



**DESARROLLO DE UN EQUIPO BASADO EN  
EL POTENCIAL REDOX PARA LA DETECCIÓN  
DE *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*  
EN LECHE CRUDA DE VACA**

**LAURA JIMENA RODRÍGUEZ CASTRO  
LINA MARÍA SOTOMONTE SANTAMARÍA**

UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA DE BIOINGENIERÍA  
2019

**DESARROLLO DE UN EQUIPO BASADO EN EL POTENCIAL REDOX PARA  
LA DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli* EN LECHE  
CRUDA DE VACA**

LAURA JIMENA RODRÍGUEZ CASTRO  
LINA MARÍA SOTOMONTE SANTAMARÍA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:  
**Bioingeniero**

Modalidad de Trabajo de Grado: Desarrollo de Producto

Tutor: Jorge Armando Oliveros Hincapié  
Cotutora: Nuri Andrea Merchán Castellanos

UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA DE BIOINGENIERÍA  
2019

## DEDICATORIA

A Dios por permitirnos cumplir con nuestras metas.  
A nuestras familias por apoyar siempre nuestros sueños.

## AGRADECIMIENTOS

*Gracias a Dios por permitirnos desarrollar este trabajo, gracias a nuestros padres y hermanos que siempre nos brindaron su apoyo incondicional, gracias a nuestro tutor Jorge Armando Oliveros hincapié y a nuestra cotutora Nuri Andrea Merchán Castellanos por guiarnos y acompañarnos durante el desarrollo de este trabajo.*

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA</b> .....	<b>19</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4. ESTADO DEL ARTE</b> .....	<b>24</b>
<b>5. MARCO REFERENCIAL</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS</b> .....	<b>26</b>
<b>5.2. <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>27</b>
5.2.1. Patogenicidad .....	28
5.2.2. Estadísticas .....	29
<b>5.3. <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>30</b>
5.3.1. Patogenicidad .....	30
5.3.2. Estadísticas .....	31
<b>5.4. POTENCIAL REDOX</b> .....	<b>31</b>
5.4.1. Métodos para medir potencial redox .....	32
5.4.2. Potencial redox en la leche .....	33
5.4.3. Potencial redox en las bacterias .....	34
<b>5.5. MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE</b> .....	<b>35</b>
<b>5.6. MARCO LEGAL NACIONAL</b> .....	<b>36</b>
5.6.1. Control de calidad de la leche .....	37
5.6.2. Control de calidad de productos derivados de la leche cruda .....	38
5.6.3. Análisis microbiológicos .....	39
5.6.4. Calidad sanitaria en alimentos .....	40
<b>6. LEVANTAMIENTO DE REQUERIMIENTOS</b> .....	<b>42</b>
<b>6.1. Requerimientos Caracterización ORP</b> .....	<b>42</b>
<b>6.2. Requerimientos Desarrollo Equipo Medición ORP</b> .....	<b>42</b>
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	<b>43</b>
<b>7.1. DISEÑO PROTOTIPO PARA LA ADQUISICIÓN DE DATOS PROVENIENTES DEL ELECTRODO DE POTENCIAL REDOX</b> .....	<b>43</b>
<b>7.2. PRUEBAS DE ASEPSIA</b> .....	<b>44</b>
7.2.1. Prueba de asepsia del electrodo .....	44
7.2.2. Prueba de asepsia con uso de cultivos bacterianos .....	46

7.3. CARACTERIZACIÓN DE POTENCIAL REDOX GENERADO POR LAS BACTERIAS.	48
7.4. IMPLEMENTACIÓN DEL EQUIPO PARA LA DETECCIÓN DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO.....	51
7.5. EVALUACIÓN DEL EQUIPO.....	53
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
8.1. ADQUISICIÓN DE LA SEÑAL .....	55
8.2. PRUEBAS PARA GARANTIZAR LA ASEPSIA DEL ELECTRODO DURANTE LAS MEDICIONES.....	57
8.2.1. Prueba inicial de asepsia .....	57
8.2.2. Prueba de asepsia con uso de cultivos bacterianos .....	59
8.3. CARACTERIZACIÓN POTENCIAL REDOX GENERADO POR LAS BACTERIAS .....	61
8.3.1 <i>Curvas de Crecimiento Bacteriano</i> .....	61
8.3.1.1. Staphylococcus aureus .....	61
8.3.1.2. Escherichia Coli .....	63
8.3.2. Curvas de variación de ORP .....	64
8.4. IMPLEMENTACIÓN DEL EQUIPO PARA LA DETECCIÓN DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO .....	71
8.4.1 Ingeniería de detalle .....	71
8.4.2. Diseño esquiopo.....	78
8.4.3. Planos del equipo .....	81
8.5. EVALUACIÓN DEL EQUIPO .....	82
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>87</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>88</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Algunos agentes causantes de ETA.....	26
Tabla 2 Indicadores redox. ....	32
Tabla 3 Características microbiológicas de la leche pasteurizada. ....	37
Tabla 4 Características microbiológicas de la leche ultrapasteurizada.....	37
Tabla 5 Características microbiológicas de la leche cruda y cruda enfriada.....	38
Tabla 6 Requisitos microbiológicos para diferentes productos derivados de la leche.....	38
Tabla 7 Rotulación tubos y momento del experimento.....	44
Tabla 8 Medio de siembra de cada muestra inoculada. ....	45
Tabla 9 Rotulación tubos prueba asepsia con bacterias. ....	47
Tabla 10 Comparación Arduino uno y LaunchPad MSP430G2. ....	52
Tabla 11 ORP y UFC/ml 24 horas de crecimiento.....	63
Tabla 12 Análisis estadístico de Shapiro- Wilk para E. coli en leche cruda .....	70
Tabla 13 Análisis estadístico de Shapiro-Wilk para S. aureus en leche cruda. ....	70
Tabla 14 Especificaciones Equipo Medición ORP.....	76
Tabla 155 Validación muestra controlada para E. coli.....	83
Tabla 166 Validación muestra controlada para S. aureus.....	83
Tabla 177 Validación muestra controlada para S. aureus.....	83
Tabla 18 Relación costos pruebas laboratorio Vs Equipo de medición .....	86

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Árbol del problema. ....	20
Figura 2 Tinción de Gram Escherichia coli (di lavoro, 2018). ....	28
Figura 3 Tinción de Gram Staphylococcus aureus (di lavoro. 2018). ....	30
Figura 4 Esquema medición potencial redox (Aguasresiduales.info, 2017).....	33
Figura 5 cultivo de S. aureus en medio BHI. ....	46
Figura 6 Lugar de recolección de muestras de leche cruda (Rodríguez, Sotomonte, 2019). ....	49
Figura 7 ejemplo usando un volumen de 1.5 mL de muestra para la medición.....	52
Figura 8 Diagrama esquemático circuito de adquisición de la señal. ....	55
Figura 9 a) Muestras inoculadas diferentes etapas del protocolo de limpieza del electrodo y b) Muestras réplicas inoculadas diferentes etapas del protocolo de limpieza del electrodo.....	58
Figura 10 muestras sembradas medio LB. ....	58
Figura 11 muestras sembradas medio MacCounkey. ....	59
Figura 12 a) muestras inoculadas durante la prueba, b) muestras después de 24 horas. ....	60
Figura 13 Muestras sembradas medio BHI. ....	60
Figura 14 Medición de ORP. ....	71
Figura 15 Sistema de procesamiento de la señal.....	72
Figura 16 Sistema de alimentación.....	75
Figura 17 Sistema de interacción con el usuario y almacenamiento.....	76

Figura 18 Equipo medición ORP. ....	77
Figura 19 Modelado fusion equipo medición ORP. ....	78
Figura 20 Vista isométrica(izquierda) y vista superior (derecha) caja principal. ....	78
Figura 21 Vista posterior (izquierda) y vista frontal (derecha) caja principal. ....	79
Figura 22 Vistas laterales caja principal. ....	79
Figura 23 Vista isométrica (izquierda) y vista superior (derecha) base del electrodo.....	79
Figura 24 Vista frontal (izquierda) y vista posterior (derecha) base del electrodo.....	80
Figura 25 Vistas laterales base del electrodo.....	80
Figura 26 Plano caja principal equipo medición ORP. ....	81
Figura 27 Plano base electrodo medición ORP. ....	82
Figura 28 Momento de toma de muestra. ....	84
Figura 29 Medición de ORP con el equipo. ....	85

### LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Metodología para la adquisición de datos provenientes del electrodo.....	43
Esquema 2 Diagrama experimental para realizar la prueba de asepsia del electrodo....	46
Esquema 3 Diagrama experimental para realizar la prueba de asepsia del electrodo usando cultivos bacterianos. ....	48
Esquema 4 Metodología para la relación de ORP y concentración de las bacterias en estudio en leche cruda. ....	50
Esquema 5 Metodología para la implementación del equipo. ....	51
Esquema 6 Diseño experimental para realizar la evaluación funcional del equipo.....	54
Esquema 7 Diagrama de flujo programa lectura de datos. ....	57
Esquema 8 Diagrama de flujo algoritmo para el procesamiento de la señal adquirida por el electrodo.....	73
Esquema 9 Diagramas de flujo para la comparación con las bases de datos de S. aureus (Izquierda) y E. coli (derecha).....	74

### LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Curva de Crecimiento de S. aureus en leche cruda.....	61
Gráfica 2 Curva de crecimiento de S. aureus en leche estéril.....	62
Gráfica 3 Curva de Crecimiento de E. coli en leche cruda.....	63
Gráfica 4 Variación del ORP en leche cruda inoculada con S. aureus. ....	64
Gráfica 5 Relación potencial redox y crecimiento de S. aureus en leche cruda. ....	65
Gráfica 6 Variación ORP en leche estéril inoculada con S. aureus.....	65
Gráfica 7 Variación del ORP en leche cruda inoculada con E. coli. ....	66
Gráfica 8 Relación potencial redox y crecimiento de E. coli en leche cruda. ....	67
Gráfica 9 Promedio medición ORP muestras de leche cruda. ....	85

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1.** Gráficas evaluación de potencial redox en muestras de leche cruda de diferentes fincas en la sabana de Bogotá.

**Anexo 2.** Gráficas caracterización del potencial redox generado por *Staphylococcus aureus*.

**Anexo 3.** Muestras inoculadas durante un periodo de 24 horas para *Staphylococcus aureus*.

**Anexo 4.** Muestras inoculadas durante un periodo de 30 horas para *Escherichia coli*.

**Anexo 5.** Tablas de coeficiente de variación

## GLOSARIO

Absorbancia (*Absorbance*). Medida de la atenuación de una radiación al atravesar una sustancia, que se expresa como el logaritmo de la relación entre la intensidad saliente y entrante (Real Academia Española, 2018).

Amplificador Operacional (*Operational Amplifier*). Dispositivos compactos activos y lineales de alta ganancia, diseñados para proporcionar la función de transferencia deseada (García, 2010).

Anova (*Analysis of Variance*). Conocido como análisis de varianza, es una prueba encargada de realizar hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones son iguales (Otero, Sánchez & Moral, 2005).

Cabina de Flujo Laminar (*Laminar Flow Cabinet*). Es un receptáculo en forma generalmente prismática con una única cara que da acceso al interior; donde se localiza la superficie de trabajo, que normalmente permanece limpia y estéril (Equipos y laboratorio de Colombia, 2018).

Contaminación cruzada (*Cross Contamination*). Se define como la transmisión de microorganismos, especialmente bacterias de un medio a otro.

*Escherichia coli* (*E. coli*). Es una bacteria con morfología de Bacillus Gram negativos (Organización mundial de la salud, 2015).

Espectrofotómetro (*Spectrophotometer*). Instrumento usado en la física óptica que sirve para medir, en función de la longitud de onda, es utilizado en los laboratorios para la cuantificación de sustancias y microorganismos (Equipos y laboratorio de Colombia, 2018).

Inocuidad Alimentaria (*Food Safety*). Se refiere a las condiciones y prácticas que preservan la calidad de los alimentos para prevenir la contaminación y las enfermedades transmitidas por alimentos (Ministerio de Salud, 2018).

Inoculación (*Inoculation*). Es la incorporación de una sustancia tóxica, venenosa, virus o bacterias en un organismo o medio (Redes Microbianas, 2018).

Leche Cruda (*Raw Milk*). Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de termización ni higienización (Decreto 616 de 2006).

Leche estéril (*Sterile Milk*). Es el producto obtenido al someter la leche cruda a una adecuada relación de temperatura y tiempo 115°C a 125°C por 20 a 30 minutos (Decreto 616 de 2006).

Microcontrolador (*Microcontroller*). Es un circuito integrado digital que puede ser usado para diversos propósitos debido a que es programables, está compuesto

por una unidad central, memorias (ROM y RAM) y líneas de entrada y salida (Electrónica, 2018).

Potencial redox (*redox potential*). Es la forma de medir la conversión entre la energía eléctrica y la energía química, realizando un intercambio de óxido-reducción (Fernández, 2018).

Rango de medición (*Measuring Range*). Es el rango de valores correspondientes a una magnitud que es capaz de ser medido por un instrumento (UBA, 2018).

Electrodo (*Electrodo*). Dispositivo que detecta determinada acción externa como temperatura, presión, etc., y la transmite adecuadamente (Real Academia Española, 2018).

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Es una bacteria con morfología de cocos Gram positivos (Camarena & Sánchez, 2018)

Tukey (*Tukey*). Es un método utilizado en ANOVA para crear intervalos de confianza para las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por familia en un nivel especificado (Minitab 2018).

## RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos son ocasionadas por el consumo de alimentos contaminados por agentes químicos, físicos y/o biológicos. La leche cruda es uno de los productos con mayor riesgo de contaminación por la presencia de bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, las cuales causan problemas gastrointestinales por liberación de toxinas producidas por estos microorganismos. En el 2018 el Instituto Nacional de Salud (INS) reportó 11502 casos de ETA en Colombia, donde el 19.4% de los brotes ocurrieron por el consumo de quesos contaminados (INS, 2018).

Una de las causas del aumento en las estadísticas de ETA en Colombia, se debe principalmente a la ausencia de técnicas microbiológicas rápidas que permitan detectar en un menor tiempo la presencia del microorganismo en el alimento. Tradicionalmente la identificación de bacterias en los alimentos se realiza mediante la técnica de pre enriquecimiento, enriquecimiento y posterior recuento en placa y en algunas ocasiones son necesarias pruebas bioquímicas confirmatorias como por ejemplo la prueba de coagulasa para *S. aureus*. Para disminuir el tiempo de análisis, nuevos métodos de detección, han sido desarrollado como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y el inmunoensayo ELISA, no obstante, su implementación es costosa y su manipulación requiere de personal calificado, sumado a lo anterior los resultados se pueden tardar entre 3 a 5 días.

Una nueva alternativa puede sustituir los métodos tradicionales de detección empleando el potencial redox (ORP) presente en los microorganismos, el cual ha sido un parámetro de control utilizado inicialmente para medir la calidad del agua o en fermentaciones de masa para pan. Sin embargo, algunos estudios relacionan el crecimiento bacteriano con la variación de potencial redox en un medio determinado, lo que puede ser un indicador del estado fisiológico de los cultivos microbianos y podría ser una herramienta útil para la determinación cualitativa y cuantitativa de la contaminación microbiana.

Por lo anterior, en el presente trabajó se desarrolló un equipo capaz de correlacionar la concentración bacteriana con el potencial redox en muchas de leche cruda. El equipo está constituido por un electrodo HI3131B de la marca Hanna Instrument, cuenta con un rango de medición de -2 V a 2 V, el procesamiento de los datos se realizó mediante el microcontrolador AtMega328 incorporado en la tarjeta Arduino, el diseño físico fue realizado en fusión 360, y algunos componentes del equipo se imprimieron en 3D.

Para la medición de potencial redox, se realizaron varias curvas de crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* teniendo como medio de cultivo base leche cruda, en donde se tomó a cada cierto periodo de tiempo medidas del potencial redox y concentración bacteriana en Unidades Formadoras de Colonias (UFC), mediante recuento en placa en medios selectivos para cada microorganismo evaluado.

Los resultados permitieron establecer que durante el crecimiento bacteriano se presenta una disminución del potencial redox significativa entre la cuarta y la sexta hora ( $p < 0,0001$ ) alcanzando valores de potencial de hasta  $-500$  mV durante la fase exponencial de *S. aureus* y *E. coli*. La variación del potencial le permitió al equipo detectar estas bacterias en un tiempo menor (menor a 10 min) al empleado actualmente por técnicas convencionales (más de 24 horas). De igual manera, se desarrolló un protocolo de asepsia para el electrodo evitando la contaminación cruzada al momento de realizar la medición.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, ETA, Potencial redox, Leche, Seguridad alimentaria, *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

Food-borne diseases are caused by the consumption of food contaminated by chemical, physical and/or biological agents. Raw milk is one of the products with the highest risk of contamination by the presence of *Escherichia coli* bacteria and *Staphylococcus aureus*, which cause gastrointestinal problems due to the release of toxins produced by these microorganisms. In 2018, the National Institute of Health (INS) reported 11502 cases of ETA in Colombia, where 19.4% of the outbreaks occurred because of the consumption of contaminated cheeses (INS, 2018).

One of the causes of the increase in the statistics of ETA in Colombia, is due mainly to the absence of rapid microbiological techniques that allow to detect in a short time the presence of the microorganism in the food. Traditionally, the identification of bacteria in food is done through the technique of pre-enrichment, enrichment and posterior plaque count and sometimes biochemical tests are necessary confirmatory such as the test of coagulase for *S. aureus*. To decrease the time of analysis, new detection methods have been developed as polymerase chain reaction (PCR) and ELISA Immunoassay, however, its implementation is expensive and its manipulation requires qualified personnel, added to what Before the results can take 3 to 5 days.

A new alternative can substitute the traditional methods of detection using the redox potential (ORP) present in the microorganisms, which has been a control parameter used initially to measure the water quality or in mass fermentations for bread. However, some studies relate bacterial growth to the variation of redox potential in a given medium, which may be an indicator of the physiological state of microbial crops and could be a useful tool for the determination qualitative and quantitative microbial contamination.

Therefore, in the present work was developed a team able to correlate the bacterial concentration with the redox potential in many of raw milk. The equipment consists of an electrode HI3131B of the brand Hanna Instrument, has a measuring range of -2 V to 2 V, the processing of the data was made by the microcontroller AtMega328 incorporated in the card Arduino, the physical design was realized in Fusion 360, and some components of the equipment were printed in 3D.

For the measurement of redox potential, several curves of growth of *E. coli* and *S. aureus* were carried out having as a medium of cultivation base raw milk, where it was taken to every certain period of time measurements of the redox potential and bacterial concentration in units Colony-Forming (CFU), by plaque count in selective media for each microorganism evaluated.

The results allowed to establish that during the bacterial growth there is a decrease of the significant redox potential between the fourth and Sixth hour ( $P < 0.0001$ ) reaching potential values of up to -500 mV during the exponential phase of *S. aureus* and *E. coli*. The variation of the potential allowed the team to detect these bacteria in a less time (less than 10 min) to the currently employed by conventional techniques (more than 24 hours). Likewise, an asepsis protocol was developed for the electrode avoiding cross-contamination at the time of measurement.

**Key words:** *Escherichia coli*, ETA, food Safety, milk, redox potential, *Staphylococcus aureus*.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se pueden dividir en infecciones alimentarias y en intoxicaciones alimentarias, estas últimas son producidas por el consumo de alimentos contaminados por agentes como: bacterias, virus, hongos y parásitos. Dos de los agentes causantes de ETA más notificados por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SIVIGILA) son *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; estas son bacterias anaerobias facultativas, capaces de colonizar la pared intestinal al producir toxinas que son liberadas por ellas; al ser ingeridas por el ser humano en productos contaminados especialmente en leche genera síntomas de intoxicación por ETA.

En Colombia, a diciembre de 2018 el Instituto Nacional de Salud (INS) reportó 11502 casos de ETA, donde el 51,2% de los brotes ocurrieron en el hogar, el 18,1% en restaurantes, el 16,2% en instituciones educativas, el 8,4% en clubes sociales, el 2,3% en establecimientos militares y el 1,7% en establecimientos penitenciarios; de los cuales el queso provocó el 20,5%, en los diferentes boletines epidemiológicos reportados en los últimos años por el INS el queso fue el mayor causante de los brotes de ETA, esto se da por la producción artesanal de este producto, donde se utiliza la leche cruda y no se le realiza ningún tipo de tratamiento como la pasteurización (INS, 2018). De los alimentos asociados a las ETA considerados de alto riesgo se encuentran: la carne, el pescado, los huevos, la leche y sus derivados debido a su alto contenido proteico (Rodríguez, et al, 2015). Mungai, Behravesch & Gould en 2015 realizaron un estudio sobre el aumento de brotes desde el 2009 hasta el 2012 en Estados Unidos asociados al consumo de leche cruda, donde 26 estados reportaron 81 brotes que causaron 979 enfermedades y 73 hospitalizaciones.

La literatura reporta diferentes metodologías para detectar *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en leche, entre ellas se encuentran la reacción en cadena de polimerasa (PCR), el Inmunoensayo ELISA, pruebas bioquímicas y recuento en placa, en esta última, después de cinco días aproximadamente son obtenidos los resultados y los precios varían desde \$33.000 COP. En Colombia, rige el decreto 616 del 2006 para realizar el control de calidad de la leche por medio de pruebas microbiológicas.

La presencia de bacterias patógenas en la leche además de conllevar posibles brotes de enfermedades, también representan pérdidas económicas en los comerciantes de leche, debido a que pueden someterse a multas económicas según la resolución 000017 de 2012 del ministerio de agricultura y desarrollo rural (Resolución 000017,2012); si la causa de la contaminación es una enfermedad como la mastitis clínica, las pérdidas suman aproximadamente \$630.000 por cada caso presentado (Vásquez, 2012).

El método propuesto en este trabajo permite la detección de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en leche cruda en un tiempo menor al requerido por métodos convencionales (recuento en placa). Para ello, se caracterizó experimentalmente el potencial redox en función de la concentración bacteriana de los microorganismos en estudio, con el fin de implementar un equipo que permita la detección de estas bacterias presentes en leche cruda usando como variable indicadora el potencial redox, la evaluación del equipo hacia la capacidad para sensar se realizó mediante pruebas a diferentes concentraciones de los microorganismos en estudio.

Con lo anterior, se abre la posibilidad de implementar nuevas metodologías para realizar un control de calidad en leche cruda, asegurando la calidad del producto en menor tiempo al empleado actualmente, que repercute directamente en el nivel de competitividad e incidencia en el mercado tanto nacional como internacional de las diferentes empresas lácteas. Además, el equipo desarrollado en este trabajo puede contribuir a disminuir las notificaciones por ETA en productos lácteos, ya que permitirá la detección oportuna de dos microorganismos que tienen gran impacto en la salud pública.

Este trabajo está dirigido a la comunidad lechera con el fin de contribuir con herramientas tecnológicas basadas en el potencial redox para la detección de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en leche cruda.

Este documento se encuentra dividido en nueve capítulos: El primer capítulo describe el problema, en el segundo capítulo se plantea la justificación, el tercer capítulo contiene los objetivos del proyecto, el cuarto capítulo muestra el estado del arte respecto a investigaciones en potencial redox, el quinto capítulo contiene el marco teórico, en el sexto capítulo contiene el levantamiento de requerimiento, en el séptimo capítulo se muestra la metodología utilizada en el proyecto, en el octavo capítulo los resultados y la discusión de los experimentos realizados y en el noveno capítulo las conclusiones del proyecto.

# 1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

## 1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Para determinar la calidad higiénica de la leche cruda tradicionalmente se llevan a cabo pruebas microbiológicas, cuyo objetivo es la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en una muestra. Las guías y normas de laboratorio presentan semejanzas en sus protocolos dentro de los cuales se destacan la preparación de la muestra, siembra en medio pre enriquecidos y enriquecidos, siembra en agar selectivo, incubación por 24 a 48 horas (dependiendo del agente) y recuento de colonias, además de las pruebas bioquímicas, cuantificación de las colonias (ISO 7218, 2014). Lo anterior, causa que el tiempo estimado para el reporte de resultados sea entre 2 a 4 días, sin embargo, si se tiene en cuenta el transporte de la muestra al laboratorio, este reporte puede demorar hasta cinco días, lo que no es muy efectivo cuando se necesitan resultados rápidos. Otra limitante en este tipo análisis es lo referentes al costo de las pruebas, en laboratorios certificados los precios pueden estar alrededor de \$33.000 COP por muestra (ISO 7218, 2014; Biotrends laboratorios, 2018) figura 1, dependiendo del microorganismo a evaluar en cada muestra.

Sumado a lo anterior, no todos los productores de productos lácteos que reciben la leche cruda como materia prima cuentan con laboratorios propios para realizar las pruebas microbiológicas; por lo que deben transportar las muestras de leche a laboratorios certificados que las realicen, aumentando el tiempo de espera para el procesamiento de la materia prima y en muchos casos, los productos artesanales como los quesos, son fabricados con leche sobre la cual no se ha realizado ningún control microbiológico. (Biotrends laboratorios, 2018) figura 1.

La ausencia en la realización de estas pruebas en productos derivados de leche cruda por ejemplo puede llegar a ocasionar en los consumidores ETA. La organización mundial de la salud (OMS) menciona que en países menos desarrollados las ETA son la principal causa de enfermedades y muertes asociadas a una carga socioeconómica considerable y en países desarrollados son responsables de altos niveles de pérdida productiva (Guerrero, 2016). Según esta misma organización, en América cada año 77 millones de personas enferman y más de 9.000 mueren, siendo los niños menores de 5 años los más afectados con más de 2.000 muertes al año (OMS, 2015). Hecho que aumenta la preocupación de la comunidad tanto a nivel nacional como mundial.

En Colombia, en el año 2014 se registraron 11.425 casos de brote de ETA donde dos de los microorganismos causantes fueron *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, (Guerrero, 2016) transmitidos por vehículos como leche cruda contaminada. En 2018, de los 429 brotes donde se pudo recolectar una muestra

del alimento, el 42% se identificó como agente etiológico una bacteria (INS, 2018).

En un país en desarrollo como Colombia, la calidad de la leche cruda es un factor muy importante para el progreso del sector económico de los lácteos, debido a que influye de manera directa en la competitividad dentro de los mercados nacionales e internacionales. En Colombia al 2016 se registraron 395.215 unidades productoras de leches de las cuales el 20% cuentan con más de 15 animales y el 80.7% corresponde a pequeños productores (ANALAC, 2016). En el año 2018 las industrias lácteas formales recibieron cerca de 3.145.900.000 litros de leche cruda (ASOLECHE, 2017), por lo que el tiempo en que las industrias deben almacenar la leche por la espera de resultados de las pruebas microbiológicas representan atrasos en la producción y pérdidas económicas.

Por lo tanto, se propone el estudio de un equipo basado en los cambios del potencial redox de la leche cruda que ocurren como consecuencia de la presencia de microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, ya que esta es la materia prima para la elaboración de diferentes productos lácteos. En la figura 1 se puede observar el árbol del problema.

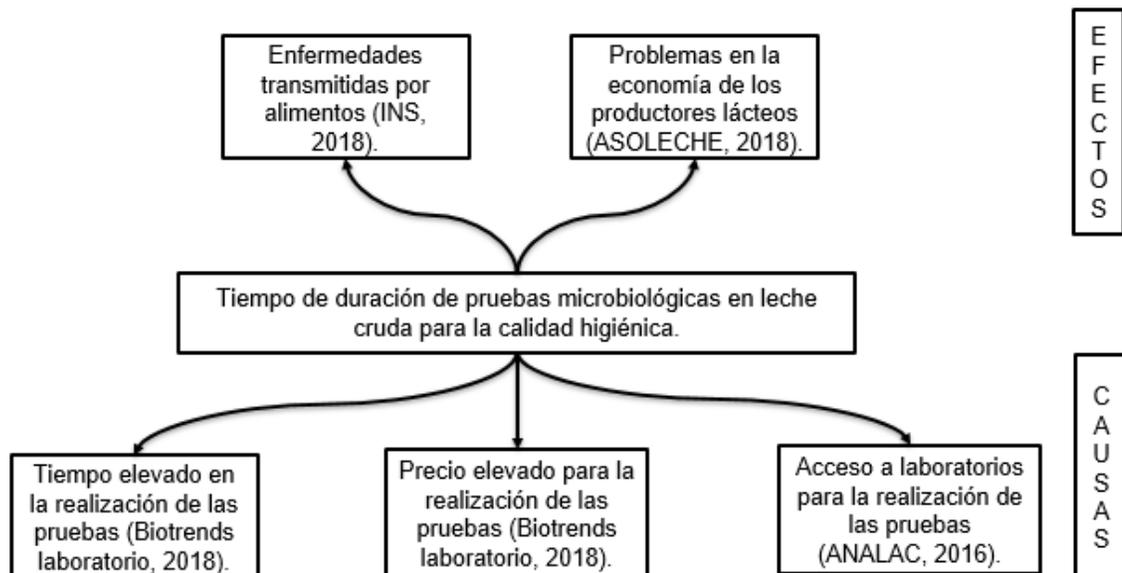


Figura 1 Árbol del problema.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Según la asociación colombiana de procesadores de leche, para el 2016 Colombia era el segundo país en Latinoamérica que consume más productos lácteos, con un consumo per cápita de 70 litros de leche líquida y 145 litros en todo el sector lácteo, donde el consumo de leche UAT aumentó un 8.1%, pasando de 529,6 millones de litros a 781,5 millones y la leche pasteurizada disminuyó un 8.4% anual (ASOLECHE, 2017). Por lo tanto, el desarrollo de un equipo capaz de realizar un control de calidad sobre la leche cruda en un tiempo menor al empleado hoy en día es indispensable para la industria de los lácteos, ya que asegura la calidad de sus productos influenciando de manera significativa el nivel de competitividad e incidencia en el mercado tanto nacional como internacional.

Además, de representar ventajas de mercado para el productor, el desarrollo del equipo también denota una ventaja importante en la seguridad alimentaria al permitir, la detección de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que tiene gran impacto en la salud pública, estas bacterias pueden encontrarse en leche debido a las malas prácticas de higiene y a enfermedades en las vacas como la mastitis, desencadenando importantes problemas de salud como vómitos, diarrea líquida, dolor cólico abdominal, enfermedad respiratoria, infecciones sanguíneas y otras enfermedades.

En el año 2014 se encontraron varios estudios de morbilidad provenientes de alimentos contaminados por estas bacterias. En el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud se reportaron 9.730 casos de ETA (Soto, Pérez, & Estrada, 2016). *E. coli* O157:H7 es causante de una tasa de mortalidad del 50% en menores de 5 años y personas de la tercera edad, con una importante incidencia en EE. UU., aproximadamente 73.000 casos por año causados por *E. coli* O157:H7 (OPS; 2019). La presencia de *Escherichia coli* se evidenció 11.502 casos en productos cárnicos y lácteos, también en pescados, mariscos y leguminosas (Soto, Pérez, & Estrada, 2016). Ombarak, et al, en el 2016 estudiaron la prevalencia de *Escherichia coli* encontrando una prevalencia del 76,4% en la leche cruda analizada, 74,5% en quesos Karish y 21,7% en quesos Ras. En Colombia el INS en diciembre de 2018 reportó que *E. coli* fue responsable de 27 brotes.

*Staphylococcus aureus* ha sido altamente reportado en brotes de ETA; en Japón se presentaron más de 13.000 casos, de los cuales 2.000 fueron resultado de contaminación en leche en una planta de producción de alimentos lácteos. En Japón, Francia y el Reino Unido la enterotoxina A de *S. aureus* es reportada comúnmente en casos ETA con una prevalencia del 77.8%. en Estados Unidos se reportó presencia de *S. aureus* en un establecimiento de comida con un

porcentaje de 44%, (Kadariya, Smith, & Thapaliya, 2014), en Irán se registró una prevalencia del 12.4% en leche cruda y productos lácteos (queso) (Jamali, Paydar, Radmehr, Ismail, & Dadrasnia, 2015). En el año 2010 se reportaron brotes de ETA por *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva con una prevalencia del 7.5% en 40 restaurantes del sector norte de Bogotá, y del 25% en 20 espacios de venta ambulatoria. En el último boletín epidemiológico generado por el INS en diciembre de 2018 *S. aureus* fue responsable de 30 brotes reportados.

Por lo mencionado anteriormente, evaluar un método alternativo para la detección de bacterias en leche cruda en un tiempo menor al empleado y a menor costo podrá permitir monitorear las materias primas, el producto final y el proceso de manipulación del producto durante su fabricación y transporte, además de contribuir a la disminución de posibles brotes por productos que salen al mercado sin ningún tipo de análisis microbiológico, crear estrategias para evitar la contaminación en los lugares de ordeño y al mismo tiempo mejorar la calidad de la salud del animal.

Este trabajo se encuentra alineado al foco misional de sostenibilidad alimentaria del programa de bioingeniería de la Universidad el Bosque. En el cual desde el perfil bioingenieril busca relacionar los principios biológicos de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* estudiando su comportamiento frente a un medio específico en este caso la leche y utilizar las herramientas ingenieriles para evaluar un nuevo parámetro que es el potencial redox, permitiendo detectar de una manera más rápida estas bacterias mejorando la seguridad alimentaria.

### 3. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

#### OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Desarrollar un equipo basado en el potencial redox para la detección de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en leche cruda de vaca.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ❖ Caracterizar experimentalmente el potencial redox en función de la concentración bacteriana de los microorganismos en estudio.
- ❖ Implementar un equipo para la detección de las bacterias en estudio en leche cruda usando como variable indicadora el potencial redox.
- ❖ Evaluar la capacidad del equipo para sensar el potencial redox mediante pruebas a diferentes concentraciones de los microorganismos en estudio.

#### 4. ESTADO DEL ARTE

El comportamiento de microorganismos como las bacterias es de gran interés en distintos campos de estudio entre ellos en la industria de alimentos, puesto que permiten la producción de alimentos como el yogurt y el queso en procesos de fermentación o en el control de la calidad asociado a la descomposición de los alimentos (Capuani, Behr, & Vogel, 2012).

Estudios se han realizado en diferentes campos teniendo como enfoque la relación del crecimiento microbiano con el ORP; uno de ellos es el sector de los alimentos; Capuani, Behr, & Vogel, (2012) realizaron un estudio donde relacionaron la influencia del crecimiento de las bacterias de ácido láctico (LAB) con el ORP en fermentaciones de masa para la producción de pan como parámetro de control; el estudio lo realizaron con las bacterias *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* y *Weissella cibaria*; observando que cada bacteria tiene diferente capacidad reductora lo que demuestra que es posible medir el ORP en la fermentaciones para utilizarlo como parámetro de control (Capuani, Behr, & Vogel, 2012).

McEgan, Mootian, Goodridge, Schaffner, & Danyluk, (2013) buscaron predecir la población de *Escherichia coli* a través de indicadores biológicos, químicos y físicos en aguas superficiales de Florida, como parámetros físicos y químicos midieron temperatura, pH, ORP, turbidez y conductividad y como indicadores biológicos la concentración de bacterias coliformes y *Escherichia coli* donde concluyeron que la técnica de regresión logística fue la mejor opción para medir la concentración de *E. coli*. Y Copeland & Lytle (2014) midieron el potencial de oxidación-reducción de importantes oxidantes en el agua potable para observar la calidad del agua y evitar contaminación por componentes químicos peligrosos para la salud.

En el estudio realizado por Fazlzadeh, Sadeghi, Bagheri, Poureshg, & Rostami, (2016) se evidencia también el uso del ORP para la detección de bacterias en este caso en aguas termales empleadas con propósitos terapéuticos y recreacionales. Este estudio se realizó en la provincia de Ardabil, Irán donde estudiaron la calidad microbiana y fisicoquímica de los balnearios considerando la influencia de las propiedades físicas y químicas en la calidad microbiana, las bacterias en estudio fueron *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, coliformes totales y coliformes fecales; y como parámetros físico-químicos turbidez, temperatura, cloro libre, conductividad, pH,

color, ORP, oxígeno disuelto y H<sub>2</sub>S, concluyendo que la conductividad y el potencial redox tenían un efecto declinante sobre la contaminación microbiana, esto quiere decir que a mayores niveles de ORP se refleja una alta concentración de oxígeno disuelto y es un signo de menor contaminación microbiana, lo que lleva a que los parámetros físicos-químicos como el ORP se pueden usar como un primer indicador de la calidad microbiana (Fazlzadeh, Sadeghi, Bagheri, Poureshg, & Rostami, 2016).

En 2007 Reichart, Szakmár, Jozwiak, Felföldic, & Baranyaic, estudiaron la medición del potencial redox como método para la determinación de coliformes, donde uno de los microorganismos estudiados fue *Escherichia coli*. Se encontraron aplicaciones de ORP por medio de colorimetría (azul de metileno y resazurina) en muestras de leche para comprobar su calidad higiénica donde relacionaron el rango de color con concentración bacteriana (Zambrano & Grass, 2008). Morandi, Silvetti, Tamburini y Brasca (2016) estudiaron los cambios de potencial redox en fermentaciones de leche para la producción de queso donde estudiaron la actividad reductora de diferentes cepas de bacterias ácido-lácticas como *Lactococcus lactis*, *Enterococcus durans*, *E. faecium*, *E. faecalis* y *Streptococcus thermophilus*, observando diferentes capacidades reductoras entre especies y entre cepas de la misma especie (Morandi, Silvetti, Tamburini, & Brasca, 2016).

Se han desarrollado diferentes metodologías para detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en leche. Una metodología molecular es la de reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Dai et al., 2015; Wei, Zhong, Hu, & Zhao, 2018) y PCR en tiempo real (Lin, Ke, Chen, & Xu, 2017). También han realizado estudios aplicando pruebas de inmunoensayo como ELISA para la detección de la enterotoxina A producida por *Staphylococcus aureus* (Nouri, Ahari, & Shahbazzadeh, 2018).

En el mercado existen diferentes equipos (portátiles y sobremesa) para la medición de potencial redox que varían en precio desde \$288.500 COP hasta \$2.190.000 COP. Estos equipos devuelven el valor medido en milivoltios y dependiendo de las características también pueden medir pH, temperatura, entre otros para muestras de agua (potable, piscinas, acuarios); no obstante, estos equipos no fueron diseñados para ser empleados en alimentos y así relacionar el valor medido de potencial redox con la presencia o ausencia de bacterias (Hanna Instruments, 2018).

## 5. MARCO REFERENCIAL

### 5.1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son originadas por la ingesta de alimentos y/o agua que contengan agentes etiológicos en cantidades que pueden afectar la salud de las personas a nivel individual o poblacional. Las ETA se pueden dividir en infecciones alimentarias que son producidas por el consumo de alimentos contaminados por agentes como bacterias, virus, hongos, parásitos, que una vez llegan a la luz del intestino pueden multiplicarse y producir toxinas que atraviesan la pared intestinal e invaden otros sistemas; y las intoxicaciones alimentarias que son producidas por el consumo de toxinas formadas en tejidos de plantas y/o animales, de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos o sustancias químicas (Guerrero, 2016; OMS, 2015).

La contaminación de los alimentos puede darse en cualquier etapa del proceso de producción hasta el consumo del alimento. Estas enfermedades se caracterizan por la aparición de síntomas gastrointestinales como: náuseas, diarrea, vómito, dolor abdominal y fiebre; de igual manera estas enfermedades pueden dar paso a síntomas neurológicos, ginecológicos e inmunológicos que pueden provocar una insuficiencia multiorgánica (OMS, 2015). En la Tabla 1 se encuentran diferentes agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos.

Tabla 1 Algunos agentes causantes de ETA.

Agente	
Bacteria	<i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Shigella</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Vibrio</i> spp. <i>Yersinia</i> spp
Parásitos protozoarios	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Cyclospora</i> spp. <i>Trichinella spiralis</i> <i>Giardia lamblia</i>

	<i>Toxoplasma caris</i> <i>Entamoeba histolytica</i>
Toxinas (Enterotoxinas)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacillus cereus</i>
Toxinas de pescado	Scombrotxin Ciguatera toxin Paralytic Shellfish toxin
Hongos	Phallotoxin de amatoxina
Virus	Norwalk Hepatitis A

**Nota** Fuente: (Foodborne disease, 2010), The Cleveland Clinic Foundation

El sistema de información regional de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) realizó una serie de reportes entre 1993-2010 donde de 9180 brotes reportados, el 69 % fue por bacterias, el 1,8 % por parásitos y el 9,7 % por virus; el porcentaje restante corresponde a causas de origen químico. En el 2013 prevaleció en Estados Unidos algunos patógenos bacterianos, como: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli* productora de toxina shiga, *Vibrio*, *Yersinia* y *Listeria*. Igualmente, para Europa en el año 2012, se encontraron brotes a causa de *Salmonella*, toxinas bacterianas, virus y *Campylobacter*. Para Colombia en el año 2018, se reportaron 11502 brotes de ETA de los cuales el 21% fueron causados por bacterias (Guerra, Almeida, & Willingham, 2016; Soto, Pérez, & Estrada, 2016; INS, 2018).

## 5.2. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae con morfología de bacilo Gram negativo, anaerobia facultativa y una temperatura óptima de crecimiento entre 30°C - 37°C (figura 2) (OMS, 2019). Este microorganismo habita en el intestino de los seres humanos y de los animales. Hoy en día se reconocen dos especies *E. coli* ETEC y *E. coli* VTEC como las de mayor impacto en la salud pública por consumo de alimentos contaminados como: carne de pavo, de pollo, de cerdo, productos lácteos, huevos, jamón de cerdo, agua y leche cruda. También hay seis grupos de cepas diarreogénicas que actúan como mecanismos de patogénesis y factores de virulencia (INS, 2015):

1. *Escherichia coli* enteropatógenos (EPEC).
2. *Escherichia coli* enterotoxigénicos (ETEC).
3. *Escherichia coli* enteroagregativa (CEEA)
4. *Escherichia coli*, verotoxigénicos o productores de toxinas Shiga (EHEC/VTEC/STEC).
5. *Escherichia coli* enteroagregativos (EAEC).
6. *Escherichia coli* con adherencia difusa (DAEC).

La detección de *Escherichia coli* se realiza por medio de varias técnicas moleculares como PCR, Elisa y cultivos microbiológicos (Soto, Pérez, & Estrada, 2016).



Figura 2 Tinción de Gram *Escherichia coli* (di lavoro, 2018).

### 5.2.1. Patogenicidad

Se presenta usualmente en alimentos contaminados, las principales cepas de *E. coli* pueden ser clasificadas como comensales, patógenos extraintestinales y patógenos intestinales. Se estima que un 10% de los pacientes con infección por *E. coli* productora de toxina shiga pueden desarrollar síndrome hemolítico urémico, ocasionando la muerte dentro de un rango de 3%-5%. A nivel global *E. coli* es la causa más común de insuficiencia renal aguda en los niños menores de 5 años. Pueden aparecer también complicaciones neurológicas con 25% y secuelas renales con 50% de los pacientes (OMS,2018).

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

**Dosis mínima infectante:** Al consumir de 10<sup>6</sup> a 10<sup>10</sup> unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de *E. coli* enterotoxigénica, ocasiona gastroenteritis ya que ellas logran colonizar el intestino delgado y producir enterotoxinas lábil al calor y la enterotoxina estable al calor (INS,2015). Cerca de 200 serotipos de *E. coli*, la OMS ha identificado a los de mayor impacto epidemiológico a O26, O103, O111 y O145 (INS, 2015; Weiler, Orrego, Alvarez, & Huber, 2017).

*Escherichia coli* enterotoxigénica es resistente al pH del estómago, sales biliares; de este modo coloniza el intestino delgado e invade los ganglios linfáticos mesentéricos, generando una infección localizada. Por lo tanto, evade las defensas intracelulares de las células intestinales sin ser modificadas o destruidas y comienza a dividirse dentro de la célula. Siguiendo a esto, pasa a la sangre y produce una infección sistémica, multiplicándose en macrófagos, y

ubicándose en hígado, médula ósea, etc. (Millemann, Granier, Boulouis, Lailier, & Belbis, 2015; Cicuta, et al, 2016).

### **5.2.2. Estadísticas**

En Colombia se realizaron estudios en los años 2010 y 2013 sobre la detección de coliforme totales como *E. coli*, se analizó muestras provenientes de diferentes puntos de comidas como restaurantes y ventas ambulantes. En el sector del norte de Bogotá se halló 40 restaurantes con venta de alimentos contaminados y 20 puntos de venta ambulancia (Soto, Pérez, & Estrada, 2016).

En Tanzania la probabilidad de que la leche se encuentre contaminada con bacterias como: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Leptospira* spp., entre otras se debe a que la leche se obtiene de origen vacuno con un estado de salud desconocido, en el cual no se observa buenas prácticas de ordeño y manipulación. Estos factores son causas potenciales de enfermedades transmitidas por la leche y la pérdida de calidad de la leche (Msalya, 2017).

*E. coli* a nivel mundial presenta problemas en la salud del ser humano, por el consumo de alimentos contaminados; en la Unión Europea se reportan más de 100.000 casos al año (N'Guessan, et al, 2015). A Continuación, se mostrará porcentajes de presencia de *Escherichia coli* en enfermedades de transmisión alimentaria en diferentes regiones:

#### **Región de África de la OMS**

La región de África ocupa el 70% de enfermedades transmitidas por alimentos, especialmente por coliforme totales: *E. coli*, causa el mayor número de muertes 32.000 por año en la región (OMS, 2015).

#### **Región de las Américas de la OMS**

Se estima 77 millones de personas se enferman anualmente por consumir alimentos contaminados, 9.000 mueren al año. Las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes son causadas por norovirus, *E. coli* y *Campylobacter* sp ocupa el 95% (OMS, 2015).

#### **Región del Mediterráneo Oriental de la OMS**

Se estima que más de 100 millones de personas que viven en esta región en la contraen enfermedades transmitidas por alimentos, 32 millones de las personas afectadas son niños menores de 5 años. Las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes son causadas por *E. coli*, norovirus y *Campylobacter* sp. ocupa el 70% (OMS, 2015).

### Región de Asia Sudoriental de la OMS

En esta región 60 millones de niños menores de 5 años se enferman, 50.000 mueren de enfermedades transmitidas por alimentos cada año. Las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes son causadas por norovirus, *Salmonella* spp. no tifoidea y *E. coli* patógena (OMS, 2015).

#### 5.3. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es una bacteria con morfología de cocos Gram positivos, su temperatura de crecimiento está dentro de un rango de 3°C - 40°C (figura 3), su género es *Staphylococcus* y se caracteriza por tener 32 especies y 8 subespecies aerobias y anaerobias facultativas (Camarena & Sánchez, 2018). Esta bacteria está presente en la nariz, la piel y la faringe, en el cual no produce ninguna enfermedad o síntomas. *S. aureus* es llamado el oportunista porque aprovecha lesiones en la piel o cualquier otro sitio para infectar ya sea en animales y humanos ya que se encuentra su vida inmunocomprometida llegando a la muerte (Mandal, 2012).

*Staphylococcus aureus*, son poblaciones naturales conocidas como “colonias enanas” o formas “G”. Al retomar un estudio aproximadamente de 40 años, se determinó que había una relación de una colonia enana con la mastitis bovina crónica en un rebaño israelí, en el cual las vacas lecheras se ven afectadas por la mastitis (Atalla, Gyles, & Mallard, 2015). *S. aureus* tiene 11 serotipos, en donde se presenta toxinas de virulencia en mamíferos, conocida como el síndrome del shock tóxico-1 (TSST-1) y toxinas exfoliativas ETA y ETB. Las enterotoxinas mencionadas anteriormente son causa de intoxicaciones alimentarias por ingerir productos contaminados, de origen lácteo y cárnico (Ministerio de Salud y Protección Social, 2011).

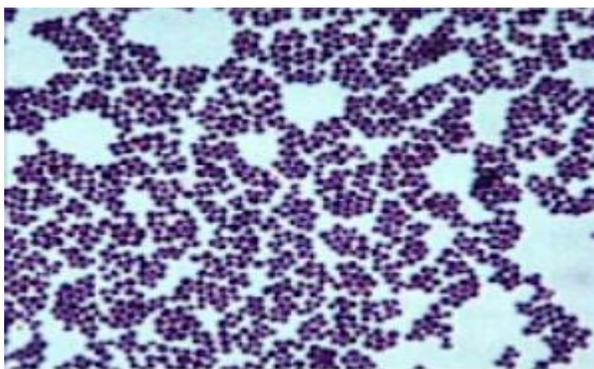


Figura 3 Tinción de Gram *Staphylococcus aureus* (di lavoro. 2018).

#### 5.3.1. Patogenicidad

*Staphylococcus aureus* es capaz de producir toxinas y enzimas extracelulares. Las enterotoxinas A, E, G, I son liberadas al ingerir alimentos contaminados, provocando intoxicaciones alimentarias (Kadariya, Smith, & Thapaliya, 2014).

Una de sus características es pertenecer a una familia de superantígenos de toxinas pirogénicas: (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI y SEJ) (Kadariya, Smith, & Thapaliya, 2014). Las toxinas pirogénicas causan actividad superantígena, como la inmunosupresión y la proliferación no controlada de células T. La actividad superantígena de las enterotoxinas estafilocócicas permite que la toxina entre al torrente sanguíneo y a su vez interacciona con las células presentadoras de antígeno y las células T. La mayoría de los efectos de las enterotoxinas estafilocócicas en ETA se desencadena al iniciar una respuesta inflamatoria intestinal focal debido a su actividad superantígena (Kadariya, Smith, & Thapaliya, 2014). Un informe indicó una concentración de 0.5 ng / mL perteneciente a las enterotoxinas estafilocócicas producto de la contaminación de la leche con chocolate causó un gran brote (Zendejas-Manzo, Avalos-Flores, & Soto-Padilla, 2014; N'Guessan, et als, 2015).

### 5.3.2. Estadísticas

*Staphylococcus aureus* a nivel mundial presenta problemas en la salud del ser humano, por el consumo de alimentos contaminados. A Continuación, se mostrará porcentajes de presencia de *Staphylococcus aureus* en enfermedades de transmisión alimentaria en diferentes países: (Kadariya, Smith, & Thapaliya, 2014; Zendejas-Manzo, Avalos-Flores, & Soto-Padilla, 2014)

En Japón se presentaron más de 13,000 casos de ETA, 2000 como resultado de la contaminación por *S. aureus* en la leche en una planta de producción de alimentos lácteos (Kadariya, Smith, & Thapaliya, 2014).

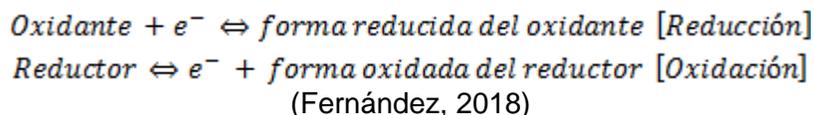
En Japón, Francia y el Reino Unido la enterotoxina A de *S. aureus* es la causa más común de ETA con una prevalencia del 77.8% (Kadariya, Smith, & Thapaliya, 2014). En Estados Unidos se reportó la presencia de *S. aureus* en restaurantes en el 44% de los alimentos evaluados, siendo el 93% de la causa de estos, errores en el procesamiento y la preparación de los alimentos; siendo el factor que más contribuyó en los brotes de ETA. Y una tasa de letalidad del 0.03% de 7126 casos en pacientes de edad avanzada (Zendejas-Manzo, Avalos-Flores, & Soto-Padilla, 2014).

## 5.4. POTENCIAL REDOX

En química, se estudia la conversión entre la energía eléctrica y la energía química realizando un intercambio de electrones entre sustancias. La oxidación se define como la pérdida de electrones; un agente oxidante es aquel que es capaz de ceder electrones (reductor), por lo tanto, la reducción es la que acepta

electrones, un agente reductor es el compuesto que es capaz de captar electrones (oxidante).

Existen reacciones que conllevan una oxidación y reducción permitiendo el cambio de energía, esta es proporcional a la capacidad de los reactivos para ceder o aceptar electrones. A continuación, se visualiza dos ecuaciones donde se describe el principio del potencial de oxidación- reducción (Murray et als, 2010, p.98; Fernández, 2018; Emerson Process Management, 2008).



#### 5.4.1. Métodos para medir potencial redox

**Colorimétricos:** Estos métodos se basan en el cambio de color como indicadores de reducción u oxidación, Los indicadores deben ser inertes y catalíticamente no activos. Son colores orgánicos como por ejemplo el azul de metileno que pierde todo el color durante la oxidación. (Palić & Dikanović-Lučan, 1993). En la tabla 2 se muestran otros indicadores redox y su color en forma oxidada y en forma reducida.

Tabla 2 Indicadores redox.

Indicador	Color reducido	Color oxidado
Azul de metileno	Azul	Incoloro
Difenillamin-Sulfato de Bario	Incoloro	Púrpura
Nitro-Ferroina	Rojo	Azula pálido
Rojo neutro	Rojo	Incoloro
Tionina	Violeta	Incoloro
Ferroina	Rojo	Azul pálido

Nota: Fuente (González, 2010)

**Electrométrico:** En este método se utilizan electrodos, una de medida et al de referencia donde el potencial redox de este último es conocido y no debe verse afectado por el medio (Palić & Dikanović-Lučan, 1993; Emerson Process Management, 2008).

### ✓ Electrodos de medida y referencia

Para conocer el potencial redox de una reacción química, se utiliza una celda electroquímica para generar electricidad a través de la reacción oxidación-reducción, por lo tanto, el ánodo es el electrodo donde se lleva a cabo la oxidación y el cátodo es el electrodo que permite la reducción; para realizar investigaciones más a fondo de los microorganismos en un medio determinado es necesario el uso de electrodos de medida y referencia (Electrodos de medida y referencia, 2018). En la figura 4 se muestra el principio en la medición de potencial redox.

Los electrodos de medición ceden, ganan o intercambian iones con el fin de saber cómo se encuentra el medio y así determinar su pH, concentración, potencial, etc. Estos electrodos pueden ser metálicos, vidrio, antimonio, quinhidrona, selectivos para iones. (Electrodos de medida y referencia, 2018; Emerson Process Management, 2008).

Los electrodos de referencia, como su nombre lo indica son la referencia sobre la cual se medirá el potencial respecto al electrodo de medida. La referencia universal para estos electrodos es de hidrógeno (0.0 V a pH 0) para los sistemas biológicos (-0.42 V a pH 7) (Murray, et al, 2010, p.98). Además del electrodo de hidrógeno puede haber electrodos de calomel, plata-cloruro de plata, Cu-CuSO<sub>4</sub>. Todos ellos con la característica principal de que su potencial no se vea afectado respecto a los cambios en la interfaz (Emerson Process Management, 2008; Electrodos de medida y referencia, 2018).

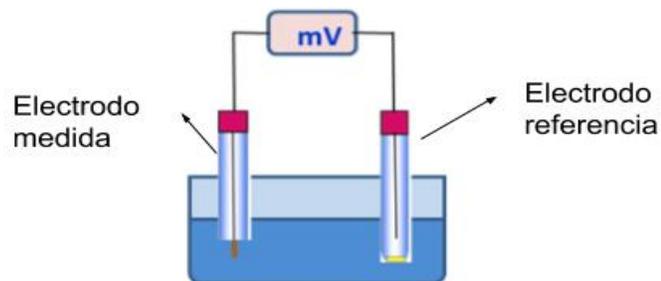


Figura 4 Esquema medición potencial redox (Aguasresiduales.info, 2017).

### 5.4.2. Potencial redox en la leche

La leche está conformada por diferentes sistemas biológicos de reducción propios de ella como las enzimas, que se ven influenciados por el crecimiento de microorganismos que aportan a la disminución del potencial redox de la leche al formar iones de  $H^+$  por la presencia de sustratos donadores de hidrógeno para las enzimas y metabolitos secundarios por la acción de las bacterias (Zambrano & Grass, 2008). El potencial de la leche fresca se encuentra en un rango de 200 mV a 300 mV, con mayor frecuencia de 230 mV a 250 mV (Palić & Dikanović-Lučan, 1993; Morandi, Silveti, Tamburini & Brasca, 2016). Este potencial se debe a la presencia de oxígeno disuelto en la leche. Las grasas, las proteínas y la lactosa no afectan el potencial redox de la leche (Palić & Dikanović-Lučan, 1993).

### **Factores que pueden variar el ORP**

- a) Tratamiento térmico disminuye el ORP
  - b) Disminuye  $O_2$  y disminuye el ORP
  - c) Contaminación con iones metálicos (Cu) aumentan el ORP
  - d) Actividad bacteriana disminuye el ORP
  - e) El pH influye en el potencial redox
- (Stanier, 1996; Prescott, Harley, & Klein, 2004).

### **5.4.3. Potencial redox en las bacterias**

Al inocular un medio con una bacteria el potencial redox se reducirá a un valor más negativo, la velocidad en que este potencial se vuelve más negativo depende de la tasa de crecimiento y del tipo de fisiología de la bacteria. La disminución del potencial redox se ha atribuido a la liberación de  $H_2$  gaseoso, y a los metabolitos reductores que se encuentran en el medio, como enzimas del alimento o de microorganismos que presenten un crecimiento activo. La disminución más rápida del potencial redox frecuentemente se relaciona con la fase exponencial que es cuando más aumentan las interacciones metabólicas (Stanier, 1996; Prescott, Harley, & Klein, 2004).

Potencial redox en microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos:

- Aerobios: en los alimentos, los microorganismos usan el oxígeno comoceptor final de electrones en la respiración, entre sus metabolitos de desecho se encuentra el agua y el dióxido de carbono, son importantes cuando el oxígeno se encuentra fácilmente en la superficie como en carnes y pan (Stanier, 1996; Prescott, Harley, & Klein, 2004; Moral, Nagar, Maan & Kaur, 2017).
- Anaerobios facultativos: su característica principal es sobrevivir en medios de presencia o ausencia de oxígeno, pertenece a las siguientes familias: Lactobacillaceae, Enterobacteriaceae, Corynebacteriaceae, estas bacterias pueden sobrevivir como se mencionó anteriormente. Por lo

tanto, estos microorganismos pueden crecer en superficie y en el interior de algunos alimentos teniendo una actividad proteolítica o lipolítica (Stanier, 1996; Prescott, Harley, & Klein, 2004; Moral, Nagar, Maan & Kaur, 2017).

- Anaerobios estrictos: como bacterias del género *Clostridium* sp más prevalente en alimentos crecen a bajos potenciales redox -300 mV. Las bacterias anaerobias crecen dentro de un rango de +30 a -250 mV para clostridios, siendo bacilos Gram positivos sobreviven a largo tiempo y alto potencial (+116 mV) teniendo en cuenta su presencia de oxígeno. Crecen comúnmente en la parte interna de los alimentos no procesados en la que está limitado el acceso al oxígeno (Stanier, 1996; Prescott, Harley, & Klein, 2004; Moral, Nagar, Maan & Kaur, 2017).

Las bacterias cuentan con un sistema molecular que les permite sentir las condiciones ambientales y así mismo responder a la variación de estas. En las bacterias estos sistemas están organizados en pares de proteínas: una cinasa sensora (CS), y una reguladora de la respuesta (RR), conformando la gran familia de sistemas de dos componentes (SDC), el número de SDC por célula varía y regulan procesos como: metabolismo energético de acuerdo a las condiciones redox del medio, mortalidad, formación de biopelículas, etc. Un ejemplo de estos sistemas se explica en la bacteria *E. coli*, esta cuenta con 4 CS: BarA, EvgS, TorS y ArcB, esta última forma parte del sistema Arc (Anoxic Redox Control), que regula la expresión de enzimas involucradas en el crecimiento aeróbico/anaeróbico, por ejemplo, cuando *E. coli* se encuentra en condiciones anaeróbicas, ArcB se activa como cinasa, se autofosforila, este grupo fosforilo es transferido a ArcA (RR), esta se une a secuencias específicas del ADN reprimiendo la expresión de genes involucrados en la respiración aeróbica y activando genes para el metabolismo fermentativo, mientras que en condiciones aeróbicas la ArcB se inactiva como cinasa, adquiere actividad de fosfatasa inactivando a ArcA como regulador transcripcional e inhabilitando el sistema (Núñez, Georgellis, & Álvarez, 2014).

## 5.5. MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE

La leche es uno de los productos de mayor importancia en la dieta de los mamíferos debido a sus características nutricionales, estas características también la hacen el medio adecuado para el crecimiento de diferentes microorganismos como hongos (mohos y levaduras) y bacterias (Robinson, 2005; Heer, 2007).

### **Bacterias encontradas en la leche cruda:**

#### *a. Bacterias Gram Positivas*

- Bacterias lácticas: fermentan la lactosa dando una porción elevada al ácido láctico, como *Pediococcus pentosaceus* (Robinson, 2005; Heer, 2007).

- Micrococcos Son bacterias generalmente aerobias que no fermentan la glucosa, sino que la degradan de forma oxidante, reduciendo ligeramente el pH. Estos no son patógenos, porque están desprovistos de coagulasa (Robinson, 2005; Heer, 2007).
- Estafilococos: Son anaerobios facultativos, y reaccionan con la glucosa, fermentándola y produciendo una reducción del pH de la leche entre 4.3 – 4.5. Son patógenas como *Staphylococcus aureus* (Robinson, 2005; Heer, 2007).
- Bacterias esporuladas: son las responsables de la alteración de la leche hervida o insuficientemente esterilizada, como *Clostridium botulinum* (Robinson, 2005; Heer, 2007).

#### b. Bacterias Gram Negativas

- Enterobacterias: se encuentran en el intestino de los mamíferos y su presencia en la leche puede deberse a una contaminación de origen fecal. Entre las enterobacterias de mayor importancia están: *Escherichia Coli*, *Salmonella* spp., *Cloaca*, o *enterobacter* (Robinson, 2005; Heer, 2007).
- Achromobacterias: son aerobias no fermentan la lactosa no coagulan la leche, se han descrito los géneros *Flavobacterium*, *Alcaligenes* y *Achromobacter* (Robinson, 2005; Heer, 2007).
- Pseudomonas: Son de importancia en la conservación de productos lácteos y representan más del 50% de la flora Gram negativa de la leche cruda, como *Pseudomonas fluorescens* (Robinson, 2005; Heer, 2007).

## 5.6. MARCO LEGAL NACIONAL

En Colombia se realizan procesos a través de la leche, los productos que se derivan de estos son: la mantequilla, quesos frescos, cuajadas en varios departamentos del país hay producción y distribución de ellos (INS,2015). La presencia de microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en leche cruda, pueden reflejar deficiencias sanitarias durante el proceso de producción.

La calidad de la leche cruda se establece con bases en parámetros higiénicos y sanitarios, los cuales inciden de manera representativa en la vida útil de este producto. Estos microorganismos pueden llegar a la leche cruda provenientes de animales infectados, heces, piel de los animales, agua, suelo, polvo, manipuladores, equipos, utensilios contaminados y derivados lácteos como quesos elaborados a partir de leche que no ha sido a procesos de pasteurización (N'Guessan, et al, 2015), es por esta razón que las entidades encargadas de vigilar los procesos de producción de alimentos para consumo humano expiden normas para controlar todos los aspectos de la cadena productiva de los alimentos.

### 5.6.1. Control de calidad de la leche

La calidad de la leche cruda que llega a la planta es fundamental para garantizar la calidad de los productos que se elaboran en la industria. Es así como cada planta establece criterios de calidad para la leche que ingresa. En varios países incluyendo Colombia el pago de leche a proveedores se hace teniendo en cuenta parámetros de calidad que se establecen de acuerdo con las políticas de calidad de la compañía y a la normatividad vigente en cada país. Para el caso de Colombia, aplica el **decreto 616 del 28 de febrero de 2006**: “por el cual se expide el reglamento técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendia, importe o exporte en el país”. En este se encuentran las características microbiológicas permitidas para leche pasteurizada Tabla 3, ultrapasteurizada Tabla 4 y ultra alta temperatura, para realizar el recuento de estos microorganismos se realiza por diferentes técnicas de cuantificación microbiana como, por ejemplo, número más probable (NMP) recomendada por el decreto, conteo en placas, recuento microscópico y espectrofotometría. Mediante el **decreto 2838 del 24 de agosto de 2006** modifica parcialmente el decreto 616 de 2006 y dicta otras disposiciones dentro de las modificaciones se encuentra el uso de tanques para el transporte de la leche que garantice una temperatura de 4°C +/- 2°C, los requisitos para poder comercializar leche cruda y leche cruda enfriada para consumo humano directo y las características microbiológicas de la leche cruda y cruda enfriada Tabla 5.

Nota: la leche cruda enfriada es definida como: “Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de terminación ni de higienización y que se conserva a una temperatura de 4°C +/- 2°C para su comercialización” (decreto 2838, 2006).

Tabla 3 Características microbiológicas de la leche pasteurizada.

<b>Índices permisibles</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>
Rto. Microorganismos mesófilos ufc/mL	3	40.000	80.000	1
Rto. Coliformes ufc/mL	3	menor de 1	10	1
Rto. Coliformes fecales ufc/mL	3	menor de 1	-	0

**Nota** Fuente: Decreto 616 de 2006

Tabla 4 Características microbiológicas de la leche ultrapasteurizada.

<b>Índices permisibles</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>
Rto. Microorganismos mesófilos ufc/mL	3	1.000	10.000	1
Rto. Coliformes ufc/mL	3	menor de 1	-	0
Rto. Coliformes fecales ufc/mL	3	menor de 1	-	0
Rto. Esporas anaerobias ufc/mL	3	menor de 1	-	0
Rto. Esporas aeróbicas ufc/mL	3	menor de 1	-	0

**Nota** Fuente: Decreto 616 de 2006

Donde:

n = número de muestras que se van a examinar

m = índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M = índice máximo permisible para identificar nivel de calidad aceptable.

C = número de muestras permitidas con resulta de entre m y M.

Ufc/mL = unidades formadoras de colonia por mililitro

Para la leche ultra alta temperatura se exige una prueba de esterilidad comercial donde luego de una incubación durante 10 días no se presente crecimiento microbiano a 55° C y 35° C.

Tabla 5 Características microbiológicas de la leche cruda y cruda enfriada.

Índice permisible	Unidades
Recuento de mesófilos aerobios UFC/mL	700.000

Nota: Fuente: Decreto 2838 de 2006

### 5.6.2. Control de calidad de productos derivados de la leche cruda.

La leche cruda es la materia prima para la elaboración de diferentes productos como por ejemplo los quesos, la mantequilla, los lactosueros que están definidos como *“Producto lácteo líquido separado de la cuajada tras la coagulación enzimática de la leche, crema, leche desnatada o descremada obtenido del proceso de elaboración de quesos”* (Resolución 2997, 2007), etc. por ello a nivel nacional se cuenta con una normativa que dicta los requerimientos microbiológicos de estos productos. La norma técnica colombiana **NTC 750 de 2000** establece la definición, clasificación y requisitos que deben cumplir los quesos para consumo directo o elaboración posterior (NTC 750, 2000), la **NTC 734 de 1996** da los requisitos microbiológicos para la mantequilla y la **Resolución 2997 de 2007** que establece el reglamento técnico y los requisitos sanitarios que deben cumplir los lactosueros usados como materia prima para la elaboración de diferentes productos (Resolución 2997, 2007). En la tabla 6 se muestran los requisitos microbiológicos para los diferentes estos productos.

Tabla 6 Requisitos microbiológicos para diferentes productos derivados de la leche.

LACTOSUEROS				
Índices permisibles	n	m	M	C
Rto. Microorganismos mesófilos /g	3	1.000	10.000	1
Rto. Coliformes /g	3	menor de	-	0

		10		
Rto. Escherichia coli /g	3	menor de 10	-	0
Rto. Staphylococcus aureus /g	3	menor de 100	100	1
Rto. Bacillus cereus /g	3	100	1.000	1
Mohos y levaduras	3	100	500	1
<i>Salmonella</i> /25g	3	0	-	0
<b>QUESO</b>				
<b>Índices permisibles</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>C</b>
Coliformes UFC/g (30°C)	3	1.000**	5.000**	1
		100*	1.000*	
Coliformes UFC/g (45°C)	3	50	100	1
		10*	100*	1
Mohos y levaduras UFC/g	3	500**	5.000**	1
Rto. Estafilococos coagulasa positiva UFC/g	3	100	1.000	1
<i>Salmonella</i> /25g	3	0	-	1
Listeria monocytogenes /25g	3	0	-	1
<b>MANTEQUILLA</b>				
<b>Índices permisibles</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>C</b>
NMP Coliformes /g	3	75	150	1
NMP Coliformes fecales /g	3	menor de 3	-	0
Rto. Mohos y levadura UFC/g	3	500	1.000	1
Rto. Staphylococcus coagulasa positiva UFC/g	3	100	200	1
<i>Salmonella</i> /25g	3	0	-	0

**Nota:** Fuente: NTC 750, 734, Resolución 2997/07

Donde:

n = número de muestras que se van a examinar

m = índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M = índice máximo permisible para identificar nivel de calidad aceptable.

C = número de muestras permitidas con resulta de entre m y M.

Ufc/mL = unidades formadoras de colonia por mililitro

\*. Índice máximo para quesos semimadurado, madurado, madurado por mohos, enteros, rallados o en polvo.

\*\* Índice máximo para quesos frescos.

### 5.6.3. Análisis microbiológicos

La norma técnica colombiana **NTC 4092 de 2009** da los requisitos generales y directrices para la implementación de las normas sobre microbiología de alimentos lácteos y productos lácteos para la enumeración de microorganismos, buenas prácticas para laboratorios microbiológicos de alimentos y directrices para la acreditación de laboratorios microbiológicos para alimentos (NTC 4092, 2009). Para realizar las pruebas microbiológicas existen protocolos emitidos por la organización internacional de estandarización (ISO) para microbiología de alimentos y alimentos para animales, donde hay un protocolo para cada bacteria como por ejemplo la **ISO 6888-1:1999** para de detección de *Staphylococcus aureus* y la **ISO 16654:2001** para *Escherichia coli*. En ellas se especifica materiales de laboratorio, preparación de la muestra, preparación del agar para el crecimiento de la bacteria, el procedimiento para la enumeración, la confirmación y la interpretación de los resultados.

#### 5.6.4. Calidad sanitaria en alimentos

La **resolución 2674 de 2013** dictan los requisitos sanitarios que deben cumplir para la fabricación, procesamiento, preparación, envase, almacenamiento, transporte, distribución y comercialización de alimentos y materias primas de alimentos; los requisitos para la notificación, permiso o registro sanitario de los alimentos según el riesgo en salud pública (resolución 2674, 2013). Y el decreto 539 de 2014 donde expiden el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los importadores y exportadores de alimentos, materias primas e insumos para alimentos destinados para el consumo humano (decreto 539, 2014).

### 5.7 MARCO LEGAL INTERNACIONAL

A nivel internacional se establecen normatividades para la calidad de la leche cruda, la cual la rige Codex, una comisión alimentaria teniendo participación de la FAO y OMS sobre normas alimentarias establecido por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Estas normas exigen que los productos derivados de la leche cruda se preparen y manipulen respecto a los principios generales de higiene de los alimentos, teniendo en cuenta los códigos de prácticas de higiene. Los productos deberán cumplir con criterios microbiológicos establecidos de conformidad con los principios de la venta de estos y tener criterios microbiológicos a los alimentos (CAC/GL 21-1997).

Se establecen bases en parámetros higiénicos y sanitarios, los cuales inciden de manera representativa en la vida útil de los siguientes productos derivados de la leche cruda por medio de la norma Codex (Codex alimentarius, 2011):

- Leches en polvo y la nata (crema) en polvo (CODEX STAN 207-1999)

- La normatividad de CODEX
- Leches fermentadas (CODEX STAN 243-2003)
- Mezclas de leche desnatada y grasa vegetal en polvo (CODEX STAN 251-2006)
- Mezclas de leche condensada edulcorada desnatada y grasa vegetal (CODEX STAN 252-2006)
- Materias grasas lácteas para untar (CODEX STAN 253-2006)
- Mantequilla (manteca) (CODEX STAN 279-1971)
- Productos a base de grasa de la leche (CODEX STAN 280-1973)
- Leches evaporadas (CODEX STAN 281-1971)
- Leches condensadas (CODEX STAN 282-1971)
- Natas (cremas) y las natas (cremas) preparadas (CODEX STAN 288-1976)
- Sueros en polvo (CODEX STAN 289-1995)

En el Reglamento (CE) 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, uno de los objetivos fundamentales de este parlamento es asegurar la salud por medio del consumo de alimentos contaminados, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación se estipula la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

El reglamento sanciona aquellos productos alimenticios que se encuentren contaminados, el cual no deben contener microorganismos ni sus toxinas o metabolitos en cantidades que pueda interactuar con la salud humana (Diario oficial de la unión europea, 2005).

## 6. LEVANTAMIENTO DE REQUERIMIENTOS

El levantamiento de requerimientos del proyecto se divide en dos partes. La primera parte, son los requerimientos para la caracterización del potencial redox con las bacterias en estudio y la segunda, son los requerimientos para el desarrollo del equipo para la medición del potencial redox.

### 6.1. Requerimientos Caracterización ORP

Las cepas bacterianas fueron suministradas por el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad el Bosque, y el proyecto se desarrolló en los laboratorios de ingeniería de la Universidad.

- Cultivos bacterianos: Al momento de realizar la curva de crecimiento y la curva de variación de ORP se deben usar cultivos puros de 24 horas de crecimiento en medio sólido.
- Conteo por placa: Para realizar la curva de crecimiento se procede cada periodo de tiempo a tomar muestras del medio inoculado con la bacteria, a partir del cual se realizan diluciones seriadas, se siembra por duplicado las últimas dos diluciones y después de 24 horas de incubación contar las colonias visibles; aplicar la ecuación (1) (Arana, Orruo, & Barcina, 2019).

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias contadas}}{ml \text{ sembrados}} * \text{Factor de dilución} \quad (1)$$

- Esterilidad: Para garantizar la asepsia al momento de realizar la caracterización del ORP se debe seguir el protocolo de limpieza planteado en el proyecto ver sección 7.2.
- Seguridad: Se deben tener en cuenta los elementos de protección personal y reglas de laboratorio al momento de manipular las muestras inoculadas con los microorganismos.

### 6.2. Requerimientos Desarrollo Equipo Medición ORP

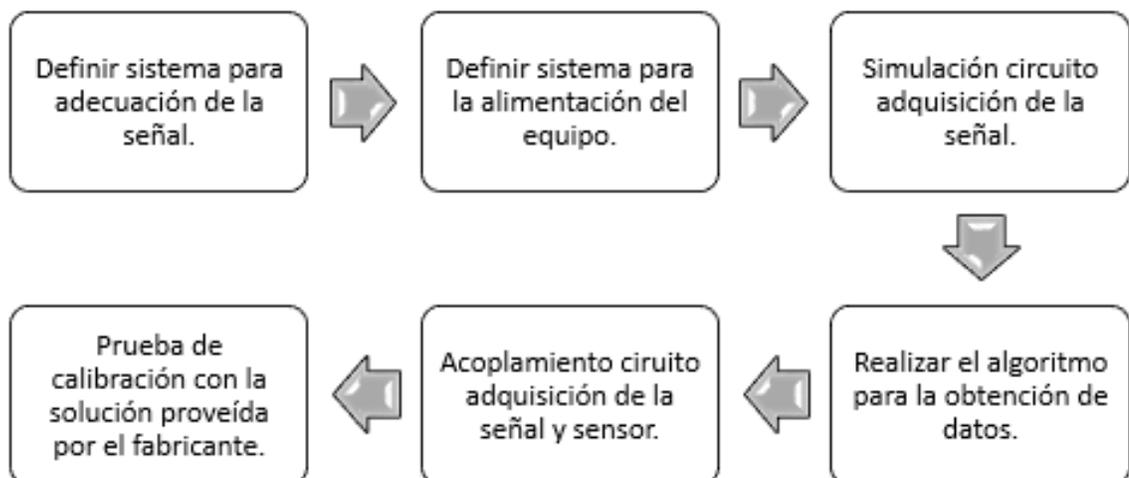
- Rango de medición: Debido al rango de medición del electrodo adquirido (-2 V a 2 V), el equipo debe ser capaz de realizar la adquisición y análisis de la señal dentro de este rango.

- Solución calibradora: Permite llevar un control del correcto funcionamiento del electrodo y del equipo al momento de realizar la medición, la solución calibradora pertenece a la compañía Hanna Instrument con un valor de 240 mV  $\pm$ 20 mV a 25°C.
- Usabilidad: El equipo debe ser fácil de manipular y contar con un manual de usuario que explique su funcionamiento.
- Desempeño: El equipo debe realizar la medición de ORP en un tiempo mínimo de 10 minutos y la detección de las bacterias en un tiempo menor a 24 horas.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. DISEÑO PROTOTIPO PARA LA ADQUISICIÓN DE DATOS PROVENIENTES DEL ELECTRODO DE POTENCIAL REDOX.

En el esquema 1 se observa la metodología empleada para la adquisición de la señal proveniente del electrodo de ORP referencia HI3131B de la marca Hanna Instrument, el rango de medición es de -2 V a 2 V con una tolerancia de  $\pm$ 10 mV. Debido a la incapacidad del Arduino para leer señales negativas fue necesario implementar un sistema electrónico para la adecuación de la señal. Se utilizaron 3 amplificadores operacionales configurados en buffer, sumador inversor e inversor, además de un regulador de voltaje 5 V a 2.5 V. La alimentación del equipo se dio por medio de una fuente dual de -10 V y 10 V, las simulaciones del circuito para la adquisición de la señal se realizaron con el software Proteus Design Suite, el algoritmo para la obtención de los datos se desarrolló en Arduino, en el esquema 7 se puede observar el diagrama esquemático del circuito implementado para la adecuación de la señal.



Esquema 1 Metodología para la adquisición de datos provenientes del electrodo.

## 7.2. PRUEBAS DE ASEPSIA

El objetivo de las pruebas es garantizar que el electrodo no contamine muestras de leche después de su uso, ya que al realizar las mediciones se tienen muestras con leche contaminada por microorganismos y es posible que se pueda alterar los resultados de las siguientes mediciones si no se realiza una buena limpieza. Para esto se propone dos pruebas una sin el uso de cultivos bacterianos y otra con el uso de estos.

El protocolo de limpieza utilizado se definió después de una revisión de diferentes técnicas utilizadas para la eliminación de bacterias en superficies (Barker, Naeeni, & Bloomfield, 2003; Echeverri, Cifuentes, Granados, Arias, & López, 2007; Gold & Hitchins, 2013).

**Nota:** Las pruebas se llevaron a cabo en la cabina de flujo laminar por lo que debe ser limpiada con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 10% antes de esterilizarla y esterilizar los materiales a usar incluido el electrodo con luz ultravioleta durante 15 minutos.

### Protocolo limpieza electrodo ORP:

1. Agregar 3 mL de hipoclorito de sodio al 10% en un tubo falcon de 15 mL y sumergir el electrodo durante 5 minutos, pasado este tiempo descartar el hipoclorito, lavar el electrodo con agua desionizada o agua destilada y secar el electrodo con una toalla estéril.
2. En otro tubo falcon de 15 mL agregar 3 mL de la solución de limpieza del fabricante\* (HI70671) y sumergir el electrodo durante 5 minutos, pasado este tiempo descartar la solución, lavar el electrodo con agua desionizada o agua destilada y secar el electrodo con una toalla estéril.

\*La solución está compuesta por formaldehído a una concentración de > 1% - < 5% y metanol con una concentración de > 0.1% - < 3%.

### 7.2.1. Prueba de asepsia del electrodo

En la primera prueba de asepsia se evaluó la presencia de contaminación en el electrodo sin el uso de cultivos microbianos.

Se tomaron 8 tubos falcon de 15 mL, se agregaron 3 mL de caldo LB en cada tubo y se rotularon como se observa en la tabla 7.

Tabla 7 Rotulación tubos y momento del experimento.

N° tubo	N° tubo replica	Momento del experimento
---------	-----------------	-------------------------

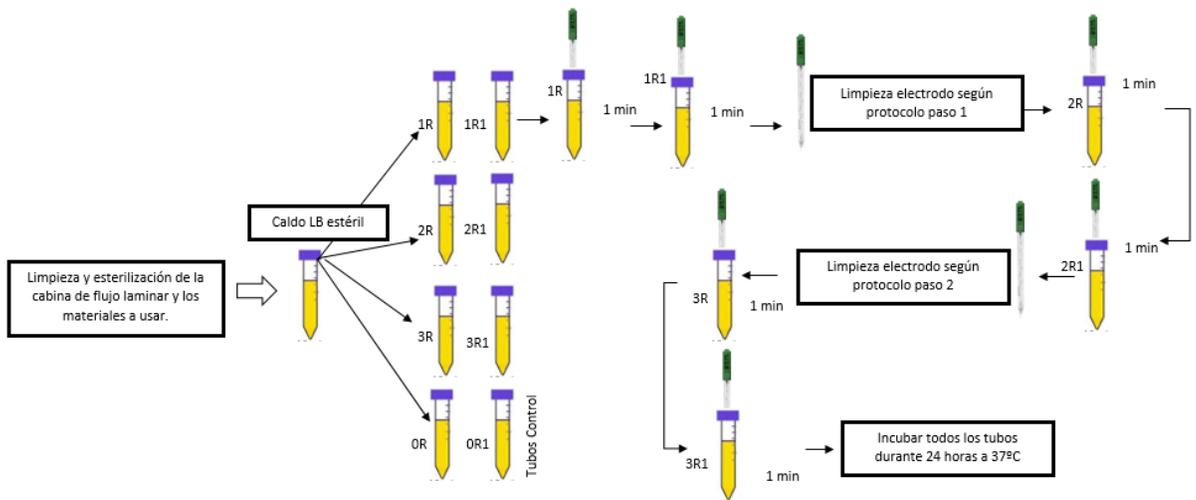
0R	0R1	Control
1R	1R1	Después de irradiación con luz UV
2R	2R1	Después de lavado con hipoclorito de sodio 10%
3R	3R1	Después de lavado con la solución del fabricante.

Los tubos 0R y 0R1 fueron los controles del experimento. Una vez se terminó de limpiar e irradiar tanto la cabina de flujo laminar como el electrodo, este último fue sumergido en el tubo 1R durante 1 minuto, pasado este tiempo se sumergió el electrodo en el tubo 1R1 durante 1 minuto. Después se sumergió el electrodo en 3 mL de hipoclorito de sodio al 10% durante 3 minutos, se lavó con agua desionizada y se secó con una toalla estéril, posteriormente se sumergió nuevamente el electrodo durante 1 minuto en el tubo rotulado como 2R, pasado este tiempo se sumergió en el tubo 2R1 durante otro minuto. Después se sumergió el electrodo en 3 mL de la solución del fabricante durante 3 minutos, se lavó con agua desionizada y se secó con una toalla estéril, finalmente se sumergió el electrodo en el tubo 3R durante 1 minuto y pasado este tiempo se sumergió en el tubo 3R1 durante otro minuto (esquema 2).

Todos los tubos donde fue sumergido el electrodo se llevaron a incubación durante 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se sembraron 10 µL de cada tubo en medio MacConkey y LB de acuerdo a la tabla 8; se sembró siguiendo la técnica de siembra por estrías.

Tabla 8 Medio de siembra de cada muestra inoculada.

<b>Medio LB</b>	<b>Medio MacCounkey</b>
Tubo 0R	Tubo 0R1
Tubo 1R	Tubo 1R1
Tubo 2R	Tubo 2R1
Tubo 3R	Tubo 3R1



Esquema 2 Diagrama experimental para realizar la prueba de asepsia del electrodo.

### 7.2.2. Prueba de asepsia con uso de cultivos bacterianos

En la segunda prueba de asepsia se evaluó la presencia de contaminación en el electrodo con el uso de cultivos microbianos, para esto se utilizó un cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 facilitado por el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad el Bosque (figura 5).

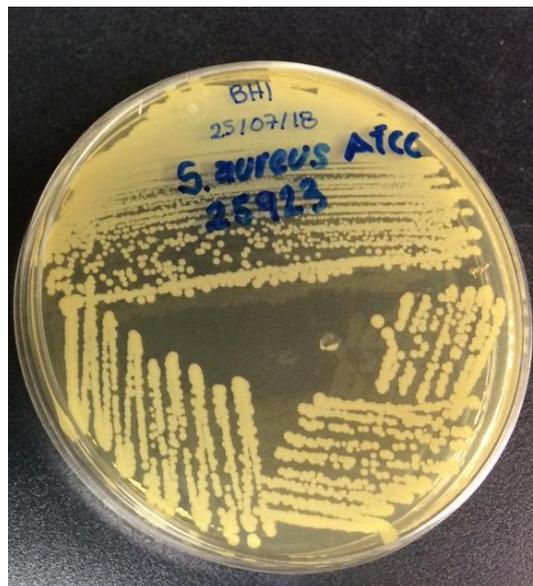


Figura 5 cultivo de *S. aureus* en medio BHI.

Se tomó una porción de cada cultivo y se inoculó en 30mL de caldo LB para posteriormente realizar las alícuotas del experimento.

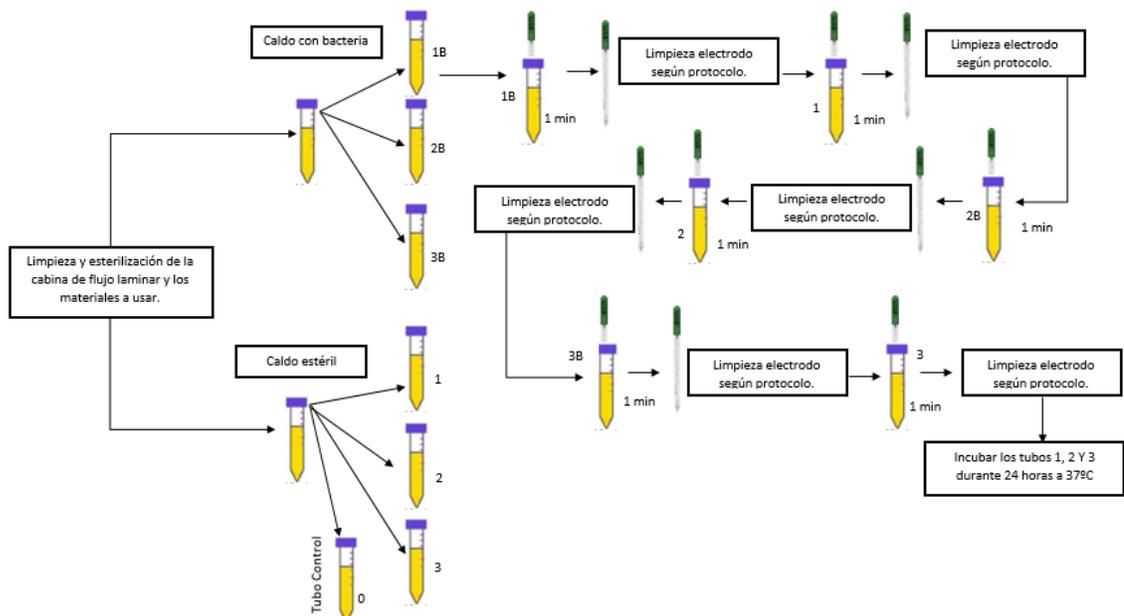
Se tomaron 7 tubos falcon de 15 mL y se rotularon como se observa en la tabla 9, en los tubos 1B, 2B y 3B se sirvieron 3 mL de caldo LB con *S. aureus*, y en los tubos 0, 1, 2, y 3 se sirvió 3 mL de caldo LB estéril donde el tubo rotulado como 0 fue el control del experimento.

Tabla 9 Rotulación tubos prueba asepsia con bacterias.

<b>N° tubo</b>	<b>Contenido</b>
0	Caldo LB control.
1	Caldo LB estéril.
2	Caldo LB estéril.
3	Caldo LB estéril.
1B	Caldo LB + bacteria
2B	Caldo LB + bacteria
3B	Caldo LB + bacteria

Primero se sumergió el electrodo en el tubo rotulado como 1B durante 1 minuto, pasado este tiempo se procedió a realizar la limpieza de este según el protocolo de limpieza descrito anteriormente y se sumergió durante 1 minuto en el tubo número 1; nuevamente se limpió el electrodo y se procedió a sumergirlo en el tubo 2B durante 1 minuto, después se limpió siguiendo el protocolo y se sumergió en el tubo número 2 durante 1 minuto, posteriormente se sumergió el electrodo en el tubo 3B durante 1 minuto y finalmente se realizó la limpieza del electrodo y se sumergió durante 1 minuto en el tubo número 3 (esquema 3).

Los tubos número 0, 1, 2 y 3 se llevaron a incubación durante 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se sembraron 10 µL de cada tubo en medio BHI para *S. aureus*, las siembras se realizaron por estría.



Esquema 3 Diagrama experimental para realizar la prueba de asepsia del electrodo usando cultivos bacterianos.

### 7.3. CARACTERIZACIÓN DE POTENCIAL REDOX GENERADO POR LAS BACTERIAS.

Las muestras de leche cruda se obtuvieron en el municipio de Chía, Hacienda la Fontana donde cuentan con un grupo de 60 reses (figura 6), las cepas bacterianas fueron facilitadas por el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad el Bosque.

Para la caracterización del potencial redox respecto al crecimiento de los microorganismos en estudio se procedió a realizar la curva de crecimiento de cada bacteria con relación al potencial redox en leche cruda; las curvas se realizaron en dos muestras de leche cruda obtenida de dos diferentes vacas, su respectivo duplicado y para determinar el valor de potencial redox de cada hora se realizaron tres repeticiones de las mediciones.



Figura 6 Lugar de recolección de muestras de leche cruda (Rodríguez, Sotomonte, 2019).

### Protocolo de curvas de crecimiento

En el diseño experimental se planteó el uso de un factor que fueron dos muestras de leche cruda obtenidas de diferentes individuos. Para la realización de las curvas se tomaron 150 mL de leche cruda procedentes de dos diferentes vacas. Las muestras fueron nombradas como LC1A y LC1B para la muestra de leche de la vaca número 1 y su respectivo duplicado y LC2A y LC2B para la muestra de leche de la vaca número 2 y su respectivo duplicado. Como control negativo fueron empleados 150 mL de leche cruda (esquema 4).

Cada muestra de leche cruda se inoculó con 3 mL de solución salina (0.85%) a una concentración aproximada de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL, una vez inoculadas las muestras fueron incubadas a 37°C por 150 rpm durante 24 horas. El muestreo se realizó a cada dos horas hasta la hora 10 y a la hora 24, (Jozwiak, Felföldi, & Baranyai, 2007; Tian, et al, 2017), tomando 3 mL de las cuales 1 mL se empleó para determinar la concentración bacteriana y 2 mL para medir el ORP.

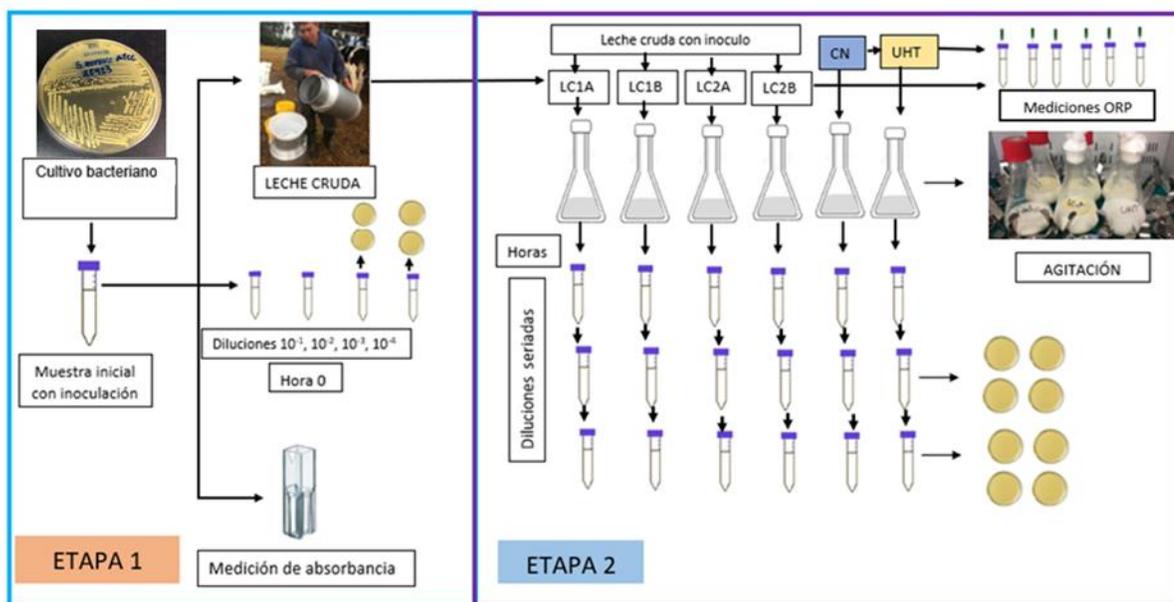
Para determinar la concentración bacteriana se realizaron diluciones seriadas aumentando el factor de dilución a través del tiempo, se sembraron las últimas dos diluciones por duplicado tomando 20  $\mu$ L o 100  $\mu$ L dependiendo del tamaño de la caja petri (65x15mm o 100x15mm), las siembras se realizaron en agar selectivo Baird Parker para *S. aureus* y MacConkey para *E. coli*. Las unidades formadoras de colonia se calcularon siguiendo la ecuación 1 planteada en el ítem 6.1.

Para la medición del potencial redox se realizaron tres repeticiones en cada tiempo de las curvas, aplicando en cada medición el protocolo de asepsia planteado en el ítem 7.2.

Por otra parte también fue realizada una curva de crecimiento de *S. aureus* a partir de 150 mL leche estéril procedente de dos vacas, la cual se obtuvo por ebullición e irradiación con luz UV durante 15 minutos. El muestreo se procedió de igual forma a las curvas anteriores.

Con el fin de terminar el tiempo que debe permanecer sumergido el electrodo en la sustancia para obtener una medición correcta, se realizaron varias mediciones con el electrodo adquirido, hasta que se estabilizara la lectura, así el tiempo en donde se obtuvo menor variación en las mediciones fue 60 segundos (Espinoza, García, Rojas, & Castillo, 2018).

Al finalizar el ensayo de las dos curvas con su respectivo duplicado se obtuvo en total de 112 datos (UFC/mL) correspondientes a las siembras en medio sólido de cada periodo muestreado (distribuidos en 16 datos por cada hora muestreada), y 84 datos derivados de la medición de potencial redox en cada hora de muestreo de las dos curvas y su respectivo duplicado (distribuidos en 12 datos por hora muestreada) Para cada microorganismo evaluado se adquirieron un total de 196 datos para la formación de la base de datos.

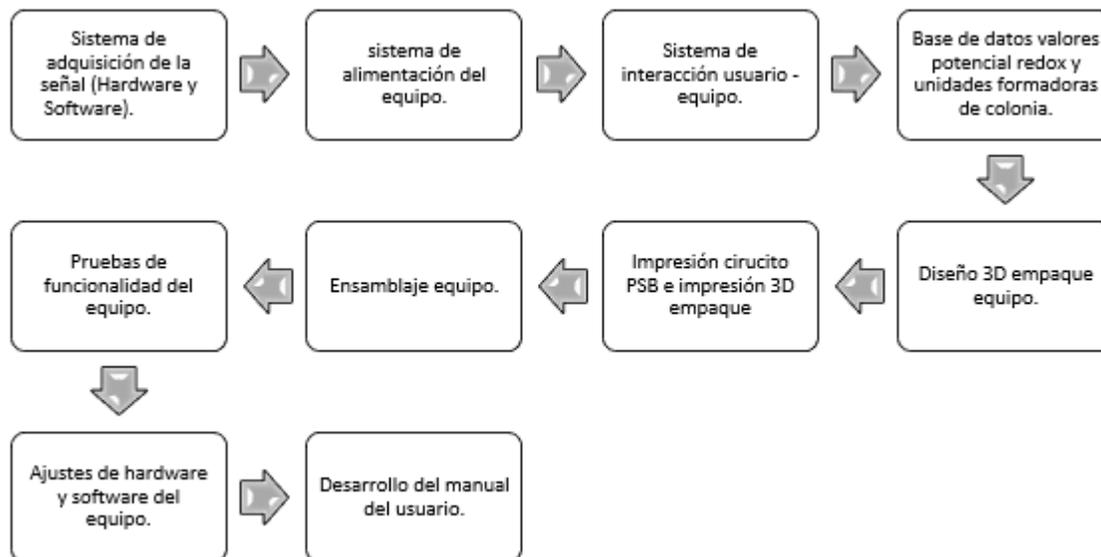


Esquema 4 Metodología para la relación de ORP y concentración de las bacterias en estudio en leche cruda.

El análisis de los datos obtenidos se realizó por medio del software XLSAT complemento de EXCEL donde se aplicó ANOVA y se realizó la comparación con Tukey, analizando las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%, y se aplicaron diferentes pruebas estadísticas para observar la variabilidad y la normalidad de los datos obtenidos, los resultados se presentarán en el siguiente capítulo.

#### 7.4. IMPLEMENTACIÓN DEL EQUIPO PARA LA DETECCIÓN DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO.

En el esquema 5 se muestra del diagrama de bloques que contiene las etapas que se siguieron para el diseño y la implementación del equipo de medición de potencial redox en leche cruda.



Esquema 5 Metodología para la implementación del equipo.

**Sistema de medición (electrodo) de potencial redox:** El electrodo HI 3131B de Hanna instrumentos está hecho con punta de platino, cuerpo de vidrio y unión cerámica, y electrolito de KCl 3.5M y AgCl que tiene la función de ser el puente salino para el funcionamiento del circuito. El electrodo cuenta con un rango de medición de -2000 mV a 2000 mV con una tolerancia del  $\pm 10$  mV (Hanna Instrument, 2018).

El sistema de medición consistió en adicionar en un tubo tipo falcon de capacidad de 15 mL un volumen entre 1.5 mL y 3 mL de la muestra a medir e introducir el electrodo sin que la punta toque el fondo del recipiente (figura 7). El electrodo se debe ubicar de manera perpendicular a la muestra y realizar una medición estacionaria (sin agitación) o agitación suave durante 60 s aproximadamente.



Figura 7 ejemplo usando un volumen de 1.5 mL de muestra para la medición.

**Sistema de procesamiento:** Se realizó la comparación entre el Arduino uno que incluye el microcontrolador ATmega328 y el LaunchPad MSP430G2 de Texas Instrument que incluye el microcontrolador TI M430G2553, donde se comparó la velocidad de procesamiento, la capacidad de almacenamiento, la cantidad de entradas analógicas y digitales y el voltaje de alimentación y entrega de estas dos tarjetas (tabla 10), donde se escogió el Arduino uno como tarjeta de procesamiento.

El sistema de procesamiento tiene la capacidad de realizar la lectura del electrodo durante 60 segundos visualizar y almacenar en una microSD el resultado obtenido. El funcionamiento del circuito para la adquisición de los datos se explica en el numeral 7.1 y en la figura 8 se puede observar el diagrama esquemático del circuito.

Tabla 10 Comparación Arduino uno y LaunchPad MSP430G2.

Arduino Uno	LaunchPad MSP430G2
Data Bus: 8 bits	Data Bus: 16 bits
Velocidad: 16 MHz	Velocidad: 16MHz
Almacenamiento: 32KB	Almacenamiento: 16KB
RAM: 2KB	RAM: 512B
Digital I/O: 14 pines	Digital I/O: 16 pines
Analog I/O: 8 pines	Analog I/O: 8 pines
Alimentación: 12 V máx.	Alimentación: 3.3 V máx.

**Sistema de alimentación:** La lectura del electrodo arrojó valores negativos de potencial redox, el Arduino no registra lecturas menores a cero, por lo tanto, se configuró un sistema de amplificadores para hacer posible la lectura. Este sistema debe ser alimentado con una fuente dual que permita también la alimentación del Arduino y los demás componentes del equipo.

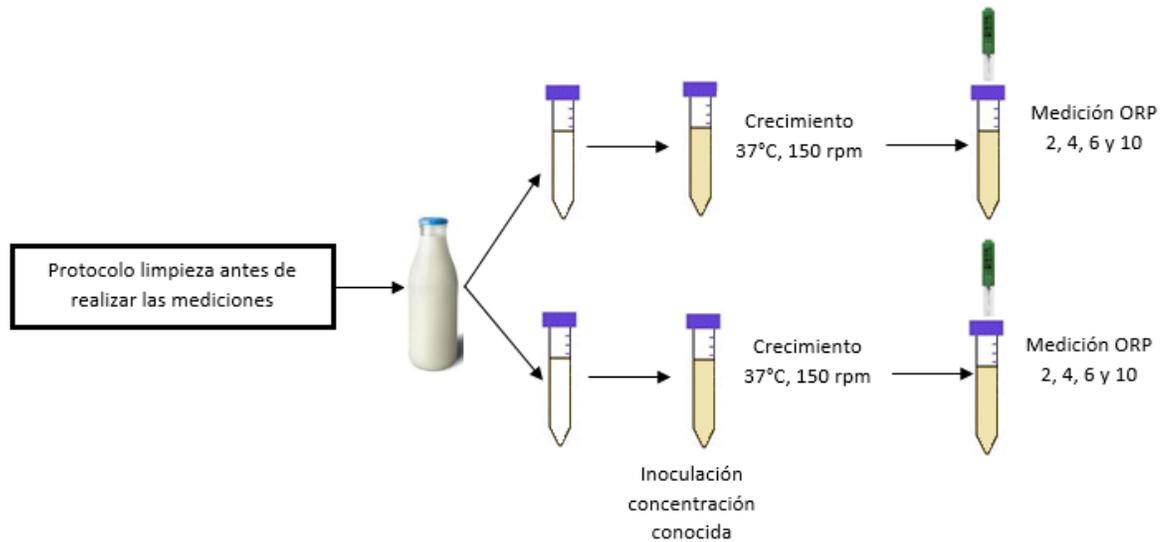
**Sistema de interacción con el usuario:** El usuario puede manipular el equipo por medio de un teclado con cuatro opciones, teniendo la posibilidad de medir y visualizar el potencial redox en una muestra de leche con posible presencia de *S. aureus*, medir y visualizar el potencial redox de una muestra de leche con posible presencia de *E. coli*, medir y visualizar el potencial redox en cualquier muestra líquida.

El almacenamiento se realizó con un adaptador para memoria microSD donde se guarden los datos obtenidos al final del análisis de la medición inicial de potencial redox. La capacidad de la memoria es delimitada por el usuario. El reporte generado en un archivo .txt que tiene un tamaño promedio de 69 bytes.

## 7.5. EVALUACIÓN DEL EQUIPO.

- La evaluación del equipo se dividió en dos partes:

La primera parte se realizó con muestras de leche inoculadas a concentraciones conocidas. Las muestras de leche cruda se transportaron al laboratorio a  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Decreto 616., 2006), se inocularon con dos concentraciones conocidas de cada bacteria, posterior a esto se llevó a crecimiento con las mismas condiciones utilizadas para la caracterización del potencial redox (ítem 7.3), se midió el potencial redox con el equipo a las 2, 4, 6 y 10 horas y se realizaron las siembras en placa correspondientes a cada hora para conocer la concentración bacteriana, estas siembras se realizaron en los mismos medios utilizados en el ítem 7.3. El objetivo de esta metodología fue comparar los valores de concentración estimados por el equipo en función de la medida de potencial redox con la concentración obtenida a partir del método de laboratorio (esquema 6).



Esquema 6 Diseño experimental para realizar la evaluación funcional del equipo.

La segunda parte consistió en acompañar el proceso de ordeño de diferentes fincas ubicadas en la sabana de Bogotá tomando una muestra de 5 mL de leche de cada vaca. En total se recolectaron 100 muestras que se transportaron a  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Decreto 616., 2006) y se realizaron las mediciones de potencial redox con el equipo diseñado después de las 5 (tiempo que se demoraron en llegar al laboratorio), 8 y 10 horas de tomada las muestras. El objetivo de esta metodología fue validar el equipo en una situación real y verificar su capacidad de detectar la ausencia de las bacterias *S. aureus* y *E. coli* en las muestras leche recolectadas.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. ADQUISICIÓN DE LA SEÑAL

Para la adecuación de la señal del electrodo se utilizó el circuito representado en la figura 8. Está compuesto por una fuente regulada de voltaje de -10 V a 10 V, un buffer para recibir la señal del electrodo, un sumador ponderado para elevar el DC de la señal y un amplificador inversor para entregar valores positivos al Arduino. En las ecuaciones 2, 3 y 4 se muestran las funciones de transferencia de cada amplificador en relación al voltaje de entrada respecto al voltaje de salida, y en la ecuación 7 se observa la función de transferencia de todo el circuito diseñado, el voltaje de salida de esta función es la que fue leída por medio del microcontrolador.

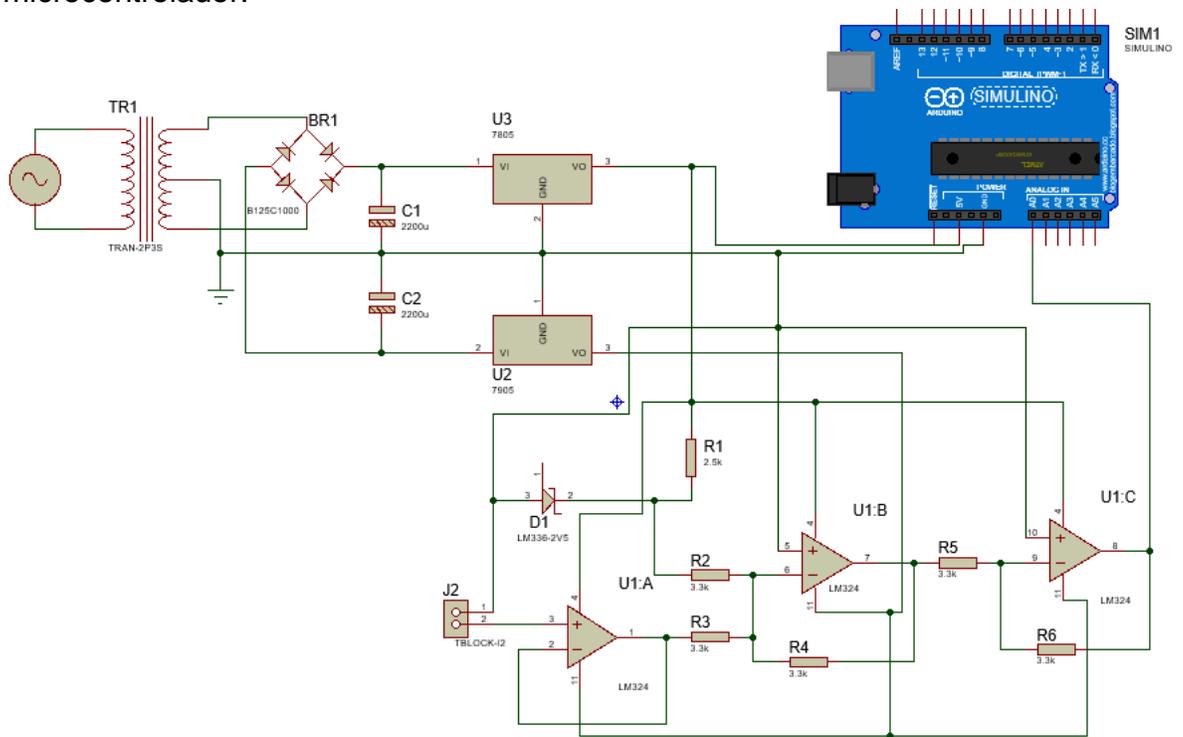


Figura 8 Diagrama esquemático circuito de adquisición de la señal.

- Función de transferencia buffer (U1: A)

$$V_{out} = V_{in} \quad (2)$$

- Función de transferencia sumador inversor (U1: B)

$$V_{out1} = -R3 * \left( \frac{V1}{R1} + \frac{V_{out}}{R2} \right) \quad (3)$$

- Función de transferencia inversor (U1:C)

$$V_{out2} = -V_{out1} * \left(\frac{R5}{R4}\right) \quad (4)$$

- Vout del circuito diseñado

$$V_{out2} = -\left(-R3 * \left(\frac{V1}{R1} + \frac{V_{out}}{R2}\right)\right) * \left(\frac{R5}{R4}\right) \quad (5)$$

Todos los valores de las resistencias son el mismo 3.3KΩ, V1=2,57 V entonces:

$$V_{out2} = -\left(-\left(V1 + V_{out}\right)\right) \quad (6)$$

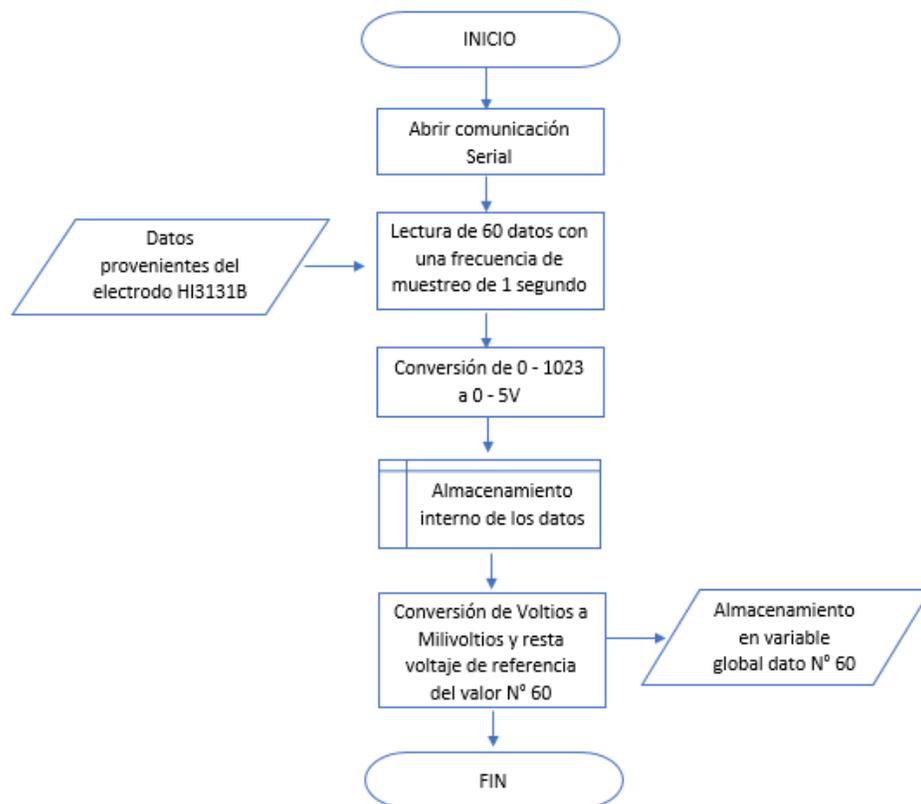
$$V_{out2} = V1 + V_{out}$$

$$V_{out2} = 2,57 + V_{out} \quad (7)$$

La adición de un offset (DC), es utilizada en circuitos que necesitan subir la señal de entrada a un valor de referencia diferente a 0 (Arias, 2018), teniendo en cuenta el voltaje que puede ser entregado por el electrodo, se seleccionó como offset un voltaje de 2,5 voltios que fue suficiente para subir la señal y poder convertir los valores de voltaje negativos entregados por el electrodo en valores positivos en un rango de 0 a 4 voltios que son valores que pueden ser leídos por el Arduino.

El circuito diseñado es ampliamente utilizado para la adecuación de este tipo de señal y su funcionamiento no implica fuentes de error considerables a la hora de realizar la medición, sin embargo, se debe considerar las pequeñas variaciones del voltaje de salida respecto al de la entrada producidas por el voltaje de offset de los amplificadores operacionales. Para minimizar este efecto se usan amplificadores de bajo offset (Granda & Mediavilla, 2015)

### Diagrama de flujo programa de lectura de los datos:



Esquema 7 Diagrama de flujo programa lectura de datos.

El esquema 7 se visualiza los 6 pasos a seguir para realizar la lectura proveniente del electrodo de ORP (HI3131B) en medida de milivoltios (mV) como indica su nombre, la señal proveniente de las reacciones de óxido - reducción en el medio de medición.

Para la lectura de los datos primero se inicia la comunicación serial con el Arduino, se procede a realizar la lectura cada segundo durante 60 segundos (de acuerdo al ítem 7.3 para garantizar la estabilización de la señal). Los datos adquiridos se almacenan en un matriz interna, una vez terminada la lectura se toma el último valor almacenado se realiza la conversión a milivoltios, se resta el voltaje de referencia (2,57 V) y se guarda en una variable global.

## 8.2. PRUEBAS PARA GARANTIZAR LA ASEPSIA DEL ELECTRODO DURANTE LAS MEDICIONES

### 8.2.1. Prueba inicial de asepsia

Las muestras inoculadas (tabla 8) se incubaron a 37°C durante 24 horas. En la figura 9a se observan las muestras inoculadas y en la figura 9b las muestras una vez pasadas las 24 horas, no se observó ningún cambio en referencia a la muestra control (tubos OR y OR1) o turbidez entre antes y después del tiempo de incubación.

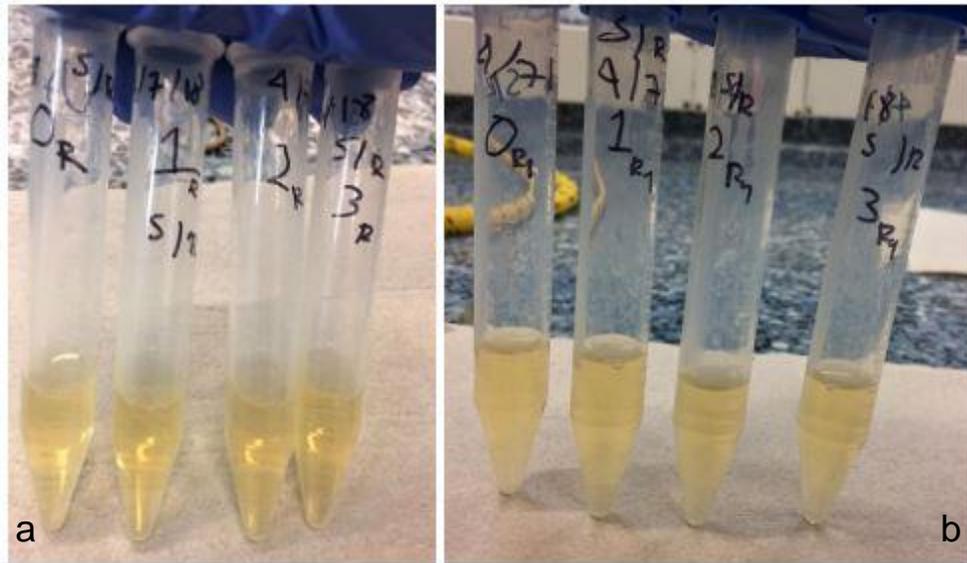


Figura 9 a) Muestras inoculadas diferentes etapas del protocolo de limpieza del electrodo y b) Muestras réplicas inoculadas diferentes etapas del protocolo de limpieza del electrodo.

Luego de las 24 horas de incubación se sembraron 10  $\mu$ L de cada muestra en medio sólido LB (figura 10) este medio permite el crecimiento óptimo de la mayoría de microorganismos (PROBIOTEK, 2019) y medio MacCounkey (figura 11), este medio permite el aislamiento y diferenciación de *Enterobacteriaceae* y bacilos Gram negativos debido a la concentración de sales biliares que inhiben el crecimiento de microorganismo Gram positivos (Becton Dickinson, 2014), como se indica en la tabla 8. Los medios se incubaron a 37°C durante 24 horas.

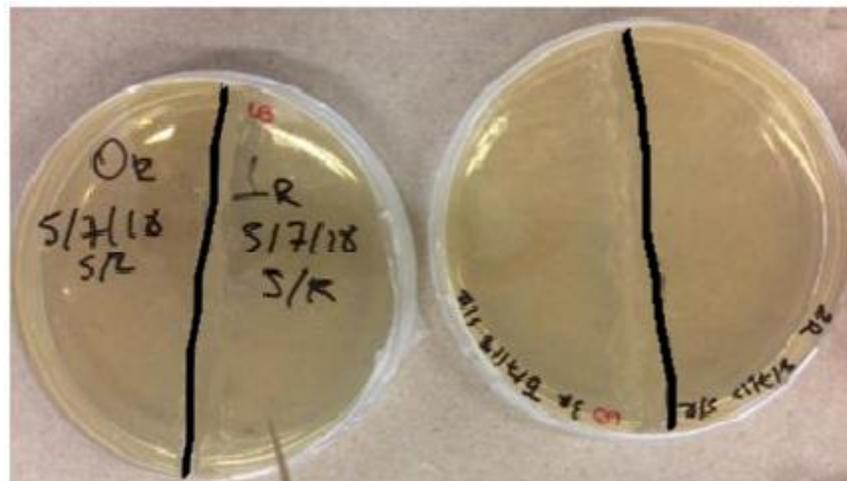


Figura 10 muestras sembradas medio LB.

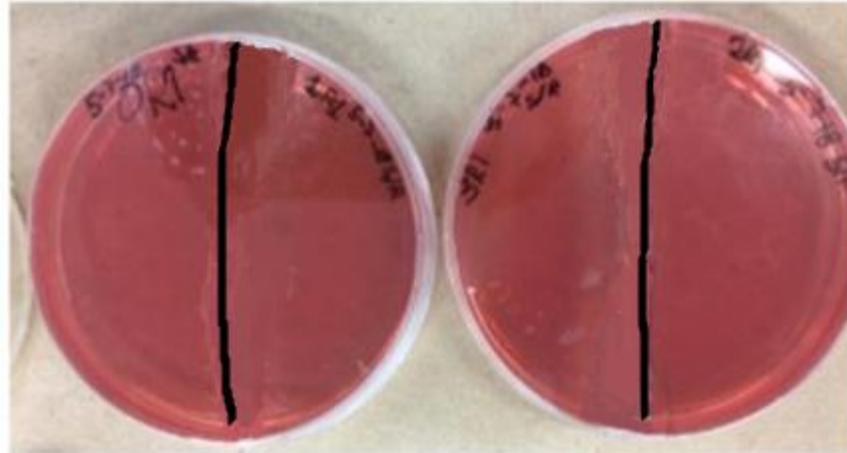


Figura 11 muestras sembradas medio MacCounkey.

Las pruebas de asepsia se realizaron en la cabina de flujo laminar, diseñada para mantener un ambiente estéril, creando una presión de aire que impide que la contaminación de las muestras (Indigotecnología, 2019), lo que se puede confirmar con la muestra control, observando las figuras 10 y 11 muestras OR y OR1 donde no se observa crecimiento de bacterias Gram positiva ni Gram negativas respectivamente.

De igual manera, se evaluó el protocolo de limpieza conformado por el uso de radiación UV, hipoclorito de sodio al 10% y solución de limpieza proveída por el fabricante, la ausencia de crecimiento de bacterias en los medios demuestra que son suficientes para la limpieza del electrodo en mediciones donde no haya presencia de microorganismos.

### **8.2.2. Prueba de asepsia con uso de cultivos bacterianos**

En las figuras 12a y 12b se observan las muestras inoculadas durante la prueba de asepsia con uso de cultivos bacterianos, y estas una vez pasadas las 24 horas de incubación.

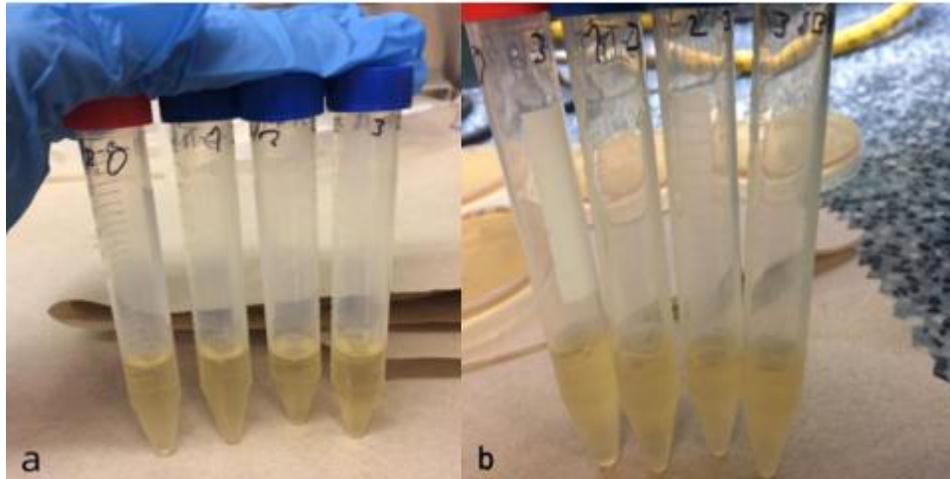


Figura 12 a) muestras inoculadas durante la prueba, b) muestras después de 24 horas.

Una vez pasada las 24 horas se sembró 10  $\mu$ L de cada tubo en medio sólido BHI, este no es selectivo, por lo que permite el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Britania , 2019), las placas sembradas se llevaron a incubar durante 24 horas a 37°C (figura 13).

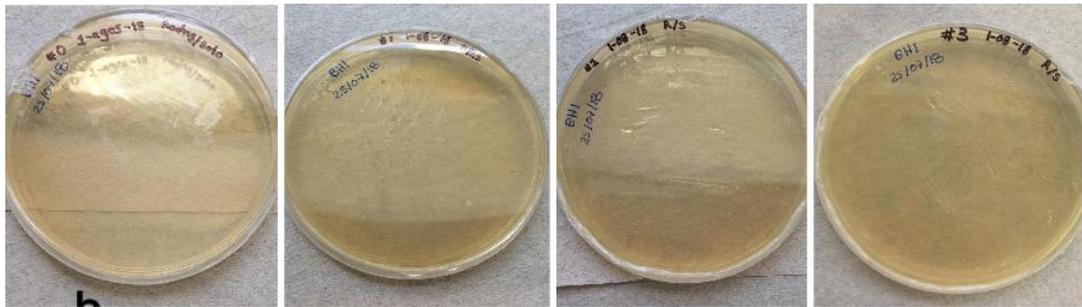


Figura 13 Muestras sembradas medio BHI.

Los resultados muestran que, siguiendo el protocolo de limpieza establecido para el electrodo, no se presenta contaminación cruzada al momento de realizar las mediciones con este. Ya que no se observa crecimiento en ninguna placa sembrada.

Debido a la ausencia de crecimiento se puede indicar que las soluciones utilizadas en el protocolo son capaces de eliminar la bacteria del cuerpo del electrodo y así mismo eliminar otros microorganismos que pueden presentarse por errores en la manipulación del electrodo por parte de los usuarios. La eficiencia del protocolo se basa en la capacidad de cada solución para la eliminación de los microorganismos, el hipoclorito de sodio induce la oxidación irreversible de los grupos sulfidrilos de las enzimas, dando como resultado enlaces disulfuro que afectan las funciones metabólicas de las bacterias (Vélez, 2015), el formaldehído presente en la solución del fabricante actúa sobre los ácidos nucleicos y las proteínas por medio de alquilación y desnaturalización (Hernández, 2006; Huerta, 2018) y la radiación UV, esta es absorbida por los ácidos nucleicos produciendo

la formación de dímeros de pirimidina que ocasionan cambios en la estructura del ADN, mutación de la células y la muerte de estas, Mercedes, Chávez, Rodríguez, Cadillo, & Valdiviezo, en el 2018, establecieron que la longitud de onda que permite la inactivación de agentes microbianos es de 253.7 nm.

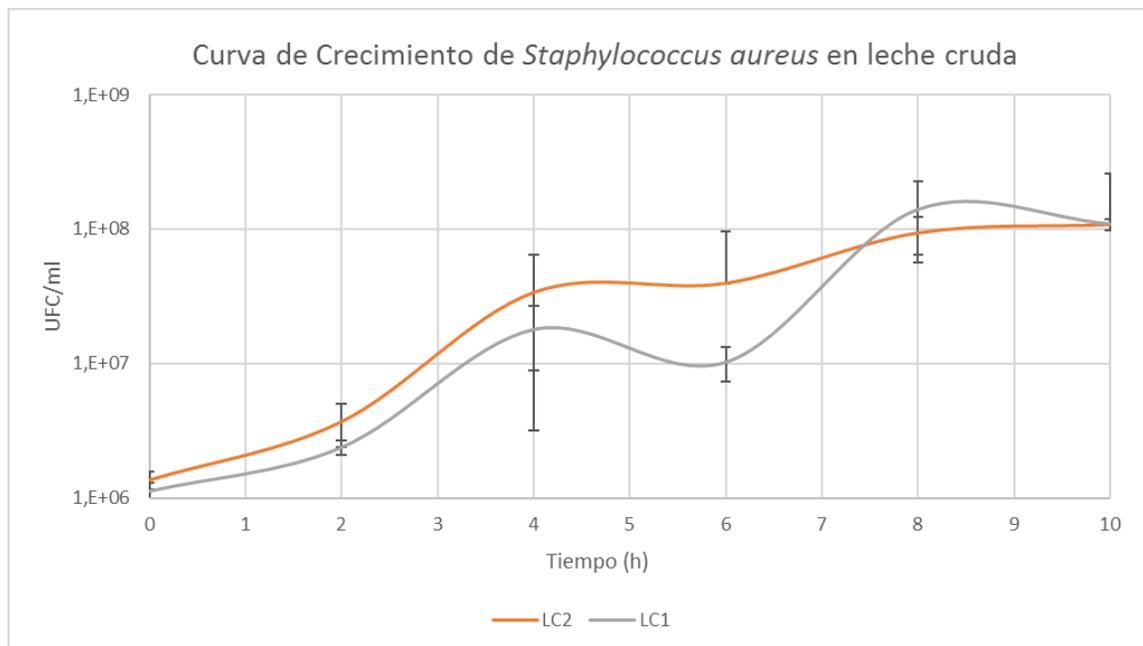
### 8.3. CARACTERIZACIÓN POTENCIAL REDOX GENERADO POR LAS BACTERIAS

#### 8.3.1 Curvas de Crecimiento Bacteriano

Uno de los objetivos del trabajo fue relacionar el potencial redox con la concentración bacteriana, por lo que se realizaron curvas de crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*. A continuación, se presentan los resultados experimentales y el análisis para cada curva.

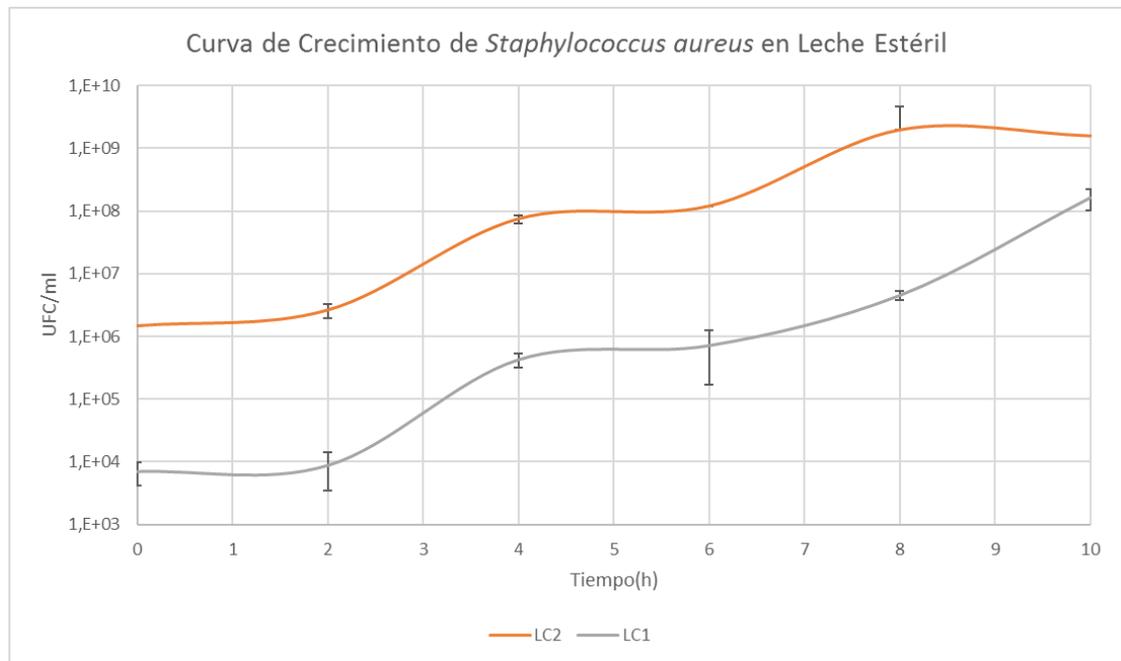
##### 8.3.1.1. *Staphylococcus aureus*

En la gráfica 1 se observa el promedio de las curvas de crecimiento de *S. aureus* en las dos muestras de leche cruda obtenidas de diferentes vacas (LC1 y LC2). La concentración inicial fue de  $1 \times 10^6$  UFC/mL presentando un crecimiento de  $5 \times 10^9$  UFC/mL durante las 24 horas de crecimiento.



Gráfica 1 Curva de Crecimiento de *S. aureus* en leche cruda.

La gráfica 2 evidencia las dos curvas de *S. aureus* en leche estéril, alcanzando concentraciones de  $2 \times 10^8$  UFC/mL en la leche LC1 y  $2 \times 10^9$  UFC/mL en LC2 hasta las 10 primeras horas de crecimiento.



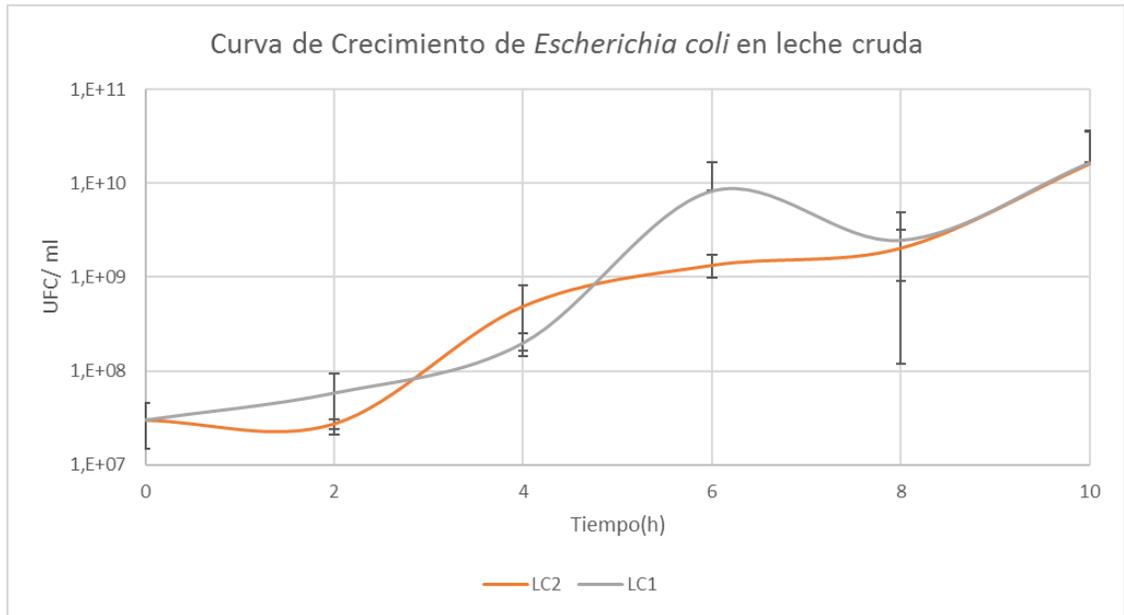
Gráfica 2 Curva de crecimiento de *S. aureus* en leche estéril.

Analizando el comportamiento de las curvas de crecimiento tanto en leche cruda como en leche estéril, se puede evidenciar que durante las dos primeras horas se presentó la fase de latencia de esta bacteria, tiempo en que le toma al microorganismo acoplarse al nuevo medio antes de iniciar su división (Prescott, Harley, & Klein, 2004), después de las dos horas de crecimiento es visible el inicio de la fase exponencial de la bacteria, donde esta comienza a crecer y dividirse hasta alcanzar la mayor concentración (Prescott, Harley, & Klein, 2004). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Medved'ová y colaboradores (2015) y Tian y colaboradores (2017) quienes reportaron esta misma cinética de crecimiento en medios como BHI, LB, TSB y leche cruda a 37°C, donde el inicio de la fase exponencial se encontró entre la segunda y la quinta hora del inicio del crecimiento.

Por otra parte, en la gráfica 1 se observó un posible inicio de la fase estacionaria en la hora 10, sin embargo, el dato obtenido a la hora 24 ( $5 \times 10^9$  UFC/mL) muestra un aumento de una unidad logarítmica en el crecimiento, de esta forma no se pudo establecer el inicio de la fase estacionaria. En contraste, en la gráfica 2 se observó el continuo crecimiento de este microorganismo, este comportamiento es posible debido a la ausencia de otros microorganismos, que pueden representar una competencia al momento de adquirir los nutrientes necesarios para el crecimiento o probablemente no existe inhibición en el crecimiento de *S. aureus* por la falta de producción de metabolitos secundarios como las bacteriocinas que representan un antimicrobiano natural y son producidas por el grupo de las bacterias ácido lácticas que se encuentran en la leche cruda (Heredia, Hernández, González, & Vallejo, 2017).

### 8.3.1.2. *Escherichia Coli*

En la gráfica 3 se observa el promedio de las curvas de crecimiento de *E. coli* en las dos muestras de leche obtenidas de diferentes vacas, donde la concentración inicial se estandarizó en  $3 \times 10^7$  UFC/mL alcanzando una concentración de  $3 \times 10^{10}$  UFC/mL a las 24 horas de crecimiento.



Gráfica 3 Curva de Crecimiento de *E. coli* en leche cruda.

Al igual que *S. aureus* se observó que la fase de latencia inicia durante las dos primeras horas del ensayo, en este tiempo el microorganismo se adapta al medio de cultivo para iniciar su replicación (Prescott, Harley, & Klein, 2004), posteriormente se inicia la fase exponencial sin tener claridad del inicio de la fase estacionaria, no obstante, el dato obtenido a las 24 horas ( $3 \times 10^{10}$  UFC/mL) puede indicar que se encontraba en esta fase. Los datos reportados por algunos autores indican que el inicio de la fase exponencial para *E. coli* en diferentes medios como Müller-Hilton, TSB y leche cruda a  $37^\circ\text{C}$  puede variar entre una hora y dos horas (Reichart, Szakmár, Jozwiak, Felföldi, & Baranyai, 2007; Céspedes Molina, 2012; Riverón-Rodríguez, et al, 2012).

Tabla 11 ORP y UFC/ml 24 horas de crecimiento.

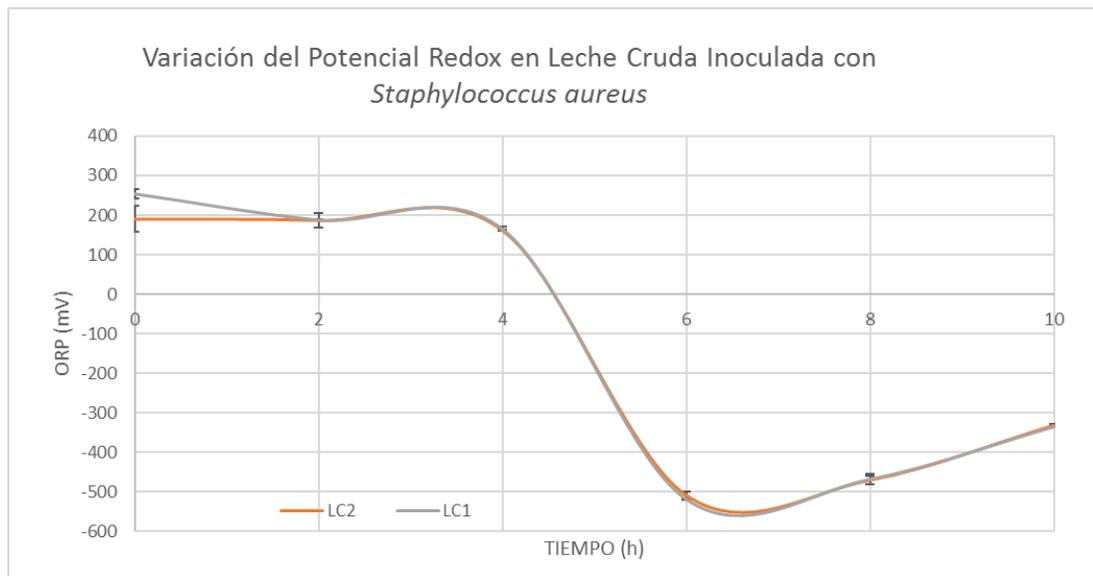
Bacteria	24 Horas	
	ORP	UFC/mL
<i>E. coli</i>	8 mV	$3 \times 10^{10}$
<i>S. aureus</i>	4 mV	$5 \times 10^9$

El tiempo de duración del experimento sólo permitió evidenciar la fase de latencia y la fase exponencial para *S. aureus* y *E. coli*, pero no la fase estacionaria ni la

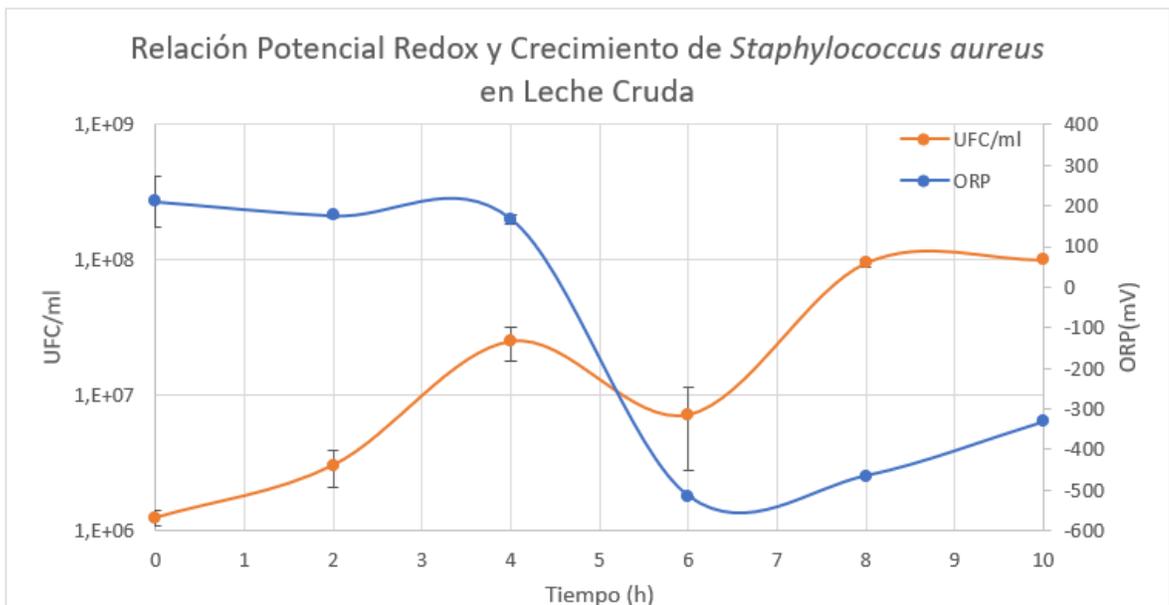
fase de muerte en relación a curvas reportadas en otros medios de cultivo, esto está relacionado a la cantidad de nutrientes que aporta el medio al microorganismo. La leche con su alto contenido de grasas, carbohidratos y proteínas de fácil acceso proporciona un medio ideal para el crecimiento de microorganismos por lo que el tiempo de crecimiento en la leche cruda es mayor y a las 10 horas de crecimiento no se pudo establecer si se iniciaba la fase estacionaria (Prescott, Harley, & Klein, 2004).

### 8.3.2. Curvas de variación de ORP

En la gráfica 4 se observa el promedio de la variación del potencial redox durante el crecimiento de *S. aureus* en las dos muestras de leche, al momento de inocular las muestras se obtuvo un potencial de 220 mV y con el transcurso del ensayo el ORP disminuyó, presentando un cambio significativo ( $p < 0,0001$ ) de ORP entre la cuarta y la sexta hora, donde disminuyó hasta -513 mV. Estos datos fueron confirmados al relacionar concentración bacteriana (UFC/mL) con ORP a través del tiempo (gráfica 5), donde se observó claramente que durante el crecimiento del microorganismo el potencial redox va disminuyendo resultado coherente con lo reportado en la literatura (Zambrano & Grass, 2008).

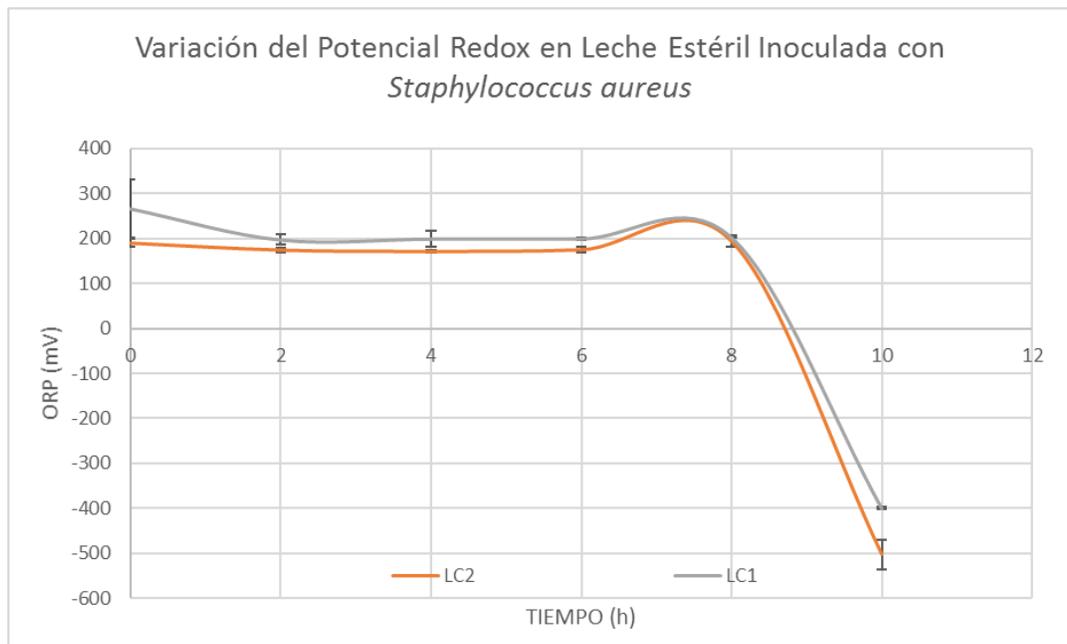


Gráfica 4 Variación del ORP en leche cruda inoculada con *S. aureus*.



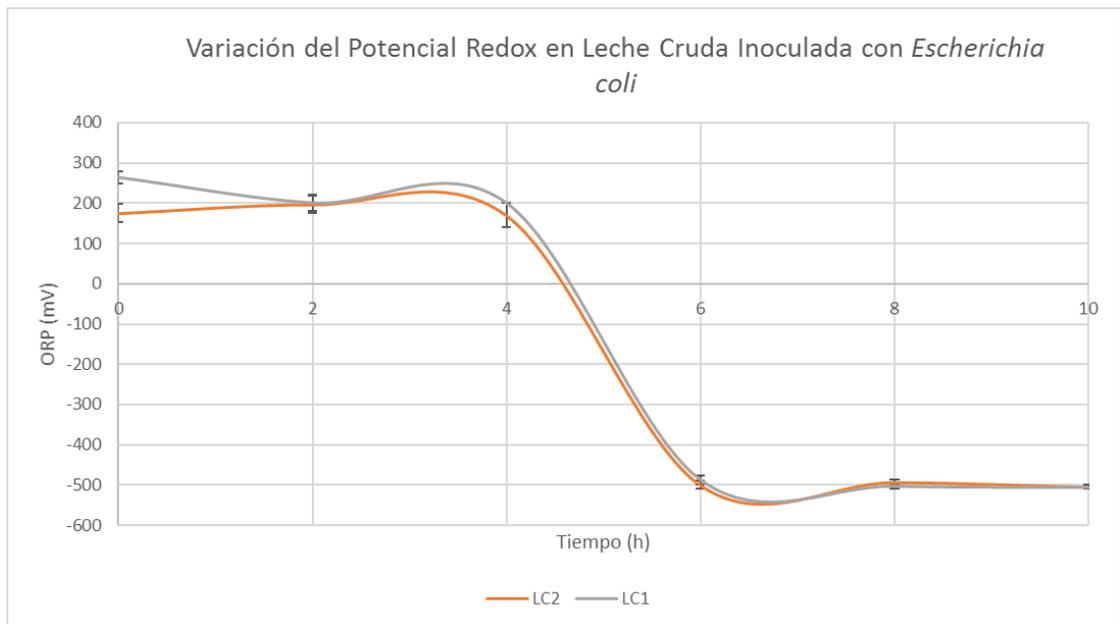
Gráfica 5 Relación potencial redox y crecimiento de *S. aureus* en leche cruda.

En la gráfica 6 se observa la variación del potencial redox en leche estéril inoculada con *S. aureus* en la cual durante las primeras seis horas el ORP es más o menos constante en las dos muestras de leche manteniéndose en valores entre 175 y 195 respectivamente, entre la sexta y octava hora se observó un leve incremento del potencial redox aproximadamente de 203 mV y a partir de esta hora el potencial disminuyó alcanzando a la décima hora valores de -400 mV para LC1 y -500 mV en LC2.

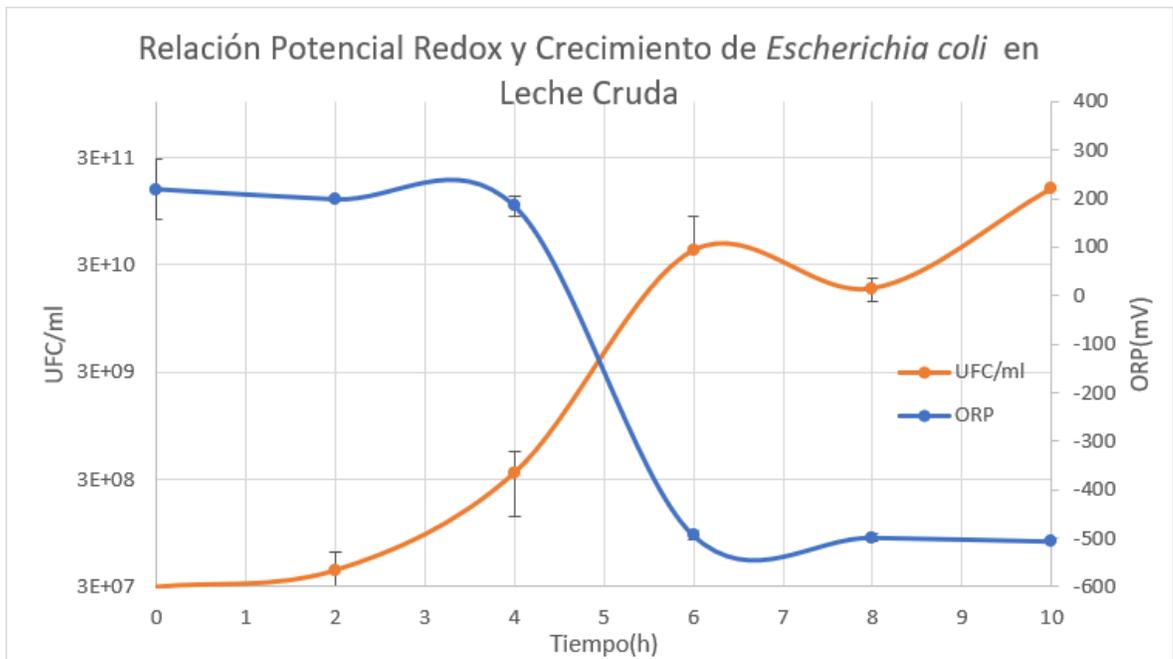


Gráfica 6 Variación ORP en leche estéril inoculada con *S. aureus*.

En la gráfica 7 se observa el promedio de la variación del potencial redox durante el crecimiento de *E. coli* en las dos muestras de leche (LC1 y LC2), al momento de inocular las muestras se obtuvo un potencial de 219 mV, y a partir de este momento empezó a disminuir, presentando el cambio más significativo ( $p < 0,0001$ ) entre la cuarta y la décima hora donde disminuyó hasta -506 mV, estas variaciones de potencial se relacionan con la concentración bacteriana (UFC/mL) en la gráfica 8, donde se evidencia que durante el crecimiento de *E. coli* el potencial redox va disminuyendo. En comparación con respecto a las variaciones de ORP presentadas en *S. aureus* presentaron un comportamiento similar exceptuando la décima hora, en esta hora para *S. aureus* se observó un leve aumento del potencial, mientras para *E. coli* este se mantuvo estable en relación a la octava hora, esta diferencia puede relacionarse con las gráficas de crecimiento donde se observó que para *S. aureus* entre la octava y décima hora la concentración fue aproximadamente la misma, mientras que en ese mismo intervalo de tiempo en *E. coli* se presentaron dos concentraciones diferentes.



Gráfica 7 Variación del ORP en leche cruda inoculada con *E. coli*.



Gráfica 8 Relación potencial redox y crecimiento de *E. coli* en leche cruda.

Al realizar el análisis de las curvas de relación potencial redox y crecimiento (gráficas 5 y 8), desde el momento de la inoculación de cada bacteria en las muestras de leche cruda el potencial redox empieza a disminuir lentamente durante las primeras cuatro horas, momento en el cual los microorganismos se encuentran en la fase de latencia (primeras dos horas) y el inicio de la fase exponencial, a partir de la cuarta hora se observó una disminución significativa ( $p < 0,0001$ , para las dos bacterias en estudio) del potencial tiempo en el que las bacterias ya se encuentran en la fase exponencial del crecimiento. El cambio en el ORP es resultante de la variación de oxígeno y/o el crecimiento de estas bacterias que causan desequilibrio de los sistemas presentes en la leche, puesto que el potencial redox en la leche es constante (200- 300 mV) siempre y cuando no haya sistemas de reducción u oxidación adicionales (Zambrano & Grass, 2008; García K., 2016)

Diferentes autores atribuyen esta fuerte disminución de potencial a la fase exponencial de las bacterias, debido a que es la fase en donde ocurren la mayor cantidad de reacciones metabólicas que le permiten a las bacterias alcanzar la mayor concentración en el medio. La interacción entre las bacterias y el medio se da por el consumo de oxígeno disuelto presente en la leche debido a que estas dos bacterias son anaerobias facultativas, por lo que utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa (Varela & Grotiuz, 2006, p.43) y a la formación de iones  $H^+$  por la presencia de moléculas donadoras de hidrógeno, como NADH que son liberadas por las bacterias como resultado de rutas metabólicas como el ciclo de Krebs. Estas moléculas donadoras de hidrógeno desequilibran los sistemas redox presentes en la leche.

Para determinar qué sistema o sistemas redox presentes en la leche causan la disminución del potencial redox, Nilsson investigó los cambios de potencial en leche normal y en leche mastítica. Los resultados obtenidos establecieron que en la leche mastítica se presentaban niveles altos de la enzima xantina oxidasa (XO), por lo que el sistema redox presente en la leche que más se ve afectado, es el compuesto por esta enzima debido a los donadores de hidrógeno que aportan las bacterias, este sistema puede causar una caída en el potencial de la leche entre un rango de 50 mV a 400 mV a 37°C (Zambrano & Grass, 2008; García K., 2016) (Vázquez, 2012). La xantina oxidasa tiene función antimicrobiana, al catalizar la oxidación de xantina a ácido úrico y peróxido de hidrógeno, este último siendo tóxico para las bacterias, en esta reacción la Xantina oxidasa usa el oxígeno como aceptor de electrones (García K., 2016). Por lo que en presencia de bacterias como *S. aureus* y *E. coli* la xantina oxidasa también consume el oxígeno presente en la leche además de los donadores de hidrógeno aportados por las bacterias para impedir el crecimiento de los microorganismos no propios de la leche cruda.

Después de las 24 horas de crecimiento, al realizar la medición de potencial redox se evidenció un aumento tendiendo a 0V (tabla 11), en la literatura no se encontraron estudios donde se evidencie este aumento y así mismo se dé una explicación; pero como se ha venido relacionando la variación del potencial redox con el crecimiento microbiano se atribuye ese aumento de potencial redox a la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, puesto que es la fase donde el crecimiento máximo ya se ha alcanzado por lo que disminuye la cantidad de reacciones metabólicas por parte de las bacterias y por ende el consumo del oxígeno disuelto en la leche, lo que lleva a que se presenten reacciones de oxidación en la leche y el potencial redox aumente, el potencial no vuelve a los valores normales para la leche (200-300 mV), lo que permite inferir que una vez se presenta contaminación en la leche el potencial redox no vuelve a equilibrarse y alcanzar los 200 mV. Esto garantiza que el equipo en cualquier situación que detecte potenciales redox mayores a 200 mV es indicativo de la ausencia de alguno de estos microorganismos patógenos (*S. aureus* y *E. coli*), es decir, en ninguna de sus fases de crecimiento las bacterias estudiadas podrán inducir al equipo a reportar falsos negativos.

Al realizar la comparación entre la variación de potencial redox en leche cruda y leche estéril inoculada con *S. aureus*, se observó que en la leche estéril el potencial disminuyó después de la sexta hora, mientras que en leche cruda disminuyó después de la cuarta hora, esto obedece a que en la leche estéril no hay presencia de la enzima xantina oxidasa debido a que la temperatura utilizada para la esterilización de la leche produce la desnaturalización de la misma (Sharma, Oey, & Everett, 2016). Capuani, Behr & Vogel midieron el potencial redox de diferentes bacterias Gram positivas (*E. faecalis*, *W. cibaria* y *P. pentosaceus*) en una mezcla de masa compuesta por harina, agua y etanol, en estas se observa la misma tendencia en relación a la obtenida para *S. aureus* en leche cruda, a excepción de *P. pentosaceus* donde el potencial redox se mantuvo constante, sin embargo, aunque presentan la misma tendencia no comparten la

magnitud de la disminución del potencial redox pues que para *E. faecalis* el valor mínimo de ORP fue de - 100 mV, para *W. cibaria* de 150 mV mientras para *S. aureus* fue de -500 mV.

Reichart, Szakmár, Jozwiak, Felföldi, & Baranyai midieron el potencial redox de diferentes bacterias coliformes entre ellas *E. coli* en medio TSB, en esta se observa una tendencia similar a la obtenida en leche cruda, la magnitud que disminuye el potencial redox en los dos medios también es similar llegando a valores de ORP aproximados de -450 mV, sin embargo, el tiempo en que ocurre la disminución más fuerte de potencial redox ocurre en diferentes tiempos, en medio TSB sucede aproximadamente a las dos horas mientras en leche cruda sucede después de las cuatro horas.

Al evaluar los cambios de potencial redox entre *S. aureus* y *E. coli* se esperaban variaciones con la misma tendencia, pero en diferentes magnitudes debido a los cambios estructurales entre las membranas de cada una, al ser Gram positiva y Gram negativa respectivamente. Estas diferencias se deben a moléculas en la cadena de transporte, dentro de estas moléculas se encuentran las quinonas y los citocromos; la primera se encuentra en forma de ubiquinona en las bacterias Gram negativas y presenta un potencial de +0,1 V y en forma de menaquinona en las bacterias Gram positivas, que por reducción aceptan dos átomos de hidrógeno; y los citocromos que se diferencian entre ellos por sus potenciales de reducción, donde *S. aureus* contiene citocromo c mientras *E. coli* no, este citocromo presenta un potencial de +0,22 V (Stainer, 2006, p.83; Murray, et als, 2010). Sin embargo, los resultados experimentales mostraron que para *S. aureus* y *E. coli* en leche cruda no se observan diferencias en la variación del potencial redox durante el crecimiento, las dos tienen la misma tendencia desde el inicio hasta las 24 horas.

### **Análisis Estadístico**

Al aplicar ANOVA a los datos de ORP obtenidos para *S. aureus* y *E. coli* no se encontraron diferencias significativas entre los valores correspondientes a los intervalos (0 a 4 horas) y (6 a 10 horas), pero si entre los intervalos mencionados, lo que indica que para realizar mediciones de comparación de ORP estas deben realizarse midiendo en una hora cualquiera del primer intervalo y en una hora cualquiera del segundo intervalo.

Para la base de datos y la caracterización de las curvas se obtuvieron un total de 12 datos por hora medida. Las mediciones de ORP realizadas, se limitaron por el costo y el tiempo requerido para la realización de cada curva. El tiempo requerido para realizar cada medición es de aproximadamente 10 minutos contando el tiempo de lectura del ORP y la limpieza después de cada medición, teniendo en cuenta que se trabajaron tres repeticiones de la medición en las seis muestras de leche, el tiempo total para la medición del potencial redox fue de 180 minutos. El tiempo requerido para realizar las diluciones seriadas y la siembra en agar fue aproximadamente de 80 minutos. En relación a los costos, los materiales necesarios para realizar la caracterización del potencial redox fue de \$1.500.000

excluyendo el material proporcionado por el laboratorio de la Universidad el Bosque que alcanza un monto de \$1.554.674 y la hora de trabajo de las personas involucradas en el proyecto.

Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico para observar la normalidad de los datos de ORP y la repetitividad del método, los datos se agruparon a partir de 6 grupos donde cada grupo tenía 12 datos para el potencial redox que es la variable aleatoria continua y se agrupan desde t0 a t10 para cada bacteria y se empleó el complemento de Excel Real Statistics.

### Análisis de normalidad de los datos agrupados

Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad de los conjuntos de datos obtenidos, planteando las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula  $H_0$ : Los datos de la variable ORP provienen de una población con distribución normal.
- Hipótesis  $H_a$ : Los datos de la variable ORP no provienen de una población con distribución normal.

Al aplicar la prueba de Shapiro-Wilk se pretendió demostrar la hipótesis nula  $H_0$  y rechazar la hipótesis  $H_a$ . Después de aplicar la prueba de normalidad, empleando los complementos estadísticos de Excel mencionados se obtuvieron los resultados que se presentan en las tablas 12 y 13, también se presentan los resultados obtenidos al aplicar la prueba Shapiro-Wilk

Tabla 12 Análisis estadístico de Shapiro- Wilk para *E. coli* en leche cruda

Shapiro-Wilk Test						
	t0	t2	t4	t6	t8	t10
p-value	0,09460268	0,05700839	0,05014688	0,78226937	0,39932967	0,35238323
Alpha	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
normal	yes	yes	yes	yes	yes	yes

Tabla 13 Análisis estadístico de Shapiro-Wilk para *S. aureus* en leche cruda.

Shapiro-Wilk Test						
	t0	t2	t4	t6	t8	t10
p-value	0,47244257	0,4056624	0,27594717	0,56698664	0,4069479	0,15577981
alpha	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

normal	yes	yes	yes	yes	yes	yes

Estos resultados permiten inferir que los datos presentan una distribución normal ya que el parámetro ( $p$ -value) tiene un valor mayor al parámetro ( $\alpha$ ) como se observa en las tablas. Para confirmar la normalidad de los datos se realizó el análisis de coeficiente de variación (anexo 5) demostrando que los conjuntos de datos agrupados para la variable continua ORP siguen una distribución normal y cumplen con el criterio de aceptación establecido ( $CV < 15\%$ ), lo que se ve reflejado igualmente en las barras de desviación estándar de ORP en cada una de las curvas. La distribución normal de los datos por medio del teorema del límite central permite establecer que los datos tomados son suficientes para validar el método y la repetibilidad de este, el teorema plantea que el tamaño de los datos de una muestra es lo suficientemente grande cuando los datos siguen una distribución normal (Mintilab, 2017).

#### 8.4. IMPLEMENTACIÓN DEL EQUIPO PARA LA DETECCIÓN DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO

##### 8.4.1 Ingeniería de detalle

##### Sistema de medición (electrodo) de potencial redox:

Se construyó una base de soporte para el electrodo adaptado para realizar la medición en un tubo falcon de 15 mL, pero no restringiendo el uso de otros envases para contener la muestra. Para garantizar una correcta medición el electrodo debe sumergirse 4 cm o 1 ½". En la figura 14 se muestra un ejemplo utilizando un volumen de 2 mL lo que por principio de Arquímedes permite que la muestra toque el electrodo hasta una altura aproximada de 4 cm.

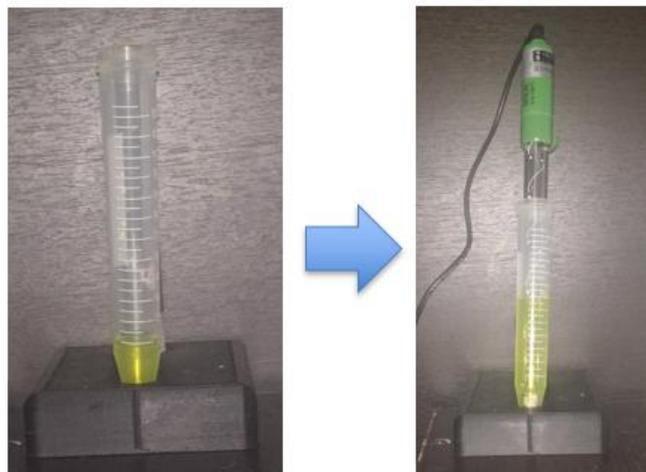


Figura 14 Medición de ORP.

### Sistema de procesamiento:

El electrodo adquirido cuenta con un rango de medición de -2000 mV a 2000 mV, para la lectura de los datos que registre, se utilizaron diferentes configuraciones de amplificadores operacionales y de un voltaje de referencia de 2,57 V, el pin de lectura del electrodo se conectó a un buffer que le permite aportar la corriente al circuito que no es capaz de entregar el electrodo, la salida del buffer se conectó junto al voltaje de referencia a la entrada inversora del segundo amplificador quedando configurado en sumador inversor por lo que todos los voltajes de salida son negativos, luego esta salida negativa se conecta al tercer amplificador configurado en inversor y la salida son voltajes positivos los cuales pueden ser leídos por el Arduino como se observa en la figura 15. Este circuito permite que se pueda leer desde el mínimo hasta el máximo valor que puede leer el electrodo, por ejemplo, si el valor registrado por el electrodo es de -2 V el valor entregado al Arduino será de 4,5 V y el programa al realizar la lectura y restar el voltaje de referencia arrojará como resultado -2 V.

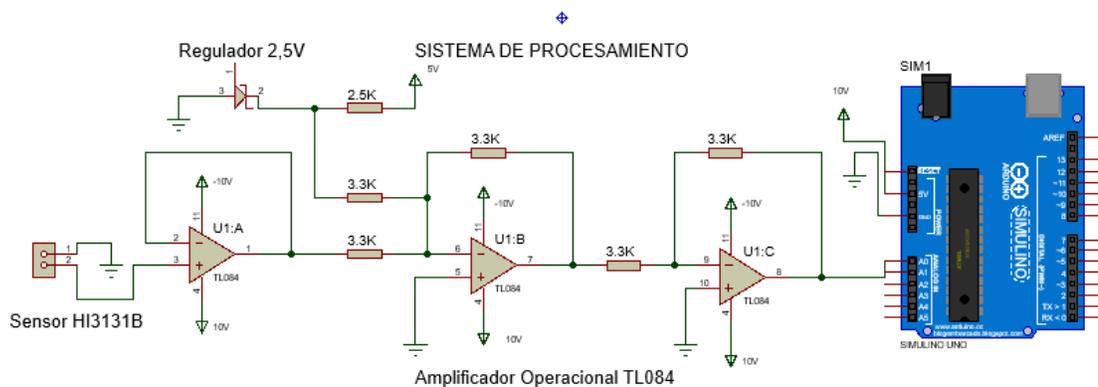
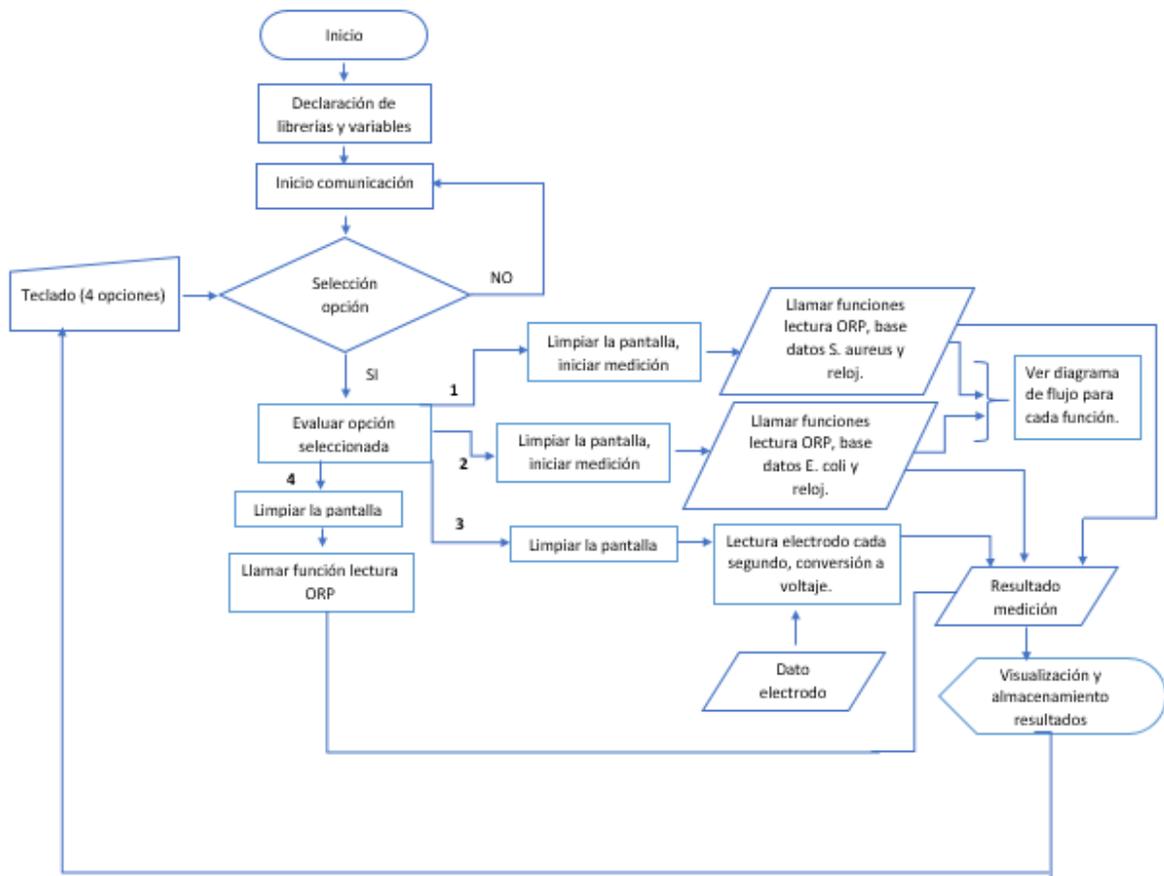


Figura 15 Sistema de procesamiento de la señal.

A continuación, se muestra el diagrama de flujo del programa para el procesamiento de la señal, en el cual el usuario tiene 4 opciones de medición: la primera, permite conocer el ORP y las UFC/mL en muestras de leche con sospecha de contaminación por *S. aureus*, la segunda, igual que la primera opción permite conocer el ORP y las UFC/mL para *E. coli*, la tercera, permite medir el ORP en muestras líquidas y la cuarta, permite medir el ORP en leche cruda, se destinó una opción especial para la medición del potencial en leche debido a que durante los experimentos en laboratorio de observo que el potencial varía durante 1 minuto aproximadamente antes de establecerse. Cada medición se almacena en una tarjeta microSD.

**Diagrama de flujo algoritmo para el procesamiento de la señal adquirida por el electrodo:**

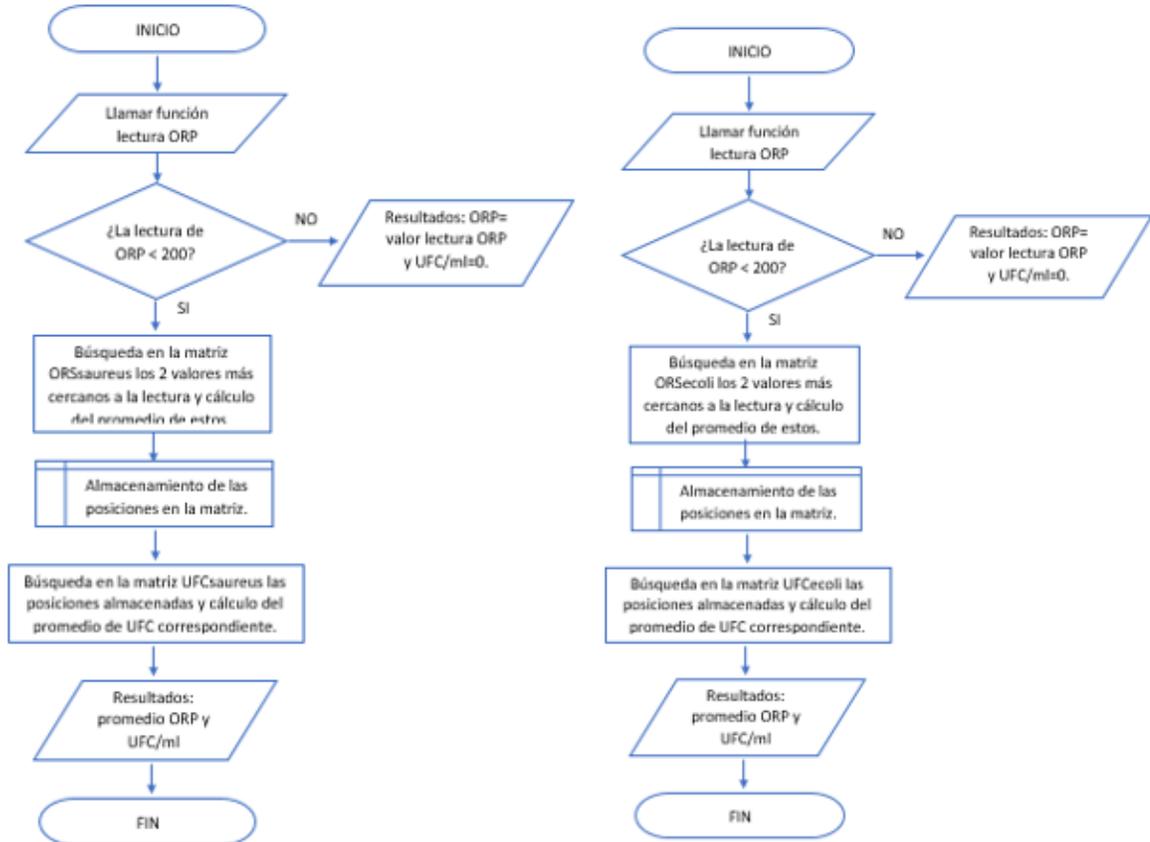


Esquema 8 Diagrama de flujo algoritmo para el procesamiento de la señal adquirida por el electrodo.

**Nota:** el diagrama de flujo programa lectura de datos se puede ver en el esquema 7, ítem 8.1.

Las funciones base de datos *S. aureus* y *E. coli* se describen en el esquema 9, cada una inicia llamando la función de medición de ORP, esta realiza la lectura del electrodo durante 1 minuto y envía el ultimo valor leído, una vez este valor llega y es menor a 200 mV, entra a la base de datos de ORP cargada en el programa, compara el valor entregado por la función lectura ORP con cada valor de la base de datos buscando los dos valores más cercanos a este, una vez los obtiene realiza dos acciones: la primera, es la interpolación de esos datos para obtener el valor de ORP que más se ajusta a la base de datos y la segunda, es el almacenamiento interno de la posición de estos valores para buscarlas en la base de datos de UFC/mL, una vez obtiene los valores de unidades formadoras de colonia realiza la interpolación entre ellos y arroja un valor de concentración bacteriana, esto valores obtenidos de la interpolación serán los mostrados en la pantalla del equipo. Si el valor entregado por la función lectura ORP es mayor a 200 mV la función base de datos no realiza ninguna comparación puesto que este

valor significa que no hay presencia de contaminación por bacterias en la muestra y como resultado muestra en pantalla el valor de ORP entregado por la función lectura ORP y 0 en la variable de UFC/mL.



Esquema 9 Diagramas de flujo para la comparación con las bases de datos de *S. aureus* (Izquierda) y *E. coli* (derecha).

### Sistema de alimentación:

El sistema de alimentación para los amplificadores operacionales y Arduino se basa en una fuente dual regulada de 10 y -10 V. Este voltaje se determinó teniendo en cuenta que el Arduino puede alimentarse con un voltaje entre 3,3 y 12 V y para el correcto funcionamiento de los amplificadores el uso de 10 V permite que estos no se saturen en ninguna etapa del procesamiento de la señal.

La fuente dual consta de 4 etapas que se observan en la figura 16, la primera etapa consiste un transformador baja-baja de 115 V a 12 V, 1 A, la segunda etapa es de rectificación compuesta por un puente de diodos, la tercera es la etapa de filtrado realizada por dos capacitores de 2200  $\mu$ F y por último la etapa de regulación encargada de entregar el voltaje DC esperado, en este caso se utilizaron dos reguladores 7810 y 7910 capaces de entregar 10 y -10 V respectivamente (Armenta, Andrade, & Morales, 2015).

La alimentación del Arduino se da por medio del pin Vin y gnd, a partir de pin 5 V se alimentan los demás componentes del equipo (LCD, adaptador microSD y reloj).

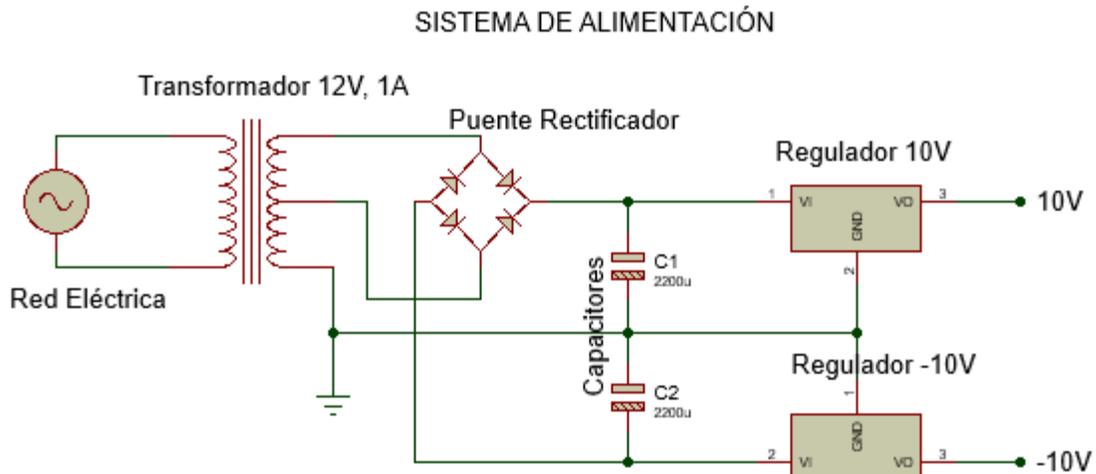


Figura 16 Sistema de alimentación.

### **Sistema de interacción con el usuario y almacenamiento:**

La pantalla LCD permite la visualización de la medición realizada, cada vez que se realice una medición la pantalla muestra la fecha en formato AAAA/MM/DD y la hora HH:MM, el valor ORP medido y dependiendo la opción que se seleccione del teclado se puede visualizar la concentración aproximada para cada bacteria.

El reloj contiene una pila de 3.3 V, lo que permite que la fecha y hora no se desconfigure al momento de apagar el equipo.

El adaptador de microSD permite insertar una microSD de la capacidad que seleccione el usuario, el programa generará un archivo.txt con la misma información que se muestra en la pantalla LCD, como se menciona anteriormente este archivo tiene un tamaño de 64 bytes.

En la figura 17 se muestra el diagrama de conexiones del Arduino para el correcto funcionamiento del equipo.

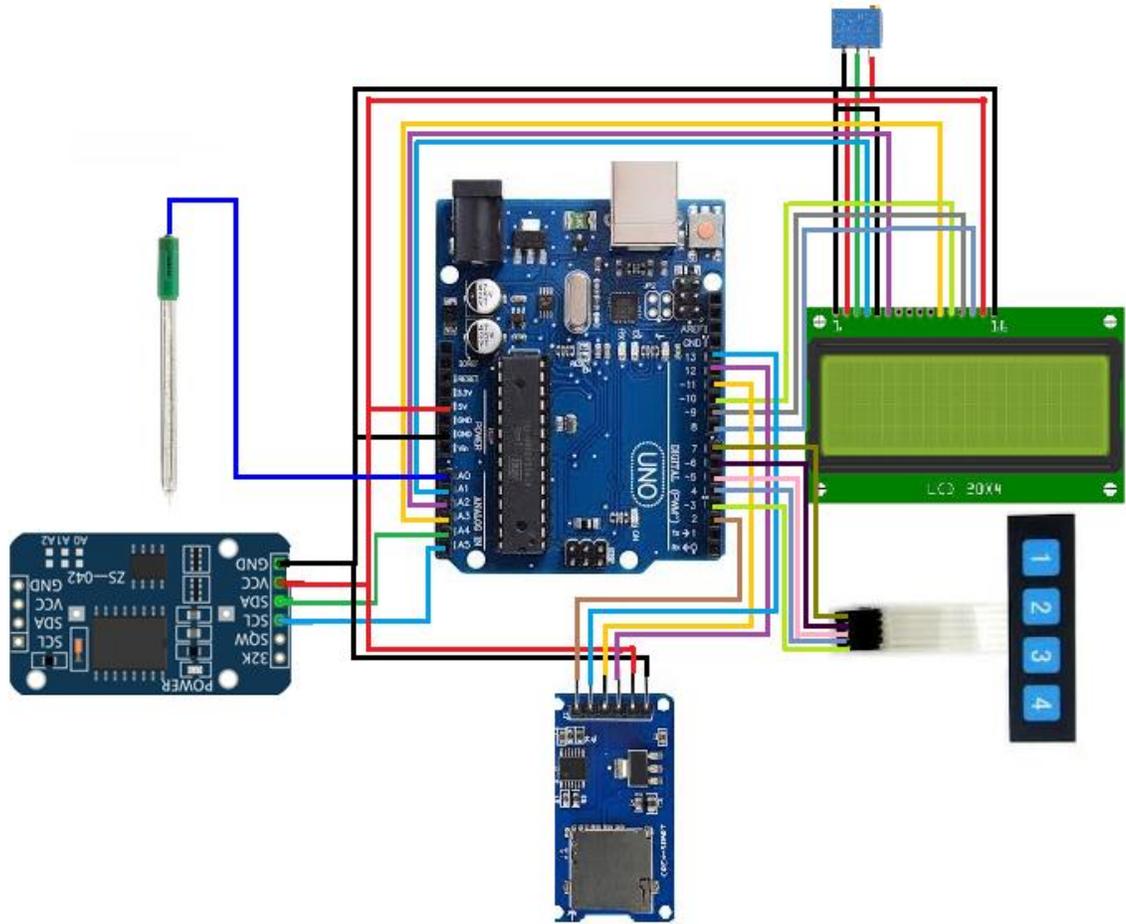


Figura 17 Sistema de interacción con el usuario y almacenamiento.

### Especificaciones:

- Exactitud: Indica la proximidad entre el valor obtenido y el valor referencial aceptado
- Precisión: Indica el grado de concordancia de los resultados obtenidos, donde no se necesita comparar un valor referencial.
- Sensibilidad: Se toma como la pendiente de la curva de calibración, un sistema es sensible si es capaz de notar mínimos cambios en su estado.
- Error de linealidad: Es la desviación máxima que se obtiene de una curva de característica real con respecto a una línea recta ideal.
- Rango: Valor máximo y mínimo de lectura del equipo.

Tabla 14 Especificaciones Equipo Medición ORP.

Rango	$\pm 2000$ mV
Exactitud	1%
Precisión	239 mV
Temperatura	0 – 50 °C
Linealidad	4,73%

Sensibilidad	10 mV
Electrodo ORP	HI3131B
Dimensiones	180 x 85 x 145 mm
Peso	865 g

### Material caja equipo:

El material con el que está construida la caja del equipo es un polímero de alta resistencia, presenta alta resistencia a los agentes químicos, no presentan oxidación, Tiene un grado de protección IP55 que según lo establece la norma IEC 60529 cuenta con protección contra el polvo y contra los chorros de agua; también cuenta con grado de protección IK 05 impacto de energía de 0.700 J lo que significa que es resistente contra el impacto de un objeto de 200 gr a una distancia de 35 cm. El material permite que sea una caja libre de halógenos, figura 18 (Dexon, 2018). El material de la base del electrodo y la pinza para este es en ABS y estos dos se acoplaron a un tornillo sin fin para que sea posible regular la altura del electrodo.



Figura 18 Equipo medición ORP.

**Ergonomía:** Para la salud y comodidad del usuario se debe situar el equipo un lugar donde pueda hacer uso de una silla cómoda de dimensiones pertinentes con el mesón donde se ubique el dispositivo para disminuir los torques en las articulaciones, evitando las lesiones en la zona cervical, dorsal, lumbar, etc.

### 8.4.2. Diseño esquivo

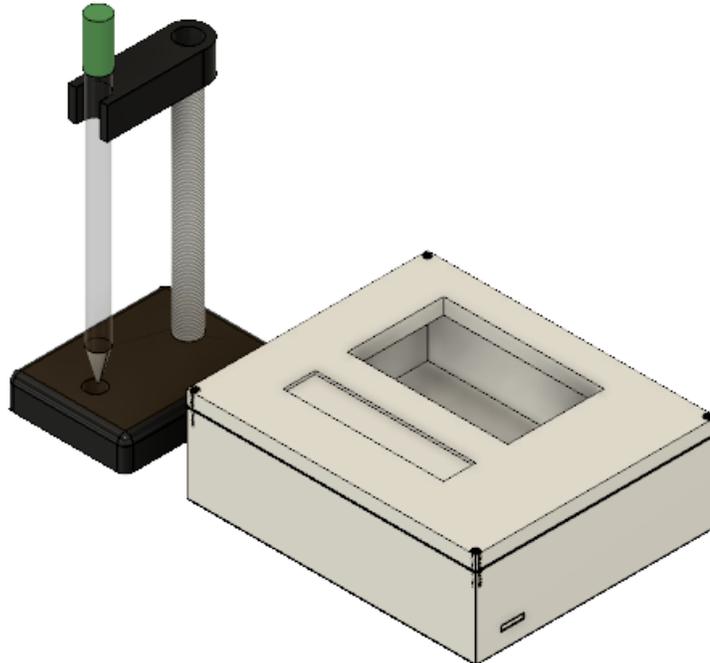


Figura 19 Modelado fusion equipo medición ORP.

- a) **Caja principal:** En la caja principal se encontrarán todos los sistemas involucrados en el funcionamiento del equipo, en la vista superior se encuentra la pantalla LCD y el teclado para interacción con el usuario (figura 20), en la parte lateral se encuentra el espacio para insertar la memoria microSD si el usuario necesita guardar los datos y la conexión del electrodo (figura 22) y en la parte posterior se encuentra la salida del cable para alimentación (figura 21).

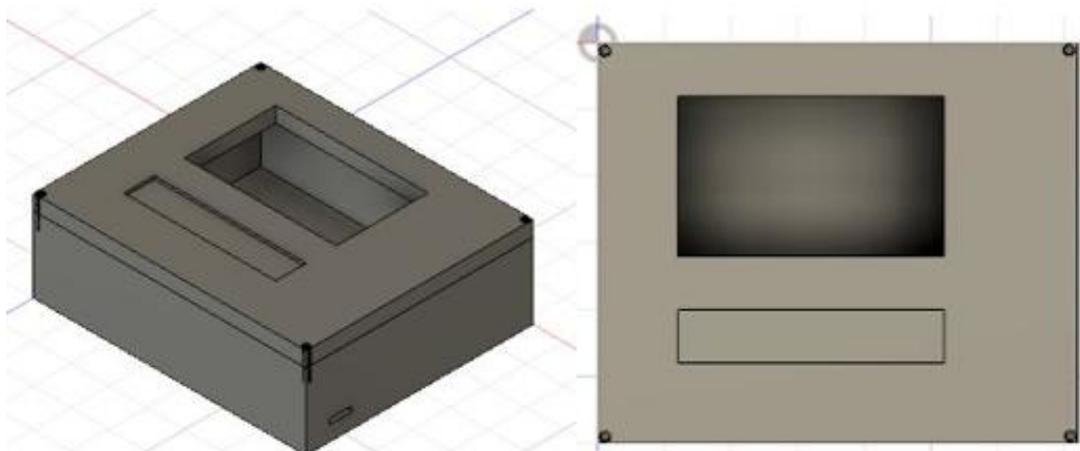


Figura 20 Vista isométrica(izquierda) y vista superior (derecha) caja principal.

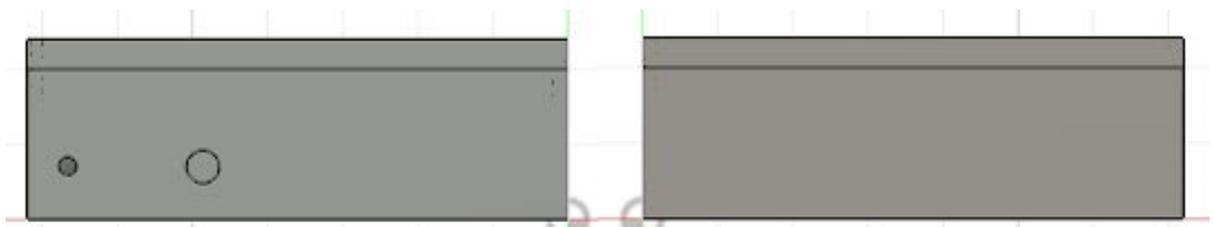


Figura 21 Vista posterior (izquierda) y vista frontal (derecha) caja principal.

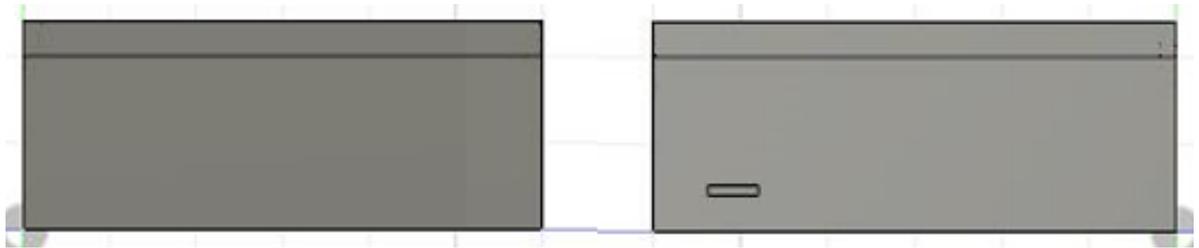


Figura 22 Vistas laterales caja principal.

**b) Bases electrodo:** La base del electrodo consta de una base para ubicar la muestra, un gancho para ubicar el electrodo y un tornillo que permite ubicar el gancho en la posición adecuada para la medición. En las figuras 23, 24 y 25 se observan las vistas superior, posterior, frontal y lateral de la base del electrodo.

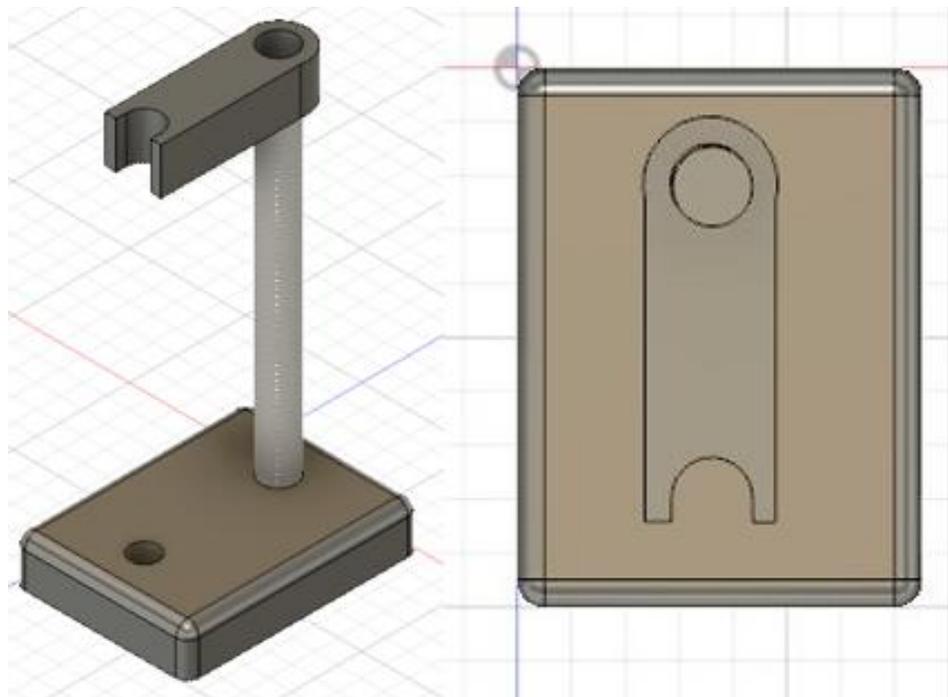


Figura 23 Vista isométrica (izquierda) y vista superior (derecha) base del electrodo.

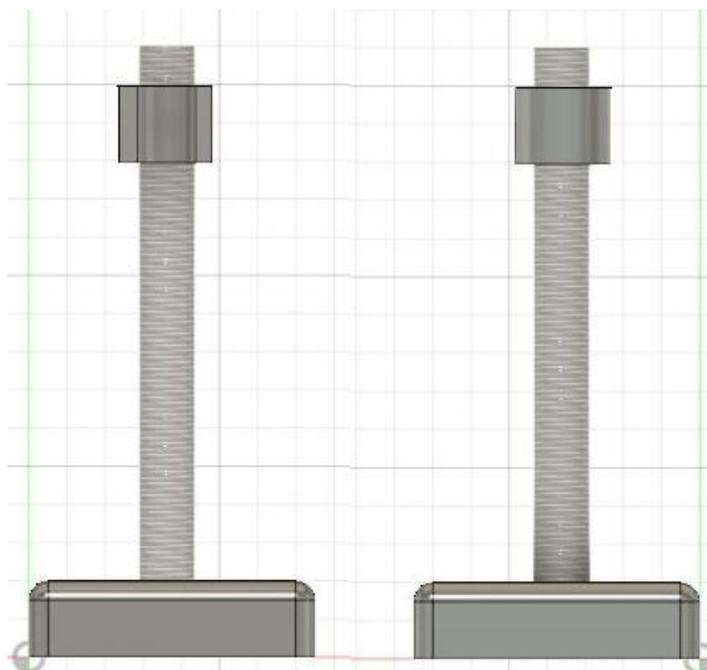


Figura 24 Vista frontal (izquierda) y vista posterior (derecha) base del electrodo.

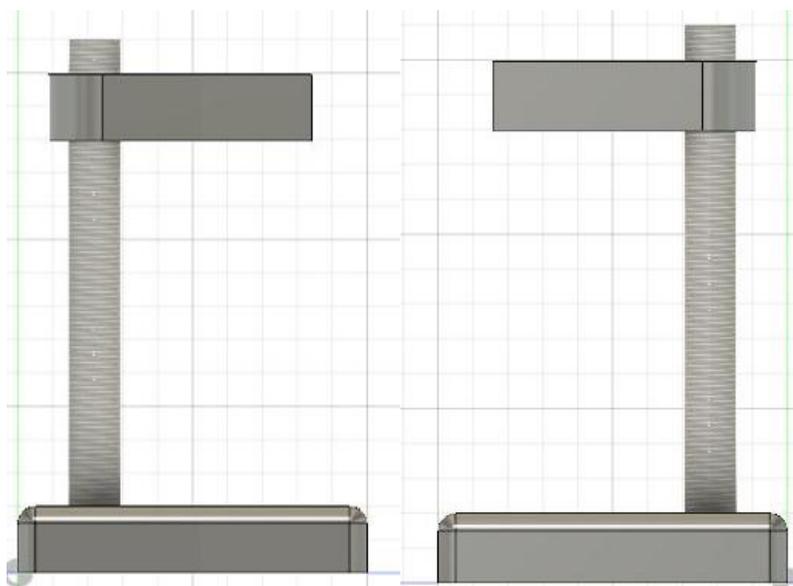


Figura 25 Vistas laterales base del electrodo.

### 8.4.3. Planos del equipo

#### a) Planos Caja Principal

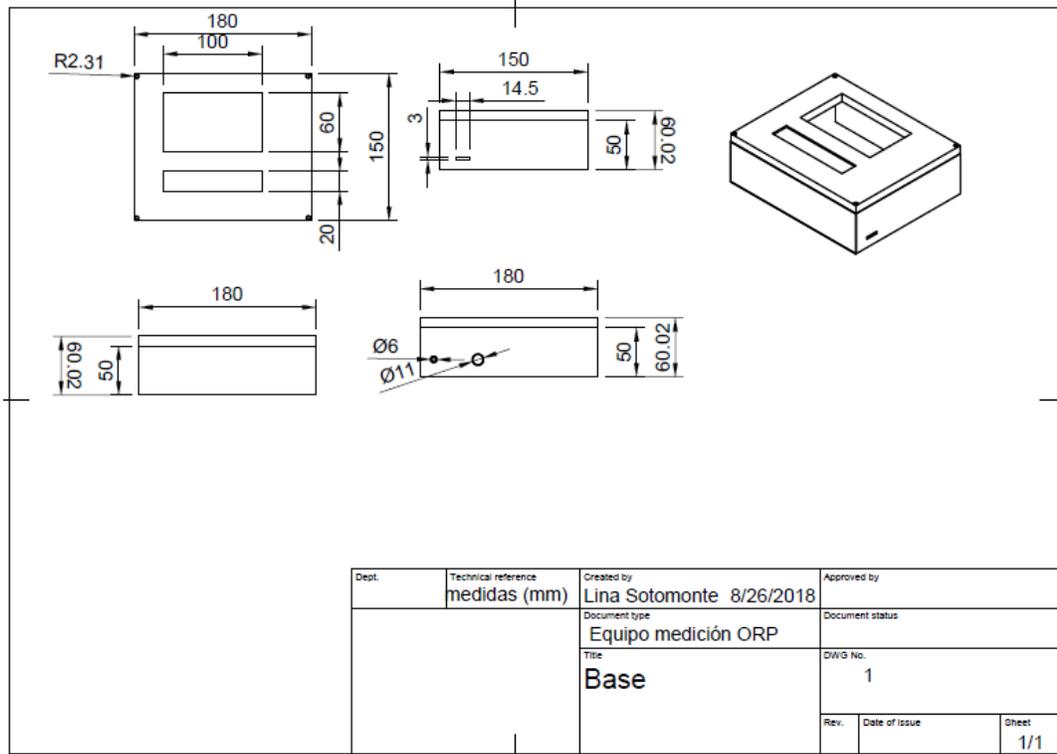


Figura 26 Plano caja principal equipo medición ORP.

#### b) Plano Base Electrodo

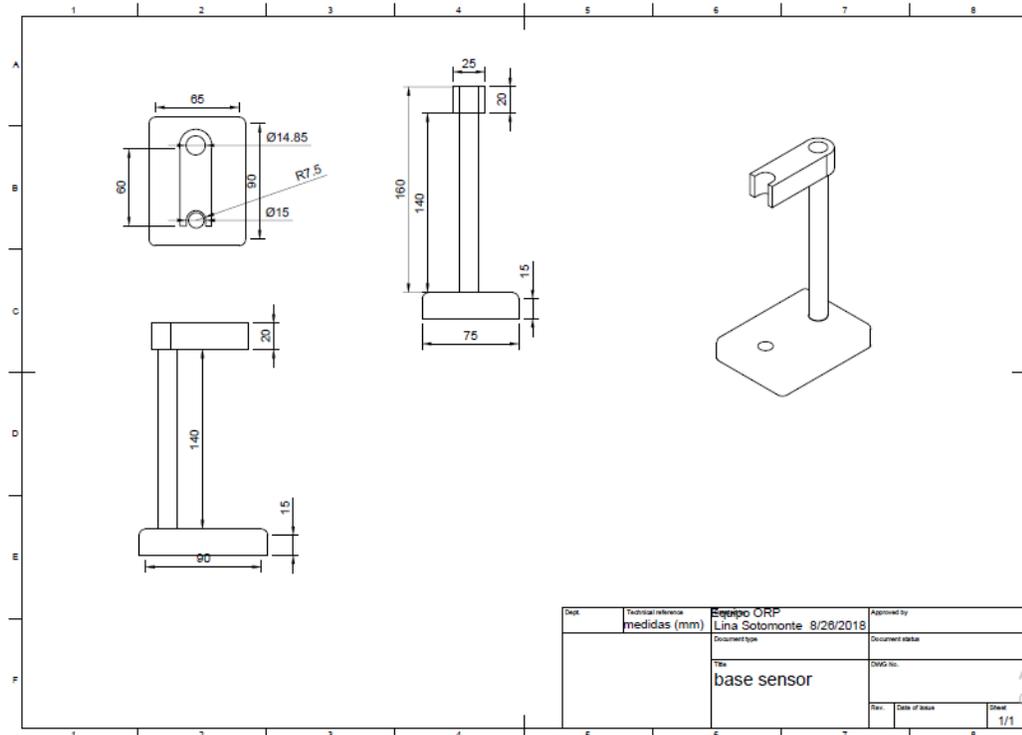


Figura 27 Plano base electrodo medición ORP.

## 8.5. EVALUACIÓN DEL EQUIPO

### Primera fase: pruebas en muestras controladas

Como se menciona en el capítulo 7 la evaluación del equipo se realizó en dos fases, la primera fase de la validación se llevó a cabo con una muestra controlada donde se tenía certeza de la presencia de *S. aureus* y *E. coli*, con el fin de medir el potencial redox con el equipo y validar la predicción de este en relación a la concentración bacteriana en UFC/ml, como se menciona en la metodología. Se inocularon las muestras con concentraciones de conocidas de cada bacteria: *S. aureus*  $1 \times 10^7$  y  $7 \times 10^6$  UFC/ml, *E. coli*  $3 \times 10^7$  UFC/ml y se llevaron a crecimiento siguiendo las condiciones utilizada en el ítem 7.3.

En las tablas 15, 16 y 17 se observan los valores de concentración y potencial redox arrojados por el equipo y los valores de concentración obtenidos después de la siembra. Teniendo en cuenta el porcentaje de error que se puede presentar en el método del recuento en placa y que este error es trasladado al equipo pues la base de datos está basada en los datos de concentración obtenidos por este método al calcular el error respecto a la concentración real (a partir de la siembra en placa) y la concentración arrojada por el equipo para *E. coli* el porcentaje de error fue de 140%, mientras que para *S. aureus* fue de 48% para los datos mostrados en la tabla 16 y 19% para los datos de la tabla 17. Sin embargo, si se

toman solo los exponenciales (unidad logarítmica) de cada concentración y se calcula el error para *E. coli* se obtiene un error del 6% y el equipo se desfasa en solo una unidad logarítmica, mientras que para *S. aureus* el error es del 0%, el cálculo del error se realiza siguiendo la siguiente ecuación:

$$e\% = \frac{\text{Valor real} - \text{Valor experimental}}{\text{Valor real}} * 100\%$$

Tabla 155 Validación muestra controlada para *E. coli*.

Hora	<i>E. coli</i> UFC/ml Inicial: 3x10 <sup>7</sup>		
	UFC/ml (Siembra)	UFC/ml (equipo)	ORP(mV)
2	8 x 10 <sup>7</sup>	2 x 10 <sup>8</sup>	106
4	2 x 10 <sup>8</sup>	2 x 10 <sup>8</sup>	106
6	7 x 10 <sup>8</sup>	4 x 10 <sup>9</sup>	-496
10	6 x 10 <sup>9</sup>	4 x 10 <sup>9</sup>	-502

Tabla 166 Validación muestra controlada para *S. aureus*.

Hora	<i>S. aureus</i> UFC/ml Inicial: 1x10 <sup>7</sup>		
	UFC/ml (Siembra)	UFC/ml (equipo)	ORP(mV)
2	2 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	176
4	4 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	176
6	7 x 10 <sup>7</sup>	7 x 10 <sup>7</sup>	-491
10	3 x 10 <sup>8</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>	-400

Tabla 177 Validación muestra controlada para *S. aureus*.

Hora	<i>S. aureus</i> UFC/ml Inicial: 7x10 <sup>6</sup>		
	UFC/ml (Siembra)	UFC/ml (equipo)	ORP(mV)
2	1 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	176
4	3 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	176
6	5 x 10 <sup>7</sup>	7 x 10 <sup>7</sup>	-112
10	2 x 10 <sup>8</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>	-491

La concentración bacteriana entregada por el equipo para *S. aureus* y *E. coli* en comparación con el conteo de UFC/mL realizadas, muestran que el equipo es capaz de entregar un valor aproximado de la concentración bacteriana al momento de la medición, lo que le permite al usuario tener el conocimiento del estado de la muestra.

Estos resultados también permiten evidenciar la ventaja de detectar la presencia de las bacterias por medio del potencial redox, puesto que la medición de este y el análisis del dato medido por parte del equipo se demora menos de 2 minutos, en comparación a la técnica de conteo en placa que toma más de 24 horas puesto que para realizar la siembra en placa en el laboratorio previamente se preparan tubos de vidrio de tapa rosca con solución salina estéril para realizar las diluciones seriadas, además de esto se prepara el agar donde se siembran las muestras, y una vez sembradas se esperan 24 horas para realizar el conteo de la colonias. Además de esto, un parámetro muy importante del equipo desarrollado en este trabajo es su portabilidad, pues fácilmente puede ser transportado y solo requiere una toma eléctrica para su operación. Claro está, garantizar la asepsia entre toma de muestras es de gran importancia para su directa aplicación en campo de forma independiente de laboratorios microbiológicos, por lo que este punto es de vital importancia para ser desarrollado en un trabajo futuro que transforme el prototipo desarrollado en este trabajo en un producto comercial.

### **Segunda fase: pruebas en muestras aleatorias**

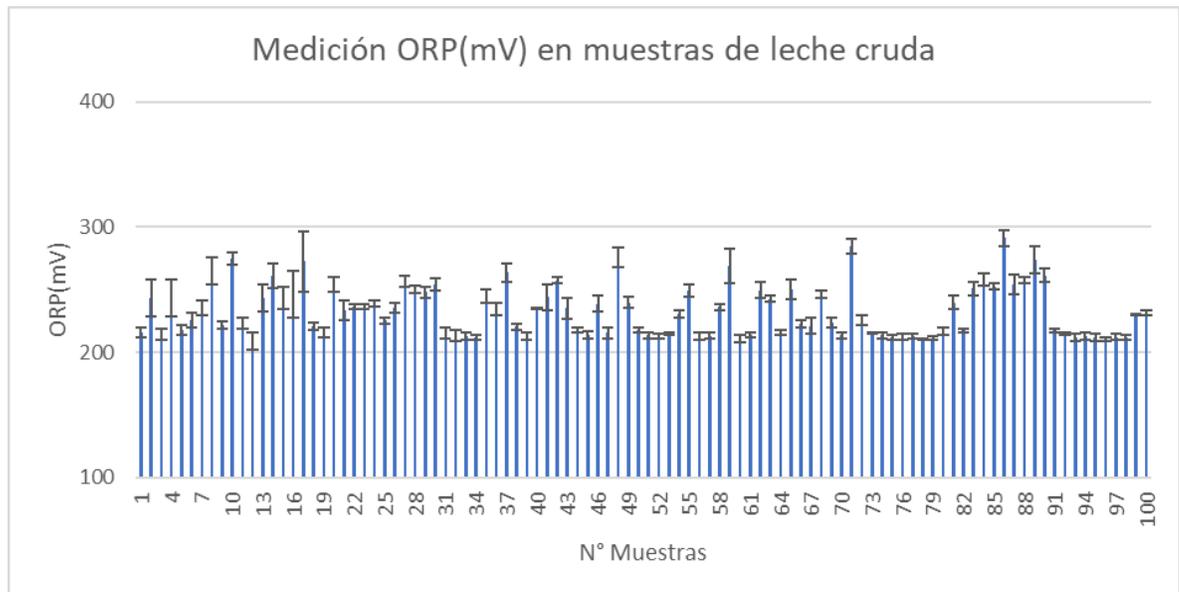
En la segunda fase se llevó a cabo la medición de potencial redox en 100 muestras de leche extraídas de diferentes vacas al momento de iniciar el ordeño de cada una en donde no se tenía conocimiento del estado de estas (figura 28), las muestras se depositaron en frascos nuevos y se trasladaron a una temperatura de  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ .



Figura 28 Momento de toma de muestra.

Las mediciones se realizaron durante 10 horas, donde la primera medición se realizó 5 horas después de tomada la muestra. En la gráfica 9 se observan los valores promedios de ORP por cada muestra de leche recolectada. El potencial redox en las muestras durante las diferentes horas de medición varió entre 213 mV y 253 mV, teniendo como valor promedio 233 mV y una desviación estándar

de 20 mV, en el anexo 1 se observan las gráficas de medición de ORP durante cada hora de medición.



Gráfica 9 Promedio medición ORP muestras de leche cruda.

En la gráfica 9 se evidencia que el potencial redox en todas las muestras se mantiene en el rango establecido en la literatura, y este no disminuye a valores menores a 200 mV lo que indica que no hay presencia de bacterias patógenas como *S. aureus* y *E. coli* en las muestras. De esta forma el equipo puede, de acuerdo a nuestros resultados, diagnosticar la ausencia de *S. aureus* y *E. coli* en todas las muestras de leche analizadas. En la figura 29 se observa el resultado arrojado por el equipo cuando hay ausencia de bacterias patógenas en la muestra medida.



Figura 29 Medición de ORP con el equipo.

Tabla 18 Relación costos pruebas laboratorio Vs Equipo de medición

<b>Laboratorio Certificado</b>					
Ítem	Duración pruebas	Cantidad	Cantidad mL muestra	Valor Unitario	Total
Recuento <i>S. aureus</i>	Recuento de <i>S. aureus</i> en laboratorios certificado	100	300	\$33.000	\$3.300.000
Recuento <i>E. coli</i>	Recuento de <i>E. coli</i> en laboratorios certificado	100	300	\$33.000	\$3.300.000
Tiempo espera resultados: aprox. 5 días hábiles					
Total					\$6.000.000
<b>Equipo Medición ORP</b>					
Detección bacterias	Detección bacterias por medio de ORP con el equipo diseñado	100	5	\$500.000	\$500.000
Tiempo espera resultados: 3 horas					
Total					\$500.000*

\*Este valor corresponde al valor de las soluciones empleadas para la limpieza del electrodo.

Realizando la comparación entre el tiempo y los costos que tomaría llevar las 100 muestras de leche a un laboratorio certificado, datos observados en la tabla 20, permite deducir la relación costo beneficio de implementar las mediciones de potencial redox como método para la detección de la presencia de bacterias patógenas (*S. aureus* y *E. coli*) en leche cruda puesto que la mayor inversión es la adquisición del equipo, en comparación con los costos y tiempos que implican llevar las muestras a un laboratorio certificado para la evaluación de la calidad de la leche.

## 9. CONCLUSIONES

La caracterización del potencial redox en relación al crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en leche cruda mostró una disminución del potencial redox hasta -500 mV, durante la fase exponencial de las bacterias. debido a la interacción entre la membrana celular de *S. aureus* y *E. coli* y la leche, así mismo, se estableció que el potencial redox no vuelve a los valores normales reportados en la literatura lo que permitió disminuir el riesgo de falsos positivos.

El equipo diseñado permitió evaluar los cambios de potencial redox en la leche generados por el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, logrando la detección de estos microorganismos en un tiempo menor a 10 minutos, en comparación al tiempo empleado actualmente por los laboratorios certificados (3 a 5 días), esta detección se generó a partir de las curvas de variación de ORP en relación a la concentración bacteriana.

La evaluación del equipo permitió determinar la ausencia y/o presencia de patógenos como *S. aureus* y *E. coli* en diferentes muestras de leche cruda en un tiempo menor al empleado actualmente. Esto permitió establecer que el potencial redox puede ser utilizado como parámetro para la medición de la calidad microbiana en muestras de leche cruda. Ampliando la base de datos del equipo y alimentándola con otras bacterias patógenas que puedan presentarse en leche el equipo puede llegar a ser un equipo comercial y ser adquirido por productores de leche que no cuenten con acceso a laboratorios certificado o privados.

Uno de los aportes de este proyecto es evidenciar que actualmente, como bioingenieros, tenemos las herramientas para desarrollar nuevas tecnologías, para evidenciar comportamientos de los microorganismos permitiendo conocer el estado de los alimentos antes del consumo humano previniendo posibles enfermedades de transmisión alimentaria.

## RECOMENDACIONES

Una vez desarrollado este trabajo y con el fin de seguir con el mejoramiento del equipo proponemos como trabajos futuros:

Evaluar el efecto de la temperatura frente a las mediciones de ORP, debido a que las mediciones realizadas en el trabajo y reportadas en la literatura fueron a 37°C. La medición en campo del ORP es posible adaptando un sistema sencillo de temperatura que permita mantener la temperatura requerida.

Evaluar qué bacterias pueden y no pueden ser detectadas a la hora de realizar las mediciones de ORP, ya que cada bacteria se comporta de diferente manera, como ocurrió en el caso de *Salmonella* spp.

Diseñar, construir y adaptar un prototipo funcional para una lámpara UV, que permite mejorar las pruebas de asepsia a la hora de medir con el equipo, en lugares que no cuente con cabina de flujo laminar, ya que en las pruebas de asepsia realizadas por el electrodo el uso de luz UV permitió la eliminación de los microorganismos, esto permitirá emplear el equipo en campo pues para su operación solo necesita de una toma eléctrica (tanto las lámparas de luz UV como el equipo).

Evaluar el uso de otro microcontrolador con la capacidad suficiente para realizar todo el procesamiento de la señal sin presentar pérdidas de estabilidad, puesto que la memoria del Arduino uno se ocupó en un 85% lo que ocasiona pérdidas de estabilidad del sistema.

Realizar las curvas de variación de potencial redox en leche mastítica para evaluar los cambios de potencial redox, y a su vez evaluar el comportamiento de la enzima xantina oxidasa.

## REFERENCIAS

- AAT BIOQUEST. (2018). *Phosphate Buffered Saline*. Obtenido de AAT BIOQUEST:  
<https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/pbs-phosphate-buffered-saline>
- Arana, I., Orruo, M., & Barcina, I. (2019). *Universidad del País Vasco, Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología*. Obtenido de Enumeración de microorganismos:  
[https://ocw.ehu.eus/pluginfile.php/1655/mod\\_resource/content/1/Tema\\_2.\\_Metodos\\_basicos\\_de\\_enumeracion\\_de\\_microorganismos.pdf](https://ocw.ehu.eus/pluginfile.php/1655/mod_resource/content/1/Tema_2._Metodos_basicos_de_enumeracion_de_microorganismos.pdf)
- Arenzoo, N., Ahari, H., & Shahbazzadeh, D. (2018). Designing a direct ELISA kit the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in raw milk samples. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1732-1737.
- Armenta, F., Andrade, M., & Morales, P. (Mayo de 2015). *mandradebs.github.io*. Obtenido de Diseño de una fuente de alimentación dual  $\pm 1.2V - \pm 25V$  de 2A:  
<https://mandradebs.github.io/schoolprojects/2015lineal/reporte%20fuente%201.2V%2025V.pdf>
- Asociación Colombiana de Procesadores de Leche. (2017). *¿Cuáles son las tendencias en el consumo de lácteos en Colombia?*. Obtenido de ASOLECHE :  
<http://asoleche.org/2017/01/31/tendencias-consumo-lacteos-en-colombia/>
- Asociación Colombiana de Procesadores de Leche. (2018). *Leche en Cifras*. Obtenido de ASOLECHE:  
<http://asoleche.org/leche-en-cifras/>
- Asociación Nacional de Productores de leche. (2016). *Ganadería en cifras*. Obtenido de ANALAC:  
<http://www.analac.org/estadisticas>
- Atalla, H., Gyles, C., & Mallard, B. (2015). *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Animal Health Research Reviews*, 33-45.
- Barker, J., Naeeni, M., & Bloomfield, S. (2003). The effects of cleaning and disinfection in reducing *Salmonella* contamination in a laboratory model kitchen. *Journal of Applied Microbiology*.
- Becton Dickinson. (abril de 2006). *Becton Dickinson*. Obtenido de BD Baird-Parker Agar :  
<https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-255084.pdf>
- Becton Dickinson. (Julio de 2014). *BD MacConkey II Agar*. Obtenido de  
<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>
- Britania . (2019). *Cerebro Corazón Infusión Agar*. Obtenido de  
[https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a281eacb5ee1.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a281eacb5ee1.pdf)
- Camarena , J., & Sanchez, R. (s.f.). Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina.

- Capuani, A., Behr, J., & Vogel, R. (2012). Influence of lactic acid bacteria on the oxidation/reduction potential of buckwheat (*fagopyrum esculentum moench*) sourdoughs. *European Food Research and Technology*, 1063/1069.
- Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea. (2016). *Calidad bacteriológica de la leche cruda*. Obtenido de <https://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/02-listeria-2016.pdf>
- Céspedes Molina, G. A. (Julio de 2012). PREDICCIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* EN LECHE CRUDA AL ELEVAR LA TEMPERATURA HASTA LA PASTEURIZACIÓN APLICANDO MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA, (Tesis de Pregrado), Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador.
- Cicuta, M., Parma, A., Viñas, M., Sanz, M., Boehringer, S., Roibón, W., . . . Vena, M. (2016). Factores de Virulencia de *Escherichia coli* aisladas de porcinos en Argentina. *Revista Veeterinaria*.
- Copenlad, A., & Lytle, D. (2014). Measuring the oxidation-reduction potential of important oxidants in drinking water. *Journl - American Water Works Association*, E20.
- Dai, F., Zhang, M., Hu, B., Sun, Y., Tang, Q., Du, M., & Zhang, X. (2015). Immunomagnetic nanoparticles based on a hydrophilic polymer coating for sensitive detection of *Salmonella* in raw milk by polymerase chain reaction. *RCS Advances*.
- Decreto 2838. (2006). *Por el cual se modifica parcialmente el Decreto 616 de 2006 y se dictan otras, Ministerio de la protección social. Colombia. 24 agosto de 2006.*
- Decreto 539. (2014). *Por el cual se expide el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los importadores y exportadores de alimentos para el consumo humano, materias primas..., Miniisterio de salud y proteccion social, Colombia, 12 de marzo de 2014.*
- Decreto 616. (2006). *Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos..., Ministerio de la protección social. Colombia. 28 de febrero de 2006.*
- Definición, composición, estructura y propiedades de la leche*. (2018). Obtenido de Universidad Nacional Abierta y a Distancia, facultad de ciencias básicas tecnología e ingeniería: [http://infolactea.com/wp-content/uploads/2016/01/301105\\_LECTURA\\_Revision\\_de\\_Presaberes.pdf](http://infolactea.com/wp-content/uploads/2016/01/301105_LECTURA_Revision_de_Presaberes.pdf)
- Dexon. (2018). Dexon. *Catalogo*. Obtenido de Catalogo.
- Echeverri, L., Cifuentes, G., Granados, J., Arias, J., & López, C. (2007). Cinética de desinfección para cinco desinfectantes utilizados en industria farmacéutica. *Revista Cubana de Farmacia*.
- Electrodos de medida y referencia*. (2018). Obtenido de Universidad Nacional Autónoma de México, facultad de química. Retrieved from: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/ELECTRODOSDEMEDIDAYDEREFERENCIA\\_22645.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/ELECTRODOSDEMEDIDAYDEREFERENCIA_22645.pdf)

- Electronica. (2018). *sherlin.xbot.es*. Obtenido de Microcontrolador:  
<http://sherlin.xbot.es/microcontroladores/introduccion-a-los-microcontroladores/que-es-un-microcontrolador>
- Emerson Process Management. (Mayo de 2008). *FUNDAMENTALS OF ORP MEASUREMENT*. Obtenido de Emerson Process Management:  
<https://www.emerson.com/documents/automation/application-data-sheet-fundamentals-of-orp-measurement-rosemount-en-68438.pdf>
- Equipos y Laboratorio de Colombia. (2018). *Equipos y laboratorio*. Obtenido de Equipos:  
<https://www.equiposylaboratorio.com>
- Espinoza, G., García, C., Rojas, A., & Castillo, K. (2018). Determinación de potencial redox de bebidas naturales, artificiales: como ayuda a la prevención del cáncer. *Conference Proceeding UTMACH*.
- Fagan, K., Salehi, E., Gruszynski, K., Smith, M. L., De perio, M. A., Su, C., & Luckhaupt, S. (2017). Occupational Distribution of Campylobacteriosis and Salmonellosis Cases - Maryland, Ohio, and Virginia. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 850/853.
- Fazlzadeh, M., Sadeghi, H., Bagheri, P., Poureshg, Y., & Rostami, R. (2016). Microbial quality and physical-chemical characteristics of thermal springs. *Environmental Geochemistry and Health*, 413-422.
- Fernández, P. (s.f.). *Equilibrio Redox. Universidad de Castilla-La Mancha*. Obtenido de <https://previa.uclm.es/profesorado/pablofernandez/QG-08-equilibrio%20redox/redoxteoria.pdf>
- García, E., Fuentes, A., & Fernández, I. (2018). *Determinación de la calidad higiénica de la leche mediante la medición indirecta del tiempo de reducción del azul de metileno o prueba de la reductasa microbiana*. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/38380/Eva%20Garc%C3%ADa.%20Calidad%20leche-2014.pdf?sequence=1>
- García, K. (2016). Estandarización del método de reducción xantina-XO para determinar el potencial redox estándar de la proteína VVD, Maestra en Ciencias en Biología Molecular, Instituto Potosí de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis Potosí.
- García, V. (9 de NOVIEMBRE de 2010). *Diario electronico*. Obtenido de Amplificador Operacional:  
<https://www.diarioelectronicohoy.com/blog/el-amplificador-operacional>
- Gold, K., & Hitchins, V. (2013). Cleaning assessment of disinfectant cleaning wipes on an external surface of a medical device contaminated with artificial blood or *Streptococcus pneumoniae*. *American Journal of Infection Control*, 901-907.
- González, M. (26 de Octubre de 2010). *Indicador Redox*. Obtenido de <https://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/indicador-redox>

- Granda, M., & Mediavilla, E. (2015). *Instrumentación electrónica: transductores y acondicionadores de señal*. Santander, Cantabria (España): Editorial Universidad Cantabria.
- Guerra, M., Almeida, A., & Willingham, A. (2016). An overview of food safety and bacterial foodborne zoonoses. *Trop Anim Health Prod*, 1095-1108.
- Guerrero, J. (2016). *Informe final del evento de enfermedades transmitidas por alimentos, Colombia*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud.
- Hanna Instruments. (2018). *Catalogo pH/ORP*. Obtenido de Hanna Instruments Colombia: <https://www.hannacolombia.com/products/category/parametro/phorp>
- Heer, G. (2007). *Microbiología de la Leche*. Obtenido de Universidad de Zulia, facultad de ciencias veterinarias.: <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologialeche/informacion/microbiologia.pdf>
- Heredia, P., Hernández, A., González, A., & Vallejo, B. (2017). BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS: MECANISMOS DE ACCIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA PATÓGENOS EN QUESOS. *Interciencia*, 340-346.
- Hernández, Á. (2006). Aportaciones al estudio de la actividad microbiana de los antisépticos y desinfectantes, (tesis doctoral), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España .
- Huerta, O. (14 de junio de 2018). *Modo de acción de los desinfectantes*. Obtenido de <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/modo-accion-desinfectantes-t42398.htm>
- Indigotecnología. (2019). *¿PARA QUÉ SIRVE UNA CABINA DE FLUJO LAMINAR?* Obtenido de <http://www.indigotecnologia.com/para-que-sirve-una-cabina-de-flujo-laminar.html>
- INS. (Noviembre de 2015). *Instituto Nacional de Salud*. Obtenido de Documentos de evaluación de riesgos en inocuidad de alimentos, Perfil de riesgo de Escherichia coli enterotoxigénica y verotoxigénica en queso fresco: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Publicaciones%20ERIA%20y%20Plaguicidas/PERFIL%20E.%20COLI.pdf>
- INS. (Octubre de 2018). *Boletín Epidemiológico*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud: <https://www.ins.gov.co/buscar-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2043.pdf>
- ISO 16654:2001. (2001). *Organización Internacional de Normalización. Suiza. mayo de 2001*.
- ISO 6888-1:1999. (1999). *Organización Internacional de Normalización. Suiza. febrero de 1999, julio de 2003*.
- ISO 7218-1:2014. (2014). *Organización Internacional de Normalización. Suiza. febrero de 2014*.

- kadariya, J., Smith, T., & Thapaliya, D. (2014). Staphylococcus aureus and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. *BioMed Research International*, <http://dx.doi.org.ezproxy.unbosque.edu.co/10.1155/2014/827965>.
- Kerario, I., Simuunza, M., Chenyambuga, S., Koski, M., Seoing-Gu, H., & Muleya, W. (2017). Prevalence and risk factors associated with theileria parva infection in cattle in three regions of tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, 1613-1621.
- Lin, B., Ke, Z., Chen, X., & Xu, R. (2017). Simultaneous detection of Salmonella spp., Staphylococcus aureus and Cronobacter in infant milk powder by multiplex quantitative real-time PCR. *Journal of Food Safety and Quality*, 4375-4381.
- Mandal. (2018). *What is Staphylococcus Aureus?* . Obtenido de News-Medical.net: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Staphylococcus-Aureus.aspx>
- Matallana E., A. C. (2015). *VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS*. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA).
- McEgan, R., Mootian, G., Goodridge, L., Schaffner, D., & Danyluk, M. (2013). Predicting salmonella populations from biological, chemical, and physical indicators in Florida surface waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 4094-4105.
- Medved'ová, A., Valík, L., Sirotná, Z., & Liptáková, D. (2015). Growth Characterisation of Staphylococcus aureus in Milk: a Quantitative Approach. *Czech J. Food Sci.*, 443-453.
- Méndez, V., & Osuna, L. (2007). Caracterización de la calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda en algunos sistemas productivos de la región del alto del chicamocha (departamento de Boyacá). *Universidad de la Salle, Bogotá*.
- Mercedes, S., Chávez, G., Rodríguez, G., Cadillo, A., & Valdiviezo, D. (2018). Inactivación in vitro de patógenos alimentarios mediante radiación UV-C. *International Multi-Conference for Engineering, Education, and Technology*, 19-21.
- Millemann, Y., Granier, S., Boulouis, H.-J., Lailier, R., & Belbis, G. (2015). Salmonellosis due to a monophasic variant of. *Veterinary Record Case Reports*.
- Ministerio de salud. (2018). *MinSalud*. Obtenido de inocuidad alimentos: <https://www.minsalud.gov.co/salud/Paginas/inocuidad-alimentos.aspx>
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2011). *Evaluación de riesgos de Staphylococcus aureus enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia*. Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-staphylococcus.pdf>
- Minitab. (2018). *¿Qué es el método de Tukey para comparaciones múltiples?* Obtenido de Minitab: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/multiple-comparisons/what-is-tukey-s-method/>

- Minitab. (2017). *El teorema del límite central*. Obtenido de <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/data-concepts/about-the-central-limit-theorem/>
- Moral, U., Nagar, P., Maan, S., & Kaur, K. (2017). A Growth of Different Types of Microorganism, Intrinsic and Extrinsic Factors of Microorganism and their Affects in Food: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 290-298.
- Morandi, S., Silveti, T., Tamburini, A., & Brasca, M. (2016). Changes in oxidation-reduction potential during milk fermentation by wild lactic acid bacteria. *The Journal of Dairy Research*, 387-394.
- Msalya, G. (2017). Contamination Levels and Identification of Bacteria in Milk Sampled from Three Regions of Tanzania: Evidence from Literature and Laboratory Analyses. *Veterinary Medicine International*.
- Mungai, E., Behraves, C., & Gould, L. (2015). Aumento de brotes asociados con la leche no pasteurizada, Estados Unidos, 2007–2012. *Enfermedades infecciosas emergentes*, 119-122. doi:<https://dx.doi.org/10.3201/eid2101.140447>.
- Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., & Weil, P. A. (2010). *Harper Bioquímica Ilustrada*. México D.F.: Mc Graw Hill.
- N'Guessan, É., Godrie, T., De Laubier, J., Di Tanna, S., Ringuet, M., & Sindic, M. (2015). A survey of bacteria found in Belgian dairy farm products. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 346-354.
- Nilsson, G. (1959). Reducing properties of normal and abnormal milk y their importance in bacteriological grading of milk. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 41-47.
- NTC 4092. (2009). *ICONTEC. Colombia. 16 de diciembre de 2009*.
- NTC 730. (2000). *ICONTEC, Colombia, 22 de noviembre de 2000*.
- NTC 734. (1996). *ICONTEC, Colombia, 23 de octubre de 1996*.
- Núñez, L., Georgellis, D., & Álvarez, A. (2014). ArcB: El sensor del estado redox en bacterias. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 135-146.
- OMS. (2005). *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- OMS. (2 de Diciembre de 2015). *Comunicado de prensa*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/>
- OMS. (20 de noviembre de 2015). *Las enfermedades de transmisión Alimentaria*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/amro\\_es.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/amro_es.pdf?ua=1)

- OMS. (20 de noviembre de 2015). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Las enfermedades de transmisión alimentaria:  
[http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/amro\\_es.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/amro_es.pdf?ua=1)
- OMS. (7 de febrero de 2018). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Escherichia coli:  
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- OMS. (2 de febrero de 2019). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Escherichia coli:  
[https://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](https://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/)
- OPS. (2019). *Organización Panamericana de Salud*. Obtenido de Peligros Biológicos:  
[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es)
- Otero, J., Sánchez, A., & Moral, E. (enero de 2005). *UAM*. Obtenido de Anova:  
<https://uam.es/departamentos/economicas/econapli/anova.pdf>
- Palić, A., & Dikanović-Lučan, ., Ž. (1993). Oksido-redukcijski potencijal mlijeka i mliječnih proizvoda. *Productos lácteos: Revista para el progreso de la producción y el procesamiento de la leche*, 133-42.
- Potencial de oxidación y reducción*. (2018). Obtenido de Universidad Nacional de Misiones, facultad de ciencias exactas, químicas y naturales: [http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/MICROGRALF/document/Teorias/TEMA\\_08\\_\\_MECANISMO\\_DE\\_ACCION\\_DE\\_LOS\\_AGENTES\\_FISICO-QUIMICOS\\_SOBRE\\_LOS\\_MICROORGANISMOS/FACTORES\\_FISICOS/POTENCIAL\\_DE\\_OXIDACION\\_REDUCCION.htm](http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/MICROGRALF/document/Teorias/TEMA_08__MECANISMO_DE_ACCION_DE_LOS_AGENTES_FISICO-QUIMICOS_SOBRE_LOS_MICROORGANISMOS/FACTORES_FISICOS/POTENCIAL_DE_OXIDACION_REDUCCION.htm)
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2004). Crecimiento Microbiano. En Prescott, Harley, & Klein, *Microbiología* (Quinta Edición ed., págs. 119-123). Mc Graw Hill. Obtenido de <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.unbosque.edu.co>
- PROBIOTEK. (2019). *Luria Bertani LB*. Obtenido de <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/caldo-luria-luria-bertani-lb/>
- Real Academia Española. (2018). *RAE*. Obtenido de Diccionario: <http://dle.rae.es/?w=diccionario>
- Redes Microbiana. (2018). *Redes Microbianas*. Obtenido de Inoculación: <http://www.redesmicrobianas.com/inoculacion/>
- Reichart, O., Szakmár, K., Jozwiak, Á., Felföldi, J., & Baranyai, L. (2007). Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination. *International Journal of Food Microbiology*, 143-148.
- Rejane C, G., Sinara T.B, M., & Odilio B.G, A. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on E. coli and S. aureus growth. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 122-127.
- Resolución 2997. (2007). *Ministerio de la protección social, Colombia, 3 de septiembre de 2007*.

- Rivera, V. (30 de julio de 2014). *Volkanrivera*. Obtenido de Comparando Arduino UNO con Launchpad MSP430: <https://volkanrivera.com/esp/2014/07/comparando-arduino-uno-con-launchpad-msp430/>
- Riverón-Rodríguez, E., Ramiez-Frómata, N., Herrera-Alba, D., Barreras-García, G., Zayaz-Tamayo, Á., & Regueiro-Gómez, Á. (2012). Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez. *CENIC Ciencias Biológicas*, 43(2).
- Robinson, R. (2005). *Dairy Microbiology Handbook* (3 ed.). New York: A John Wile & Sons, INC.
- Rodríguez, H., Barreto, G., Sedrés, M., Bertot, J., Martínez, S., & Guevara, G. (2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. *Revista electrónica de Veterinaria*, 1-27.
- Sharma, P., Oey, I., & Everett, D. W. (2016). Thermal properties of milk fat, xanthine oxidase, caseins and whey proteins in pulsed electric field-treated bovine whole milk. *Food Chemistry*, 34-42.
- Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. 11-21.
- Stanier, R. (1996). Microbiología. En R. Stanier, *Microbiología* (págs. 83-93). Barcelona: Reverte S.A.
- The Cleveland Clinic Foundation. (2018). *Foodborne disease*. Obtenido de The Cleveland Clinic Foundation: <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/infectious-disease/foodborne-disease/#top>
- Tian, D., Yuanjie, S., Zhaohuan, Z., Donghong, L., Xingqian, Y., Shiguo, C., & Yong, Z. (2017). A Multiplex RT-PCR Assay for *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. Detection in ra milk with Pre-enrichment. *Frontiers in Microbiology*.
- UASLP. (2 de abril de 2008). *Universidad Autonoma de San Luis de Potosi*. Obtenido de Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS): [http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_Buffer\\_PBS.pdf](http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf)
- UBA. (2018). *UBA*. Obtenido de Introducción a la Instrumentación: <http://laboratorios.fi.uba.ar/lscm/Instrum01.pdf>
- Varela, G., & G, G. (2006). Temas de Bacteriología y Virología medica. En G. Varela, & G. G. Montevideo: FEFMUR.
- Vélez, H. (2015). Acción bactericida del hipoclorito de sodio a 37°C vs hipoclorito de sodio (tesis pregrado), Universidad de Guayaquil, Santiago de Guayaquil, Ecuador.
- Wei, C., Zhong, J., Hu, T., & Zhao, X. (2018). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* by multiplex PCR in milk. *Springer Link*.

- Weiler, N., Orrego, M., Alvarez, M., & Huber, C. (2017). Detección molecular de *Escherichia coli* diarreogénica en pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo en Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 16-21.
- Yun, S., Ho-Jun, S., Hwa, Y. S., Taihua, L., Haryoung, P., & Min-Go, K. (2013). Novel antibody/gold nanoparticle/ magnetic nanoparticle nanocomposites for immunomagnetic separation and rapid colorimetric detection of *Staphylococcus aureus* in milk. *Biosensors & Bioelectronics*, 432-439.
- Zambrano, J. J., & Grass, J. F. (2008). Valoración de la calidad higiénica de la leche cruda en la asociación de productores de leche de sotará – asproleso, mediante las pruebas indirectas de resazurina y azul de metileno. *Scielo*, 56-66.
- Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed*, 129-143.
- Zhao, W., Yang, R., Shem, X., & Chen, X. (2013). Lethal and sublethal injury and kinetics of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk by pulsed electric fields. *Food Control*, 6-12.