



Consejo de Educación
TÉCNICO-PROFESIONAL

Cuantificación de la **lactosa e identificación de** **aminoácidos en muestras** **de yogures comerciales**

Alumnas: Bassadone, A. y Caceres, K.

Bachillerato “Química Industrial” 3° BG U.T.U

Pando, 2020

1. ÍNDICE.....	1
2. RESUMEN.....	4
2.1 Summary.....	4
3. INTRODUCCIÓN.....	4
4. OBJETIVOS.....	5
5. PREGUNTA INVESTIGABLE.....	5
6. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	5
6.1 ¿Qué es el yogurt?.....	5
6.1.1 Fermentación láctica.....	5
6.1.2 Las bacterias en el yogurt.....	6
6.1.2.1 Muestras de las bacterias ácido lácticas.....	7
6.1.2.2 Características generales.....	8
6.1.3 Cultivos bacterianos en el procesos del yogurt.....	8
6.2 ¿Qué es un autoclave y para qué sirve?.....	9
6.3 ¿Qué es un aminoácido?.....	10
6.3.1 Enlace peptídico.....	10
6.3.2 Aminoácidos esenciales y no esenciales.....	11
6.3.3 Las proteínas.....	13
6.3.4 Proteínas de los lácteos.....	13
6.4 Cromatografía en capa fina.....	14
6.4.1 Reacción de la ninhidrina.....	16
6.5 Algunos glúcidos presentes en los lácteos.....	17
6.5.1 Intolerancia a la lactosa.....	17
6.5.2 Reactivo de Fehling.....	19
6.5.3 Espectrofotómetro.....	21
6.5.4 Centrifuga.....	22
6.6 Antecedentes.....	22
7. MATERIALES, SUSTANCIAS Y/O SOLUCIONES.....	23
7.1 Esterilizado de material de vidrio por autoclave.....	23
7.2 Método de diluciones y recuento de placas.....	23
7.3 Identificación de aminoácidos por cromatografía en capa fina.....	23
7.4 Determinación de lactosa por espectrofotometría.....	23

8. TÉCNICAS.....	24
8.1 Plan de muestreo.....	24
8.2 Esterilizado de material de vidrio por autoclave.....	24
8.3 Método de diluciones y recuento en placas.....	24
8.4 Identificación de aminoácidos por cromatografía en capa fina.....	24
8.5 Determinación de lactosa por espectrofotometría.....	25
9. RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.....	26
9.1 Recuento de UFC.....	26
9.2 Identificación de aminoácidos en muestras de yogurt por cromatografía en capa fina..	27
9.3 Determinación de lactosa por espectrofotometría.....	27
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	28
11. PERSPECTIVAS.....	30
12. BIBLIOGRAFÍA.....	31
12.1 Marco teórico y antecedentes.....	31
12.2 Figuras.....	32
12.3 Tablas.....	33
12.4 Gráficas.....	33
12.5 Fotos.....	34
12.6 Metodología.....	34
12.7 Ficha de medidas de seguridad.....	34
13. ANEXOS.....	35
13.1 Fichas de medidas de seguridad.....	35
13.2 Cálculos.....	52
13.2.1 Determinación de lactosa por espectrofotometría.....	52
13.2.2 Recuento de bacterias ácido lácticas.....	52

2. RESUMEN

En el siguiente trabajo se determinó e identificó algunos de los componentes de yogures comerciales de las marcas CLALDY y Vital+ de Conaprole, por métodos clásicos e instrumentales, entre el mes de octubre y noviembre de 2020. Se determinó la cantidad de lactosa que contiene 100 g de yogurt, de forma indirecta con el reactivo de Fehling, por el método instrumental de espectrofotometría; los resultados fueron para CLALDY ($3,08 \pm 0,04$) g y Vital+ de Conaprole ($2,46 \pm 0,02$) g para 100 g de alimento. También se determinó un recuento de bacterias ácido lácticas (BAL), mediante técnicas de dilución en cajas de Petri con agar y TSB; los resultados para las concentraciones cuantificables fueron los siguientes: CLALDY ($10^{-5} = 4,5 \times 10^6$) UFC y ($10^{-8} = 8,6 \times 10^9$) UFC, y Vital+ de Conaprole ($10^{-5} = 0,0142 \times 10^9$) UFC y ($10^{-6} = 0,115 \times 10^9$) UFC. Se identificaron 8 aminoácidos presentes (ALA, PHE, GLI, GLN, HIS, GLU, MET y ASP), por el método clásico de cromatografía en capa fina, por medio de hidrólisis química utilizando el reactivo revelador ninhidrina. En conclusión, la cantidad de lactosa que contiene 100 g de yogurt en ambas marcas comerciales, están dentro del rango de alimentos medio (2 a 5) g de lactosa que hay en 100 g de alimento. El conteo de microorganismos viables en placa no fue producto de un resultado positivo. Finalmente, los 8 aminoácidos fueron identificados de forma rápida y sencilla.

2. SUMMARY

In the following work, some of the commercial yoghurt components of the CLALDY and Vital + brands from Conaprole were determined and identified, by classical and instrumental methods, between October and November 2020. The amount of lactose contained in 100 g was determined. of yoghurt, indirectly with Fehling's reagent, by the instrumental method of spectrophotometry; the results were for CLALDY (3.08 ± 0.04) g and Vital + from Conaprole (2.46 ± 0.02) g per 100 g of food. A lactic acid bacteria (LAB) count was also determined by dilution techniques in Petri dishes with agar and TSB; the results for the quantifiable concentrations were as follows: CLALDY ($10^{-5} = 4.5 \times 10^6$) CFU and ($10^{-8} = 8.6 \times 10^9$) CFU, and Vital + from Conaprole ($10^{-5} = 0.0142 \times 10^9$) CFU and ($10^{-6} = 0.115 \times 10^9$) CFU. The 8 amino acids present (ALA), (PHE), (GLI), (GLN), (HIS), (GLU), (MET), (ASP) were identified by the classical method of thin layer chromatography, using chemical techniques. . hydrolysis with ninhydrin developer reagent. In conclusion, the amount of lactose contained in 100 g of yogurt in both commercial brands is within the range of the average foods (2 to 5) g of lactose in 100 g of food. The count of viable microorganisms on the plate was not the product of a positive result. Finally, the 8 amino acids were quickly and easily identified.

3. INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta la creciente demanda de los consumidores por productos lácteos, y el elevado número de personas que padecen intolerancia a la lactosa, la idea principal fue elegir un producto lácteo que se adaptara a varias técnicas aprendidas durante el curso, y poder integrar las asignatura de Introducción al Análisis Químico, Química Biorgánica y Microbiología, y que a su vez el mismo, en este caso el yogurt, tuviera beneficios para la salud.

Para llevar a cabo el estudio se seleccionaron dos tipos de yogures comerciales, que cumplieran con las mismas condiciones siendo ambos descremados y sin adición de azúcar (CLALDY y Vital+ de Conaprole).

La primera pregunta que se presentó fue, ¿cuál es la concentración de lactosa en una porción de yogurt? y ¿un paciente con baja intolerancia a la lactosa puede consumir?; para ello se pensó en determinar el contenido de lactosa de forma indirecta con el reactivo de Fehling por espectrofotometría, aprovechando que los yogures son descremados, para no tener interferencia con lípidos y al no tener azúcar añadida, sólo se determinaría el contenido de lactosa.

En segundo lugar, como el yogurt tiene varias proteínas de alto valor biológico, se decidió identificar los aminoácidos presentes, utilizando la cromatografía en capa fina, debido a que es un método de separación de los componentes de una mezcla, y se realiza de forma rápida y sencilla.

Por último, como el yogurt es elaborado por una fermentación láctica y que las bacterias ácido lácticas son las causantes de este proceso, se decidió realizar el método de diluciones y el recuento de placas, para cuantificar las unidades formadoras de colonias por mL, y así relacionar con lo aprendido en Microbiología.

4. OBJETIVOS

- Determinar la concentración de lactosa por espectrofotometría.
- Identificar cualitativamente los 8 aminoácidos presentes, por cromatografía TLC.
- Cuantificar la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) para cada muestra de yogurt.

5. PREGUNTA INVESTIGABLE

¿Qué sucede con la concentración de lactosa (expresada en g/100 g de yogurt), la composición de aminoácidos y la cantidad de UFC de las bacterias ácido lácticas, según las marcas comerciales (CLALDY y Vital+ de Conaprole), descremados y sin adición de azúcar?

6. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

6.1 ¿Qué es el yogurt?

El yogurt es un producto popular entre los consumidores, que se obtiene de la fermentación de la leche por microorganismos específicos (*streptococcus thermophilus* y *lactobacillus bulgaricus*). Tiene la característica de ser altamente nutritivo, sabroso y de fácil digestión. Su consumo en la actualidad se ha llevado en aumento por lo que el mercado lo demanda.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un vasto conjunto de microorganismos benignos, dotados de propiedades similares, que fabrican ácido láctico como producto final del proceso de fermentación.

Gracias a la elaboración del yogurt y otros productos lácteos fermentados, las bacterias ácido-lácticas seguirán representando una explotación como cultivos probióticos. Éstas se complementan con las bacterias presentes en la flora intestinal y contribuyen al buen funcionamiento del aparato digestivo. Ante la creciente demanda de los consumidores, cada día más preocupados por la salud, el mercado internacional de estos productos no cesa de incrementarse. (Mendoza, 2007)

La acción de estas bacterias desencadena un proceso microbiano por el cual la lactosa (el azúcar de la leche) se transforma en ácido láctico.

6.1.1 Fermentación láctica

Consiste en la formación de lactato a partir de la glucosa, que a su vez puede proceder de la lactosa. En primer lugar la lactosa se hidroliza en glucosa y galactosa; y esta última se isomeriza a glucosa, con lo que el resultado son dos moléculas de glucosa. Se produce la glucólisis y se forman dos moléculas por cada glucosa. Finalmente el piruvato se reduce al lactato, consumiendo el $\text{NADH} + \text{H}^+$ producido en la glucólisis. Como en el caso anterior, el rendimiento energético es de 2 ATP por cada glucosa, (4 ATP a partir de lactosa) (Asensio, Capel, Cuadrado, García y Oña. 2010).

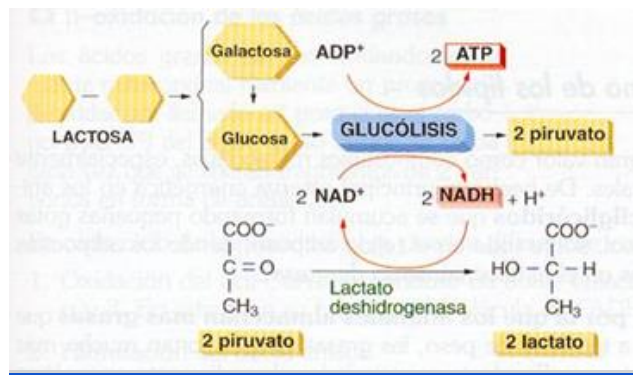


Figura N° 1 Fermentación láctica

A medida que el ácido se acumula, la estructura de las proteínas de la leche va modificándose (van cuajando), y lo mismo ocurre con la textura del producto. Existen otras variables, como la temperatura y la composición de la leche, que influyen en las cualidades particulares de los distintos productos resultantes.

Una de las propiedades más destacables del yogurt es su capacidad para regenerar la flora intestinal, la cual se ve muy afectada por una mala alimentación y sobre todo, por infecciones y abuso de medicamentos como los antibióticos. (Mendoza, 2007)

6.1.2 Las bacterias en el yogurt

Las bacterias ácido-lácticas se han empleado para fermentar o crear cultivos de alimentos durante al menos cuatro milenios. Se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza, así como en el aparato digestivo.

El ácido láctico es también el que confiere a la leche fermentada ese sabor ligeramente acidulado. Los elementos derivados de las bacterias ácido lácticas producen a menudo otros sabores o aromas característicos. El acetaldehído, por ejemplo, da al yogurt su aroma característico, mientras que el diacetilo confiere un sabor de mantequilla a la leche fermentada. Pueden añadirse asimismo al cultivo de microorganismos, como las levaduras, a fin de obtener sabores particulares.

En lo que concierne al yogurt, su elaboración deriva de la simbiosis entre dos bacterias, el *streptococcus thermophilus* y el *lactobacillus bulgaricus*, que se caracterizan porque cada una estimula el desarrollo de la otra.

Cualquier yogurt comercial también puede llevar (aunque no es necesario) *streptococcus lactis*. Esta interacción reduce considerablemente el tiempo de fermentación y el producto resultante tiene peculiaridades que lo distinguen de los fermentados mediante una sola cepa de bacteria. (Mendoza, 2007)

6.1.2.1 Estructuras de las bacterias ácido lácticas

Streptococcus thermophilus

Taxonomía



- **Dominio:** Bacteria
- **Filo:** Firmicutes
- **Clase:** Bacilli
- **Orden:** Lactobacillales
- **Familia:** Lactobacillaceae
- **Género:** Streptococcus
- **Especie:** *Streptococcus thermophilus* (Wikipedia, 2020)

Figura N°2 *Streptococcus thermophilus*

1. Es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, su tamaño oscila entre 0,7 y 0,9 micras.
2. Su morfología depende del sustrato y la temperatura de crecimiento. En la leche a 45 °C forma generalmente cadenas cortas, en 30 °C muchas aparecen como diplococos.
3. También se caracteriza por tener un amplio rango en su temperatura de crecimiento con un óptimo de 40 °C a 45 °C (mínimo de 20 °C y máximo de 50 °C), no crece a 35 °C.
4. Existe en la ubre de la vaca sana, en las máquinas ordeñadoras y en recipientes de leche, así como en la leche cruda. Como es bastante termorresistente, sobrevive a la pasterización corta y larga, pero no a la pasterización alta.
5. Tiene el papel como probiótico, aliviando los síntomas de intolerancia a la lactosa y otros trastornos gastrointestinales. (Rodríguez, Ramírez, Uresti y Grande, 2020)

Lactobacillus bulgaricus

Taxonomía



- **Dominio:** Bacteria
- **División:** Firmicutes
- **Clase:** Bacilli
- **Orden:** Lactobacillales
- **Familia:** Lactobacillaceae
- **Género:** Lactobacillus
- **Especie:** *L. delbrueckii* (Orla-Jensen 1919) Rogosa & Hansen 1971
- **Subespecie:** *bulgaricus* (Wikipedia, 2020)

Figura N°3 *Lactobacillus bulgaricus*

1. Formado por bacterias Gram positivas de forma bacilar que suelen formar largas cadenas.
2. Se desarrolla a 15 °C, muere en cultivos repetidos en caldo de lactosa – peptona – levadura, es incapaz de desarrollarse en medio que contengan 2,5 por 100 de cloruro de sodio y no crece en caldo a pH de 7,8.

3. *Lactobacillus bulgaricus* aporta nutrientes esenciales para *Streptococcus thermophilus* aminoácidos (valina, leucina, isoleucina e histidina) y este a su vez produce compuestos similares al ácido fórmico que estimula el desarrollo y crecimiento del *Lactobacillus bulgaricus*.
4. En esta simbiosis es el *Streptococcus thermophilus* quien inicia la fermentación láctica y que se desarrolla muy intensamente hasta un pH de 5,5. La acidez, el consumo de oxígeno y la liberación de sustancias volátiles, crean las condiciones ideales para que se desarrolle el *Lactobacillus bulgaricus*. Siendo el *Streptococcus thermophilus* menor productor de ácido láctico que el *Lactobacillus bulgaricus*. (Rodríguez et al., 2020)

6.1.2.2 Características generales

Son varias las especies de bacterias que se pueden encontrar en el yogurt pero las más comunes son:

- *Lactobacillus acidophilus* se puede encontrar formando parte de la flora normal de las mucosas corporales. Ésta especie es capaz de vivir en ambientes muy ácidos, hecho que le hace responsable de las etapas finales de la fermentación ya que otros BAL no pueden soportar estas condiciones. Respecto a su metabolismo produce exclusivamente ácido láctico a partir de la lactosa.
- *Lactobacillus bulgaricus* fermenta la leche para producir acetaldehído provocando una bajada del pH que coagula la leche mediante la desnaturalización de sus proteínas y creando así el aroma característico del yogurt. Estas bacterias crecen mejor en ambientes ácidos. Son utilizadas para producir diferentes tipos de yogurt.
- *Streptococcus thermophilus* se encuentran en el aparato gastrointestinal humano y puede soportar altas temperaturas, esta característica es una ventaja para la producción de yogurt puesto que los procesos requieren llevar la leche a altas temperaturas.

Entre la dos especies de bacterias ácido lácticas el *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* se establecen dos tipos de interacciones: protocoperación y anabiosis.

Lactobacillus bulgaricus libera péptidos y aminoácidos, mayormente valina, que sirven para mejorar el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*, y este último mejora el crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* con la formación de ácido fórmico a partir de ácido pirúvico en condiciones anaeróbicas.

Durante el crecimiento combinado de ambas especies el ácido láctico se produce a un ritmo más elevado que por separado. A este proceso le llamamos protocoperación.

La anabiosis se produce en alcanzar ciertos niveles de ácido en el producto donde crecen ambas especies; en ese punto *Streptococcus thermophilus* deja de crecer pero su homóloga, esto es debido a las diferencia de tolerancia al ácido de las dos especies. Para evitar que esto pase se deben de controlar las condiciones de crecimiento de las bacterias en el yogurt y enfriarlo rápidamente una vez se haya formado. (Blog de l'assignatura de Microbiología de la UdG. Curs 2015-2016.)

6.1.3 Cultivos bacterianos en el proceso de yogurt

Cuando exploramos el mundo del yogurt, es importante enfocarnos en el proceso de fermentación láctea, donde la principal materia prima es la leche cruda.

Por lo tanto debemos siempre tomar en cuenta los siguientes factores:

- La leche contiene casi todos los factores de crecimiento necesarios para las bacterias ácido lácticas.
- Solo una leche de alta calidad debe ser utilizada.

- Un excesivo crecimiento de microorganismos contaminantes en la leche antes de la fermentación puede producir metabolitos, los cuales pueden inhibir el adecuado crecimiento de las bacterias lácticas.

El yogurt es una leche fermentada tradicional a la flora esencialmente termófila resultante de dos bacterias ácido lácticas simbióticas: *Streptococcus salivarius spp. thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii spp. bulgaricus*, siendo la temperatura óptima de crecimiento de las mismas de 40 °C a 45 °C.

Bacterias que se usan en liofilizados de inoculación directa en la elaboración de yogurt:

a) *Streptococcus Thermophilus*

- Es la cepa más exigente en factores de crecimiento.
- Es muy sensible a fagos e inhibidores (antibióticos).
- Es auto-limitado por la producción de ácido láctico.
- Determina la textura (polisacáridos extracelulares).

b) *Lactobacillus Bulgaricus*

- Permite la actividad proteásica permitiendo la liberación de péptidos y aminoácidos utilizables por el Estreptococo.
- Es determinante en la segunda fase el crecimiento simbiótico durante la fabricación del yogurt, beneficiándose de los factores estimulantes del crecimiento producidos por el Estreptococo.
- Determina el “sabor propio” al yogurt (producción de acetaldehído).
- Principal cepa involucrada en la post-acidificación. (Mauricio, 2014)

Antes de identificar las bacterias del yogurt en los medios de cultivos, se esterilizó el material necesario en autoclave antes del procedimiento. A continuación se expone una descripción del instrumento.

6.2 ¿Qué es una autoclave y para qué sirve?



Una autoclave es un recipiente metálico de paredes gruesas con cierre hermético que permite trabajar con vapor de agua a alta presión y alta temperatura, que sirve para esterilizar material de laboratorio. La autoclave inactiva todos los virus y bacterias, aunque se ha llegado a saber que algunos microorganismos pueden soportar las temperaturas del mismo. Las autoclaves se utilizan en aplicaciones principalmente de esterilización y en la industria química.

Figura N°4 Autoclave

Muchas autoclaves se usan para esterilizar equipos y suministros sometiéndolos a vapor de agua saturado a alta presión a 120 °C durante alrededor de 15 a 20 minutos dependiendo del tamaño de la carga y el contenido. (Lopez, 2017)

Otro de los estudios realizados fue la identificación de aminoácidos por cromatografía en capa fina.

6.3 ¿Qué es un aminoácido?

Un aminoácido es la unidad fundamental que constituye a las proteínas (la proteína es un polímero y los **aa** son sus monómeros).

Para la mayoría de los seres vivos (como los seres humanos) son 20 aa los que forman a las proteínas, pero existen otros dos aa proteicos en algunos seres vivos (selenocisteína y pirrolisina).

Cada (aa) está formado por un átomo de carbono unido a

- un grupo carboxilo : $O = C - OH$
- un grupo amino: $H - N - H$
- y a un átomo de hidrógeno y un grupo radical (R) que permite identificar a cada aa particular (ya que es distinto para cada caso). (Gatto, 2019)

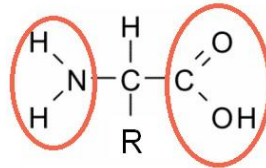


Figura N° 5. Estructura de un aminoácido (aa).

Después de analizar la estructura de un aminoácido, se analiza cómo se forman los enlaces peptídicos entre ellos para obtener péptidos y proteínas.

6.3.1 Enlace peptídicos

Se llama enlace peptídico el enlace químico que se establece entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro aminoácido. Esta clase de enlace, donde se pierde una molécula de agua, permite la formación de los mencionados péptidos y de las proteínas.

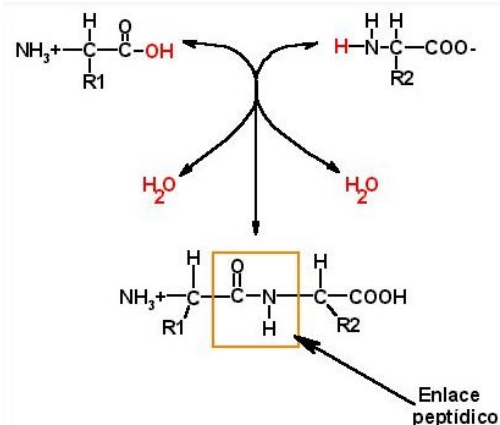


Figura N°6 Enlace peptídico

Al unirse un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo ($-COOH$) con pérdida de una molécula de agua, se establece un enlace $CO-NH$. El desarrollo de este enlace siempre necesita el aporte de energía; a su vez, cuando el enlace peptídico se rompe, se produce la liberación de energía.

La rotura de un enlace peptídico puede producirse a través de la hidrólisis: así se denomina al desdoblamiento que registra una molécula por intermedio del agua. La hidrólisis, en el ámbito natural, se produce de una manera muy lenta, aunque es posible acelerar el proceso haciendo uso de diversas técnicas.

Métodos para acelerar la rotura de un enlace peptídico:

- **Hidrólisis ácida:** se consigue dejando la proteína en una ebullición durante mucho tiempo con soluciones de tipo ácido fuerte (H_2SO_4 y HCl). Este camino consigue la destrucción completa del triptófano y parte de la treonina y la serina.

- **Hidrólisis básica:** por lo general se lleva a cabo haciendo uso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ o NaOH , y no destruye los aminoácidos mencionados en el método anterior.
- **Hidrólisis enzimática:** en los seres vivos, esta forma de degradar los enlaces peptídicos es la más común. En este caso entran en acción unas enzimas proteolíticas que actúan lentamente y muchas veces no completan su trabajo, aunque tampoco se produce la destrucción de los aminoácidos ni la racemización.
- **Hidrólisis por aumento de temperatura:** si las condiciones son normales, los enlaces peptídicos no se destruyen, pero la proteína sí puede desnaturalizarse (es decir que se rompen sus estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria). Por otro lado, si se aplica una temperatura superior a los $110\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas, si es posible destruir los enlaces. (Pérez y Gardey, 2018)

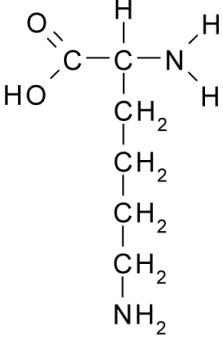
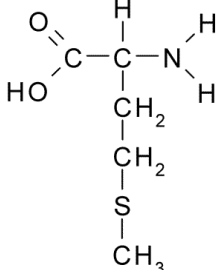
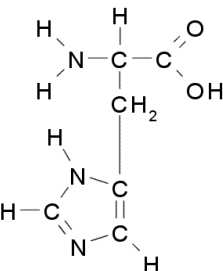
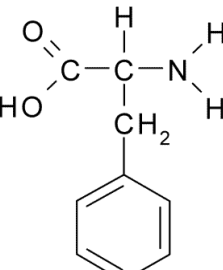
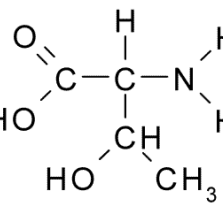
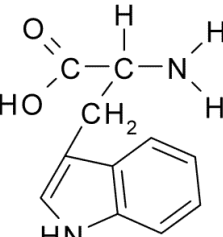
6.3.2 Aminoácidos esenciales y no esenciales

De los 20 aminoácidos que se combinan para formar las proteínas, algunos pueden ser sintetizados por el cuerpo humano, por lo que se denominan no esenciales: **alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, serina y tirosina**. Hay otros, los denominados aminoácidos esenciales o indispensables que, sin embargo, no pueden ser sintetizados por el hombre por lo que tienen que ser aportados por los alimentos, por la dieta, condicionando su esencialidad. Estos son: **histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina**. La **arginina** puede ser esencial para los niños muy pequeños ya que sus requerimientos son mayores que su capacidad para sintetizar este aminoácido. Hay también dos aminoácidos no esenciales que se forman a partir de otros esenciales: **cisteína (y cistina)** a partir de **metionina**, y **tirosina** a partir de **fenilalanina**. Si la dieta no aporta suficiente cantidad de fenilalanina o si el organismo no puede transformar la fenilalanina en tirosina por algún motivo como sucede en la enfermedad hereditaria denominada fenilcetonuria, entonces la tirosina se convierte en esencial. (Carbajal, s.f).

El yogurt contiene los 9 aminoácidos esenciales que el organismo no puede sintetizar por sí mismo. La tabla siguiente detalla la función de cada uno de ellos.

Tabla N°1 Figuras de las estructuras semidesarrolladas de aa

Nombre del AA	Fórmula semidesarrollada	Función
<u>Isoleucina</u>	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad // \\ \text{H}-\text{N}-\text{C}-\text{C} \\ \quad \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{CH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{CH}_3 \end{array} $	Formación de hemoglobina, reparación de tejido muscular, piel y huesos, regula el azúcar en la sangre y los niveles de energía.
<u>Leucina</u>	$ \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ // \quad \quad \\ \text{C}-\text{C}-\text{N} \\ \quad \quad \\ \text{HO} \quad \text{CH}_2 \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{CH} \\ \quad \quad / \quad \backslash \\ \quad \quad \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array} $	Cicatrización de huesos, tejido muscular y piel, producción de la hormona de crecimiento y reduce los niveles de azúcar en sangre.

<p><u>Lisina</u></p>		<p>Colágeno, producción de anticuerpos, correcta absorción de calcio y reduce los niveles altos de triglicéridos.</p>
<p><u>Metionina</u></p>		<p>Antioxidante, previene la acumulación de grasa en el hígado y arterias.</p>
<p><u>Histidina</u></p>		<p>Producción de glóbulos rojos y blancos de la sangre, para el mantenimiento de las vainas de mielina, para el crecimiento y reparación de tejidos.</p>
<p><u>Fenilalanina</u></p>		<p>Promueve el estado de alerta por producir noradrenalina, que transmite señales entre las células nerviosas de nuestro cerebro.</p>
<p><u>Treonina</u></p>		<p>Prevenir la acumulación de grasas, formación de elastina, el esmalte de los dientes y colágeno.</p>
<p><u>Triptófano</u></p>		<p>Relajante natural, reduce el apetito y aumenta la liberación de hormonas de crecimiento.</p>

<u>Valina</u>	$ \begin{array}{c} \text{O} & & \text{H} & & \text{H} \\ \parallel & & & & \\ \text{C} & - & \text{C} & - & \text{N} \\ / & & & & / \quad \backslash \\ \text{HO} & & \text{CH} & & \text{H} \\ & & / \quad \backslash & & \\ & & \text{H}_3\text{C} & & \text{CH}_3 \end{array} $	Reparación de tejidos, el mantenimiento del equilibrio de nitrógeno en el cuerpo y el metabolismo muscular. El tejido muscular lo utiliza como energía.
---------------	--	---

(Blog de García, 2016)

6.3.3 Las proteínas

Todos los tejidos vivos contienen proteínas. Se distinguen químicamente de los lípidos y de los glúcidos por contener nitrógeno. Son polímeros de aminoácidos (hay 20 distintos) unidos por enlaces peptídicos. Una proteína puede contener varios cientos o miles de aminoácidos y la disposición o secuencia de estos aminoácidos determina la estructura y la función de las diferentes proteínas. Algunas son estructurales (como el colágeno del tejido conectivo o la queratina que se encuentra en pelo y uñas), otras son enzimas, hormonas, etc. Las proteínas son el constituyente principal de las células y son necesarias para el crecimiento, la reparación y la continua renovación de los tejidos corporales y esto determina su continua necesidad. Por ejemplo, el tejido epitelial del intestino es reemplazado cada tres o cuatro días. También proporcionan energía (4 kcal/g) pero, por razones fisiológicas y económicas, es poco recomendable utilizarlas para este fin. Sin embargo, si en la dieta no hay suficiente cantidad de grasas o glúcidos, la proteína se usará para proporcionar energía. Esto es lo que ocurre, por ejemplo, en la inanición. (Carbajal, s.f).

6.3.4 Proteínas de los lácteos

El contenido proteico de los lácteos varía dependiendo del tipo de lácteo que se considere. La leche contiene entre 3 y 4 % de proteínas, y esta fracción proteica se distribuye entre caseínas (78 % del nitrógeno de la leche) y proteínas del lactosuero o seroproteínas (17 % del nitrógeno de la leche), presentando un 5 % de nitrógeno no proteico (5 %).

Hay varios tipos de caseínas (α , κ , β y γ -caseínas), que se agrupan en micelas. La caseína tiene gran interés tecnológico por su capacidad de coagular, lo que permite obtener quesos y otros productos. En cuanto a las proteínas del suero, se trata de proteínas solubles, principalmente α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina sérica, proteosomas-peptonas, inmunoglobulinas, además de metaloproteínas como lactoferrina, transferrina o ceruloplasmina, y enzimas, como lipasas, proteasas y fosfatasas.

Las proteínas de los lácteos son de un elevado valor biológico. Si se compara el perfil de la proteína láctea con el de la proteína patrón (que considera las necesidades de aminoácidos esenciales de niños de uno a tres años), se observa que la proteína láctea tiene todos los aminoácidos esenciales en cantidad superior al patrón.

Destaca el elevado contenido en aminoácidos de cadena ramificada (**leucina, isoleucina y valina**). Estos aminoácidos, además de intervenir en la síntesis proteica, son sustratos para la gluconeogénesis y estimulan la síntesis proteica y de proteína muscular. Además, el elevado contenido en lisina hace que estas proteínas puedan complementar las de otros alimentos, como ocurre cuando se combinan con los cereales o legumbres, aumentando el valor biológico de la proteína total ingerida.

La caseína favorece la absorción del calcio, ya que forma con este mineral casein-fosfopéptidos, que son complejos solubles y fácilmente absorbibles.

En los últimos años se ha despertado gran interés por determinados péptidos bioactivos presentes en la leche de vaca, cabra y oveja, ya que además de su interés nutricional han mostrado presentar propiedades inmunomoduladores, antimicrobianas, antihipertensivas y antitrombóticas. Estos péptidos pueden producirse durante la digestión normal de la caseína en el tracto gastrointestinal, en la fermentación microbiana de la leche, o mediante hidrólisis por enzimas proteolíticas.

Por otro lado, la lactoferrina aunque se encuentra en pequeñas cantidades en la leche, tiene gran importancia, ya que interviene en la homeostasis del hierro y puede tener propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras y antiinflamatorias.

En las leches fermentadas se incorporan sólidos lácteos por lo que el contenido en proteínas suele ser mayor que en la leche, y además son de alta digestibilidad, debido por una parte a que en el proceso de elaboración del producto las bacterias actúan sobre las proteínas liberando péptidos y aminoácidos, y por otro a la coagulación de la caseína en finas partículas por el descenso del pH, lo que facilita la acción de las enzimas intestinales. (Moreno et al., 2013).

Para identificar cualitativamente los aminoácidos se puede utilizar la cromatografía, que es una técnica analítica que permite separar los componentes que integran una mezcla, de forma rápida y sencilla.

6.4 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son: un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas.

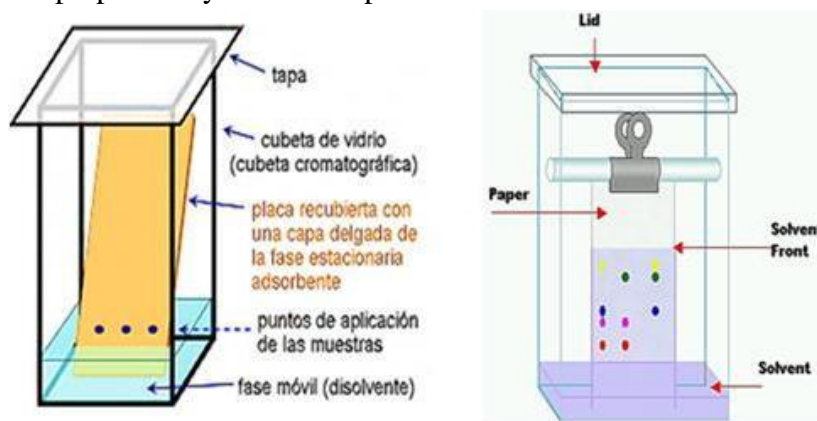


Figura N° 8 Realización de cromatografía en capa fina

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

Polaridad de los compuestos orgánicos en orden creciente:

hidrocarburos < olefinas < flúor < cloro < nitro < aldehído

aldehído < éster < alcohol < cetonas < aminas < ácidos < amidas

Al realizar la elección del adsorbente se debe tener en cuenta el tamaño de las partículas del adsorbente, cuanto más finamente dividido esté mayor será su adhesión al soporte, aunque también se le puede añadir un adherente (yeso,...). Algunos de los adsorbentes más utilizados son: Celulosa, Almidón, Azúcares, Gel de sílice (silicagel), Óxido de aluminio (alúmina), Carbón activo (carbón en polvo), Kieselguhr. El adsorbente se pasa por agua destilada. Se agita de modo mecánico. La proporción de adsorbente y agua depende del tipo de adsorbente. Dos partes de agua y una de adsorbente pueden tomarse como norma general, no obstante, habrán de consultarse las instrucciones del fabricante. Originariamente se utilizaban, como soporte del adsorbente, láminas de vidrio, pero en la actualidad

también se utilizan láminas de otros compuestos orgánicos más flexibles. Dependiendo del tipo de separación que se desee (cualitativa o preparativa) se utilizará un tamaño de placa u otro. En general para realizar una separación preparativa de un gramo de muestra es necesario una placa de vidrio de 20 x 20 cm, 35 g de adsorbente y 80 mL de agua destilada.

Las propiedades de la fase estacionaria pueden alterarse mediante la adición de compuestos tales como soluciones tamponadoras para mantener el pH deseado. En la preparación de las placas también se pueden adicionar indicadores fluorescentes o aglomerantes. Cabe destacar la adición de nitrato de plata (AgNO_3), a este proceso se le denomina argentación, y se utiliza para separar componentes insaturados.

El desarrollo de los cromatogramas en capa fina se realiza normalmente por el método ascendente, esto es, al permitir que un eluyente ascienda por una placa casi en vertical, por la acción de la capilaridad. La cromatografía se realiza en una cubeta. Para conseguir la máxima saturación posible de la atmósfera de la cámara, las paredes se tapizan con papel impregnado del eluyente. A veces pueden obtenerse separaciones mejores sin poner papeles en las paredes, cosa que no debe olvidarse. Generalmente el eluyente se introduce en la cámara una hora antes del desarrollo, para permitir la saturación de la atmósfera. El tiempo de desarrollo, por lo general, no llega a los 30 minutos. El tiempo de una cromatografía cualitativa suele ser de un par de minutos, mientras que el tiempo de una cromatografía preparativa puede llegar a un par de horas. Las placas pueden desarrollarse durante un tiempo prefijado, o hasta que se alcance una línea dibujada a una distancia fija desde el origen. Esto se hace para estandarizar los valores de *RF*. Frecuentemente esta distancia es de 10 cm; parece ser la más conveniente para medir valores de *RF*.

Después del desarrollo, las placas pueden secarse rápidamente con una corriente de aire caliente. La mejor posición de desarrollo para un componente es el punto medio entre el origen y el frente del eluyente, ya que permite separar las impurezas que se desplazan con mayor y menor velocidad. El frente del eluyente nunca debe llegar a tocar el borde de la placa. Si la placa se estropea por acción del aire o de la luz, se secará en una cámara que contenga un gas inerte o aislada de la luz. (Textos científicos.com, 2007).

Para el revelado se utiliza la reacción de la ninhidrina que es un reactivo específico para identificar a los aminoácidos.

6.4.1 Reacción de la Ninhidrina

La ninhidrina es un poderoso oxidante que reacciona con el grupo amino de aminoácidos y proteínas a través de una descarboxilación oxidativa en presencia de calor.

La ninhidrina se reduce a hidridantina al reaccionar con el aminoácido, que es convertido en aldehído, amoníaco y dióxido de carbono. La hidridantina reacciona con el amoníaco liberado y otra molécula de ninhidrina, generando un complejo púrpura/violeta.

Con el aminoácido prolina genera un complejo amarillo característico que sirve de ensayo específico para este aminoácido. (Blog de Quimicafacil.net, 2019)

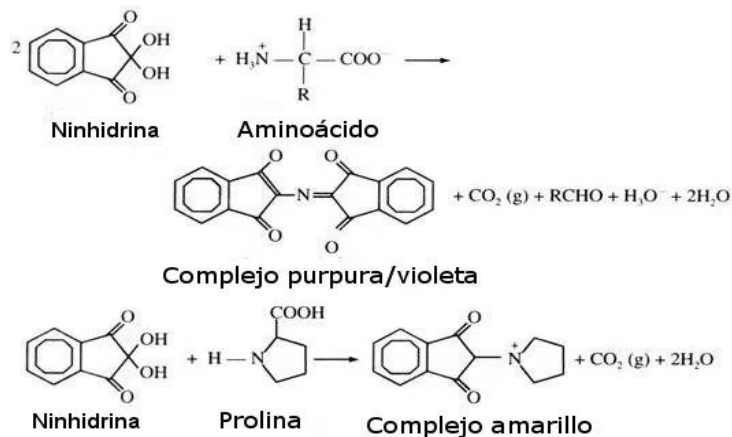


Figura N° 9 Ensayo de ninhidrina

Por último se estudió la lactosa, y se cuantificó de manera indirecta por espectrofotometría utilizando el reactivo de Fehling.

6.5 Algunos glúcidos presentes en los lácteos

El principal glúcido (también llamado hidrato de carbono) de la leche es la lactosa, y proporciona más de la cuarta parte de la energía de la leche si se trata de leche entera, llegando a superar el 50 % cuando se trata de desnatada. La lactosa es un disacárido exclusivo de la leche, compuesto de glucosa y galactosa, con un débil sabor dulce, sensible al calor y que es fermentable por algunas bacterias, aspecto aprovechado para la fabricación de quesos y yogures.

La lactosa favorece la absorción del calcio. Aunque el mecanismo no está completamente establecido, parece ser por un aumento de la permeabilidad intestinal, lo que facilita la absorción mediante difusión pasiva. Este efecto positivo de la lactosa es especialmente importante cuando otros mecanismos de absorción del calcio están comprometidos, por ejemplo en el déficit de vitamina D.

Algunos individuos no son capaces de digerir la lactosa por carecer sus células intestinales del enzima que la hidroliza, la lactasa, o por disminución de su actividad; la hidrólisis ocurre en un medio acuoso, este rompe el enlace glicosídico por la adición de una molécula de agua, dando lugar a los monosacáridos que la componen (galactosa y glucosa). La acumulación de la lactosa provoca un aumento de la osmolaridad, lo que conduce a diarreas y otros trastornos digestivos.

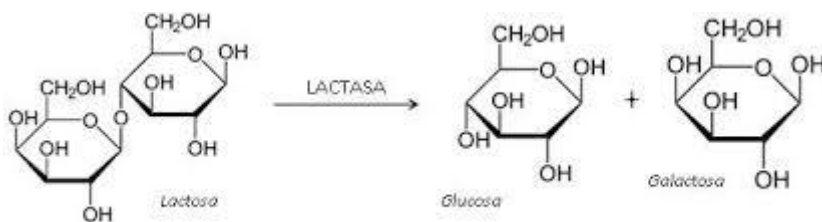


Figura N° 10 Hidrólisis enzimática de la lactosa

En estos casos, se puede sustituir la leche por productos lácteos que contienen menores cantidades de glúcidos. Por ejemplo quesos, ya que en su elaboración gran parte de la lactosa se pierde en los procesos de desuerado y maduración. Los productos fermentados frescos, como el yogur, pueden tener un contenido final de lactosa similar o inferior al de la leche de partida, ya que aunque se añaden sólidos lácteos con lactosa en su elaboración, una parte de la misma es transformada en ácido láctico. A pesar de esto, las leches fermentadas son mejor toleradas que la leche, ya que las enzimas bacterianas

contribuyen a la hidrólisis de la lactosa en el intestino. Además, hoy en día hay disponibles en el mercado leches de consumo con reducido contenido en lactosa.

La leche también contiene otros glúcidos en muy pequeñas cantidades como glucosa, galactosa, fructosa, y N-acetilglucosamina, que contribuyen al desarrollo de la microbiota intestinal en el recién nacido, aunque en menor proporción que la leche materna. (Moreno et al., 2013)

6.5.1 Intolerancia a la lactosa

La digestión defectuosa de la lactosa es la intolerancia a los glúcidos más común. Esta situación se debe a la deficiencia de lactasa, una enzima que se encuentra en el intestino delgado, que desdobra a la lactosa en glucosa y galactosa. Cuando esta enzima falla se produce la intolerancia a la lactosa, que no es otra cosa que su mala digestión y malabsorción.

La producción insuficiente de lactasa puede aparecer en tres situaciones distintas:

- Por un lado, existe el déficit primario congénito de lactasa, en el que de una forma heredada existe la ausencia absoluta de lactasa desde los primeros días de vida.
- Por otro lado, existe el déficit secundario de lactasa, que ocurre cuando a consecuencia de una enfermedad intestinal se pierde temporalmente la capacidad de producir lactasa.
- Sin embargo, la causa más frecuente es el déficit primario adquirido de lactasa, en el que la lactasa se expresa correctamente desde el nacimiento, pero a partir de la infancia se produce una disminución de la actividad de la lactasa.

El déficit primario adquirido es muy frecuente, ya que se presenta en uno de cada tres adultos. En estos casos, la pérdida de la capacidad de producir lactasa intestinal justifica la aparición de síntomas de intolerancia con la toma de leche o lácteos.

Síntomas:

Se debe sospechar este cuadro cuando tras la ingestión de leche se presentan síntomas tales como dolor abdominal, distensión abdominal, gases y/o diarrea. Es un problema que afecta a una extensa población a nivel mundial, pero sin ser una entidad de gravedad para la salud.

La gente que tiene problemas para digerir la lactosa aprende, probando, cuales son los productos lácteos y en qué cantidad puede tomarlos sin presentar molestias y los que se debe evitar. Muchos podrán disfrutar de los productos lácteos en pequeñas cantidades o junto con otros tipos de alimentos.

La gravedad de los síntomas varía dependiendo de la cantidad de lactosa ingerida y de la tolerancia individual. Hay pacientes que con cantidades pequeñas de lactosa (de 5 a 12 g, contenidos en 100 a 250 mL de leche) pueden presentar síntomas.

Los síntomas pueden variar según la cantidad o frecuencia de lactosa ingerida. Aparecen lentamente, entre 30 minutos y 2 horas tras la ingestión, pudiendo no asociarse a alimentos ingeridos varias horas antes o de manera regular.

Según la cantidad diaria de gramos de lactosa tolerada sin aparición de síntomas, se pueden clasificar en sensibilidad alta (de 1 a 4 g), media (de 5 a 8 g), o baja (de 9 a 12 g). La lactosa podrá tolerarse mejor, incluso en dosis mayores si se distribuye a lo largo del día o se consume junto a otros nutrientes.

Tratamiento:

El tratamiento consiste en la reducción de la ingesta de lactosa hasta cantidades que no provoquen síntomas, dependiendo del grado de intolerancia a la lactosa de cada persona. Esta medida puede complementarse con otras, como la toma de lactasa exógena (comprimidos) o la toma de lácteos modificados sin lactosa.

No suele ser necesaria la exclusión completa de la lactosa, puesto que la mayoría de pacientes con malabsorción de lactosa pueden tolerar hasta 10 g de lactosa en una toma.

En la dieta baja en lactosa hay que contemplar el consumo oculto de lactosa, por ejemplo, por la toma de medicamentos. Uno de cada cinco medicamentos contiene lactosa en su excipiente por lo que las personas polimedicadas podrían tener problemas de tolerancia. (Moreno, 2020)

La siguiente figura muestra los alimentos lácteos en función de la cantidad de lactosa que contienen:

Contenido de lactosa / 100 g alimentos		
Bajo contenido (0-2 g)	Medio (2-5 g)	Alto (> 5 g)
Margarina, mantequilla	Yogurt	Nata
Quesos: azul, emmental, manchego, parmesano, gouda, cheddar, camembert, brie, gruyere, mozzarella	Queso blanco, porciones, de untar Petit suisse	Leche vaca, oveja (Entera / desnatada / semidesnatada)
Leche baja en lactosa	Crema, flan, natillas Leche de cabra	Bechamel Helados de leche Leche en polvo Leche condensada Chocolate con leche

Figura N° 11 Contenido de lactosa en alimentos lácteos

La Organización Mundial de Gastroenterología, resume el pensamiento actual sobre las recomendaciones para las diferentes indicaciones en particular y se basan en niveles de evidencia graduada.

Malabsorción de la lactosa:

Las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* mejoran la digestión de la lactosa y reducen los síntomas relacionados con su intolerancia. Esto se confirmó en una serie de estudios controlados con individuos que consumen yogurt con cultivos vivos.

El yogurt con cultivos vivos de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* tienen que contener por lo menos 10^8 UFC de cada cepa por gramo de producto. Según dice el “Dictamen científico sobre la justificación de las declaraciones de propiedades saludables relacionadas con los cultivos de yogurt vivo y la digestión mejorada de la lactosa (ID 1143, 2976) de conformidad con el artículo 13, apartado 1, del Reglamento (CE) no 1924/2006”. (Guía mundial de la WGO, 2017)

Para poder determinar la lactosa por espectrofotometría se utilizó el reactivo de Fehling, el cual su acción se fundamenta en el poder reductor de los azúcares.

6.5.2 Reactivo de Fehling

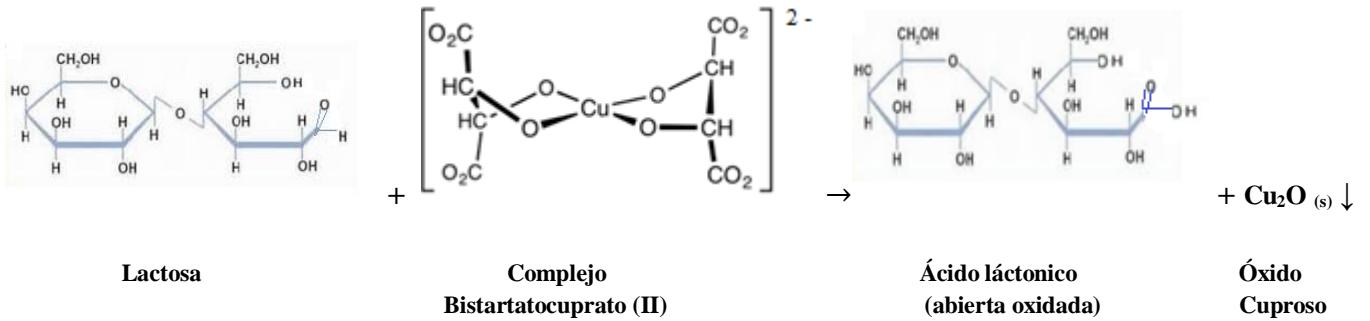
El reactivo de Fehling, también conocido como Licor de Fehling, es una solución descubierta por el químico alemán Hermann von Fehling y que se utiliza como reactivo para la determinación de azúcares reductores. Sirve para demostrar la presencia de glucosa, así como para detectar derivados de ésta, tales como la sacarosa o la fructosa.

El licor de Fehling consiste en dos soluciones acuosas:

- Solución A- Sulfato de cobre cristalizado 35 g y agua destilada hasta 1000 mL.
- Solución B- Sal de Seignette o Tartrato mixto de potasio y sodio 150 g, solución de hidróxido de sodio al 40 % 3 g y agua hasta 1000 mL.

Ambas se guardan separadas hasta el momento de su uso, para evitar la precipitación del hidróxido de cobre. El ensayo con el licor de Fehling se fundamenta en el poder reductor del grupo carbonilo de los aldehídos. Éste se oxida a ácido, y reduce la sal de cobre en medio alcalino a óxido de cobre (I), formando un precipitado de color rojo.

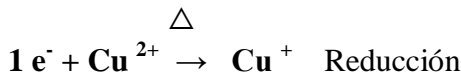
Ecuación química:



Al calentar el sistema se produce una reacción redox:

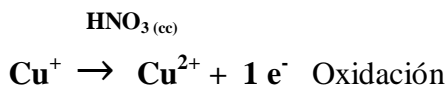
La lactosa se oxida a ácido láctónico y el complejo bistartatocuprato (II) se reduce a óxido cuproso. El precipitado que se forma de óxido cuproso es de color rojo ladrillo.

- Ecuación:



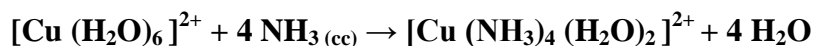
Al precipitado de óxido cuproso (Cu_2O) se le agregó HNO_3 (cc) hasta disolución total, obteniéndose nuevamente el Cu^{2+} (ion cúprico). El ácido nítrico actúa como oxidante.

- Ecuación:



Luego se agregó NH_3 (cc) en exceso obteniéndose una gama de complejos, siendo el más abundante en las condiciones de trabajo el complejo diacuatetraminocobre (II) $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (color azul violeta). El complejo absorbe en una longitud de onda de 620 nm.

Ecuación química:



Por lo tanto la relación es de 1:1, donde la cantidad química del complejo diacuatetraminocobre (II) es igual a la cantidad química de lactosa

$$n [\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} = n \text{ Lactosa}$$

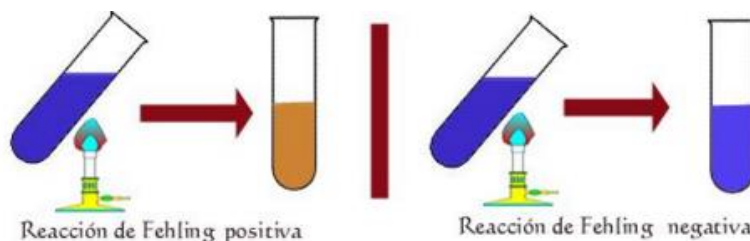
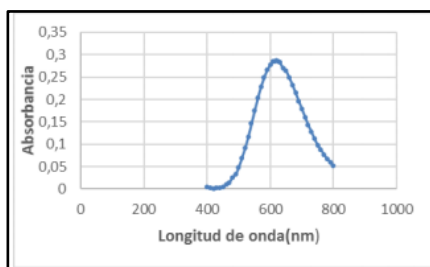


Figura N° 12 Reacción de Fehling

Un aspecto importante de esta reacción es que la forma aldehído puede detectarse fácilmente aunque exista en muy pequeña cantidad. Si un azúcar reduce el licor de Fehling a óxido de cobre (I) de color rojo, se dice que es un azúcar reductor. Esta reacción se produce en medio alcalino fuerte, por lo que algunos compuestos no reductores como la fructosa que contiene un grupo cetona, puede enolizarse a la forma aldehído dando lugar a un falso positivo. Al reaccionar con monosacáridos se torna verdoso, y si lo hace con disacáridos toma el color del ladrillo. (de Jaime y de Jaime 2010)

Para la determinación indirecta de la cantidad de lactosa se puede utilizar el método espectrofotométrico. En la siguiente figura se puede observar en la gráfica, la máxima sensibilidad para el complejo de diacuotetraminocobre (II) que tiene una longitud de onda de 620 nm.



Gráfica N° 1 Máxima sensibilidad para el complejo de diacuotetraminocobre (II) con una longitud de onda 620 nm

6.5.3 Espectrofotómetro

Es un instrumento que tiene la capacidad de proyectar un haz de luz monocromática (de un largo de onda particular) a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra.

Funciones:

- 1) Brinda información sobre la naturaleza de la sustancia en la muestra. Esto se puede lograr midiendo la absorbancia (A) a distintos largos de onda (λ) y graficar estos valores en función del largo de onda, formando un espectrograma. Como cada sustancia tiene unas propiedades espectrales únicas, distintas sustancias producen distintos espectrogramas. Esto se debe a que cada sustancia tiene un arreglo de átomos tridimensional particular que hace que cada sustancia tenga características únicas. Al ser expuestos a la luz del espectrofotómetro, algunos electrones de los átomos que forman las moléculas absorben energía entrando a un estado alterado. Al recuperar su estado original, la energía absorbida es emitida en forma de fotones. Esa emisión de fotones es distinta para cada sustancia, generando un patrón particular, que varía con el largo de onda usado. Dependiendo del largo de onda, será la cantidad de energía absorbida por una sustancia, lo que logra generar un espectro particular al graficar (A).
- 2) Dice cuánta cantidad de la sustancia de interés está presente en la muestra. La concentración es proporcional a la absorbancia, según la Ley Beer-Lambert: a mayor cantidad de moléculas presentes en la muestra, mayor será la cantidad de energía absorbida por sus electrones.
 - $A = K C L$
 - A: absorbancia
 - K: coeficiente de extinción molar
 - C: concentración
 - L: distancia que viaja la luz a través de la muestra (normalmente es de 1 cm).

La cubeta promedio, que guarda la muestra, tiene dimensiones internas de un centímetro (L). La ecuación describe una línea recta, donde el origen es cero. Si L es constante 1,0 cm y se conoce el valor de K, podemos calcular C en base a Abs:

- $A / K L = C$

El espectrofotómetro mide la absorbancia de una muestra en los espectros de luz ultravioleta y visible 200 a 850 nm. El largo de onda es determinado por un prisma que descompone el rayo de luz de acuerdo al largo de onda escogido. Luego la luz pasa por una hendidura que determina la intensidad del haz. Este haz atraviesa la muestra y llega a un tubo fotográfico, donde es medido. La cantidad de luz que atraviesa la muestra es el porcentaje (%) de transmitancia. Se puede usar esta unidad o cambiarla a absorbancia usando la siguiente ecuación:

- $\%T = - \text{Log } A$

El espectrofotómetro puede dar ambos valores a la misma vez, ahorrando la necesidad de hacer los cálculos. (Transmitancia = cantidad de luz que atraviesa la mezcla). Una característica del instrumento es la necesidad de "blanquear" el aparato antes de cada lectura. Esto se hace colocando una cubeta con una solución control que tenga todos los componentes de la reacción menos la sustancia que va a ser medida en el instrumento y ajustando la lectura a cero absorbancia. El propósito de esto es eliminar el registro de absorbancia (background) que puedan presentar los demás componentes de la reacción a ese largo de onda particular. Todas las moléculas presentan absorbancia porque todas interfieren con el paso de la luz. Sólo que la absorbancia será óptima a un largo de onda de luz específico para cada tipo de sustancia. (Grau, 1982)

Para evitar la pérdida de óxido de cobre (I) se utiliza el método de separación por centrifugación.

6.5.4 Centrifuga

La centrífuga es un equipo de laboratorio que genera movimientos de rotación, tiene el objetivo de separar los componentes que constituyen un sistema. Hoy en día existe una diversidad de centrífugas que tiene diferentes objetivos, independientemente del tipo de investigación o industria.

Por lo general, la centrífuga es utilizada en los laboratorios como proceso de separación de la sedimentación de los componentes líquidos y sólidos. Hay diferente tipos de centrífugas, como centrífugas de baja velocidad, centrífugas para micro hematocritos, y ultracentrífugas, este último tipo generalmente se utiliza para la separación de las proteínas. (Fernández, 2015)

6.6 Antecedentes

En la investigación que llevaron a cabo Medina y Lozano (s.f.), los resultados que obtuvieron por cromatografía en capa fina, con la reacción de ninhidrina para la identificación de los aminoácidos presentes en las muestras de yogurt, se pueden observar en la siguiente tabla y figura.

Tabla N°2 Aminoácidos presentes en el yogurt

Nombre de aa	Color presente	Nombre de aa	Color presente
1. Tirosina (Y)	Violeta	10. Treonina (T)	Violeta
2. Lisina (K)	Rojo	11. Triptófano (W)	Violeta
3. Isoleucina (I)	Rojo	12. Ácido aspártico (D)	Naranja
4. Alanina (A)	Rojo	13. Arginina (R)	Café
5. Serina (S)	Rojo	14. Histidina (H)	Naranja
6. Metionina (M)	Naranja	15. Ácido glutámico (E)	Rojo
7. Prolina (P)	Naranja	16. Valina (V)	Rojo
8. Glicina (G)	Violeta	17. Muestra en base	Rojo
9. Fenilalanina (F)	Rojo	18. Muestra en ácido	Naranja

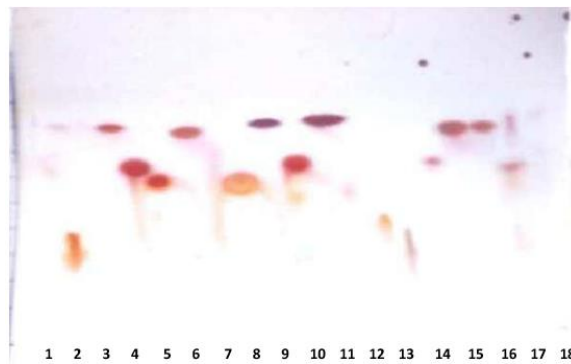


Figura N° 13 Placa cromatográfica con patrones de aminoácidos y muestras problema.

7. MATERIALES, SUSTANCIAS Y/O SOLUCIONES

7.1 Esterilizado de material de vidrio por autoclave:

Material:

- Autoclave, cinta adhesiva, materiales a utilizar en el método de diluciones, papel Kraft.

Soluciones:

- Agua destilada.

7.2 Método de diluciones y recuento en placas

Material:

- Balanza analítica, caja de Petri, celda de espectrofotómetro, espátula, espectrofotómetro, gradilla, incubadora, matraz Erlenmeyer, mechero de alcohol, papel secante, pipeta graduada de 1 mL, piseta, tubos de ensayo, vaso de Bohemia.

Soluciones:

- Agar
- agua destilada
- TSB

7.3 Identificación de aminoácidos por Cromatografía en capa fina

Material:

- Acetato de celulosa, balanza, cámara cromatográfica, capilares, frasco, horno, pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL, papel, placa cromatográfica, plancha de calentamiento, recipientes plásticos, tubo capilar, vaso de precipitado de 50 mL.

Soluciones:

- Acetona (C_3H_6O)
- Ácido acético ($C_2H_4O_2$)
- Ácido clorhídrico 6 mol/L (HCl)
- Agua (H_2O)
- Butanol ($C_4H_{10}O$)
- Hidróxido de sodio 6 mol/L (NaOH)
- Etanol al 70 % (EtOH)
- Ninhidrina ($C_9H_6O_4$)
- Patrón de cada uno de los aminoácidos:
 - Glicina ($C_2H_5NO_2$)
 - L- ácido glutámico ($C_5H_9NO_4$)
 - L- alanina ($C_3H_7NO_2$)
 - L- fhenilalanina ($C_9H_{11}NO_2$)

- L- histidina ($C_6H_9N_3O_2$)
- L- methionine ($C_5H_{11}NO_2S$)
- Ácido aspártico ($C_4H_7NO_4$)
- Glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$)

7.4 Determinación de lactosa por espectrofotometría

Material:

- Balanza analítica, baño de agua hirviendo, baño de hielo, bureta de 10 mL, centrífuga, cubetas de vidrio de 1 cm, espectrofotómetro, matraces aforados de 25, 50 y 250 mL, pipeta graduada de 5 mL, tubos de centrifuga, vaso de bohemia de 50 mL.

Sustancias y/o soluciones

- Ácido nítrico concentrado (HNO_3)
- Amoníaco concentrado (NH_3)
- Lactosa anhidra ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
- Soluciones de Fehling A y B

8. TÉCNICA

8.1 Plan de muestreo

- Se seleccionaron dos muestras de yogures descremados sin adición de azúcares, el día 20 de octubre de 2020, de las marcas CLALDY de 780 mL y Vital+ de Conaprole 1 kg, de un supermercado de la zona (DEVOTO) de la ciudad de Pando.
- La elección fue al azar, verificando la fecha de vencimiento y que el envase se encontrara en perfectas condiciones.
- El traslado se realizó en una conservadora, hasta el lugar donde fue estudiado.

8.2 Esterilizado de material de vidrio por autoclave:

Procedimiento:

- 1) Inicialmente se forró el material de vidrio con papel Kraft.
- 2) Posteriormente se colocó agua destilada en la autoclave verificando que el agua esté por encima de la resistencia.
- 3) Luego se colocó la rejilla y la base para los materiales a esterilizar.
- 4) Se colocó el material a esterilizar dentro de la autoclave.
- 5) Finalmente se cerró la autoclave y se inició su funcionamiento.

8.3 Método de diluciones y recuento en placas

Procedimiento de dilución para cada muestra y recuento de UFC (unidades formadoras de colonias)

- 1) Inicialmente se esterilizó el campo de trabajo con alcohol 70 % y se colocaron 2 mecheros de alcohol en cada extremo del campo.
- 2) Se preparó el caldo de cultivo, primero se midió 7,5 g de Agar y 7,5 g de TSB, obteniendo una masa total de 15,0 g, luego se enrasó con agua destilada en un matraz de 250 mL.
- 3) Posteriormente se preparó el inoculante en un vaso de Bohemia con 1 g de muestra y 9 mL de agua destilada.
- 4) Se rotularon los tubos de ensayo.
- 5) Posteriormente se colocó 9 mL de agua destilada en 8 tubos de ensayo.
- 6) Se adicionó 1 mL de inoculante al primer tubo de ensayo.
- 7) Posteriormente se tomó 1 mL del primer tubo y se realizaron diluciones en serie con el resto de los tubos, tomando 1 mL de la solución anterior.
- 8) Se vertió en cuatro cajas de Petri el caldo de cultivo y se colocaron las cuatro últimas diluciones.

- 9) Posteriormente se colocó en incubadora a 40 °C durante 7 días.
- 10) Finalmente se contaron las colonias en cada caja de Petri.

8.4 Identificación de aminoácidos por Cromatografía en capa fina

Procedimiento para cada muestra

- 1) Inicialmente se preparó la fase móvil en un vaso de precipitado de 50 mL (ácido acético, butanol, acetona y agua en proporciones 7:7:0,15:9,2 respectivamente).
- 2) Posteriormente se tapó el vaso de precipitado con papel vinipel para no permitir que escaparan vapores.
- 3) Luego se agregó la fase móvil en la cámara cromatográfica y se tapó inmediatamente para que no se escaparan vapores y también para que la cámara alcanzara la saturación necesaria.
 - Para la hidrólisis
- 4) Se tomó 6 g de muestra, luego se dividió por la mitad para hacer las respectivas hidrólisis, una mitad con 2 mL HCl 6 mol/L y la otra mitad 2 mL NaOH 6 mol/L.
- 5) Posteriormente, se dejó calentando a 100 °C por 12 horas.
- 6) A continuación se agregó 2,5 mL de etanol al 70 % a cada una de las muestras y se dejó en reposo por 15 minutos.
- 7) Paralelamente, y utilizando la placa cromatográfica y un tubo capilar se comenzó a realizar la siembra con cada uno de los patrones de cada aminoácido, y adicionalmente con patrones de la muestra hidrolizada en medio básico y la hidrolizada en medio ácido.
- 8) Los puntos de siembra se colocaron a 1 cm del inicio de la placa cromatográfica.
- 9) Posteriormente, se colocó la placa cromatográfica de acetato de celulosa en la cámara cromatográfica previamente saturada y se empezó a dejar correr la fase móvil en la fase estacionaria. Esto se dejó durante 1 hora y 15 minutos, momento en el cual la fase móvil estaba a punto de finalizar el corrimiento dentro de la placa cromatográfica.
- 10) Posteriormente, se retiró la placa cromatográfica de la cámara, y se dejó secar para luego agregarle el revelador de ninhidrina.
- 11) Finalmente, se colocó la placa cromatográfica en la estufa a una temperatura de 80 °C, y se dejó dentro por 8 minutos (para observar las manchas obtenidas).

8.5 Determinación de lactosa por espectrofotometría

- Procedimiento:

- Preparación del patrón de Lactosa:

- 1) Se disolvieron 125 mg de lactosa (medidos por diferencia de masas) en agua destilada en un matraz aforado de 50 mL. Se obtuvo así un patrón de lactosa de 2500 ppm.

- Preparación de la muestra:

- 1) Se midió una masa de 1,5 g de yogurt (con balanza analítica) en un matraz aforado de 50,0 mL
- 2) Se llevó a aforo con agua destilada.

- Determinación espectrofotométrica:

- 1) Se llenó una bureta de 10 mL con la solución patrón de lactosa y se transfirieron los siguientes volúmenes de la misma a una serie de tubos de centrífuga:

	Blanco	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm
Patrón (mL)	0	0,5	1,0	1,5	2,0

- 1) Se preparó además otro tubo con 1 mL de solución de la muestra.
- 2) Se agregó agua destilada a cada tubo de manera de alcanzar aproximadamente los 2 mL de líquido en cada uno.
- 3) Por otra parte, se preparó 20 mL de reactivo de Fehling mezclando partes iguales de solución A y B.

- 4) Se agregó a cada tubo 2 mL de reactivo y se colocó en un baño de agua hirviendo por cinco minutos.
- 5) Se centrifugó los tubos a 2500 rpm por cinco minutos.
- 6) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de cada tubo en agua destilada.
- 7) Se verificó que el volumen de líquido fuera aproximadamente el mismo en cada tubo y se centrifugó nuevamente a 2500 rpm por cinco minutos.
- 8) Se descartó el sobrenadante.
- 9) Se colocó los tubos en una gradilla y se agregó a cada uno dos gotas de ácido nítrico concentrado, de manera que se disuelva el precipitado.
- 10) Se diluyó con agua destilada y se transfirió cuantitativamente el contenido de cada tubo a una serie de matraces aforados de 25 mL.
- 11) Se agregó a cada uno 2 mL de amoníaco concentrado y se enrasó con agua destilada.
- 12) Se midió la absorbancia de las soluciones de cada matraz a 620 nm contra la solución correspondiente al blanco. Se cuidó que la superficie de la cubeta estuviera perfectamente limpia antes de realizar las mediciones.
- 13) Se graficó en un diagrama de dispersión la concentración de lactosa contra la absorbancia y se determinó la ecuación de la recta de mejor ajuste a los puntos mediante el método de mínimos cuadrados.
- 14) Para determinar la concentración de lactosa en cada dilución se utilizó el volumen de solución patrón transferido a cada tubo de centrifuga, en un volumen final de 25 mL.
- 15) A partir de la absorbancia obtenida para el matraz de la muestra interpolar en la ecuación anterior para obtener su concentración (expresada como ppm de lactosa), y a partir de ella calcular la masa de lactosa en el yogurt.

9. RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

9.1 Recuento de UFC

Tabla N°3 Cuantificación de UFC en los yogures CLALDY y Vital+ de Conaprole

Muestra CLALDY	Muestra Vital+ de Conaprole
$10^{-5} = 4,5 \times 10^6$ UFC	$10^{-5} = 0,0142 \times 10^9$ UFC
$10^{-6} =$ Sin cuantificar	$10^{-6} = 0,115 \times 10^9$ UFC
$10^{-7} =$ Sin cuantificar	$10^{-7} =$ Sin cuantificar
$10^{-8} = 8,6 \times 10^9$ UFC	$10^{-8} =$ Sin cuantificar

9.2 Identificación de aminoácidos en muestras de yogurt por cromatografía en capa fina

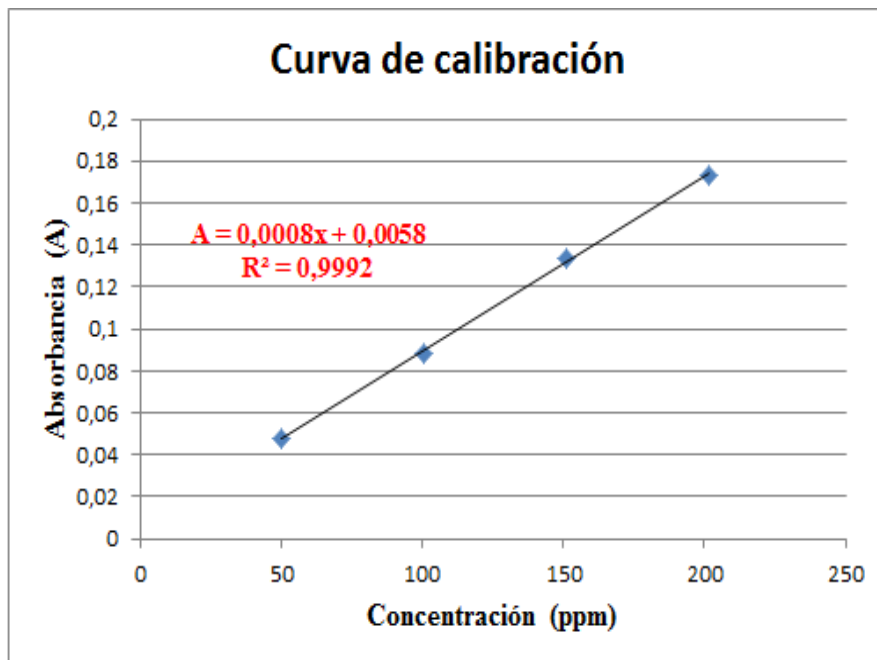
Tabla N°4 Identificación de aminoácidos de los yogures comerciales por cromatografía

Nombre de aa	Color presente
1. L- Alanina (ALA)	Magenta
2. Fenilalanina (PHE)	Magenta
3. Glicina (GLI)	Magenta
4. Glutamina (GLN)	Magenta
5. L- Histidina (HIS)	Magenta
6. L- Ácido glutámico (GLU)	Magenta
7. Metionina (MET)	Magenta
8. Ácido aspártico (ASP)	Magenta
9. Muestra ácida :	
Claldy	Magenta
Vital+ de Conaprole	Magenta
10. Muestra básica:	
Claldy	Magenta
Vital+ de Conaprole	Magenta

9.3 Determinación de lactosa por espectrofotometría

Tabla N° 5 Determinación de lactosa por espectrofotometría

Solución (mL)	Concentración (ppm)	Absorbancia (A)
0	0	0,0046
0,5	50,36	0,0478
1,0	100,72	0,0888
1,5	151,08	0,1340
2,0	201,44	0,1728



Gráfica N° 2 Absorbancia vs Concentración

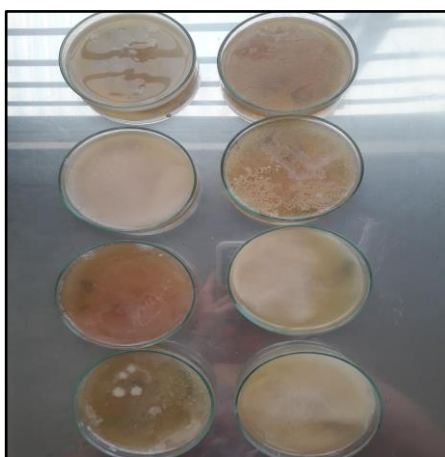
Resultado

Tabla N°6 Contenido de lactosa en 100 g de yogurt

CLALDY	(3,08 ± 0,04) g
Vital + de Conaprole	(2,46 ± 0,02) g

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Foto N° 1 Crecimiento de colonias de bacteria en el cultivo



El conteo de microorganismos viables en placa se determinó mediante la disolución de 1 mL de muestra en 9 mL de agua destilada, y se realizaron ocho diluciones decimales por cada muestra, de las cuales fueron transferidas las cuatro últimas a cajas de Petri, que contenían el medio de cultivo 1:1 de agar y TSB para siembra en superficie. Las cajas fueron incubadas a 40 °C y se observaron a las 96 horas. Se tuvo en cuenta únicamente las cajas de Petri en las que se contabilizaron entre 30 y 300 colonias. El número de colonias fue multiplicado por el inverso de la dilución para obtener la cantidad de UFC/mL. Los resultados obtenidos en la muestra de yogurt marca CLALDY fueron los siguientes: para la concentración de 10^{-5} mL se contabilizaron 45 colonias ($4,5 \times 10^6$) UFC/mL, en 10^{-6} y 10^{-7} , no se pudieron cuantificar debido a un

crecimiento masivo por un exceso de muestra, en 10^{-8} = 86 colonias ($8,6 \times 10^9$) UFC/mL; en la muestra de Vital+ de Conaprole para la concentración 10^{-5} mL = 142 colonias ($0,0142 \times 10^9$) UFC/mL, en 10^{-6} = 115 colonias ($0,115 \times 10^9$) UFC/mL y en 10^{-7} y 10^{-8} no se pudieron cuantificar la cantidad de colonias. Se contabilizó en el yogurt CLALDY menos cantidad de colonias en la muestra más concentrada (10^{-5} mL = 45 UFC), y más cantidad de colonias en la muestra menos concentrada (10^{-8} mL = 86 UFC); es lógico pensar que, si mayor es la dilución menor es la concentración de la muestra y la cantidad de colonias presentes son menores. En la muestra Vital+ de Conaprole no se pudieron cuantificar las diluciones menos concentradas y en

las de mayor concentración los resultados si fueron justificados, dado que a mayor concentración, menor es la cantidad de colonias presentes. En conclusión, para obtener resultados más certeros, las muestras de yogurt utilizadas en la siembra deberán ser de menor cantidad que la empleada en la técnica.

Foto N°2 Hidrólisis ácida



Foto N°3 Hidrólisis básica



De acuerdo a los datos obtenidos en la Tabla N°1, se lograron identificar (ALA), (PHE), (GLI), (GLN), (HIS), (GLU), (MET) y (ASP) algunos de los aminoácidos presentes en los yogures, como se pueden observar en la Foto N° 3, las muestras hidrolizadas en medio básico (NaOH 6 mol/L) y en la Foto N° 2 las hidrolizadas en medio ácido (HCl 6 mol/L). Se identificó cualitativamente por cromatografía en capa fina, realizando anteriormente una hidrólisis. Se acondicionó la cámara cromatográfica, preparando la fase móvil 7:7:0,15:9,2 (acético, butanol, acetona y agua). La hidrólisis química, que fue realizada durante 12 horas en un baño de agua a 90 °C, con el fin de romper los enlaces peptídicos de la proteína y así separar cada aminoácido; posteriormente se agregó al mismo EtOH 70 %, y se extrajo con un tubo capilar del sobrenadante, para la realización de la siembra en la placa cromatográfica, en la cual también se sembraron los patrones de aminoácidos. Para el revelado se utilizó la reacción de la ninhidrina que es específica para determinar aminoácidos; la misma cuando reacciona con el grupo amino de los aminoácidos cambia su color inicial de incoloro a magenta, por lo cual de esta forma se pudo comparar las muestras de las hidrólisis con las siembras de los patrones. Se hizo un estudio comparativo de color y altura en las dos hidrólisis; se observó que las dos presentan el mismo color (magenta) y que están alineadas a la misma altura. También se pudo observar que en la hidrólisis básica (Foto N° 3), las manchas están con menos forma definida y acentuadas que en la hidrólisis ácida (Foto N°2), dado que, ésta última su función es la destrucción completa del triptófano, parte de la treonina y la serina, de los cuales estos tres aminoácidos no se identificaron porque no se contaban con los patrones. Para finalizar, se puede concluir que las muestras de yogures contienen todos los aminoácidos analizados, y que la técnica utilizada es sencilla y rápida para realizar la identificación de los mismos.

Foto N° 4 Soluciones y patrones para la cuantificación de lactosa en el yogurt



El contenido de lactosa en muestras de yogures descremados y sin adición de azúcar, se cuantificó con el reactivo de Fehling de manera indirecta con el método espectrofotométrico. A causa de que la solución de lactosa es de color incolora, el reactivo de Fehling aporta el complejo bistartratocuprato (II). El reactivo se utiliza para la determinación de azúcares reductores y también sirve para demostrar la presencia de glucosa, y se preparó 1:1 (solución A y solución B). En tubos de centrifuga por separados se agregaron las muestras y los patrones de diferentes concentraciones (0 / 0,5 / 1,0 / 1,5 y 2,0) ppm, a los mismos se adicionó 2 mL del reactivo y se llevó a baño de agua por

10 minutos aproximados; luego se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos, y se descartó el sobrenadante

(contenido de lactosa y reactivo de Fehling), posteriormente se agregó agua destilada y se volvió a centrifugar por el mismo tiempo. Se descartó nuevamente el sobrenadante y se observó un precipitado de color rojo ladrillo (formación de óxido cuproso), debido que, al calentar el sistema a baño de agua pasó por diferentes etapas, en la que se produjo una reacción redox: la lactosa se oxidó a ácido láctico y el complejo bistartratocuprato (II) se redujo a óxido cuproso. Luego se descartó el sobrenadante por segunda vez (agua destilada, posibles restos de reactivo y ácido láctico), los tubos de centrífuga se llevaron a campana donde allí se adicionaron a cada uno dos gotas de HNO_3 (cc), hasta su disolución total, obteniéndose una oxidación para nuevamente obtener el Cu^{2+} (ion cúprico), los mismos se trasvasaron a matraces aforados de 25 mL, en los que se agregaron 2 mL de NH_3 (cc) y se enrasaron con agua destilada, donde se formaron una gama de complejos, siendo el más abundante en las condiciones de trabajo el complejo diacuotetraminocobre (II) de color azul-violeta, el mismo tiene una longitud de onda de 620 nm (máxima sensibilidad). Posteriormente se midió la absorbancia realizando 5 réplicas de cada muestra en una longitud de onda de 580 nm. La longitud de onda que se eligió no es la máxima sensibilidad que tiene el complejo, sin embargo está dentro de la curva y la diferencia es solo de 40 nm, en las cuales no hay diferencia significativa en los resultados. Los resultados se obtuvieron mediante una curva de calibración (Absorbancia vs Concentración), aplicando la ley de Beer, donde establece que, la concentración de una solución química es directamente proporcional a su absorción de luz. Por lo tanto podemos decir que la cantidad química del complejo diacuotetraminocobre (II) es igual a la cantidad química de lactosa inicial. Los contenidos fueron los siguientes, CLALDY ($3,08 \pm 0,04$) g y Vital+ de Conaprole ($2,46 \pm 0,02$) g para 100 g de yogurt. De acuerdo con el Dr. Moreno (especialista en gastroenterología): *“No suele ser necesaria la exclusión completa de la lactosa, puesto que la mayoría de pacientes con malabsorción de lactosa pueden tolerar hasta 10 g de lactosa en una toma”*. En resumen, se concluye que los yogures estudiados en una porción de 200 g contienen de lactosa para CLALDY 6,16 gramos y Vital+ de Conaprole 4,92 g, siendo estos dos valores menores a lo que la mayoría de los pacientes con malabsorción de lactosa pudieran tolerar por día, como bien afirma el Dr. Moreno. Por otro lado, como también se puede comparar con la figura N° 11, el contenido (expresado en gramos de lactosa en 100 g de alimento), coincide con el valor referenciado de la tabla de la categoría medio 2 a 5 g.

11. PERSPECTIVAS

Algunos de los otros posibles estudios que se le pueden realizar al yogurt son:

- ❖ Estudio de la lactosa que contiene el yogurt elaborado con leche descremada de cabra.
- ❖ Estudio de cinética de reacción de las propiedades fisicoquímicas y de la aceptabilidad sensorial (pH, acidez titulable, sólidos totales y grasa).
- ❖ Estudio cuantitativo de aminoácidos presentes.
- ❖ Identificación de las especies de bacterias presentes.
- ❖ Presencia de mohos y levaduras.
- ❖ Estudio comparativo de los aminoácidos presentes en yogurt elaborado con leche de cabra y un yogurt elaborado con leche bovina.

12. BIBLIOGRAFÍA

12.1 Marco teórico y antecedentes

- Asensio, A. Capel, J. Cuadrado, J. García, J. Oña. J (2020). 2.5.5.4.2. Fermentación. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 de <https://www.biologiasur.org/index.php/139-apuntes-de-biologia/celula-eucariotica-iii/309-2-5-5-4-2-fermentacion#:~:text=Fermentaci%C3%B3n%20%20%20%20mol%C3%A9culas%20de%20glucosa.>
- Carbajal, A. Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. (s.f). “Manual de Nutrición y Dietética”. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-cap-5-proteinas.pdf>
- Colaboradores de Wikipedia. (2020, 4 septiembre). *Lactobacillus bulgaricus*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 https://es.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_bulgaricus
- de Jaime, J. y de Jaime, L. (2010). “Reactivo de Fehling”. Epónimos Científicos. Universidad Cardenal Herrera-CEU (Moncada, Valencia). Recuperado el 03 de noviembre de 2020 de <https://blog.uchceu.es/eponimos-cientificos/wp-content/uploads/sites/24/2011/10/epo-FEHLING.pdf>
- Determinación de aminoácidos por Cromatografía en capa fina*. Recuperado el 20 de agosto de 2020 de https://www.academia.edu/25230385/SEPARACION_DE_AMINOACIDOS CONTENIDOS EN UNA MUESTRA DE YOGURT POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA
- Fernández, N. (2015, 22 marzo). *Centrífuga de Laboratorio*. TP - Laboratorio Químico. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 en <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/centrifuga-de-laboratorio.html>
- Gatto, A. (2019). ¿Qué son los aminoácidos? ¿Qué propiedades presentan?: Aminoácidos. Recuperado el 13 Noviembre 2020, de: <http://aulas.uruguayeduca.edu.uy/mod/book/view.php?id=76894>
- Grau, C. (1982). Espectrofotómetro - EcuRed. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 en <https://www.ecured.cu/Espectrofot%C3%B3metro>
- Guarner et al., (2017). “Probióticos y prebióticos”. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. Recuperado el 08 de noviembre de 2020 de <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2017.pdf>
- López, L. (2017, 26 agosto). *Autoclave de Laboratorio*. TP - Laboratorio Químico. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 en <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/autoclave-de-laboratorio.html>
- Mauricio. (2014). “Cultivos bacterianos en el proceso del yogurt”. Publireportaje: Solvesa Ecuador S.A. Recuperado el 03 de noviembre de 2020 de https://issuu.com/mauriciocuaspud/docs/cultivos_bacterianos_en_el_proceso
- Microbiología 2015-2016. “Las bacterias del yogurt”. (2016). Ana Muñoz, Elia Ventura, Ana Jiménez, Marta Pardo, Meritxell Moreno. [Mensaje de un blog]. Recuperado el 25 de agosto de 2020 de <http://microbiologiaudg1516.blogspot.com/2016/03/las-bacterias-del-yogur.html>
- Moreno, F. (2020). “Intolerancia a la lactosa”. Doctor especialista en Gastroenterología. Colon Clínica y maternidad. Recuperado el 08 de noviembre de 2020 de <http://www.clinicrldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2017.pdf>
- Moreno, L., Cervera, P., Ortega, R., Díaz, J., Baladía, E., Basulto, J. Bel, S., Iglesia, I., López, A., Manera, M., Rodríguez, E., Santaliestra, A., Babio, N., y Salas, J. (2013). “Evidencia científica sobre el

papel del yogur y otras leches fermentadas en la alimentación saludable de la población española". Recuperado el 25 de agosto de 2020 de <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v28n6/38originalfuncionales01.pdf>

Pérez, J. y Gardey, A. (2018). "Definición de enlace peptídico". Recuperado el 07 de noviembre de 2020 de <https://definicion.de/enlace-peptidico/>

Quimicafacil.net. (2019). "Análisis cualitativo de proteínas". [Mensaje de un blog]. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 de <https://quimicafacil.net/manual-de-laboratorio/analisis-cualitativo-de-proteinas/>

Rodríguez, A. Ramírez, D., Uresti, S. y Grande, M. (2020). *Productos lácteos*. slideshare. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 en <https://es.slideshare.net/dayanarmzlucero/productos-lacteos-32476722>

Textos científicos.com. "Elaboración del Yogur". (2007). Lázaro Mendoza. [Mensaje de un blog]. Recuperado el 25 de agosto de 2020 de <https://www.textoscienfificos.com/alimentos/yogur>

Textos científicos. (2007). "Cromatografía en capa fina". Recuperado el 26 de agosto de 2020 de <https://www.textoscienfificos.com/quimica/cromatografia/capa-fina>

Vitaliv. "Los 9 aminoácidos esenciales". (2016). Lucía García. [Mensaje de un blog]. Recuperado el 25 de agosto de 2020 de <https://vitaliv.app/amoniacidos-esenciales/>

12.2 Figuras

- Figura N° 1. Fermentación láctica. Acuña, S. (2020). Fermentación. [Ilustración]. BiologíaSur. Recuperado el 10 de noviembre de 2020 en <https://www.biologiasur.org/index.php/139-apuntes-de-biologia/celula-eucariotica-iii/309-2-5-5-4-2-fermentacion>
- Figura N° 2. *Streptococcus thermophilus*. Hernández, M. (2016). [Fotografía]. prebioticosyprobioticos.com. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 en <https://prebioticosyprobioticos.com/microorganismos-probioticos/streptococcus-termophilus/>
- Figura N° 3. *Lactobacillus bulgaricus*. Suarez, J. (2018). [Ilustración]. Phytocode. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 en <http://phytocode.net/phytoglossary/lactobacillus-bulgaricus/>
- Figura N° 4. Autoclave. Smith, N. (2009). All-American eléctrico Esterilizadores [Fotografía]. Amazon. Recuperado el 10 de noviembre de 2020 en <https://www.amazon.com/-/es/50X-120V-All-American-el%C3%A9ctrico-Esterilizadores/dp/B00284BJQA>
- Figura N° 5. Estructura de un aminoácido (aa). Recuperado el 27 de agosto de 2020 de http://aulas.uruguayeduca.edu.uy/pluginfile.php/239734/mod_book/chapter/21039/Aminoacido1.jpg
- Figura N° 6. Enlace peptídico. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 de <https://www.drosophila.es/wp-content/uploads/2014/02/enlacepeptidico.png>
- Tabla N° 1. (Figuras N°7) estructuras semidesarrolladas de aminoácidos. Recuperado el 24 de agosto de 2020 de <http://aulas.uruguayeduca.edu.uy/mod/book/view.php?id=76894&chapterid=21046>
- Figura N° 8. Realización de cromatografía en capa fina. Pereira, F. (2015). [Ilustración]. DOCPLAYER. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 en <https://docplayer.es/92920925-Universidad-nacional-autonoma-de-nicaragua-unan-leon-facultad-de-ciencias-quimicas-carrera-de-farmacia.html>
- Figura N° 9. Ensayo de ninhidrina Cátedra de Farmacognosia. PROTEÍNAS, PÉPTIDOS Y AMINOÁCIDOS [Ilustración]. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/wp-content/uploads/2017/03/TP3-PROTE% C3% 8DNAS-PEP-AA-2017.pdf>
- Figura N° 10. Estructura de la lactosa. Larrosa, M. (2019). Galactosemia [Ilustración]. La enciclopedia libre. Recuperado el 07 de noviembre de 2020 en <https://es.wikipedia.org/wiki/Galactosemia>
- Figura N° 11. Contenido de lactosa en alimentos lácteos. Recuperado el 08 de noviembre de 2020 de https://2.bp.blogspot.com/-442JXG6dn0g/W7n6P0AkVfi/AAAAAAAAAJTU/UGhs-HYny_MsgymtSWQLyN3CIerS_15qACLcBGAs/s640/Alimentos-contenido%2Blactosa-intolerancia.png

- Figura N° 12. Reacción de Fehling Jaime, J. (2010). REACTIVO DE FEHLING [Ilustración]. Epónimos Científicos. Recuperado el 10 de noviembre de 2020 en <https://blog.uchceu.es/eponimos-cientificos/wp-content/uploads/sites/24/2011/10/epo-FEHLING.pdf>
- Figura N° 13. Placa cromatográfica con patrones de aminoácidos y muestras problema. Recuperado el 20 de agosto de 2020 de <https://www.academia.edu/25230385/SEPARACION%20DE%20AMINOACIDOS%20CONTENIDOS%20EN%20UNA%20MUESTRA%20DE%20YOGURT%20POR%20CROMATOGRAFIA%20EN%20CAPA%20FINA>

12.3 Tablas

- Tabla N° 1. estructuras semidesarrolladas de aminoácidos. Recuperado el 24 de agosto de 2020 de <http://aulas.uruguayeduca.edu.uy/mod/book/view.php?id=76894&chapterid=21046>
- Tabla N° 2. Aminoácidos presentes en el yogurt Recuperado el 20 de agosto de 2020 de <https://www.academia.edu/25230385/SEPARACION%20DE%20AMINOACIDOS%20CONTENIDOS%20EN%20UNA%20MUESTRA%20DE%20YOGURT%20POR%20CROMATOGRAFIA%20EN%20CAPA%20FINA>
- Tabla N° 3. cuantificación de UFC en los yogures CLALDY y Vital+
- Tabla N° 4. Identificación de aminoácidos de los yogures comerciales por cromatografía
- Tabla N° 5. Determinación de lactosa por espectrofotometría
- Tabla N° 6. Contenido de lactosa en 100 g de yogurt
- Tabla N° 7. Fichas de medida de seguridad
- Tabla N° 8. Datos de masa para la determinación de lactosa
- Tabla N° 9. Resultados de las réplicas de patrones y promedio de absorbancia
- Tabla N° 10. Resultados de las réplicas de absorbancia CLALDY
- Tabla N° 11. Resultados de las réplicas de absorbancia Vital+ de Conaprole
- Tabla N° 12. Estadística

12.4 Gráficas

- Gráfica N° 1. Máxima sensibilidad para el complejo de diacuatetraminocobre (II) con una longitud de onda 620 nm. Toledo, A. Egli, W. Seré, P. Pary, P. Bengoa, L. Química [Gráfico]. Jornadas de jóvenes investigadores. Recuperado el 12 de noviembre de 2020 en https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/13275/21-qumica-toledo-ayelen-unlp.pdf
- Gráfica N° 2. Absorbancia vs Concentración

12.5 Fotos

- Foto N° 1. Crecimiento de colonias de bacteria en el cultivo
- Foto N° 2. Hidrólisis ácida
- Foto N° 3. Hidrólisis básica
- Foto N° 4. Soluciones y patrones para la cuantificación de lactosa en el yogurt
- Foto N° 5. Envase de yogurt CLALDY
- Foto N° 6. Información Nutricional de yogurt CLALDY
- Foto N° 7. Envase de yogurt CLALDY
- Foto N° 8. Información Nutricional de yogurt Vital+ de Conaprole

12.6 Metodología y Antecedentes

- Determinación de aminoácidos por Cromatografía en capa fina. Recuperado el 20 de agosto de 2020 de https://www.academia.edu/25230385/SEPARACION_DE_AMINOACIDOS CONTENIDOS EN UNA MUESTRA DE YOGURT POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA
- Determinación de Lactosa. Recuperado el 24 de agosto de 2020 de http://aulas.uruguayeduca.edu.uy/pluginfile.php/299030/mod_resource/content/3/GI%20Acidos%20reductores%20totales%20en%20miel.pdf
- Perez, P. (2018). MÉTODO DE LAS DILUCIONES Y RECuento EN PLACA. SliderPlayer. Recuperado el 20 de octubre de 2020 de <https://slideplayer.es/slide/14666725/>

12.7 Fichas de medidas de seguridad

- *Aceite de inmersión*. Recuperado el 27 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-104699?Origin=PDP
- *Acetona*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-100014?Origin=PDP
- *Ácido acético*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-100062?Origin=PDP
- *Ácido clorhídrico*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-110164?Origin=PDP
- *Ácido Nítrico concentrado*. Recuperado el 25 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-101799?Origin=PDP
- *Ácido Sulfúrico concentrado*. Recuperado el 28 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-112080?Origin=PDP
- *Agua destilada*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de file:///C:/Users/Usuario/Desktop/146654_SDS_CO_ES.PDF
- *Alcohol Butanol*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-109630?Origin=PDP
- *Alcohol Etanol*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-107017?Origin=PDP
- *Alcohol Etilico*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de <https://www.ecosmep.com/cabecera/upload/fichas/9175.pdf>
- *Amoníaco concentrado*. Recuperado el 25 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-105423?Origin=PDP
- *Cloruro de bario dihidratado*. Recuperado el 28 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-101719?Origin=PDP
- *Glicina*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de file:///C:/Users/Usuario10/Downloads/104201_SDS_ES_ES.PDF
- *Hidróxido de sodio*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-106462?Origin=PDP
- *L-leucina*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-105360?Origin=PDP
- *L-ácido glutámico*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-100291?Origin=PDP
- *L-methionina*. Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-105707?Origin=PDP


- *L- histidina.* Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-104351?Origin=PDP
- *L- fhenilanina.* Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-107256?Origin=PDP
- *L- alanina.* Recuperado el 26 de agosto de 2020 de file:///C:/Users/Usuario/Desktop/101007_SDS_ES_ES.PDF
- *Ninhidrina.* Recuperado el 26 de agosto de 2020 de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Ninhydrin,MDA_CHEM-106762?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
- *Reactivo de Fehling (A).* Recuperado el 25 de agosto de 2020 de https://www.javeriana.edu.co/documents/4486808/5015300/FEHLING+SOLUCION+A_LABBOX.pdf
- *Reactivo de Fehling (B).* Recuperado el 25 de agosto de 2020 de https://www.javeriana.edu.co/documents/4486808/5015300/FEHLING+SOLUCION+B_LABBOX.pdf/75bba0d7-46e2-4947-ae57-d4288b44d5f1?version=1.0



13. ANEXOS

13.1 Fichas de medidas de seguridad


Tabla N°7 Fichas de medida de seguridad





<u>Sustancia y/o soluciones</u>	<u>Concentración</u>	<u>Pictograma</u>	<u>Frases H</u>	<u>Frases P</u>
Aceite de inmersión			<ul style="list-style-type: none"> ° Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos 	<ul style="list-style-type: none"> ° Evitar su liberación al medio ambiente.
Acetona (C₃H₆O)		 	<ul style="list-style-type: none"> ° Líquido y vapores muy inflamables. ° Provoca irritación ocular grave. ° Puede provocar somnolencia o vértigo. ° La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel. 	<ul style="list-style-type: none"> ° Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. ° EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. ° Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente cerrado herméticamente.


<p>Ácido Nítrico (HNO₃)</p>	<p>69 %</p>		<ul style="list-style-type: none"> ° Puede agravar un incendio; comburente. ° Puede ser corrosivo para los metales. ° Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. ° Tóxico en caso de inhalación. ° Corrosivo para las vías respiratorias. 	<ul style="list-style-type: none"> ° Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección. <p>Intervención:</p> <ul style="list-style-type: none"> ° EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagar la boca. NO provocar el vómito. ° EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. ° EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. ° EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.
--	--------------------	--	--	--


<p>Ácido sulfúrico (H₂SO₄)</p>	<p>98 %</p>		<ul style="list-style-type: none"> ° Puede ser corrosivo para los metales. ° Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. 	<ul style="list-style-type: none"> ° Llevar guantes/ prendas/ lentes/ máscara de protección. ° EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagarse la boca. NO provocar el vómito. ° EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. ° EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.
<p>Amoniaco (NH₃)</p>	<p>28 - 30 %</p>		<ul style="list-style-type: none"> ° Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. ° Puede irritar las vías respiratorias. ° Muy tóxico para los organismos acuáticos. 	<ul style="list-style-type: none"> ° Evitar su liberación al medio ambiente. ° Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección. ° EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagar la boca. NO provocar el vómito. ° EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua


				<p>cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.</p> <p>° EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.</p>
--	--	--	--	--

<p>Ácido acético (C₂H₄O₂)</p>	<p>96 %</p>		<ul style="list-style-type: none"> ◦ Líquidos y vapores inflamables. ◦ Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Mantener alejado de fuentes de calor. ◦ Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección. ◦ EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagar la boca. NO provocar el vómito. ◦ EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. ◦ EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.
---	-------------	--	---	--


<p>Ácido clorhídrico (HCl)</p>	<p>6 N</p>	 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Puede ser corrosivo para los metales. ◦ Provoca irritación cutánea. ◦ Provoca irritación ocular grave. ◦ Puede irritar las vías respiratorias. 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. ◦ EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.
<p>Agar agar</p>		 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Puede provocar una reacción alérgica en la piel. ◦ Se sospecha que provoca defectos genéticos. 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. ◦ EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

<p>Agua destilada (H₂O)</p>			<p>No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008</p>	
<p>Alcohol Butanol (C₄H₁₀O)</p>			<ul style="list-style-type: none"> ° Líquidos y vapores inflamables. ° Provoca irritación ocular grave. ° Puede causar irritación respiratoria, y somnolencia o mareos. 	<ul style="list-style-type: none"> ° Mantener alejado de fuentes de calor. ° EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. ° EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

<p>Alcohol Etanol (C₂H₅OH)</p>	<p>70 %</p>		<ul style="list-style-type: none"> ° Líquido y vapores muy inflamables. ° Provoca irritación ocular grave. 	<ul style="list-style-type: none"> ° Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. ° Conectar a tierra/enlace equipotencial del recipiente y del equipo de recepción. ° EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. ° Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente cerrado herméticamente.
--	-------------	--	--	---

<p>Alcohol etílico (C₂H₆O)</p>	<p>95 %</p>		<ul style="list-style-type: none"> ° Provoca irritación ocular grave ° Líquido y vapores muy inflamables 	<ul style="list-style-type: none"> ° Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. ° Mantener el recipiente herméticamente cerrado. ° Lavarse concienzudamente tras la manipulación ° Llevar guantes/prendas/lentes/máscara de protección ° EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado ° En caso de incendio: Utilizar extintor de polvo ABC para la extinción. ° Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco
--	--------------------	--	--	--



			<ul style="list-style-type: none"> ° Eliminar el contenido/el recipiente de acuerdo con la normativa sobre residuos peligrosos o envases y residuos de envases respectivamente
<p>Glicina (C₂H₅NO₂)</p>	<p>° Esta sustancia no es clasificada como siendo peligrosa según la legislación de la Unión Europea.</p>		<ul style="list-style-type: none"> ° Tras inhalación: aire fresco. ° En caso de contacto con la piel: Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse. ° Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua. Retirar las lentillas. Tras ingestión: hacer beber agua (máximo 2 vasos), en caso de malestar consultar al médico.


<p>Hidróxido de sodio (NaOH)</p> <p>-----</p> <p>Perla</p>			<ul style="list-style-type: none"> ° Puede ser corrosivo para los metales. ° Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. 	<ul style="list-style-type: none"> ° Llevar guantes/prendas/ gafas/máscara de protección. ° EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagarse la boca. NO provocar el vómito. ° EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. ° EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.
<p>L- ácido glutámico (C₅H₉NO₄)</p>			<ul style="list-style-type: none"> ° Esta sustancia no es clasificada como peligrosa según la legislación de la Unión Europea. 	<ul style="list-style-type: none"> ° Tras inhalación: aire fresco. ° En caso de contacto con la piel: Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse. ° Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua. Retirar las lentillas. Tras ingestión: hacer beber agua (máximo

		2 vasos), en caso de malestar consultar al médico.
L- metionina (C ₅ H ₁₁ NO ₂ S)	° Esta sustancia no es clasificada como siendo peligrosa según la legislación de la Unión Europea.	<p>° Tras inhalación: aire fresco.</p> <p>° En caso de contacto con la piel: Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse.</p> <p>° Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua. Retirar las lentillas. Tras ingestión: hacer beber agua (máximo 2 vasos), en caso de malestar consultar al médico.</p>
Glutamina (C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃)	° Esta sustancia no es clasificada como siendo peligrosa según la legislación de la Unión Europea.	<p>° Tras inhalación: aire fresco.</p> <p>° En caso de contacto con la piel: Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse.</p> <p>° Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua. Retirar las lentillas. Tras ingestión: hacer</p>

		<p>beber agua (máximo 2 vasos), en caso de malestar consultar al médico.</p>
<p>Ácido aspártico (C₄H₇NO₄)</p>	<p>° Esta sustancia no es clasificada como siendo peligrosa según la legislación de la Unión Europea.</p>	<p>° Tras inhalación: aire fresco.</p> <p>° En caso de contacto con la piel: Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse.</p> <p>° Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua. Retirar las lentillas. Tras ingestión: hacer beber agua (máximo 2 vasos), en caso de malestar consultar al médico.</p>

<p>L- histidina (C₆H₉N₃O₂)</p>	<p>° Esta sustancia no es clasificada como siendo peligrosa según la legislación de la Unión Europea.</p>	<p>° Tras inhalación: aire fresco.</p> <p>° En caso de contacto con la piel: Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse.</p> <p>° Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua. Retirar las lentillas. Tras ingestión: hacer beber agua (máximo 2 vasos), en caso de malestar consultar al médico.</p>
<p>L- fenilalanina (C₉H₁₁NO₂)</p>	<p>° Esta sustancia no es clasificada como siendo peligrosa según la legislación de la Unión Europea.</p>	<p>° Tras inhalación: aire fresco.</p> <p>° En caso de contacto con la piel: Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse.</p> <p>° Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua. Retirar las lentillas. Tras ingestión: hacer beber agua (máximo 2 vasos), en caso de malestar consultar al médico.</p>

<p>L- alanina (C₃H₇NO₂)</p>	<p>° Esta sustancia no es clasificada como siendo peligrosa según la legislación de la Unión Europea.</p>	<p>° Tras inhalación: aire fresco.</p> <p>° En caso de contacto con la piel: Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse.</p> <p>° Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua. Retirar las lentillas. Tras ingestión: hacer beber agua (máximo 2 vasos), en caso de malestar consultar al médico.</p>		
<p>Ninhidrina (C₉H₆O₄)</p>			<p>° Nocivo en caso de ingestión.</p> <p>° Provoca irritación cutánea.</p> <p>° Provoca irritación ocular grave.</p>	<p>° EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.</p> <p>° EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.</p>
<p>Reactivo de Fehling (A)</p>			<p>° Provoca irritación ocular grave. ° Provoca irritación cutánea. ° Tóxico para los</p>	<p>° Impida que se libere al medio ambiente.</p> <p>° Recoger la</p>

			<p>organismos acuáticos.</p> <p>° Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.</p>	<p>sustancia derramada.</p> <p>° Elimínense esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida de eliminación residuos especiales o peligrosos, conforme a la reglamentación local, regional, nacional y/o internacional.</p> <p>Contiene : Cobre (II) sulfato pentahidratado - Ácido sulfúrico</p>
Reactivo de Fehling (B)			<p>° Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.</p> <p>° Provoca lesiones oculares graves.</p>	<p>° Llevar guantes, prendas, gafas y máscara de protección. ° No respirar el polvo, el humo, el gas, la niebla, los vapores o el aerosol.</p> <p>° EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuáguese la boca. NO provoque el vómito.</p> <p>° EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.</p> <p>° EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quítese</p>

			<p>inmediatamente las prendas contaminadas. Aclárese la piel con agua o dúchese.</p> <p>° Elimínense esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida de eliminación residuos especiales o peligrosos, conforme a la reglamentación local, regional, nacional y/o internacional. Contiene : Hidróxido de sodio</p>
TSB	<p>° Esta mezcla no está clasificada como peligrosa según la legislación de la Unión Europea.</p>	<p>° Tras inhalación: aire fresco.</p> <p>° En caso de contacto con la piel: Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse.</p> <p>° Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua. Retirar las lentillas. Tras ingestión: hacer beber agua (máximo 2 vasos), en caso de malestar consultar al médico.</p>	

13.2 Cálculos

13.2.1 Recuento de bacterias ácido lácticas en cajas de Petri

- Muestra CLALDY

$$45 \text{ UFC} \times 1/10^{-5} = 4,5 \times 10^6 \text{ UFC}$$

$$86 \text{ UFC} \times 1/10^{-8} = 8,6 \times 10^9 \text{ UFC}$$

- Muestra Vital+ de Conaprole

$$142 \text{ UFC} \times 1/10^{-5} = 0,0142 \times 10^9 \text{ UFC}$$

$$115 \text{ UFC} \times 1/10^{-6} = 0,115 \times 10^9 \text{ UFC}$$

13.2.2 Determinación de lactosa por espectrofotometría

Foto N° 5 Envase yogurt CLALDY



Foto N° 6 Información Nutricional de yogurt CLALDY





• **Datos:**

Tabla N°8 Datos de masa para la determinación de lactosa

Muestra	masa (g)
Lactosa anhidra	0,1259
CLALDY	1,5268
Vital+ de Conaprole	1,5289

• **Concentración de Lactosa expresada en ppm**

Fórmula:

$$\text{Concentración (ppm)} = m \text{ (g)} / V(L) \times 1000$$

$$\text{Concentración} = 0,1259 \text{ g} / 0,050 \text{ L} = 2,518 \text{ g/L} \times 1000 = \mathbf{2518 \text{ ppm}}$$

- **Concentraciones de patrón (expresadas en ppm)**

Fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

- $2518 \text{ ppm} \times 0,5 \text{ mL} = C_2 \times 25 \text{ mL}$

$$C_2 = 2518 \text{ ppm} \times 0,5 \text{ mL} / 25 \text{ mL} = \mathbf{50,36 \text{ ppm}}$$

- $2518 \text{ ppm} \times 1,0 \text{ mL} = C_2 \times 25 \text{ mL}$

$$C_2 = 2518 \text{ ppm} \times 1,0 \text{ mL} / 25 \text{ mL} = \mathbf{100,72 \text{ ppm}}$$

- $2518 \text{ ppm} \times 1,5 \text{ mL} = C_2 \times 25 \text{ mL}$

$$C_2 = 2518 \text{ ppm} \times 1,5 \text{ mL} / 25 \text{ mL} = \mathbf{151,08 \text{ ppm}}$$

- $2518 \text{ ppm} \times 2,0 \text{ mL} = C_2 \times 25 \text{ mL}$

$$C_2 = 2518 \text{ ppm} \times 2,0 \text{ mL} / 25 \text{ mL} = \mathbf{201,44 \text{ ppm}}$$

Tabla N°9 Resultados de las réplicas de patrones y promedio de absorbancia

Patrón (mL)	Réplica N° 1 (A)	Réplica N° 2 (A)	Réplica N° 3 (A)	Réplica N° 4 (A)	Réplica N° 5 (A)	Promedio (A)
0	0,003	0,003	0,005	0,006	0,006	0,0046
0,5	0,054	0,052	0,052	0,052	0,052	0,0524
1,0	0,095	0,094	0,093	0,093	0,092	0,0934
1,5	0,141	0,138	0,137	0,139	0,138	0,1386
2,0	0,178	0,177	0,178	0,177	0,177	0,1774

- **Determinación de las concentraciones de las muestras**

Tabla N°10 Resultados de las réplicas de absorbancia CLALDY

Réplica	Absorbancia (A)	Concentración (ppm)	masa (g)	masa en 100 g
N° 1	0,066	1881,25	0,04703125	3,080380534
N° 2	0,065	1850,00	0,04625000	3,029211423
N° 3	0,066	1881,25	0,04703125	3,080380534
N° 4	0,066	1881,25	0,04703125	3,080380534
N° 5	0,067	1912,5	0,04781250	3,131549646

Resultado de la Gráfica N°2 Curva de calibración

$$A = 0,0008 C + 0,0058$$

→ Réplica N° 1, 3, 4

$$0,0660 A - 0,0058 / 0,0008 = 75,25 \text{ ppm}$$

→ Réplica N° 2

$$0,0650 A - 0,0058 / 0,0008 = 74,00 \text{ ppm}$$

→ Réplica N° 5

$$0,0670 A - 0,0058 / 0,0008 = 76,50 \text{ ppm}$$

- **Concentración de lactosa en 1 mL de muestra**

Fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

→ Réplica N° 1, 3, 4

$$75,25 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} = C_2 \times 1 \text{ mL}$$

$$C_2 = 75,25 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} / 1 \text{ mL}$$

$$C_2 = 1881,25 \text{ ppm}$$

- **Cálculo de la cantidad de lactosa**

Fórmula:

$$C \text{ (ppm)} = m \text{ (mg)} / V \text{ (L)}$$

Cálculo de masa:

$$m \text{ (mg)} = C \text{ (ppm)} \times V \text{ (L)}$$

$$m \text{ (mg)} = 1881,25 \text{ ppm} \times 0,025 \text{ L}$$

$$m = 47,03125 \text{ mg} \rightarrow \mathbf{0,04703125 \text{ g}}$$

- **Cálculo de la cantidad de lactosa en 100 g de yogurt**

0,04703125 g _____ 1,5268 g de muestra de CLALDY

$$x = \text{_____} 100 \text{ g} \quad x = \mathbf{3,080380534 \text{ g}}$$

→ Réplica N° 2

$$74,00 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} = C_2 \times 1 \text{ mL}$$

$$C_2 = 74,00 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} / 1 \text{ mL}$$

$$C_2 = \mathbf{1850 \text{ ppm}}$$

- **Cálculo de la cantidad de lactosa**

$$m \text{ (mg)} = 1850 \text{ ppm} \times 0,025 \text{ L}$$

$$m = 46,25 \text{ mg} \rightarrow \mathbf{0,04625 \text{ g}}$$

- **Cálculo de la cantidad de lactosa en 100 g de yogurt**

0,04625 g _____ 1,5268 g de muestra de CLALDY

$$x = \text{_____} 100 \text{ g} \quad x = \mathbf{3,029211423 \text{ g}}$$

→ Réplica N° 5

$$76,50 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} = C_2 \times 1 \text{ mL}$$

$$C_2 = 76,50 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} / 1 \text{ mL}$$

$$C_2 = 1912,5 \text{ ppm}$$

• **Cálculo de la cantidad de lactosa**

$$m \text{ (mg)} = 1912,5 \text{ ppm} \times 0,025 \text{ L}$$

$$m = 47,8125 \text{ mg} \rightarrow 0,0478125 \text{ g}$$

• **Cálculo de la cantidad de lactosa en 100 g de yogurt**

0,0478125 g _____ 1,5268 g de muestra de CLALDY

$$x = \frac{0,0478125 \text{ g}}{1,5268 \text{ g}} \times 100 \text{ g} \quad x = 3,131549646 \text{ g}$$

Tabla N°11 Resultados de las réplicas de absorbancia Vital+ de Conaprole

Réplica	Absorbancia (A)	Concentración (ppm)	masa (g)	masa en 100 g
N° 1	0,0540	1506,25	0,03765625	2,462963569
N° 2	0,0540	1506,25	0,03765625	2,462963569
N° 3	0,0540	1506,25	0,03765625	2,462963569
N° 4	0,0540	1506,25	0,03765625	2,462963569
N° 5	0,0540	1506,25	0,03765625	2,462963569

Resultado de la Gráfica N°2 Curva de calibración

$$A = 0,0008 C + 0,0058$$

→ Réplica N° 1, 2, 3, 4, 5

$$0,0540 A - 0,0058 / 0,0008 = 60,25 \text{ ppm}$$

- **Concentración de lactosa en 1 mL de muestra**

Fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

→ Réplica N° 1, 2, 3, 4,5

$$60,25 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} = C_2 \times 1 \text{ mL}$$

$$C_2 = 60,25 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} / 1 \text{ mL}$$

$$C_2 = 1506,25 \text{ ppm}$$

-
- **Cálculo de la cantidad de lactosa en 100 g de yogurt**

Fórmula:

$$C \text{ (ppm)} = m \text{ (mg)} / V \text{ (L)}$$

Cálculo de masa:

$$m \text{ (mg)} = C \text{ (ppm)} \times V \text{ (L)}$$

$$m \text{ (mg)} = 1506,25 \text{ ppm} \times 0,025 \text{ L}$$

$$m = 37,65625 \text{ mg} \rightarrow 0,0376562 \text{ g}$$

-
- **Cálculo de la cantidad de lactosa en 100 g de yogurt**

0,0376562 g _____ 1,5289 g de muestra de CLALDY

$$x = \text{_____} 100 \text{ g} \quad x = 2,462963569 \text{ g}$$

- **Cálculo de Intervalo de Confianza (IC)**

Fórmula:

$$\bar{X} \pm z \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Tabla N°12 Estadística

Marca de Yogurt	CLALDY	Vital+ de Conaprole
X	3,080380534	2,462963569
XS	0,036182025	0
IC	0,044174386	0

- **Cálculo de porcentaje**

$$2,462963569 \frac{\quad}{\quad} 100\% \quad \quad \quad x = 0,0246296$$

$$x = \frac{\quad}{\quad} 1\%$$

Resultados:

CLALDY (3,08 ± 0,04) g
Vital+ de Conaprole (2,46 ± 0,02) g