquia el cambio en la Av. Ferroviaria. Posterior a ello se decidió hacer una dilución la cual se realizó de acuerdo a la *ecu. 1.*, para obtener una muestra con menor concentración, mientras que, para la segunda muestra se dejó la concentración inicial. Una vez obtenida ambas concentraciones se realizó una mezcla con una proporción de 75 % leche y 25% agua purificada tratada con NPs de cobre.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad \text{ecu. 1}$$

Donde:

C_1 = Concentración inicial

V_1 = Volumen inicial

C_2 = Concentración final

V_2 = Volumen final

2.1.2 Cuantificación de iones cobre residuales

Para determinar el porcentaje de las nanopartículas de cobre en la leche, se debe hacer un análisis residual en las muestras tratadas para establecer si está en el rango permitido en alimentos (Martínez Guijarro, 2020). Las muestras se enviaron al laboratorio NEMALAB S.A para su respectivo análisis de cobre residual, donde se empleó la técnica de espectroscopia de absorción atómica.

2.2 Análisis microbiológicos en la leche

Para los ensayos microbiológicos se utilizaron metodologías adecuadas para el análisis de leche pasteurizada, alineadas con lo que se establece en la Norma INEN 10:2012. Se realizaron los ensayos especificados para aerobios mesófilos, *Escherichia coli*, Coliformes totales, antes y después de aplicar el tratamiento. Para efectuar estos análisis, se debe asegurar que todo el material a utilizar esté perfectamente limpio y desinfectado, incluyendo el área de trabajo, que debe mantener estas mismas condiciones. Se debe realizar un adecuado control sobre la carga microbiana del aire la cual debe estar controlada durante el ensayo, además las diferentes áreas del laboratorio deben estar libres de insectos y polvo.

2.2.1 Recuento de microorganismo aerobios mesófilos (RAM)

La leche cruda y la leche tratada deben evaluarse en su calidad microbiológica, por lo tanto, esto se realizó por medio de un recuento de aerobios mesófilos por duplicado por cada muestra, según la norma NTE INEN 1529: 2006.

El agua peptona al 1% y el agar nutritivo fueron preparados y esterilizados de acuerdo a las indicaciones establecidas por el fabricante. Se preparó una solución madre añadiendo 10 ml de leche cruda (muestra control) o tratada (4 y 11 ppm) en 90 de agua peptona al 1%, y a partir de esta se realizaron diluciones decimales en el orden de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . En condiciones estériles y con ayuda de una micropipeta, se tomó 1 ml de cada dilución y se depositó en cajas Petri bien identificadas para diferenciar las muestras tratadas de las muestras control. Inmediatamente, se vertieron aproximadamente 20 mL de agar Nutritivo, fundido y templado a 45°C , en cada placa. El inóculo se mezcló con el medio de cultivo mediante un ligero movimiento en forma de balanceo (5 movimientos en el sentido de las manecillas del reloj y 5 en sentido contrario). Una vez solidificado el agar, las placas se cerraron herméticamente con cinta de papel para evitar la contaminación cruzada y se incubaron durante a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24-48h, pasado el período de incubación se procedió al recuento de las colonias. El recuento de las UFC/ml de la leche cruda y tratada con Cu se realizó de acuerdo a la ecu. 2. Se tomaron en cuenta las placas que contenían entre 15 a 300 colonias.

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d} \quad \text{ecu 2.}$$

Σ_c = sumatoria de cada colonia en todas aquellas placas que se seleccionaron

V = Volumen que se inocularon en la caja Petri

n_1 =Número de placas en la primera dilución seleccionada

n_2 = Número de placas en la segunda dilución seleccionada

d= Factor de la dilución en la primera dilución seleccionada (d= 1 cuando se ha inoculado una muestra líquida sin diluir)

2.2.2 Recuento de *E. coli* y coliformes totales

El recuento de *E. coli* y coliformes totales se realizó de acuerdo con lo establecido en la Norma AOAC 991.14. Para evaluar la calidad microbiológica de la leche cruda, se utilizaron placas 3M Petrifilm® *E. coli*/coliformes (ECC). En primer lugar, se colocó la placa Petrifilm en un lugar de superficie plana, posterior a ello se levantó el film superior,

con la ayuda de una pipeta colocada perpendicularmente a la placa, se depositó 1 ml de la muestra centrado en la placa. Luego, con mucho cuidado se acento el film de la parte superior, cuidando que no se formen burbujas de aire. Posteriormente, cuando se bajó la cara lisa, se puso el difusor sobre el film superior y, con precaución, se ejerció presión con el fin de distribuir el inóculo sobre toda el área circular, se esperó un minuto a que se solidifique el gel y luego se procedió a incubar las placas con la cara hacia arriba en pilas de cinco, durante 24 horas para coliformes y 48 horas para *Escherichia coli*. Las lecturas de las placas Petrifilm se realizaron con un contador de colonias estándar. El recuento de UFC/mL se realizó de acuerdo a la 2. Se tomaron en cuenta las placas que contenían entre 15-150 colonias por placa.

Según la AOAC OFFICIAL METHOD 991.14, las colonias de *E. coli* confirmadas presentan un color azul o rojo-azulado que se asocia al gas atrapado en la placa de forma independiente del tamaño o la intensidad de su color, sin contar las colonias azules que no presentan gas. Mientras que las colonias rojas y asociadas a burbujas de gas corresponderán a coliformes totales.

2.3 Análisis Físicoquímicos en la leche tratada con iones de cobre

Todos los análisis físicoquímicos se efectuaron por duplicado en la misma muestra.

2.3.1. Determinación de densidad relativa

Se sostuvo la probeta inclinada y se vertió la leche hasta llenarla con el fin de no formar espuma y la introducimos en un baño de agua procurando que el nivel de agua se encuentre de 1 cm a 3 cm por debajo del borde de la probeta. Cuando la temperatura de la leche se estabilizó se determinó su valor con un termómetro y se registró con una letra t. Sumergimos el lactodensímetro con cuidado hasta que se acercó a su punto de equilibrio e imprimamos un pequeño movimiento de rotación con el fin de que se una a las paredes de la probeta. Cuando el lactodensímetro quedo en estado de reposo y no rozó las paredes de la probeta se leyó la medida de la graduación que corresponde al menisco superior y se registró el valor como d, para el cálculo de la densidad (20/20°C) se usó la fórmula que se muestra en la ecuación 3 (NTE INEN 11, 1984).

$$d_{20} = d + 0,0002(t-20) \quad \text{ecu. 3}$$

Donde:

d_{20} = densidad relativa a 20/20 °C

d = densidad aparente a t °C

t = temperatura de la muestra analizada en °C

2.3.2 Determinación acidez titulable

Se llevó la muestra a una temperatura de 20°C y se mezcló agitando levemente hasta que homogenizo cuidando que no haya separación de la grasa por la agitación. En un matraz Erlenmeyer se pesó 20 gramos de muestra con una aproximación de 0,1 mg. Se diluyo el contenido del matraz con agua destilada (volumen 2 veces mayor) y se agregó 2 cm³ de solución indicadora de fenolftaleína. Se preparó una solución al 0,1 N de hidróxido de sodio y con una bureta se cogió una pequeña cantidad de la solución, se agregó cuidadosamente a la muestra de leche y agua destilada la solución al 0,1 N de hidróxido de sodio mientras se agitaba hasta conseguir un viraje a un color rosado persistente. Se continuó agregando esta solución hasta que el tono rosado duró 30 segundos y luego se midió en la bureta el volumen de la solución que se empleó, para el cálculo de la acidez titulable se usó la fórmula que se muestra en la ecuación 4 (NTE INEN 13, 1984).

$$A = 0,090 \frac{V \cdot N}{m_1 - m} \cdot 100 \quad \text{ecu. 4}$$

Donde:

A = acidez titulable de la leche, en porcentaje en masa de ácido láctico.

V = volumen de la solución de hidróxido de sodio que se emplea durante la titulación

N = normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

m = masa del matraz Erlenmeyer sin la muestra de leche en g.

m_1 = masa del matraz Erlenmeyer con la muestra de leche, en g.

2.3.3. Determinación de contenido de grasa y proteínas

Para la determinación de contenido de grasa y proteínas, se envió una muestra de la leche tratada con iones de cobre y una muestra de leche sin tratar al laboratorio LASA, el cual emplearon la normativa INEN 10:2012 Leche Pasteurizada. Para poder determinar un cambio en la misma. El método de ensayo que se aplicó por parte del laboratorio fue normativa INEN – ISO 8262-3 para Grasa total y para Proteínas fue la normativa INEN-ISO 20483.

2.3.4 Análisis estadístico.

Se expresó todos los resultados de los análisis microbiológicos como la media \pm la desviación estándar, se realizó el posterior análisis estadístico de los mismo, para ello se empleó el software estadístico Infostat v.2008 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los valores del recuento de UFC/mL de RAM, *E.coli* y coliformes totales se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con el fin de encontrar diferencias significativas entre tratamientos. Con la aplicación de un test a *posteriori* de comparación de medias Tukey (con un nivel de confianza del 95 %). Los datos se transformaron en logaritmo 10 (log 10) para el análisis estadístico.

CAPITULO III

3. RESULTADO Y DISCUSIONES

3.1 Tratamiento con iones de cobre

Los resultados obtenidos del laboratorio NEMALAB S.A nos indican que el agua purificada y tratada con NPs de cobre obtuvo una concentración de 11,09 ppm de cobre residual. Al mezclar 75% de leche cruda con 25% de esta agua purificada, la concentración de cobre residual disminuye a 0,55 ppm en la muestra 1, mientras en la muestra 2 esta concentración disminuye a 1,55 ppm. Esta reducción en la concentración residual puede explicarse por varias razones, entre las principales que considera esta investigación está el hecho de que el cobre puede reaccionar con microorganismos y sustancias quelantes en la leche. Los iones de cobre se unen a enzimas y proteínas de los microorganismos, inactivándolos, o dañando sus membranas celulares. Por otra parte, las sustancias quelantes, como proteínas, forman complejos estables con los iones de cobre, disminuyendo su concentración libre. Estas interacciones reducen la actividad residual del cobre en la mezcla de leche tratada, resultando en una baja concentración de cobre residual (Prado, Vidala & Durán, 2012). Otra razón es que, al añadir este componente en otro (leche) e incrementa el volumen total de la solución, la concentración del Cu disminuye. Esto se debe a que el mismo número de moles de la sustancia se distribuye en un mayor volumen, provocando un efecto de dilución.

3.1.1 Resultado de cobre residual.

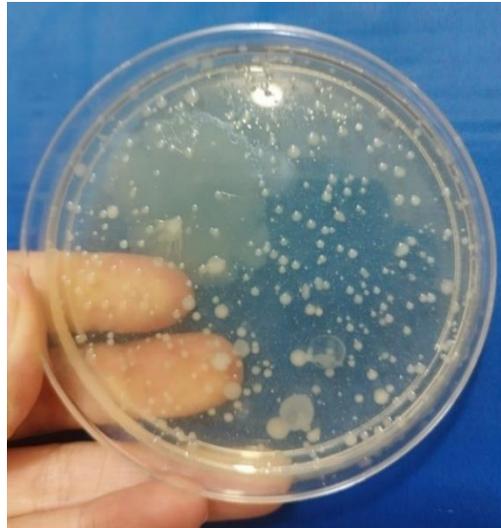
En el presente trabajo se determinó que la muestra 2 de leche tratada con 11 ppm de cobre presentaba un valor residual de 1,55 ppm. Según Taylor, Tsuji, Garry, McArdle, Goodfellow, Adams, y Menzie (2020), el consumo estimado de cobre en alimentos para adultos varía entre 0,93 y 1,3 mg/ L día, mientras que el Instituto de Medicina de los Estados Unidos establece que la ingesta diaria recomendada oscila entre 1,0 y 1,7 mg/L día, y los suplementos alimenticios contienen entre 1,3 y 2,2 mg/ L día de cobre. Además, Bost, Oberli, Kalonji, Huneau, y Margaritis (2016) mencionan que una dosis de cobre por debajo de 0,8 mg tiende a tener una baja absorción, mientras que una dosis de 2,4 mg/ L día, presenta una mayor absorción. Por lo tanto, el valor de 1,55 ppm de cobre residual

en la muestra 2 de leche tratada se ajusta adecuadamente a los límites aceptables para el consumo humano.

3.2 Presencia y efecto de microorganismos aerobios mesófilos, *E. coli* y coliformes totales en la calidad de la leche

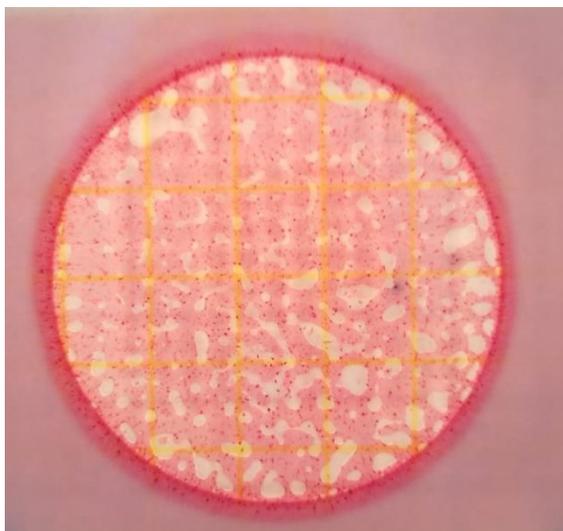
En la Figura 4 y 5. se puede apreciar un ejemplo del crecimiento de microorganismos mesófilos, *E. coli* y coliformes totales (respectivamente) de las muestras control.

Figura 4. Microorganismos aerobios mesófilos



Fuente: *Los autores*

Figura 5. *E. coli* y coliformes totales

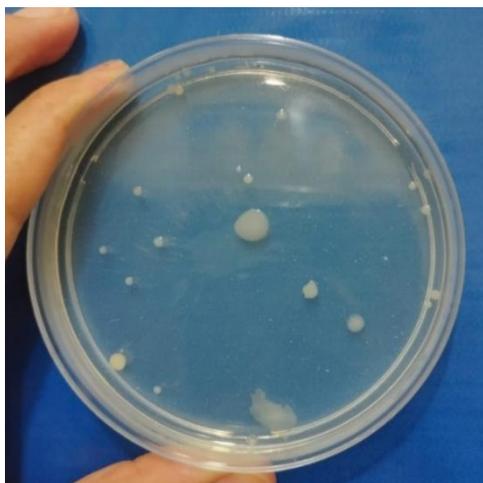


Fuente: *Los autores*

3.3 Efecto de las nanopartículas de iones cobre sobre microorganismos aerobios mesófilos, *E. coli* y coliformes totales en la calidad de la leche tratada

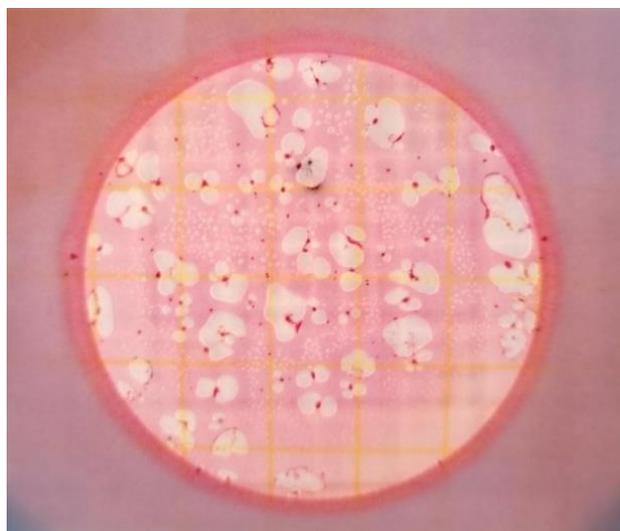
En la Figura 6 y 7. se puede observar las placas del crecimiento de los microorganismos aerobios mesófilos, *E. coli* y coliformes totales (respectivamente) de las muestras tratadas con NPs de cobre.

Figura 6. Actividad antibacteriana de las NPs de cobre en el RAM.



Fuente: *Los autores*

Figura 7. Actividad antibacteriana de las NPs de cobre en *E. coli* y coliformes totales.



Fuente: *Los autores*

En la Tabla 3 se puede visualizar los promedios obtenidos del recuento de UFC/ml para cada una de las muestras evaluadas.:

Tabla 3. Promedio de UFC/ml de microorganismos aerobios mesófilos, *E. coli* y Coliformes totales en leche cruda y leche tratada con NPs.

	RAM (UFC/mL)		coliformes totales (UFC/mL)		<i>E. coli</i> (UFC/mL)	
Control	2,3 x 10 ⁴	a	1,3 x 10 ⁴	a	1,3 x 10 ²	a
4 ppm Cu	3,3 x 10 ³	b	5,2 x 10 ³	b	75	a
11 ppm Cu	9,6 x 10 ²	c	1,7 x 10 ³	c	40	a

Fuente: *Los Autores*

Los valores obtenidos en la Tabla 3, representan en las muestras control como en las muestras tratadas con nanopartículas de cobre (NPs de Cu), el impacto significativo del cobre en la microbiota de la leche. En cuanto al RAM y coliformes totales, se observó una disminución significativa ($F_{2, 5} = 76,17$; $p = 0,027$; $F_{2, 5} = 56,54$; $p = 0,0042$, respectivamente) de UFC/ mL en las muestras tratadas en comparación a las muestras control. Sin embargo, en el recuento de *E. coli* el tratamiento con NPs de Cu no mostró

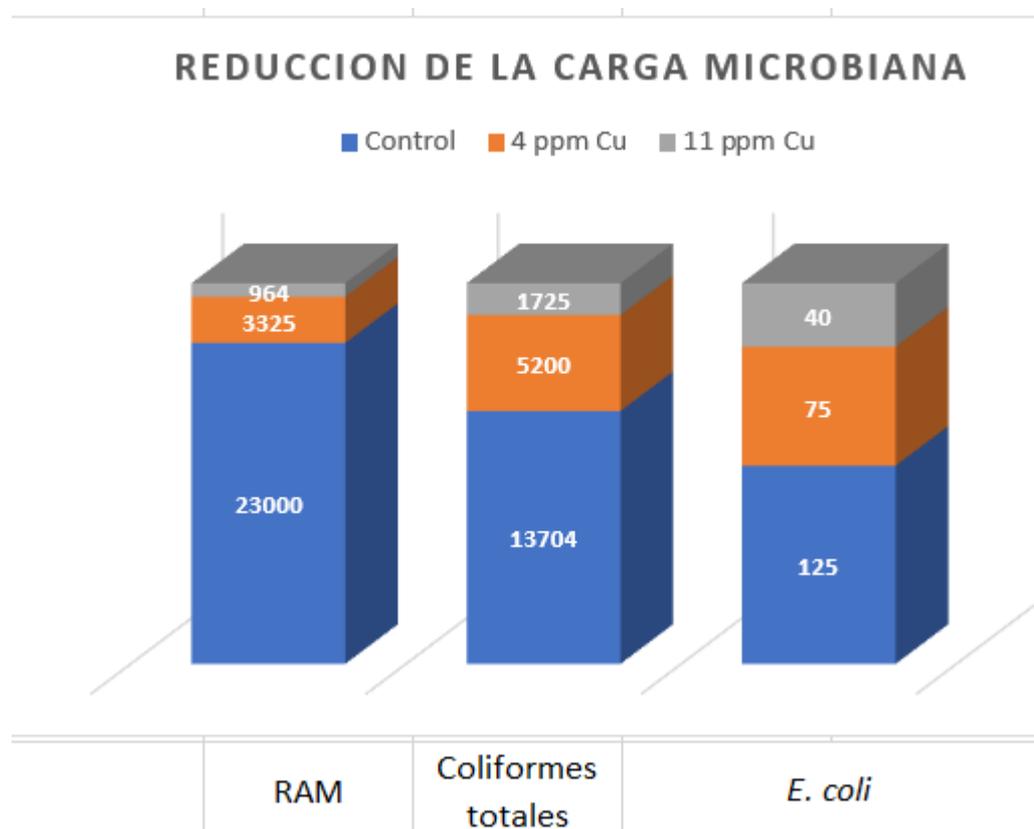
ser significativamente efectivo ($(F_{2, 5} = 2,60; p = 0,2214)$). Por otra parte, las muestras de leche tratadas con NPs de Cu también presentaron diferencia significativa entre las distintas concentraciones ensayadas, siendo la concentración más alta la que produjo recuentos significativamente más bajos de UFC/ mL en RAM y coliformes totales.

Es importante destacar que la leche cruda utilizada en los ensayos microbiológicos cumplía con los valores de recuento microbiano establecidos para aerobios mesófilos (RAM) según la norma NTE INEN 9:2015. Después de los tratamientos, los recuentos microbianos de RAM en las muestras tratadas con NPs de Cu no solo se redujeron significativamente, sino que, también se mantuvieron dentro de los límites establecidos por la norma NTE INEN 10:2012. En general, los tratamientos con NPs de Cu redujeron entre 1 y 2 unidades logarítmicas de RAM cuando las muestras se trataron con 4 y 11 ppm, respectivamente. En cuanto a los valores de coliformes totales, a pesar de la reducción significativa de UFC/mL en las muestras tratadas con NPs de Cu (una reducción logarítmica), no se logró cumplir con los valores establecidos en la norma NTE INEN 10:2012, que exige un recuento de <1 UFC/mL. Los valores de *E. coli* si bien son relativamente bajos no se acercan a los recuentos establecidos por la NTE INEN 10: 2012 para leche pasteurizada, la cual establece un valor < 10 UFC /mL.

En general, los resultados obtenidos sugieren que, las NPs de cobre tiene un efecto antimicrobiano notable, sin embargo, el efecto de las concentraciones ensayadas no es suficiente para lograr un efecto similar a la pasteurización de la leche.

En la Figura 8 se puede visualizar la gráfica de la reducción de la carga microbiana en los diferentes tratamientos con respecto al control.

Figura 8. Reducción de la carga microbiana



Fuente: *Los autores*

Hasta la finalización de la revisión bibliográfica de este trabajo de investigación, no se encontró estudios similares a este. Sin embargo y aunque no son comparables, es importante mencionar que existen estudios realizados en otras matrices, en las que se observó un efecto antimicrobiano del Cu. (Cuenca & Medina, 2022) indicó que al aplicar concentraciones de cobre con una concentración de 9 ppm lograron una reducción del crecimiento de micelio de *Fusarium spp.*, en piñas en un 50,7%, los cuales evaluaron la actividad antifúngica de nanopartículas de cobre de iones de cobre. (Garay & Jaramillo, 2022) mencionaron que, al aplicar una concentración de 2 ppm de Cu no se vio un efecto inhibitor en coliformes totales, sin embargo una concentración de 4 ppm de Cu si mostro un efecto de inhibición en este grupo de bacterias para jugo de naranja.

3.4 Efecto de las NPs de cobre sobre la calidad fisicoquímica de leche

Para comparar el efecto en las cualidades fisicoquímicas de la leche, se aplicaron los mismos análisis a una muestra no tratada y a una muestra tratada con 11,09 ppm de cobre, siendo esta última la que mejor resultados dio en la parte microbiológica. Al comparar los parámetros de la leche cruda y la leche tratada con nanopartículas (NPs) de cobre, se observa una variación que puede indicar que el tratamiento con NPs interfiere en la composición de la leche, reduciendo la cantidad de minerales o alterando su estructura.

En el caso de la densidad, se observó que la leche cruda a 15 °C tenía una densidad de 1,025 g/ml y a 20 °C una densidad de 1,024 g/ml, mientras que la leche tratada con NPs de cobre tenía un valor de 1,019 g/ml a 15 °C y 1,018 g/ml a 20 °C. Los valores de acidez fueron menores en la leche tratada, pasando de 0,047 % de ácido láctico en la leche cruda a 0,037 % de ácido láctico en la leche tratada, lo que podría indicar un efecto positivo en la reducción de la acidez, siendo ventajoso para prolongar la vida útil de la leche. No existe una diferencia significativa en lo que se refiere a porcentaje de grasa total, la leche cruda contiene 3,6 % y la leche tratada presenta un valor de 3,3% y en lo que se refiere a proteína, la leche cruda tiene un valor de 3,5% y la leche que se aplicó iones de cobre presenta un valor de 2,3% lo que nos indica que el tratamiento con NPs no afecta al porcentaje de grasa y tampoco va a realizar algún cambio significativo en la proteína de la misma. El cobre residual en la leche no se une significativamente con las proteínas lácteas como la caseína por lo que su variación va a hacer mínima, en el porcentaje de grasa el cobre puede catalizar la oxidación de los ácidos grasos insaturados de la leche, lo que podría generar una mínima afectación de la estabilidad de la grasa.

Sin embargo, estos valores no cumplen con los requisitos establecidos por la normativa NTE INEN 9:2012 para leche cruda, ni con los requisitos de la norma NTE INEN 10:2012 para leche pasteurizada, lo que sugiere que la leche adquirida para las pruebas podría haber estado alterada previamente a su adquisición o que el tratamiento con NPs de cobre altera de alguna forma la composición de la leche cruda en un porcentaje.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

- La aplicación del tratamiento con nanopartículas (NPs) de cobre ha demostrado ser efectiva en la reducción de los niveles de *E. coli* y coliformes totales en la leche cruda, disminuyendo las unidades formadoras de colonias (UFC) en al menos una unidad logarítmica. Esto evidencia un claro efecto inhibitor sobre la calidad microbiológica de la leche. Por lo tanto, a mayor concentración de NPs de cobre residuales en la leche, mayor será el efecto antimicrobiano.
- Los análisis de las características fisicoquímicas muestran cierta variabilidad entre los valores de la muestra de leche cruda y la muestra tratada con nanopartículas (NPs) de cobre. La adición de agua purificada con NPs de cobre parece afectar las propiedades fisicoquímicas de la leche, como la densidad y la acidez, impactando así en su calidad. De acuerdo con la normativa para leche pasteurizada, se ve que mantiene los rangos para porcentaje de grasa total y para proteínas, lo que se evidencia que el tratamiento aplicado no afecta significativamente a esos parámetros fisicoquímicos.
- Para la muestra de leche tratada con nanopartículas (NPs) de cobre, se obtuvo un contenido residual de cobre de 1,5 mg/L. Según las investigaciones citadas en este documento, el Instituto de Medicina de los Estados Unidos (IOM) proporciona valores de un adulto promedio que puede consumir aproximadamente 1,0-1,7 mg/L Cu / día. Lo que nos indica que el cobre residual en nuestro producto se encuentra dentro del rango óptimo permitido.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda trabajar con una concentración de cobre superior a 11,00 ppm en agua purificada para incrementar la cantidad de cobre en la leche y potenciar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas (NPs) de cobre.
- Además, se sugiere evaluar el efecto de las NPs de cobre sobre microorganismos patógenos como *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*, con el objetivo de determinar si el cobre inhibe estos dos microorganismos patógenos, lo que permitiría considerar este tratamiento como una alternativa no térmica a la pasteurización.

BIBLIOGRAFÍA

1. Artica M., L. (2014). Métodos para el análisis Físicoquímico de la leche y sus derivados. (2 ed). Huncayo. Editorial Libros y Editores S.A. Huancayo, Perú, 173 p.
2. Association of Analytical Communities (AOAC). (2006). Testing Disinfectants Against Salmonella choleraesuis. In: Official Methods of Analysis of AOAC International: Chapter 6 – Disinfectants. USA; Edición actual.
3. Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (2016) Scientific Opinion on the safety of cooper.
4. Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J. F. y Margaritis, I. (2016). Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.02.006>
5. Britto Hurtado, Cortez Valadez & Flores Acosta, (2022). Aplicaciones tecnológicas de las nanopartículas en la medicina e industria. Universidad de Sonora, México).
6. Calderón, C. M., Lara, L. J. D. S., Montes, M. F. L., Recinos, G. J. F., Schmidt, D. E. P., & Navarro, M. L. R. Las nanopartículas de cobre como agente antimicrobial. Revisión de la Literatura. Directorio Revista ADM Estudiantil, 13.
7. Cárdenas et al ., (2018) Uso de pruebas afectivas, discriminatorias y descriptivas de evaluación sensorial en el campo
8. Chang Raymond & College Williams. (2002). Química-Septima edición. McGRAW-HILL Interamericana editores, S.A. DE C.V. A Subsidiary of the McGraw-Hill companies. Mexico, D:F.
9. Contreras Saenz, S., & Orjuela Barreto, M. Y. (2023). Desarrollo de la argumentación científica mediada desde una secuencia didáctica fundamentada en la actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre.
10. Cuenca Michael, Medina Santos. (2022). Efecto de la aplicación de nanopartículas de iones de cobre sobre el crecimiento de *Fusarium sp* proveniente de la piña.

11. Crisan, M. C., Teodora, M., & Lucian, M. (2021). Copper nanoparticles: Synthesis and characterization, physiology, toxicity and antimicrobial applications. *Applied Sciences*, 12(1), 141.
12. Dávila Fernández Nuria & Hernández García Juan. (2006). Métodos de ensayos rápidos de detección de microorganismos en la leche. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. VII, núm. 7, julio, 2006, pp. 1-18.
13. De los Reyes, G., Molina, B., y Coca, R. (2010). Calidad de la leche cruda: Primer foro sobre ganadería lechera de la zona Alta de Veracruz. Sistemas Pecuarios del Estado de Veracruz. Memorias. México. 10 p.
https://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CALIDADDELALECHECRUDA.pdf
14. Del Cid, E. (2006). Industrias lácteas. www.senasa.gov.ar.
15. EPA. 2002. Estándares del reglamento nacional primario de agua potable (en línea). Estados Unidos. Consultado 5 septiembre del 2002. Disponible en <http://www.epa.gov/safewater/agua/estandares.html>
16. Flores, M. E. B. (2001). Incidencia de enterobacterias en empaques de tomate.
17. Forouzesh Abed, Forouzesh Fatemeh, Foroushani Sadegh Samadi, Forouzesh Abolfazl & Zand Eskandar. (2021). A new method for calculating copper content and determining appropriate copper levels in foods. *Revista chilena de nutrición* Dic 2021, Volumen 48 N° 6 Páginas 862 – 873.
18. Guillen L, Millán B, Araque M. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio*. 2014; 18:100-8
19. Gutiérrez, M. y Cornejo, A. (2017). Análisis Técnico-Económico para la fabricación de elementos de cobre antimicrobiano y su comercialización en el sector de la salud. [tesis de grado, Pontificia Universidad Católica del Perú]. Repositorio PUCP. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/9465>
20. Gutiérrez MI. (2014). Evaluación microbiológica en frutas exóticas: mango fresco (*Mangifera indica* L.) y sus variedades. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
21. Guzmán Duxtan, Aldo Javier, Rengifo Maraví, Joel Claudio, & Echevarría Muñoz, Jezabel Milagros. (2020). Síntesis y caracterización de nanopartículas de

- cobre (NPs Cu) por el método poliol asistido vía microondas (MW). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(4), 412-427.
22. Hereña Robles, C. J., & Melo De Paz, I. S. (2018). El Espectrofotometro uv-visible y su utilización en el análisis de cobre.
 23. Hernández-Rodríguez, R., Armenteros-Amaya, M., & Silvera-Segura, K. (2020). Caracterización de la cadena de producción láctea en cuatro provincias de Cuba. Generalidades y descripción del contexto externo (I). *Revista de Salud Animal*, 42(1).
 24. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC]. (2023). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2022. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2022/PPT_%20ESPAC_%202022_04.pdf
 25. Kumar, P., Mahajan, P., Kaur, R., & Gautam, S. (2020). Nanotechnology and its challenges in the food sector: A review. *Materials Today Chemistry*, 17, 100332.
 26. León Acevedo, Orozco Ossa, & López Torres. (2023). Evaluación de protocolos de síntesis de nanopartículas de cobre u óxidos de cobre. *Ingeniería*, 28(2), e19067. <https://doi.org/10.14483/23448393.19067>
 27. Lira Saldivar et al., “Potencial de la nanotecnología en la agricultura,” *Acta Univ.*, vol. 28, no. 2, pp. 9-24, Jun. 2018, doi: 10.15174/AU.2018.1575.
 28. Llontop-Gonzales, J. A. (2016). Presencia de cobre en piscos de producción artesanal. [tesis de grado, Universidad Alas Peruanas]. Repositorio UAP. <https://repositorio.uap.edu.pe/handle/20.500.12990/7911>
 29. López Ricardo, Y., Zhurbenko, R., & Rodríguez Martínez, C. (2016). Efecto de la combinación de bases nutritivas con el inhibidor sobre la recuperación de salmonelas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(1), 0-0.
 30. Luquez, L. (2001). *Biotecnología Láctea. Industrias y Servicios*.
 31. Maldonado Contreras, L. K. (2020). Evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia de las técnicas de placa petrifilm usados en el laboratorio de microbiología de una planta de derivados cárnicos.
 32. Mariscal P, Ibáñez R, Gutiérrez M. Características Microbiológicas de Leche Cruda de Vaca en Mercados de Abasto de Trinidad Bolivia. (2013). En:

http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2307-96062013000200002&script=sci_arttext Acceso 01 de abril 2016.

33. Martínez Montes, M., & Solano de la Cruz, N. (2022). Calidad física y microbiológica de la leche cruda que se expende en la ciudad de Huancavelica.
34. Martínez Guijarro, M. (2020). Análisis Instrumental. Espectrometría de Absorción Atómica (EAA).
35. Mehrani, Z., Ebrahimzadeh, H., Asgharinezhad, A. A., y Moradi, E. (2019). Determination of copper in food and water sources using poly mphenylenediamine/CNT electrospun nanofiber. *Microchemical Journal*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103975>
36. Mejia, D. M. G. (2019). Nanotecnología en la Industria Alimentaria. *Revista Sennova: Revista Del Sistema De Ciencia, Tecnología E Innovación*, 4, 34-43.
37. Meza, H., & Dayana, K. (2023). Presencia de staphylococcus aureus meticilino resistente en carnes y manipuladores en expendios públicos en la ciudad de valledupar, cesar.
38. Milk-ed , (2022) Evaluación sensorial de productos lácteos.
39. Montalvo Quirós, S. (2019). Diseño, síntesis y evaluación de nuevos nanosistemas para su aplicación en biomedicina.
40. Muñoz Iñiguez, Botín Valencia & Esparza Anaya. (2022). Leche cruda de vaca destinada a la elaboración de productos artesanales: calidad microbiológica y fisicoquímica. *Universidad de Guadalajara, Mexico. Biotecnia*, vol. 24, núm. 3, pp. 28-34, 2022
41. Normativa Técnica Ecuatoria-NTE INEN 1529. (2015). Control microbiológico de los alimentos, Salmonella. Método de detección. Primera edición.
42. Normativa Técnica Ecuatoria-NTE INEN 11. (1984). DETERMINACION DE LA DENSIDAD RELATIVA. Primera revisión. Obtenida de: <https://ia601409.us.archive.org/23/items/ec.nte.0011.1984/ec.nte.0011.1984.pdf>
43. Normativa Técnica Ecuatoria-NTE INEN 12. (1973). LECHE. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA. Otenido de: <https://ia601406.us.archive.org/19/items/ec.nte.0012.1973/ec.nte.0012.1973.pdf>
44. Normativa Técnica Ecuatoria-NTE INEN 13. (1984). LECHE. DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE. Primera revisión.

Obtenido de:

<https://ia801901.us.archive.org/31/items/ec.nte.0013.1984/ec.nte.0013.1984.pdf>

45. Normativa Técnica Ecuatoria-NTE INEN 14. (1983). LECHE. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES Y CENIZAS. Primera revisión. Obtenido de:
<https://ia601401.us.archive.org/6/items/ec.nte.0014.1984/ec.nte.0014.1984.pdf>
46. Normativa Técnica Ecuatoria-NTE INEN 16. (1983). Leche. Determinación de proteínas. Primera revisión. Obtenido de:
<https://ia802905.us.archive.org/34/items/ec.nte.0016.1984/ec.nte.0016.1984.pdf>
47. NTE INEN 9, (2015) Leche Cruda. Requisitos.
48. Ojeda, G. A., Arias Gorman, A. M., & Sgroppo, S. C. (2019). Nanotecnología y su aplicación en alimentos. Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología.
49. Olan Mateos, P. C. (2021). Evaluación de la funcionalidad de ligninas obtenidas a partir de subproductos del café para la producción de nanopartículas y su aplicación al desarrollo de envases sostenibles.
50. Pacheco Coello (2022). Síntesis verde de nanopartículas de cobre (npacu) y su efecto antimicrobiano. *Saber: Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación*, 34.
51. Paulina Silva. (2012). Cobre en alimentos de consumo básico por espectroscopia de absorción atómica modalidad de llama. Costa Rica. Obtenido de:
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-14292012000200009&script=sci_arttext#1
52. Pelczar, M. & Reid, R. (1966). Microbiología. Trad. L. Hontañón. 2 ed. Madrid, España, Ediciones Castilla. 664 p.
53. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement, Disk Diffusion and MIC Testing, volume 29 N°3 M100-S19 (2009), Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
54. Pitout J. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2012; 3:1-7.

55. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F & Arcoraci V. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*: 8416763.
56. Pillco Guamán, J. M. (2023). Evaluación de las características sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas de la leche cruda del criadero “Brown Swiss Jr”, parroquia Chiguaza, provincia de Morona Santiago–Ecuador, 2023.
57. Prado Valeria, Vidala Roberto & Durán Claudia. (2012). Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica. *Rev Med Chile*; 140: 1325-1332.
58. Puga-Torres Byron, Meneses Cunama Dennisse Carolina, Meneses Pineda James Orlando, (2023). Plan piloto para el mejoramiento de la calidad nutricional y conteo de células somáticas de leche bovina, producida por pequeños productores de la provincia de Pichincha-Ecuador, aplicando un programa de capacitación. Pilot plan to improve the nutritional quality and somatic cell count of bovine milk produced by small producers in the Province of Pichincha-Ecuador, applying a training program *Siembra*, vol. 11, núm. 1, e4493, 2024 Universidad Central del Ecuador
59. Quigley L, O’Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37: 664-698. doi: 10.1111/1574-6976.12030.
60. Sánchez, C. E. H. (2017). Actividad antimicrobiana de nanopartículas de Cobre soportadas en una matriz de quitosano.
61. Sánchez-Venegas, J., Pillaca, M., Landauro, C. V., Ramirez, P., Lovera, D., Bernaldo, J., Eca, A., & De la Cruz, F. (2016). Actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano por cobre nanoestructurado obtenido de minerales de la región Marañón: comparación con cobre comercial. *Revista Peruana de Biología*, 23(3), 305-310.
62. Taylor, A. A., Tsuji, J. S., Garry, M. R., McArdle, M. E., Goodfellow, W. L., Adams, W. J., y Menzie, C. A. (2020). Critical Review of Exposure and Effects: Implications for Setting Regulatory Health Criteria for Ingested Copper. *Environmental Management*, 65(1), 131–159. <https://doi.org/10.1007/s00267-019-01234-y>

63. Terán Flores, J. M. (2019). Análisis del mercado de la leche en Ecuador: factores determinantes y desafíos.
64. Turnlund Copper, Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ. (2006). Modern Nutrition in Health and Disease. 10th ed. Baltimore MD: Lippincott, Williams & Wilkins; p.171-8.
65. Valdivia Calixto, J. A. (2017). Cambios físico químicos, sensoriales y nutricionales, debido a la evaporación de la leche fresca entera.
66. Vásquez, F. C. M., Martínez, G. R., Mancera, V. M. M., Ávila, L. E. O., & Vargas, M. R. (2007). Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). *Revista de Medicina Veterinaria*, (14), 61-83.
67. Zárate Ochoa, E. 2022. Síntesis de nanopartículas de cobre por el método de ALSL, y su uso potencial en inhibición de E. coli. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 72 pp

ANEXOS

Anexo A. Obtención de NPs de cobre y uso en leche cruda

Figura A1. Uso de agua purificada para la obtención de NPs de cobre



Figura A2. Preparación de la muestra de leche con el tratamiento de NPs de cobre



Anexo B. Análisis microbiológico

Figura B1. Agar Buffered Peptone Water y agar Nutrient



Figura B2. Preparación de diluciones

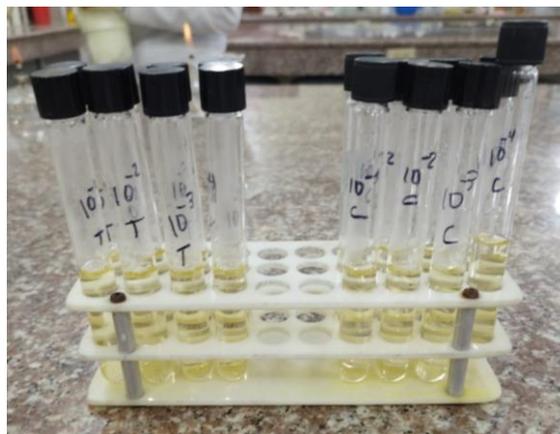


Figura B3. Siembra en placa



Figura B4. Siembra en placa Petri flim



Figura B5. Conteo de colonias

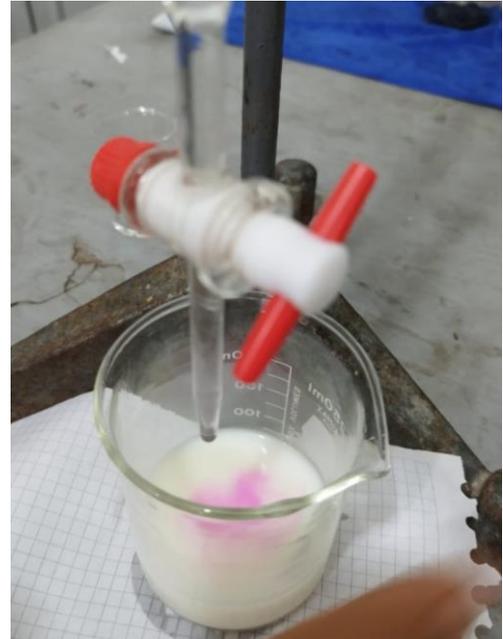


Anexo C. Análisis Físico químico

Anexo C1. Densidad relativa



Anexo C2. Acidez titulale



Anexo D. Recuentos de microorganismos mesófilos, coliformes totales y *E.coli* en leche cruda y leche tratada.

TABLA D1. Microorganismos aerobios mesófilos.

Tratamiento	Replicas	Placa	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Control	R1	P1	-	233	73	28
		P2	-	232	82	9
	R2	P1	-	140	67	2
		P2	-	154	43	6
4 ppm de Cu	R1	P1	-	15	8	-
		P2	-	37	9	-
	R2	P1	-	41	7	AL
		P2	-	40	8	AL
11 ppm de Cu	R1	P1	89	16	3	-
		P2	81	18	3	-
	R2	P1	79	30	1	-
		P2	80	31	2	-

Cálculos:

- CONTROLES**

Replica 1:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{233 + 232 + 73 + 82}{1(2 + 0,1(2))0,01}$$

$$N = 28181 ; N = 2,8 \times 10^4 \frac{UFC}{ml}$$

Replica 2:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{140 + 154 + 67 + 43}{1(2 + 0,1(2))0,01}$$

$$N = 18363 ; N = 1,8 \times 10^4 \frac{UFC}{ml}$$

Promedio de los controles: $2,3 \times 10^4$ UFC/ml

- **TRATAMIENTO 4 PPM Cu**

Replica 1:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{15 + 37}{1(2 + 0,1(0))0,01}$$

$$N = 2600 ; N = 2,6 \times 10^3 \frac{UFC}{ml}$$

Replica 2:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{41 + 40}{1(2 + 0,1(2))0,01}$$

$$N = 4050 ; N = 4,0 \times 10^3 \frac{UFC}{ml}$$

Promedio de los controles: $3,3 \times 10^3$ UFC/ml

- **TRATAMIENTO 11 PPM Cu**

Control 1:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{89 + 81 + 16 + 18}{1(2 + 0,1(2))0,1}$$

$$N = 927 ; N = 9,3 \times 10^2 \frac{UFC}{ml}$$

Control 2:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{79 + 80 + 30 + 31}{1(2 + 0,1(2))0,1}$$

$$N = 1000 ; N = 1,0 \times 10^2 \frac{UFC}{ml}$$

Promedio de los controles: $9,7 \times 10^2$ UFC/ml

Tabla D2. Recuento de coliformes totales

Tratamiento	Replicas	Placa	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Control	R1	P1	-	119	18	16
		P2	-	110	20	15
	R2	P1	-	149	10	20
		P2	-	156	13	15
(4 ppm)	R1	P1	-	50	0	0
		P2	-	40	0	0
	R2	P1	-	54	0	0
		P2	-	64	0	0
(11 ppm)	R1	P1	79	12	5	-
		P2	60	17	8	-
	R2	P1	AL	25	6	-
		P2	AL	15	5	-

Cálculos:

- **CONTROLES**

Replica 1:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{115 + 110 + 18 + 20}{1(2 + 0,1(2))0,01}$$

$$N = 12136,36 ; N = 1,2 \times 10^4 \frac{UFC}{ml}$$

Replica 2:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{149 + 156 + 16 + 15}{1(2 + 0,1(2))0,01}$$

$$N = 15272,72 ; N = 1,5 \times 10^4 \frac{UFC}{ml}$$

Promedio de los controles: $1,35 \times 10^4$ UFC/ml = $1,4 \times 10^4$ UFC/ml

• **TRATAMIENTO 4 PPM Cu**

Replica 1:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{50 + 40}{1(2 + 0,1(0))0,01}$$

$$N = 4500 ; N = 4,5 \times 10^3 \frac{UFC}{ml}$$

Replica 2:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{54 + 64}{1(2 + 0,1(0))0,01}$$

$$N = 5900 ; N = 5,9 \times 10^3 \frac{UFC}{ml}$$

Promedio de los controles: $5,2 \times 10^3$ UFC/ml

- **TRATAMIENTO 11 PPM Cu**

Control 1:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{12 + 17}{1(2 + 0,1(0))0,01}$$

$$N = 1450 ; N = 1,4 \times 10^3 \frac{UFC}{ml}$$

Control 2:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{25 + 15}{1(2 + 0,1(0))0,01}$$

$$N = 2000 ; N = 2,0 \times 10^3 \frac{UFC}{ml}$$

Promedio de los controles: $1,8 \times 10^3$ UFC/ml

Tabla D3. Recuento de *E. Coli*

Tratamiento	Replicas	Placa	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Control	R1	P1	-	1	0	0
		P2	-	1	0	0
	R2	P1	-	2	0	0
		P2	-	2	0	0
4 ppm de Cu	R1	P1	-	1	0	0
		P2	-	0	0	0
	R2	P1	-	2	0	0
		P2	-	0	0	0
11 ppm de Cu	R1	P1	1	0	0	-
		P2	3	0	0	-
	R2	P1	6	1	0	-
		P2	6	3	0	-

Cálculos:

- CONTROLES**

Replica 1:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{2}{1(2 + 0,1(0))0,01}$$

$$N = 1000 ; N = 1,0 \times 10^2 \frac{UFC}{ml}$$

Replica 2:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{4}{1(2 + 0,1(0))0,01}$$

$$N = 2000 ; N = 2,0 \times 10^2 \frac{UFC}{ml}$$

Promedio de los controles: $1,5 \times 10^2$ UFC/ml estimativo.

- **TRATAMIENTO 4 PPM Cu**

Replica 1:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{1}{1(2 + 0,1(0))0,01}$$

$$N = 50 \frac{UFC}{ml}$$

Replica 2:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{2}{1(2 + 0,1(0))0,01}$$

$$N = 100 \frac{UFC}{ml}$$

Promedio de los controles: 75 UFC/ml

- **TRATAMIENTO 11 PPM Cu**

Control 1:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{1 + 3}{1(2 + 0,1(0))0,1}$$

$$N = 20 \frac{UFC}{ml}$$

Control 2:

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$N = \frac{6 + 6}{1(2 + 0,1(0))0,1}$$

$$N = 60 \frac{UFC}{ml}$$

Promedio de los controles: 40 UFC/ml

Anexo E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Anexo E1. Recuentos microbianos de RAM, coliformes totales y *E. coli* transformados a log. 10.

Caso	Tratamiento	RAM	Coliformes totales	<i>E.coli</i>	LOG10_RAM	LOG10_Coliformes totales	LOG10_ <i>E. coli</i>
1	Control	28000	12136	100	4.45	4.08	2.00
2	Control	18000	15272	150	4.26	4.18	2.18
3	4 ppm Cu	2600	4500	50	3.41	3.65	1.70
4	4 ppm Cu	4050	5900	100	3.61	3.77	2.00
5	11 ppm Cu	927	1450	20	2.97	3.16	1.30
6	11 ppm Cu	1000	2000	60	3.00	3.30	1.78

Análisis de la varianza

LOG10_RAM

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LOG10_RAM	6	0.98	0.97	3.09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.90	2	0.95	76.17	0.0027
Tratamiento	1.90	2	0.95	76.17	0.0027
Error	0.04	3	0.01	-	-
Total	1.94	5	-	-	-

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.46705

Error: 0.0125 gl: 3

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
11 ppm Cu	2.98	2	0.08	A
4 ppm Cu	3.51	2	0.08	B
Control	4.35	2	0.08	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

LOG10_Coliformes totales

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LOG10_Coliformes totales	6	0.97	0.96	2.30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.82	2	0.41	56.54	0.0042
Tratamiento	0.82	2	0.41	56.54	0.0042

Error	0.02	3	0.01	-	-
Total	0.84	5	-	-	-

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.35503

Error: 0.0072 gl: 3

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
11 ppm Cu	3.23	2	0.06	A
4 ppm Cu	3.71	2	0.06	B
Control	4.13	2	0.06	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

LOG10_E. coli

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LOG10_E. coli	6	0.63	0.39	13.22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.30	2	0.15	2.60	0.2214
Tratamiento	0.30	2	0.15	2.60	0.2214
Error	0.17	3	0.06	-	-
Total	<u>0.48</u>	5	-	-	-

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.00822

Error: 0.0582 gl: 3

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
11 ppm Cu	1.54	2	0.17	A
4 ppm Cu	1.85	2	0.17	A

Control	2.09	2	0.17	A
---------	------	---	------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo F. Análisis de laboratorio

Anexo F1. Análisis de agua purificada tratada con NPs de cobre



CLIENTE	SANCHEZ C. GUASTAVO / LAPO E. RAUL	DOCUMENTO:#62516
REMITE	GUSTAVO SANCHEZ / RAUL LAPO	FECHA DE MUESTREO: 18/07/2.024
PROPIEDAD	TESIS	FECHA DE INGRESO: 18/07/2.024
SITIO	:MACHALA - EL ORO	FECHA DE SALIDA: 24/07/2.024

ANALISIS QUIMICO DE AGUA

CODIGO	NUMERO DE	IDENT.	miligramos x Litro
LAB.	MUESTRA	MUESTRA	COBRE (Cu)
9758	1	MUESTRA# 1	11,09

Anexo F2. Análisis de cobre residual en leche tratada con Nps de cobre

CLIENTE	SANCHEZ C. GUASTAVO / LAPO E. RAUL	DOCUMENTO:#62533
REMITE	:GUSTAVO SANCHEZ / RAUL LAPO	FECHA DE MUESTREO: 19/07/2.024
PROPIEDAD	:TESIS	FECHA DE INGRESO: 19/07/2.024
SITIO	: MACHALA - EL ORO	FECHA DE SALIDA: 25/07/2.024

ANALISIS QUIMICO DE AGUA

CODIGO	NUMERO DE	IDENT.	miligramos x Litro
LAB.	MUESTRA	MUESTRA	COBRE (Cu)
9761	1	LECHE CON COBRE	1,55



Ing. Yesenia Sanchez
(e) Jefe de Laboratorio




Ing. Narciso Durado
Serv. Al Cliente

"ESTOS RESULTADOS PUEDEN SER SUJETOS DE COMPARACIÓN, SIEMPRE Y CUANDO SE UTILICE LA MISMA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE ESTE LABORATORIO."

Anexo F3. Análisis de porcentaje de grasa total y de proteínas en leche cruda.



INFORME DE RESULTADOS

INF.LASA-06-08-24 -8256
ORDEN DE TRABAJO No. 24-5227

ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO

ITEM	PARÁMETROS	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE U (k=2)	MÉTODO DE ENSAYO
1	GRASA TOTAL (a)	%	3,6	± 4,6 %	PEE.LASA.FQ.1063 NTE INEN -ISO 8262-3
2	PROTEÍNA (a) (f = 6,38)	%	3,5	± 5,0 %	PEE.LASA.FQ.11 AOAC 981.10, 928.08, 991.20, NTE INEN ISO 20483

El parámetro marcado con (a) ESTÁ incluido en el alcance de acreditación de A2LA.

Anexo F3. Análisis de porcentaje de grasa total y de proteínas en leche tratada con NSp de cobre.

ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO

ITEM	PARÁMETROS	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE U (k=2)	MÉTODO DE ENSAYO
1	GRASA TOTAL (a)	%	3,3	± 4,6 %	PEE.LASA.FQ.1063 NTE INEN -ISO 8262-3
2	PROTEÍNA (a) (f = 6,38)	%	2,3	± 5,0 %	PEE.LASA.FQ.11 AOAC 981.10, 928.08, 991.20, NTE INEN ISO 20483

El parámetro marcado con (a) ESTÁ incluido en el alcance de acreditación de A2LA.

Ing. Andrea López
ASISTENTE TÉCNICO