



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**Producción de biofilms a partir de diferentes matrices biodegradables y evaluación
de su actividad antibacteriana**

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Edison Fabricio Guaypatín Sánchez

Tutora: Ing. Liliana Alexandra Cerda Mejía Ph.D.

Ambato – Ecuador.

Noviembre – 2019

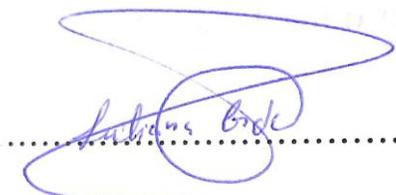
APROBACIÓN DEL TUTOR

Ing. Liliana Alexandra Cerda Mejía Ph.D.

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 09 de noviembre del 2019



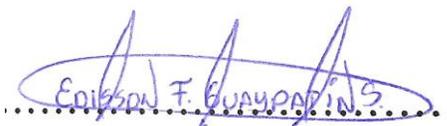
Ing. Liliana Alexandra Cerda Mejía Ph.D.

C.I. 180414808-6

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Edison Fabricio Guaypatín Sánchez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Sr. Edison Fabricio Guaypatín Sánchez

C.I. 180464042-1

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



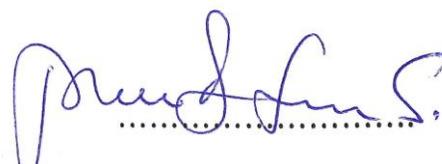
.....
Presidente del Tribunal



.....

Lic. David Andrés Terán Mera PhD.

C.I. 171656972-6



.....

Ing. Mario Daniel García Solís PhD.

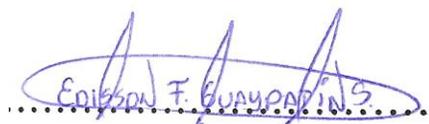
C.I. 110360547-1

Ambato, 12 de noviembre del 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Sr. Edison Fabricio Guaypatín Sánchez

C.I. 180464042-1

AUTOR

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen de la peña por haberme bendecido cada día y así conseguir todas las metas y objetivos que me he propuesto a lo largo de mi vida.

A mis padres ya que con su apoyo y amor incondicional se me ha permitido cumplir una meta más, gracias por sus consejos y por haberme inculcado el respeto, la honestidad y la perseverancia.

A mis hermanas Mirian y Lilian que gracias a su apoyo brindado y sus palabras de aliento me han dado las fuerzas para cumplir todos mis propósitos.

A mi sobrino Carlitos por ser una personita muy especial y por estar junto a mí en todo momento.

A las memorias de mis abuelitos Gregorio, Delfina y de mi hermano César pues han sido un motivo para conseguir mis objetivos.

A mi abuelita Piedad por sus bendiciones y por brindarme todo ese cariño desde el día que nací.

Fabricio

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica de Ambato y en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología ya que me han permitido llegar a ser un profesional.

A todos los docentes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, por haberme compartido sus conocimientos, en especial a la Ing. Liliana Cerda Ph.D., al Lcdo. David Terán Ph.D. y a la Ing. Verónica García Ph.D. pues gracias a su guía, dedicación y tiempo ha sido posible la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Alexis Debut Ph.D. por su valiosa contribución en el área de microscopía electrónica de Barrido (SEM) que fue de mucha importancia en el desarrollo de este proyecto.

A mis padres por ser mi fuente de motivación e inspiración en mi carrera universitaria y por su apoyo en todo momento a pesar de los problemas que existieron en esta difícil etapa.

A Erika que me ha brindado su apoyo, amor y comprensión incondicional y que ha estado en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis amigos y compañeros de aula por su apoyo en momentos de dificultad y por su amistad en el trayecto de mi vida universitaria.

Gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN EJECUTIVO	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I	16
1.1 Antecedentes investigativos	16
1.1.1 Polímero	16
1.1.2 Tipos de polímeros por su origen	16
1.1.2.1 Polímeros sintéticos	16
1.1.2.2 Polímeros obtenidos a partir de recursos renovables.....	16
1.1.3 Celulosa	16
1.1.4 Celulosa Bacteriana	17
1.1.5 Komagataeibacter xylinus	17
1.1.6 Cáscara de cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>).....	17
1.1.7 Carragenato	18
1.1.8 Almidón.....	18
1.1.9 Gelatina	18
1.1.10 Agar	18

1.1.11 Actividad antimicrobiana de nanopartículas metálicas	18
1.2 Hipótesis	19
1.2.1 Hipótesis nula	19
1.2.2 Hipótesis alternativa	19
1.3 Señalamiento de variables de la hipótesis	19
1.3.1 Variables dependientes	19
1.3.2 Variables independientes	19
1.4 Objetivos	20
1.4.1 Objetivo General	20
1.4.2 Objetivos específicos	20
CAPÍTULO II	21
2.1 Materiales	21
2.1.1 Cáscara de cacao	21
2.1.2 Carragenato grado comercial y grado reactivo	21
2.1.3 Gelatina pura comestible	21
2.1.4 Cepa bacteriana (<i>Komagataeibacter xylinus</i>)	21
2.2 Métodos	21
2.2.1 Procesamiento de la cáscara de cacao	21
2.2.2 Obtención de cepa en medio sólido	22
2.2.3 Biofilms producidos por Celulosa Bacteriana (CB)	22
2.2.4 Obtención de biofilm	22
2.2.5 Lavado de biofilms de CB	23
2.2.6 Conservación de biofilms	23
2.2.7 Films producidos a partir de carragenato, agar y almidón	23
2.2.8 Obtención de films producidos a partir de carragenato, agar y almidón	23
2.2.9 Impregnación de nanopartículas de níquel, plata y zinc en biofilms de celulosa bacteriana	24
2.2.10 Impregnación de nanopartículas de níquel, plata y zinc en films elaborados con la mezcla de diferentes matrices biodegradables	24
2.2.11 Análisis por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM)	24
2.2.12 Actividad antibacteriana	24

2.2.13 Análisis de resultados	25
CAPÍTULO III.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
3.1 Análisis y discusión de resultados	26
3.1.1 Producción de biofilms mediante aplicación de <i>Komagataeibacter xylinus</i>	26
3.1.2 Producción de films biodegradables a partir de mezclas de almidón soluble, carragenato, y agar.....	28
3.1.3 Impregnación de nanopartículas de plata, zinc y níquel en films.....	29
3.1.4 Evaluación mecánica	33
3.1.5 Evaluación antibacteriana.....	35
3.2 Verificación de hipótesis	40
CAPÍTULO IV	41
4.1 CONCLUSIONES.....	41
4.2 RECOMENDACIONES	42
MATERIAL DE REFERENCIA	43
5.1 Referencias Bibliográficas.....	43
ANEXOS	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de medio H-S común.....	22
Tabla 2. Componentes de medios con sustitución parcial y total de glucosa.	22
Tabla 3. Mezclas de matrices para films sin microorganismo.	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biofilms obtenidos en medio H-S: (A) 30 ml de medio en caja Petri, (B) 50 ml de medio en matraz.	26
Figura 2. Biofilms obtenidos harina de cáscara de cacao: (A) 30 ml de medio en caja Petri, (B) 50 ml de medio en matraz.	28
Figura 3. Films obtenidos por casting: (A) 30 ml de medio en caja Petri, (B) 50ml de medio en matraz.	29
Figura 4. Biofilms impregnados con nanopartículas metálicas: (A) Impregnación con plata, (B) Impregnación con zinc, (C) Impregnación con níquel.....	30
Figura 5. Micrografía SEM en film de celulosa bacteriana aplicado en la mezcla (Glucosa/Almidón) con impregnación de plata.	30
Figura 6. Mapping de films en medio H-S: A) Impregnación con nanopartículas de plata. B) Impregnación con nanopartículas de zinc. (Palacios, 2019).	31
Figura 7. Ilustración de la interacción entre el carragenato y las nanopartículas de plata. (Elsupikhe, Shameli, Ahmad, Ibrahim, & Zainudin, 2015).	32
Figura 8. Ilustración de la interacción entre amilopectina y nanopartículas de plata (Salaheldin, 2018).	32
Figura 9. Diagramas de esfuerzo: (A) Biofilm (Glucosa/Almidón) sin impregnación, (B) Biofilm (HCC/Almidón) Impregnación Ag, (C) Film sin microorganismo (Agar/Almidón) Impregnación Ni.....	35
Figura 10. Antibiogramas control con Ampicilina – Prueba positiva (+) y Prueba negativa (-): (A) E. coli, (B) Staphylococcus aureus.	36

Figura 11. Antibiogramas con impregnación de nanopartículas de plata probadas en E.coli: (A) Film sin microorganismo (Carragenato/Almidón), (B) Film de celulosa bacteriana (HCC/Carragenato grado comercial).....	36
Figura 12. Antibiogramas con impregnación de nanopartículas de plata probadas en S. aureus: (A) Film sin microorganismo (Carragenato/Almidón), (B) Film de celulosa bacteriana (HCC/Carragenato grado comercial).....	37
Figura 13. Antibiogramas con impregnación de nanopartículas de zinc probadas en E.coli: (A) Film sin microorganismo (Carragenato/Almidón), (B) Film de celulosa bacteriana (HCC/Carragenato grado comercial).....	38
Figura 14. Antibiogramas con impregnación de nanopartículas de níquel probadas en E.coli: (A) Film sin microorganismo (Carragenato/Almidón), (B) Film de celulosa bacteriana (HCC/Carragenato grado comercial).....	38
Figura 15. Antibiograma con film sin impregnación de nanopartículas metálicas probada en S. aureus.	39
Figura 16. Prueba no paramétrica de Wilcoxon para la evaluación de formación de halos de inhibición: (A) E. coli (B) S. aureus.....	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Films de celulosa bacteriana producida con 30 ml de medio de cultivo H-S: (A) Glucosa/Almidón (B) Glucosa/Carragenato grado comercial (C) Glucosa/Gelatina.	49
Anexo 2. Films de celulosa bacteriana producida con 30 ml de medio de cultivo H-S: (A) HCC/Almidón (B) HCC/Carragenato grado comercial (C) HCC/Gelatina.	49
Anexo 3. Films de celulosa bacteriana producida con 50 ml de medio de cultivo H-S: (A) Glucosa/Almidón (B) Glucosa/Carragenato grado comercial (C) Glucosa/Gelatina.	49
Anexo 4. Films de celulosa bacteriana producida con 50 ml de medio de cultivo H-S: (A) HCC/Almidón (B) HCC/Carragenato grado comercial (C) HCC/Gelatina.	50
Anexo 5. Antibiogramas, films impregnados/sin microorganismo/evaluados en E. coli: (A) Agar/Almidón (B) Agar/Carragenato grado comercial (C) Carragenato/Almidón...	50

Anexo 6. Antibiogramas, films impregnados/celulosa bacteriana/evaluado en E.coli: (A) Glucosa/Almidón (B) Glucosa/Carragenato grado reactivo (C) Glucosa/Carragenato grado comercial (D) Glucosa/Gelatina.....	51
Anexo 7. Antibiogramas, films impregnados/celulosa bacteriana/evaluado en E.coli: (A) HCC/Almidón (B) HCC/Carragenato grado reactivo (C) HCC/Carragenato grado comercial (D) HCC/Gelatina.....	52
Anexo 8. Antibiogramas, films impregnados/sin microorganismo/evaluados en S. aureus: (A) Agar/Almidón (B) Agar/Carragenato grado comercial (C) Carragenato/Almidón...	52
Anexo 9. Antibiogramas, films impregnados/celulosa bacteriana/evaluado en S. aureus: (A) Glucosa/Almidón (B) Glucosa/Carragenato grado reactivo (C) Glucosa/Carragenato grado comercial (D) Glucosa/Gelatina.....	53
Anexo 10. Antibiogramas, films impregnados/celulosa bacteriana/evaluado en S. aureus: (A) HCC/Almidón (B) HCC/Carragenato grado reactivo (C) HCC/Carragenato grado comercial (D) HCC/Gelatina.....	54
Anexo 11. Tamaño de halos de inhibición medidos en cultivos de E. coli.	55
Anexo 12. Tamaño de halos de inhibición medidos en cultivos de S. aureus.	56

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

HCC = Harina de cáscara de cacao

CB = Celulosa bacteriana

RESUMEN EJECUTIVO

Polímeros biodegradables poseen escasas propiedades viscoelásticas, de ruptura, de barrera y antibacterianas afectando su uso en la industria. El objetivo de esta investigación es producir films con diferentes matrices biodegradables, para mejorar sus propiedades y evaluar su efecto antibacteriano mediante la impregnación de nanopartículas metálicas. Se determinó que los films producidos por *Komagataeibacter xylinus* con un volumen de medio de cultivo de 50 ml produjo films gruesos, al igual que en los films obtenidos de mezclas filmogénicas con el aumento a 20 ml de la mezcla final.

Se realizaron pruebas de esfuerzo como la fuerza axial y tensión relacionadas con la resistencia de materiales cuando se aplican fuerzas axiales en direcciones contrarias; obteniendo 21 – 24 N de fuerza axial y 1,9 – 3,8 % de tensión para la mezcla de glucosa/carragenato grado comercial siendo la prueba más representativa.

La evaluación antibacteriana demostró que solo los films impregnados con plata poseen un efecto antibacteriano frente a *E. coli* y *S.aureus*; dando halos de inhibición de 1,2 - 1,4 cm de diámetro para films de CB y 1,3 - 2,5 cm de diámetro para films de soluciones filmogénicas evaluados en *E.coli*. Por otro lado, se obtuvieron valores entre 1,33 – 2,01 cm de diámetro para films de CB y 1,09 – 1,29 cm de diámetro para films de soluciones filmogénicas evaluados en *S. aureus*.

Palabras clave: celulosa bacteriana, soluciones filmogénicas, nanopartículas, antibacteriano.

ABSTRACT

Biodegradable polymers have few viscoelastic, rupture, barrier and antibacterial properties affecting their use in industry. The objective of this research is to produce films with different biodegradable matrices, to improve their properties and evaluate their antibacterial effect by impregnating metal nanoparticles. It was determined that films produced by *Komagataeibacter xylinus* with a volume of culture medium of 50 ml produced thick films, as in films obtained from filmogenic mixtures with the increase to 20 ml of the final mixture.

Stress tests such as axial force and tension related to the strength of materials were performed when axial force is applied in opposite directions; obtaining 21-24 N of axial force and 1.9-3.8% of tension for the commercial grade glucose / carrageenan mixture being the most representative test.

The antibacterial evaluation showed that only films impregnated with silver have an antibacterial effect against *E. coli* and *S. aureus*; giving inhibition halos of 1.2 - 1.4 cm in diameter for CB films and 1.3 - 2.5 cm in diameter for films of filmogenic solutions evaluated in *E. coli*. On the other hand, values between 1.33 - 2.01 cm in diameter were obtained for CB films and 1.09 - 1.29 cm in diameter for films of filmogenic solutions evaluated in *S. aureus*.

Keywords: bacterial cellulose, filmogenic solutions, nanoparticles, antibacterial.

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Polímero

Son moléculas orgánicas que son parte de diversos productos obtenidos a partir de combustibles fósiles. Estas moléculas están formadas por unidades más pequeñas llamadas monómeros, los mismos que a su vez están formados por átomos de carbono **(Hermida, 2011)**.

1.1.2 Tipos de polímeros por su origen

1.1.2.1 Polímeros sintéticos

Son elementos producidos por el hombre; se clasifican en dos categorías de acuerdo con el comportamiento que poseen cuando se encuentran expuestos al calor: termoplásticos y termorrígidos. Los termoplásticos se ablandan o se funden cuando se calientan, son solubles en ciertos disolventes; por otro lado, los termorrígidos al ser sometidos al calor se descomponen y no es posible su fundición ni solubilización **(Hermida, 2011)**

1.1.2.2 Polímeros obtenidos a partir de recursos renovables

Los polímeros biodegradables poseen grandes ventajas: técnicas, industriales y especialmente ambientales por su fácil reciclaje y biodegradación **(Masmoudi, Bessadok, Dammak, Jaziri, & Ammar, 2016)**. Estos polímeros se pueden obtener directamente de la biomasa (polisacáridos, proteínas, lípidos); por síntesis química usando monómeros renovables de base biológica (ácido poliláctico) o por microorganismos modificados genéticamente (polihidroxialcanoatos) **(García, Sendón, & Rodríguez, 2016)**.

1.1.3 Celulosa

Es una fibra vegetal, que es el constituyente más importante de las paredes celulares de plantas. Puede ser sintetizada por microorganismos, plantas y animales **(Ramírez, 2012)**. La celulosa es el biopolímero natural más producido en el mundo (1.5×10^{12} toneladas por

año). En los últimos años se ha tomado a este compuesto como materia prima renovable y biodegradable en diversas aplicaciones proponiendo una solución al reciente desafío industrial para enfrentar con éxito los problemas medioambientales y de reciclaje (**Heinze, 2015**).

1.1.4 Celulosa Bacteriana

Es un biopolímero producido por microorganismos de diferentes reinos como: Fungi (*Dictyostelium*), Monera (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*), Animal (Tunicidae). Dentro del reino monera, la producción de celulosa es muy variada, las especies productoras se encuentran dentro de los géneros *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Zoogloea* y bacterias acéticas. La especie *K. xylinum* perteneciente al último género antes mencionado es la que posee la mayor capacidad de producción, ya que el nivel de pureza y estructura es parecida a la celulosa procedente de fuentes vegetales (**Perumpuli, Watanabe, & Toyama, 2014**).

1.1.5 *Komagataeibacter xylinus*

Anteriormente llamada *Gluconacetobacter xylinus*, (**Lavasani, Motevaseli, Shirzad, & Modarressi, 2017**), es un microorganismo aerobio y gram negativo, generalmente se encuentra en el vinagre, frutas y verduras. Produce celulosa en medios líquidos y sólidos, la misma que se puede evidenciar por la presencia de una película en la superficie de la placa (**Perumpuli et al., 2014**).

1.1.6 Cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*)

Ecuador es uno de los principales productores de cacao a nivel mundial pues satisface al 60% de la población mundial con cacao fino de aroma (**System, 2018**). La gran demanda de este producto conduce a la existencia de toneladas de desechos principalmente por la cáscara, lo que ha obligado a científicos a investigar soluciones para dicho problema (**Redgwell et al., 2003**). Sin embargo, muchas empresas destinan este producto a la alimentación animal, fertilizantes o también como comburente para calderas (**Okiyama, Navarro, & Rodrigues, 2017**).

1.1.7 Carragenato

El carragenato pertenece a una familia de polisacáridos lineales sulfatados que se producen en la pared celular y en la matriz intercelular de diferentes especies de algas rojas (**Abdou & Sorour, 2014**).

1.1.8 Almidón

El almidón es la principal reserva de energía en las plantas acumulándose en órganos de reserva como tubérculos o semillas durante extensos períodos de tiempo, lo que permite la formación de grandes estructuras granulares. Las fuentes de almidón más significativas a nivel industrial son: el almidón de maíz, trigo, yuca y papa. El almidón se ha utilizado como materia prima para la producción de plásticos biodegradables debido a sus propiedades, bajo precio y abundante disponibilidad (**Torres, Troncoso, Torres, Díaz, & Amaya, 2011**).

1.1.9 Gelatina

La gelatina es un biopolímero natural que se deriva de la hidrólisis del colágeno insoluble, el cual se encuentra presente en los huesos y la piel; la gelatina además de poseer buena biocompatibilidad y biodegradabilidad (**Magro, 2017**), representa una alternativa viable como material formador de películas debido a su abundancia, bajo costo y disponibilidad (**Aguilar et al., 2012**).

1.1.10 Agar

Es un polisacárido utilizado en la industria alimentaria como espesante, gelificante y estabilizante; generalmente se obtienen de diversas especies de algas rojas (**Domínguez & Jimenez, 2012**). Este polímero está formado por la mezcla de: agarpectina y agarosa (**Rivas, Cachile, & Francois, 2010**). Los recubrimientos a base de polisacáridos poseen numerosas ventajas y pueden emplearse para extender la vida de anaquel de diversos alimentos como frutas y hortalizas (**Morales, 2011**).

1.1.11 Actividad antimicrobiana de nanopartículas metálicas

Diferentes metales se han empleado desde la antigüedad para el tratamiento de diversas enfermedades; sin embargo en la actualidad se utilizan nanopartículas metálicas como

agentes antimicrobianos debido a su amplio espectro inhibitorio para combatir infecciones producidas por bacterias, virus y hongos (**Brandelli, Ritter, & Fonseca, 2017**).

Se han estudiado diferentes nanopartículas metálicas como: óxido de zinc el cual tiene varias funcionalidades como la actividad antibacteriana, (**Ali, Ambreen, et al., 2016**). También se han evaluado las nanopartículas de plata, las cuales son muy valoradas en la industrias de polímeros no solo por su propiedades fisicoquímicas, sino también por su bajo costo y por sus propiedades antibacterianas (**Ali, Haq, et al., 2016**).

Además existen nanopartículas de otros metales, tales como: oro, óxido de titanio, óxido de cobre y óxido de magnesio las cuales poseen propiedades antimicrobianas (**Brandelli et al., 2017**).

1.2 Hipótesis

1.2.1 Hipótesis nula

H₀: La mezcla de matrices biodegradables con la impregnación de nanopartículas de metales no posee efecto antibacteriano.

1.2.2 Hipótesis alternativa

H₁: La mezcla de matrices biodegradables con la impregnación de nanopartículas de metales posee efecto antibacteriano.

1.3 Señalamiento de variables de la hipótesis

1.3.1 Variables dependientes

- Cáscara de cacao, agar, almidón, gelatina sin sabor, carragenato

1.3.2 Variables independientes

- Producción de biofilms de celulosa bacteriana y films a partir de la mezcla de matrices con características antimicrobianas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Producir de biofilms a partir de diferentes matrices biodegradables y evaluar de su actividad antibacteriana.

1.4.2 Objetivos específicos

- Obtener biofilms de celulosa con sustitución parcial de la fuente de carbono con almidón, carragenato y gelatina, a partir de *Komagataeibacter xylinus*.
- Obtener films biodegradables a partir de mezclas de almidón soluble, carragenato, y agar.
- Realizar una impregnación con nanopartículas de plata, zinc y níquel a los mejores tratamientos y caracterizar la estructura de los biofilms producidos mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).
- Evaluar la efectividad antibacteriana de los biofilms frente a cepas de microorganismos.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Cáscara de cacao

Se empleó 2,5 kilos de cáscara de cacao obtenidos de la provincia de Santo Domingo de los colorados, los cuales fueron recogidos y llevados al laboratorio de canje de deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato para su posterior tratamiento.

2.1.2 Carragenato grado comercial y grado reactivo

Se adquirió 29 gramos de carragenato grado comercial en el almacén de productos químicos y materias primas “INTEQ” de la ciudad de Ambato. Por otra parte, el carragenato grado reactivo se adquirió en la empresa Sigma en Estados Unidos de América.

2.1.3 Gelatina pura comestible

Se empleó 142 gramos de gelatina pura comestible, la cual se adquirió de la empresa “PRODEGEL” ubicada en el cantón Pelileo sector Pachanlica vía a Baños, provincia de Tungurahua.

2.1.4 Cepa bacteriana (*Komagataeibacter xylinus*)

La formación de biofilms mediante celulosa bacteriana se produjeron con el empleo de las diferentes matrices y la cepa de *Komagataeibacter xylinus* (K2G30 =UMCC 2756), obtenida en la colección alemana DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig).

2.2 Métodos

2.2.1 Procesamiento de la cáscara de cacao

Fueron lavadas en agua y secadas a 60°C por 24 horas, esto con la finalidad de eliminar el agua contenida y así facilitar la posterior molienda, para este proceso se utilizó un

molino de mano (Corona, Colombia); finalmente la harina de cáscara de cacao (HCC) obtenida fue esterilizada en autoclave a 121°C por 15 minutos (Hirayama, Japón).

2.2.2 Obtención de cepa en medio sólido

Para replicación de la cepa de *Komagataeibacter xylinus* se prepararon resuspensiones de crecimiento bacteriano en cajas petri empleando medio sólido H-S, finalmente se llevó a incubación a 30°C por 48 horas.

2.2.3 Biofilms producidos por Celulosa Bacteriana (CB)

Se aplicó la metodología propuesta por **Hestrim & Schramm, 1954** con el uso de medio H-S, que se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes de medio H-S.

Medio de cultivo	Componentes	g/L	pH
H-S	Glucosa	20	6
	Peptona	5	
	Extracto de levadura	5	
	Fosfato disódico	2,7	
	Ácido cítrico	1,15	

Fuente: (Hestrim & Schramm, 1954)

Tabla 2. Componentes de medios con sustitución parcial y total de glucosa

Tratamiento	Componentes		
1	Glucosa	Almidón	Glicerol
2		Carragenato	
3		Gelatina sin sabor	
4	Harina de cáscara cacao	Almidón	
5		Carragenato	
6		Gelatina sin sabor	

2.2.4 Obtención de biofilm

Para la obtención de biofilms primero se calculó las cantidades exactas de cada componente con respecto a 50 ml, siguiendo la formulación de la Tabla 1; sin embargo los 20 g/L de glucosa fueron reemplazados parcial y totalmente por los componentes descritos en la Tabla 2 con los siguientes porcentajes: 37.5% de Glucosa o HCC, 37.5%

de componentes adicionales y 25% de glicerol; seguido se colocaron los ingredientes en matraces Erlenmeyer de 250 ml (ESCO) cubriendo la boca del matraz con papel aluminio y ajustándolo con cinta a las paredes del matraz. La producción de biofilms de celulosa se realizó en estático en una incubadora a 30°C por 12 días (**Gullo, La China, Falcone, & Giudici, 2018**).

2.2.5 Lavado de biofilms de CB

Para eliminar partículas extrañas, se lavaron los biofilms con abundante agua destilada para luego someter a un blanqueamiento con NaOH 0,8% durante 20 minutos. Finalmente se eliminó el hidróxido de sodio lavando los biofilms con agua destilada durante 15 minutos. Durante el lavado se añadió fenolftaleína, la cual permitió comprobar la eliminación total de hidróxido.

2.2.6 Conservación de biofilms

Los biofilms fueron colocados en una solución de ácido acético 0,01% a 4°C, con el fin de prevenir la degradación o contaminación.

2.2.7 Films producidos a partir de carragenato, agar y almidón

Para el proceso de elaboración de films con diferentes matrices se aplicó el método de casting; las soluciones filmogénicas de carragenato, agar y almidón se prepararon por separado. En la Tabla 3, se detalla cada una de las mezclas evaluadas.

Tabla 3. Mezclas de matrices para films sin microorganismo.

Mezclas			
Componente 1	Proporción (%)	Componente 2	Proporción (%)
Agar	60	Almidón	40
Agar	60	Carragenato	40
Carragenato	60	Almidón	40

2.2.8 Obtención de films producidos a partir de carragenato, agar y almidón

Para la obtención de los films, las soluciones filmogénicas se elaboró al 2% con respecto al agua utilizada en el proceso, una vez pesado cada componente se disuelve en 100 ml de agua destilada en una plancha de calentamiento con agitación a 70°C durante 25 minutos; posteriormente la mezcla final se las preparó de acuerdo a las proporciones descritas en la

Tabla 3 y se añadió glicerol al 8% de la mezcla final, para dejarlas en agitación durante 1 hora a 80°C (Martins et al., 2013). Una vez transcurrido el tiempo requerido, la solución final se distribuyó en cajas Petri de plástico de 8,5 cm de diámetro, agregando 20 g en cada una, corroborando la cantidad por medio de una balanza digital (Ohaus). Finalmente, las placas se las llevó a una incubadora (ESCO) para su secado a 30°C durante 48 horas.

2.2.9 Impregnación de nanopartículas de níquel, plata y zinc en biofilms de celulosa bacteriana

Se colocaron los biofilms en soluciones independientes de sulfato de níquel, nitrato de plata y sulfato de zinc con una concentración de 1mM en una incubadora con agitación (Benchmark) durante 1 hora a 200 RPM, posteriormente se coloca en una solución de NaOH 0,01 M con el objetivo de reducir el tamaño de partícula del metal impregnado. Finalmente se lavó con una solución de etanol absoluto y posteriormente con agua desionizada con el objetivo de descartar las partículas no impregnadas en el biofilm

2.2.10 Impregnación de nanopartículas de níquel, plata y zinc en films elaborados con la mezcla de diferentes matrices biodegradables

El proceso de impregnación de nanopartículas en este tipo de films se realizó en oscuridad; se añadió 1 ml de cada solución a una concentración de 1mM de las sales a la mezcla final antes del proceso térmico a 80°C.

2.2.11 Análisis por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se evaluaron pequeños trozos de cada muestra de films secos (con y sin impregnación) en un microscopio electrónico de barrido (TESCAN, 2014), modelo Mira 3, con el objetivo de visualizar la morfología de los biofilms.

Por medio de dos capas de cinta de carbono de doble faz conductora se fijó cada muestra en un Stub, para luego cubrirla por 30 segundos con una capa de aproximadamente 20nm de oro conductor (pureza de 99.99%) por medio de un evaporador (sputtering evaporator) Quorum Q150R ES previo al análisis.

2.2.12 Actividad antibacteriana

Para la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de difusión en placa, se empleó una cepa Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y una Gram negativa (*Escherichia coli*)

respectivamente como agentes patógenos de prueba. Estos microorganismos se inocularon en medio líquido LB (Luria Bertani), para luego incubarlos a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Los inóculos obtenidos se ajustaron con respecto al equivalente de McFarland que es de $1,5 \times 10^8$ ufc/ml, se tomó 0,1 ml de medio con esta concentración de bacteria, con el fin de dispersar en cajas Petri de vidrio con medio LB sólido. A continuación, las películas se cortaron en discos de 10 mm con un cortador de golpe (Aleman, Alemania). Previo al ensayo se elaboraron también discos de una película sin ningún agente antibacteriano de cada muestra y discos con Ampicilina 100 mg/ml de concentración como antibiótico, los cuales sirvieron como control negativo y control positivo respectivamente. Luego los discos fueron colocados en las placas ya rotuladas para finalmente llevarlas a incubación a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Cabe recalcar que todos los discos de todas las muestras con excepción de los discos con antibiótico fueron sometidos a luz UV durante 12 minutos para su esterilización.

El efecto inhibitor se determinó midiendo las zonas de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de los discos.

2.2.13 Análisis de resultados

Se realizó un análisis estadístico utilizando el programa R studio, con un nivel de confianza del 95% para los resultados obtenidos de la formación de halos de inhibición producidos en la prueba de actividad antibacteriana por parte de los films. Los resultados se analizaron mediante la prueba paramétrica de Wilcoxon, comparando así el rango medio de las muestras relacionadas y determinando si existe diferencia significativa entre las mismas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

3.1.1 Producción de biofilms mediante aplicación de *Komagataeibacter xylinus*

La producción de los films se realizó en cajas Petri agregando 30 ml de medio H-S modificado a cada una, sin embargo, se obtuvieron biofilms muy delgados (Fig. 1A), por esta razón se emplearon matraces de 250 ml de capacidad, permitiendo agregar una mayor cantidad de medio de cultivo (50 ml), esto permitió obtener biofilms con una textura más gruesa (Fig. 1B) debido al mayor aprovechamiento de nutrientes por parte del microorganismo.

La producción de celulosa bacteriana se produce gracias a la síntesis de *K. xylinus* por medio de un conjunto metabólico de fosfato de hexosa, que se obtiene de forma directa por el ión fosforilato de hexosas exógenas, o también indirectamente por medio de la vía gluconeogénica o el ciclo pentosa (Singhsa, Narain, & Manuspiya, 2018).

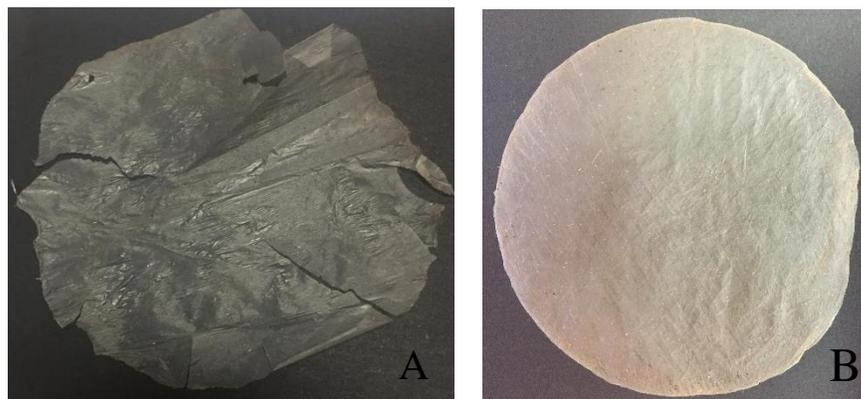


Figura 1. Biofilms obtenidos en medio H-S: (A) 30 ml de medio en caja Petri, (B) 50 ml de medio en matraz.

Los biofilms obtenidos con la relación glucosa/almidón posee una contextura gruesa, mostrando así que el porcentaje utilizado de cada sustancia fue correcta, a pesar de que el almidón como única matriz y debido a sus propiedades físicas no es apropiado para la producción de films, la mezcla con otro tipo de matriz favorece la obtención de celulosa

bacteriana (**García et al., 2016**); el microorganismo aprovecha la glucosa en comparación con el almidón, el glicerol actúa como un plastificante reduciendo la tensión de deformación, dureza y densidad del film (**Vieira, Da Silva, Dos Santos, & Beppu, 2011**), también interviniendo como fuente de carbono, además otorgando mayor flexibilidad y resistencia (**Tabaïi & Emtiazi, 2016**).

Por el contrario, la textura de los biofilms obtenidos de la relación glucosa/carragenato no fue la adecuada, a pesar de que se empleó carragenato de tipo kappa, que posee mejores características para formación de films en comparación a los tipos iota y lambda. Éstas características se pueden atribuir a la diferencia entre los grupos sulfato y los puentes anhidro (**Tye et al., 2017**).

El carragenato es un compuesto utilizado como espesante en la industria alimenticia, solidificó el medio de cultivo, lo que provocó que el microorganismo no aproveche de forma idónea los nutrientes del medio. Teniéndose mismo problema con el carragenato grado reactivo, provocando que los films que poseen ese compuesto sean más delgados en comparación con el carragenato grado comercial.

Una de las características de la HCC es que posee una alta concentración de carbohidratos (**Villamizar, Rodriguez, & León, 2017**), al utilizarla junto con el glicerol se obtuvieron films con una textura gruesa, mayor resistencia y flexibilidad. En la Figura 2 se observa que los films poseen pequeñas partículas de la harina que se quedaron atrapadas en el film, debido a la formación en multicapas, este problema se debe a las condiciones de los materiales y proceso utilizado, los mismos que son los responsables de la formación como también de la malformación de films, lo que puede provocar la acumulación de fibras (**Carreño Pineda, Caicedo Mesa, & Martínez Riascos, 2012**).

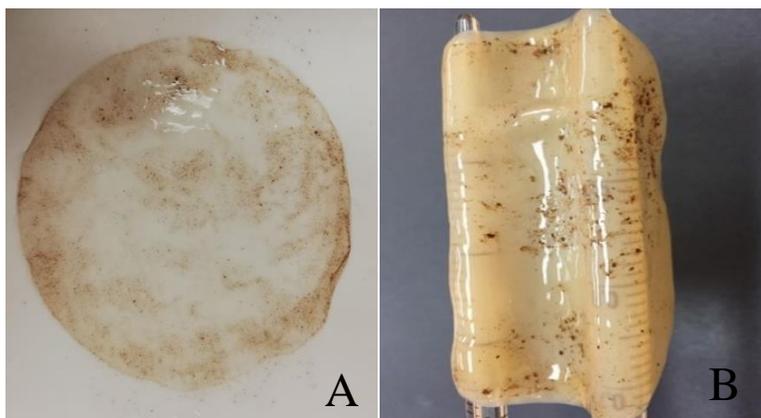


Figura 2. Biofilms obtenidos harina de cáscara de cacao: (A) 30 ml de medio en caja Petri, (B) 50 ml de medio en matraz.

3.1.2 Producción de films biodegradables a partir de mezclas de almidón soluble, carragenato y agar.

El uso de diferentes mezclas de polímeros naturales tiene como objetivo mejorar las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera de los films (Martins et al., 2013). Se realizó la mezcla de diferentes compuestos mediante el método de casting utilizando cajas Petri de polipropileno, ya que este material evita la adherencia de los films a la base de las placas. La cantidad agregada de solución (10 g) produjo films demasiado delgados, lo que se solucionó duplicando la cantidad de solución, obteniendo films con una textura más gruesa, resistente y a su vez incrementando la flexibilidad debido al glicerol.

El proceso de secado se lo realizó en incubadora, puesto que el flujo de aire fue de gran importancia para un mejor secado y extracción de films de las cajas Petri, luego del secado los films presentaron gránulos en toda la superficie, debido a que existió una insuficiente solubilidad de los componentes en el agua (Fig. 3).

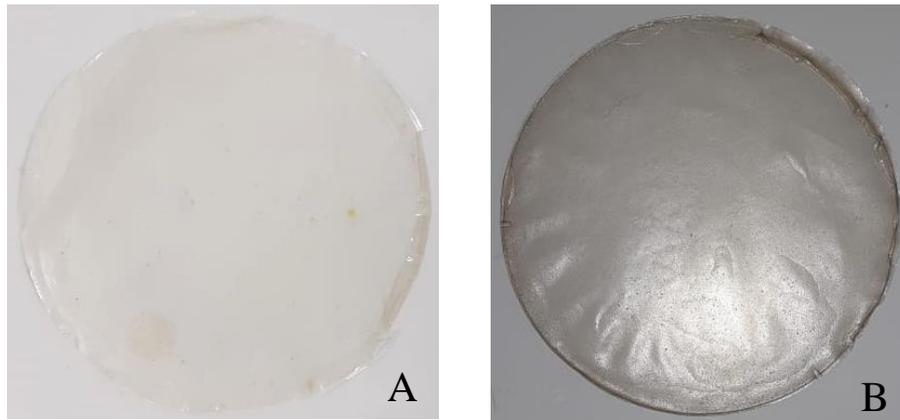


Figura 3. Films obtenidos por casting: (A) 30 ml de medio en caja Petri, (B) 50ml de medio en matraz.

Dado que el almidón no es recomendable para la elaboración de films, debido a que sus propiedades son muy pobres, es decir, se producen films demasiado frágiles y a su vez no poseen gran flexibilidad (**Lawton & Fanta, 1994**), es necesario una mezcla con otras matrices que puedan mejorar dichas características como el agar, ya que su naturaleza es menos higroscópica, que establece una gran ventaja en comparación con otras matrices como el carragenato, puesto que el objetivo principal de estos films en el mundo del envasado de alimentos es disminuir el contenido de humedad que se transfiere entre los alimentos y el ambiente (**Sousa, Sereno, Hilliou, & Gonçalves, 2010**).

Por su parte el k-carragenato posee una carga negativa por disacárido por lo que tiene predisposición a formar films con excelentes características especialmente la resistencia a la tracción (**Cha, Choi, Chinnan, & Park, 2002**), por esta razón las mezclas fueron más resistentes y flexibles.

3.1.3 Impregnación de nanopartículas de plata, zinc y níquel en films.

Dado que se obtuvo muestras con características aceptables, la impregnación de nanopartículas metálicas se realizó en todos los tratamientos. Dicha impregnación produjo un cambio de color en los biofilms especialmente en los que poseían plata, ya que el Nitrato de plata es fotosensible y el film adquiere un color gris (**Malygin, 1998**); a diferencia de los biofilms impregnados con zinc se tornaron de color amarillento. Por otra

parte, los biofilms impregnados con níquel no obtuvieron un color diferente como se puede observar en la Figura 4.

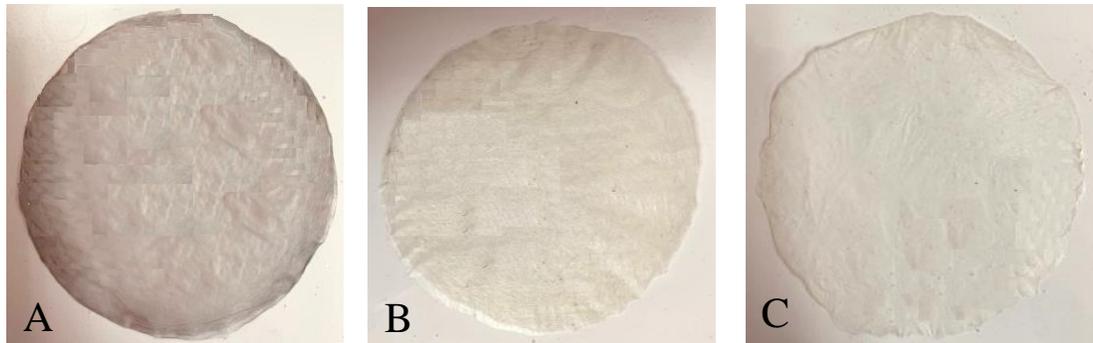


Figura 4. Biofilms impregnados con nanopartículas metálicas: (A) Impregnación con plata, (B) Impregnación con zinc, (C) Impregnación con níquel.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una de las técnicas más importantes debido a que puede revelar características morfológicas de organismos aislados (**Golding, Lamboo, Beniac, & Booth, 2016**). Esta técnica fue empleada para identificar y visualizar de manera óptima las nanopartículas impregnadas en los tratamientos realizados. En la Figura 5, se observan los resultados de esta evaluación donde se puede apreciar que los films tienen impregnados las nanopartículas en su estructura, ya que las nanofibrillas al tener carga negativa captan iones del metal mediante interacciones electrostáticas, haciendo que dichos iones se distribuyan uniformemente por la superficie del film (**Maria, Santos, Oliveira, Valle, & Ribeiro, 2010**).

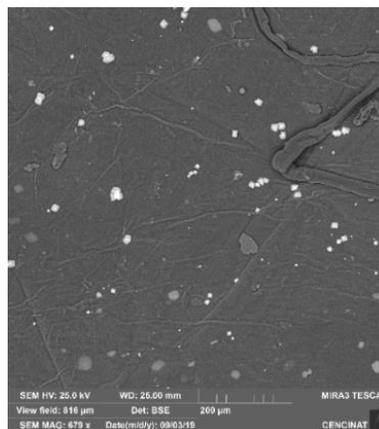


Figura 5. Micrografía SEM en film de celulosa bacteriana aplicado en la mezcla (Glucosa/Almidón) con impregnación de plata.

En la Figura 6 se observa un mapping, realizado por **Palacios, (2019)**, donde se aprecia la presencia de nanopartículas de los diferentes metales; logrado mediante el empleo del método propuesto por **Ali, Ambreen, et al., (2016)**, de esta manera se demostró que el proceso de impregnación en los films fue el adecuado, pues se utilizó el mismo procedimiento de impregnación para este estudio.

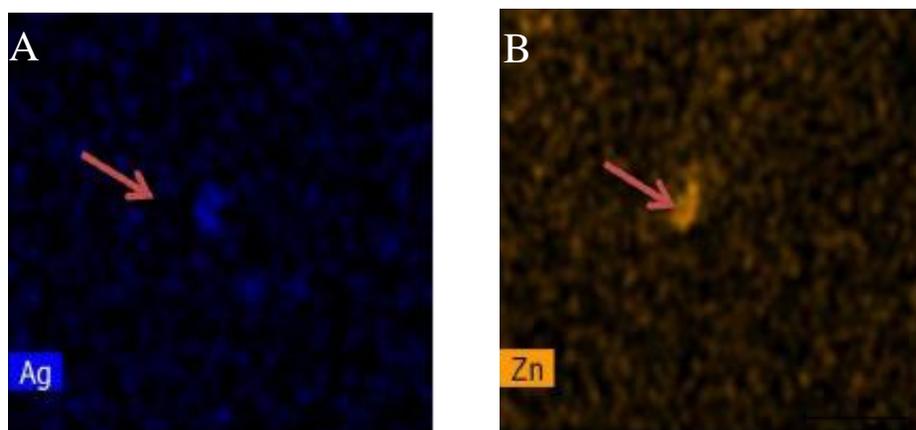


Figura 6. Mapping de films en medio H-S: A) Impregnación con nanopartículas de plata. B) Impregnación con nanopartículas de zinc. (**Palacios, 2019**).

La impregnación de las nanopartículas de plata en la superficie del biofilm se da por la interacción de las fuerzas de van der Waals, presentes entre las cargas positivas que rodearon las partículas inactivas de plata y las cargas negativas presentes en el oxígeno de los grupos hidroxilo pertenecientes a la estructura molecular del carragenato. Adicionalmente se puede decir que existe una interacción entre el grupo carboxilo que forma parte de la estructura de la glucosa, ya que tiene mayor disponibilidad con las moléculas de hidrógeno en dicho grupo en comparación con el grupo aldehído (Fig. 7).

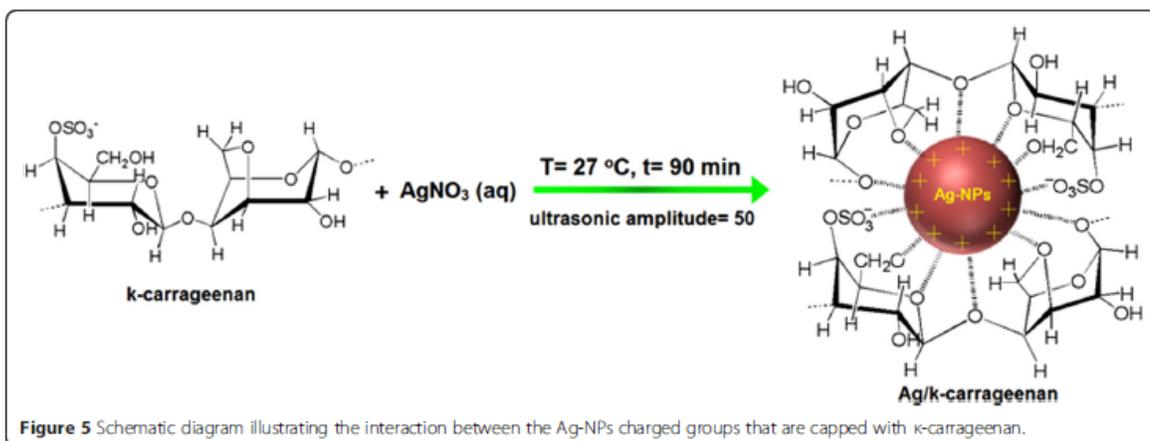


Figura 7. Ilustración de la interacción entre el carragenato y las nanopartículas de plata. (Elsupikhe, Shameli, Ahmad, Ibrahim, & Zainudin, 2015).

Para el caso de la interacción entre almidón y las nanopartículas de plata, el proceso de gelatinización del almidón se dio a 85°C, sin embargo, **Salaheldin, (2018)** menciona que a 90°C se podría mejorar la hidrólisis de amilosa en moléculas de maltosa.

La reducción de iones de plata se dio gracias a la reacción de grupos aldehído presentes en la glucosa permitiendo pasar de Ag^+ a Ag^0 . En la Figura 8 se puede observar el mecanismo de interacción entre las nanopartículas de plata y el polisacárido del almidón en forma helicoidal (**Salaheldin, 2018**).

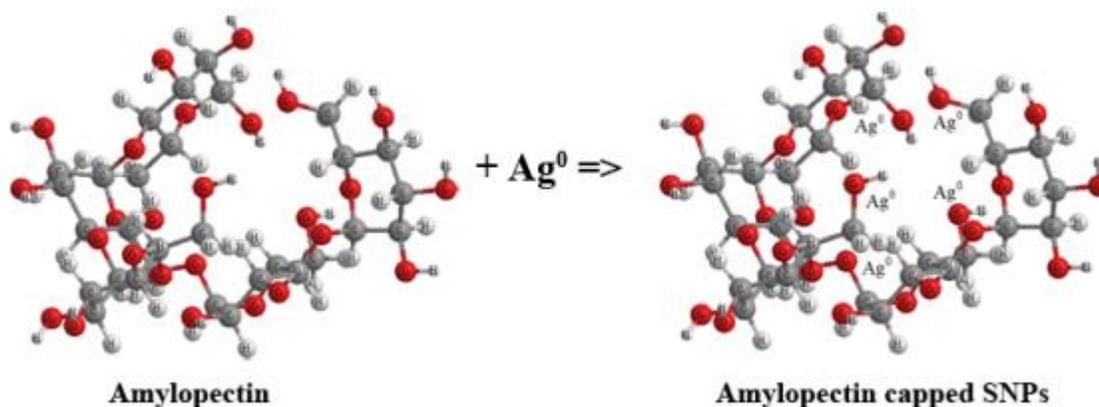


Figura 8. Ilustración de la interacción entre amilopectina y nanopartículas de plata (Salaheldin, 2018).

Lascombes et al., (2017) menciona que la relación entre almidón y carragenato obedece a interacciones electroestáticas entre las fracciones cargadas positivamente de proteínas endógenas del almidón ubicadas en toda la extensión superficial de los gránulos y las cadenas de carragenato con cargas negativas.

Por otro lado, gracias a que las nanopartículas de plata tienen estabilidad con los grupos carboxilato y amino del colágeno, se formó un complejo entre estos componentes estableciendo una estructura compacta (**Drobotă, Grierosu, Radu, & Vasilescu, 2014**).

3.1.4 Evaluación mecánica

La medición del esfuerzo de deformación fue importante, ya que se evaluó la resistencia en términos de fuerza axial y tensión. Según **Bajpai, (2018)**, estos parámetros son indicativos de la resistencia y longitud de los materiales y de las uniones producidas entre las mismas pudiendo evaluar el potencial de resistencia de los films a la deformación excesiva o rotura. Los films elaborados con la mezcla entre glucosa y almidón presentaron el mayor efecto de resistencia, pues 3 de las 4 muestras evaluadas obtuvieron valores en un rango entre 19 – 22 N para la fuerza axial mientras que para la tensión los valores se ubicaron en un rango entre 5.1 – 6 %. El resultado obtenido en estas muestras puede ser atribuido a que el microorganismo aprovechó las tres fuentes de carbono proporcionadas creando así un film más resistente, según **Lindh, (2007)** un adecuado suministro de la fuente de carbono puede maximizar el crecimiento y producción de biofilm por parte del microorganismo tomando en cuenta los factores de crecimiento.

Por otro lado, las muestras elaboradas a partir de la mezcla entre glucosa y carragenato grado comercial, también obtuvieron valores altos con respecto a la fuerza axial, dichos valores se ubicaron en un rango de 21 – 24 N de fuerza axial y 1,9 – 3,8 % de tensión. Los valores obtenidos en este caso señalan que el carragenato al no ser un componente de grado reactivo, no tiene la capacidad suficiente para ejercer su propiedad gelificante por lo que no solidificó el medio en gran proporción y el microorganismo aprovechó los nutrientes provistos, dando como resultado films con características de resistencia superior.

Con respecto a los resultados obtenidos en la combinación compuesta por HCC, las muestras de la relación HCC/almidón presentaron mayor resistencia con valores comprendidos entre 12 – 16 N para fuerza axial y entre 1 – 9 % de tensión. La resistencia de este film puede deberse a que posee buena fuente de carbono con rango que oscilan entre 41 – 43% (**Sánchez, 2013**).

En cuanto a los films formados sin el empleo de microorganismo, la mezcla entre agar/almidón obtuvo mejores resultados con valores entre 16,25 – 28 N para la fuerza axial y entre 13,4 – 3,5 % de tensión, lo que quiere decir que la relación (60/40) para agar/almidón respectivamente fue adecuada. La resistencia del film puede atribuirse a la formación de enlaces intermoleculares de hidrógeno entre el almidón y el agar (**Wu, Geng, Chang, Yu, & Ma, 2009**).

Por otro lado, los films obtenidos con carragenato para ambas mezclas (agar/carragenato y carragenato/almidón) tuvieron valores bajos con respecto a la primera mezcla a pesar de que el carragenato dispone de gran capacidad de formación de films debido a que posee una carga negativa por unidad de disacárido (**Zarina & Ahmad, 2015**). La escasa resistencia y tensión de mencionados films puede deberse a que el porcentaje de las matrices no fue la correcta, (Wu et al., 2009), menciona que una inadecuada proporción de matrices tendrá un efecto negativo, ya que puede provocar la ruptura de la compaginación entre las mismas, haciendo que la superficie de fractura del film no sea uniforme obteniendo errores en pruebas posteriores.

Finalmente, otro factor que influye en la carente resistencia al igual que la tensión en las diferentes muestras con las distintas impregnaciones también se puede otorgar al proceso de impregnación pues según (Cha et al., 2002) es probable que dicho proceso produzca una ruptura en la red de fibrillas haciendo que los films se vuelvan más débiles y menos resistentes.

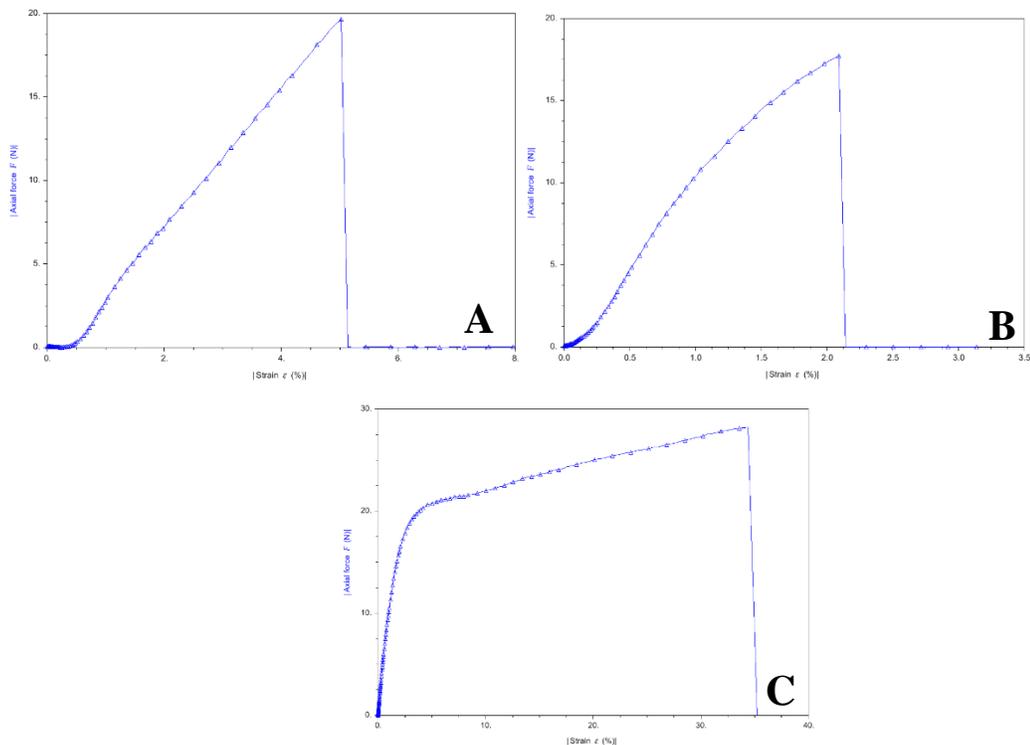


Figura 9. Diagramas de esfuerzo: (A) Biofilm (Glucosa/Almidón) sin impregnación, (B) Biofilm (HCC/Almidón) Impregnación Ag, (C) Film sin microorganismo (Agar/Almidón) Impregnación Ni.

3.1.5 Evaluación antibacteriana

Las nanopartículas de diversos metales son muy utilizadas en el campo antibacteriano, especialmente las provenientes de plata, ya que posee gran poder bactericida, pues limita la división celular al interactuar con el ADN o con las enzimas presentes en dichos microorganismos (Maria et al., 2010)

Se ajustaron los inóculos de cada microorganismo con el equivalente de McFarland, de $1,24 \times 10^8$ UFC/ml y $2,6 \times 10^7$ UFC/ml para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* respectivamente. Con la evaluación se determinó el poder antibacteriano de las nanopartículas impregnadas en los films, por lo que la actividad contra microorganismos se tomó desde el límite de la zona de inhibición incluyendo el diámetro del film en diferentes ángulos puesto que dicha zona en muchos casos fue irregular. En la Figura 10 se puede observar que las placas control obtuvieron halos de inhibición con medidas promedio de 1,74 cm. para *E. coli* y 1,5 cm. para *S. aureus* en las pruebas positivas. Con

estudios proteómicos han mostrado que la interacción de entre las nanopartículas de plata con células de *E. coli* da como resultado el desvanecimiento de la fuerza motriz del protón, lo que provoca que las células del microorganismo mueran (Lok et al., 2007).

Con relación a *Staphylococcus aureus*, los diferentes antibiogramas presentaron menor inhibición en contraste a *E. coli*. En la Figura 12 se puede observar los halos de inhibición producidos por la acción de las diferentes nanopartículas metálicas donde claramente se identifica que de igual manera las nanopartículas de plata fueron las únicas en proporcionar a los films un efecto antibacteriano mínimo, pues en los films producidos sin microorganismo tuvieron halos con valores entre 1,33 – 2,01 cm, mientras que para los films de celulosa bacteriana se obtuvieron valores entre 1,09 – 1,29 cm de diámetro.

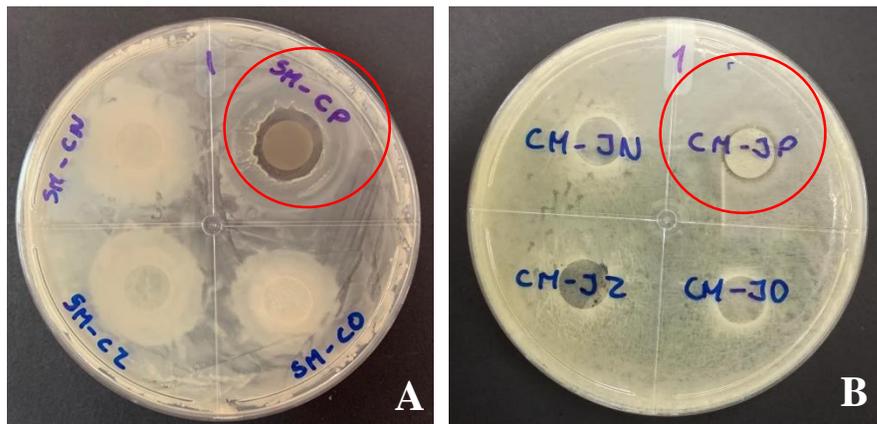


Figura 12. Antibiogramas con impregnación de nanopartículas de plata probadas en *S. aureus*: (A) Film sin microorganismo (Carragenato/Almidón), (B) Film de celulosa bacteriana (HCC/Carragenato grado comercial).

Por el contrario, las partículas de zinc no otorgaron ningún efecto antibacteriano a los films contra *E. coli* y *S. aureus*; la ausencia de dicho efecto puede deberse a que la concentración y el tipo de compuesto no fueron los adecuados pues (Mirjalili & Yassini Ardekani, 2017) menciona que se utilizó 0,7 g. de óxido de zinc, obteniendo halos de inhibición para ambos microorganismos (Fig. 13)

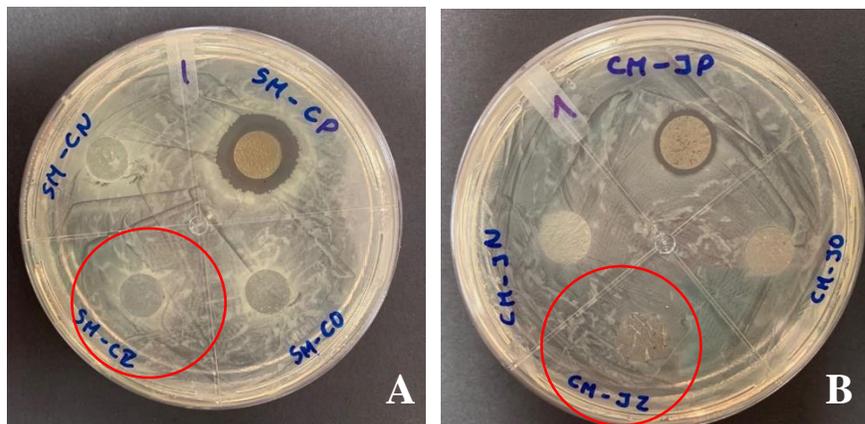


Figura 13. Antibiogramas con impregnación de nanopartículas de zinc probadas en *E.coli*: (A) Film sin microorganismo (Carragenato/Almidón), (B) Film de celulosa bacteriana (HCC/Carragenato grado comercial).

Las nanopartículas de níquel tampoco otorgaron algún efecto antibacteriano a los films, por lo que de igual manera se puede atribuir a la concentración y al tipo de sustancia utilizada pues de acuerdo a **Mirhosseini, Kheiri Hafshejani, Dashtestani, Hakimian, & Haghirosadat, (2018)**, empleó $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0.035mM de concentración observando la presencia de halos de inhibición del mismo modo dicho ensayo fue evaluado para ambos microorganismos (Fig. 14).

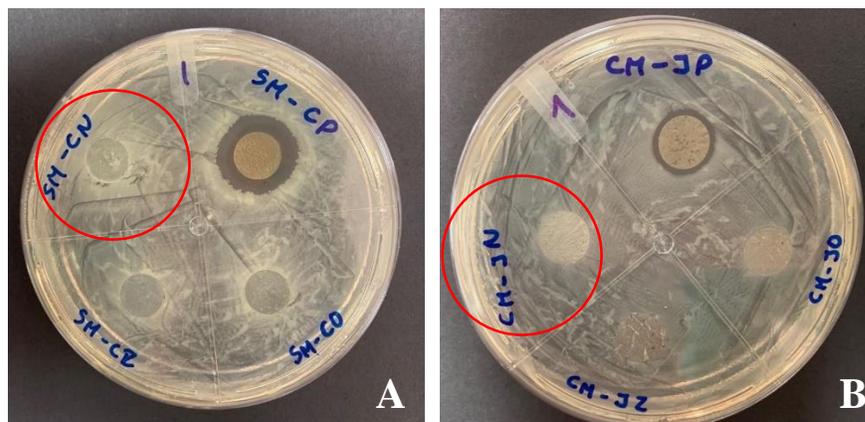


Figura 14. Antibiogramas con impregnación de nanopartículas de níquel probadas en *E.coli*: (A) Film sin microorganismo (Carragenato/Almidón), (B) Film de celulosa bacteriana (HCC/Carragenato grado comercial).

En la Figura 15 se observó que para el caso de *S. aureus*, existió crecimiento del microorganismo sobre el film sin impregnación, lo que puede deberse a que el

microorganismo consumió la fuente de carbono presente en el film. (Balasubramanian, Harper, Shopsis, & Torres, 2017) mencionan que cuando en el medio se presentan condiciones de baja energía por un déficit de glucosa, el 99% de la población celular pierde su viabilidad mientras que el 1% se vuelve una población más densa tomando un perfil de tamaño pequeño.

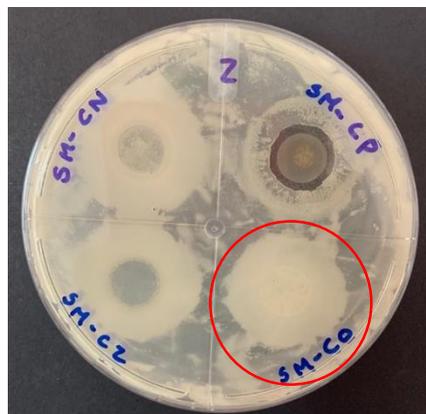


Figura 15. Antibiograma con film sin impregnación de nanopartículas metálicas probada en *S. aureus*.

Mediante el análisis de correlación de rango de Spearman se determinó que existe diferencia significativa ($p=0.01117$) entre los halos formados frente a *E. coli* (Figura 16A) por parte de los diferentes tratamientos, señalando que se obtuvieron los mejores resultados con los tratamientos conformados por las matrices de glucosa/almidón, glucosa/gelatina y HCC/carragenato grado comercial, producidos con microorganismo, obteniendo halos de 1,3 cm de diámetro. En la Figura 16B, para el caso de *S. aureus*, al igual que en el *E. coli* existe diferencia significativa entre los tratamientos ($p= 0,003312$), determinando que el mejor resultado se obtuvo con la mezcla de matrices entre Carragenato/Almidón sin microorganismo, obteniendo un halo de 1,33 cm de diámetro.

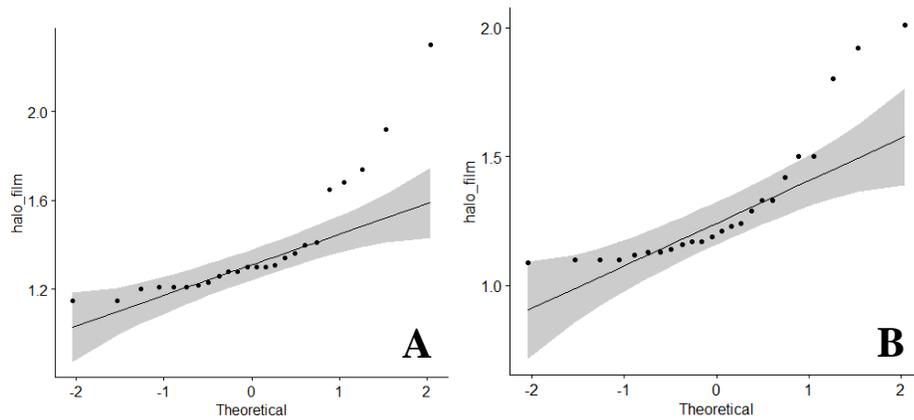


Figura 16. Prueba no paramétrica de Wilcoxon para la evaluación de formación de halos de inhibición: (A) *E. coli* (B) *S. aureus*.

3.2 Verificación de hipótesis

Mediante el análisis estadístico utilizando el 95% de confianza se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, estableciendo que la mezcla de matrices biodegradables con la impregnación de nanopartículas de metales posee efecto antibacteriano.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- La sustitución parcial o total de la fuente de carbono en la elaboración de films de celulosa bacteriana presentó resultados tanto favorables como desfavorables pues la interacción entre las diversas matrices hizo que los films presentaran mayor textura gracias al aumento de medio de cultivo que fue aprovechado por el microorganismo, por otro lado, el glicerol a más de actuar como plastificante, actuó como fuente de carbono adicional permitiendo obtener films de mejores características.
- El método de casting permitió obtener films a partir de soluciones filmogénicas las cuales gracias a la combinación de las diferentes matrices y el aumento de solución a 20 g. para cada film, se obtuvieron films más resistentes además que el glicerol al actuar como plastificante otorgó más flexibilidad, de igual manera el método de secado en incubadora permitió un secado homogéneo y completo en todo el film.
- La impregnación de nanopartículas metálicas en todos los tipos de films, los mismos que cambiaron su coloración especialmente los films impregnados con nanopartículas de plata a un color gris mientras que el zinc tornó a films un color amarillento sin embargo el níquel no otorgó ninguna coloración a los films.
- Mediante la técnica de mapping y la microscopía electrónica de barrido (SEM) se pudo comprobar la presencia de nanopartículas metálicas en la estructura de los films al igual que las aglomeraciones producidas por la mezcla de las matrices para el caso de los films producidos sin microorganismo.
- A través de pruebas de esfuerzo aplicadas a todos los films impregnados, se pudo observar que la interacción entre las matrices originó una relación inversamente proporcional entre la tensión y la fuerza axial, haciendo que ciertas combinaciones de films sean más resistentes a las pruebas mecánicas, donde se obtuvo que la relación glucosa/almidón obtuvo valores entre 19 – 22 N y 5.1 – 6 % de tensión mientras que la relación HCC/almidón obtuvo entre 12 – 16 N de fuerza axial y entre 1 – 9 % de

tensión además para la mezcla entre agar/almidón obtuvo mejores resultados con valores entre 16,25 – 28 N de fuerza axial y entre 13,4 – 3,5 % de tensión.

- Mediante la aplicación de antibiogramas se evaluó la efectividad antibacteriana de los films debido a la presencia de halos de inhibición exclusivamente en films impregnados con plata. Por otro lado, los films sin impregnación no tuvieron ningún poder antibacteriano, además se constató la ineficiencia antibacteriana de las demás impregnaciones frente a ambos microorganismos.
- Estadísticamente se puede afirmar que los mejores tratamientos en la evaluación antibacteriana frente a *E. coli* son tratamientos de glucosa/almidón, glucosa/gelatina y HCC/carragenato grado comercial; mientras que en la evaluación realizada frente a *S. aureus* el mejor tratamiento fue la mezcla entre carragenato/almidón. Sin embargo, mediante un análisis visual se puede manifestar que frente a *E. coli* y *S. aureus* son las mezclas entre carragenato grado comercial/almidón y agar/carragenato grado comercial respectivamente.

4.2 RECOMENDACIONES

- Es necesario investigar sobre la adecuada proporción entre los diferentes tipos de carragenato tanto grado comercial como grado reactivo ya que, al diferir su pureza, las proporciones serán muy diferentes.
- Se recomienda utilizar otros componentes químicos con mayor concentración para mejorar la efectividad antibacteriana
- Se recomienda hacer un estudio previo del tamaño de las nanopartículas metálicas lo cual servirá para mejorar la impregnación en la estructura del film y por lo tanto la actividad antibacteriana.
- Se recomienda realizar una prueba de aplicación de los films que obtuvieron mejores características en un alimento con el fin de evaluar su efecto sobre el mismo además del tiempo de vida útil del alimento.

MATERIAL DE REFERENCIA

5.1 Referencias Bibliográficas

- Abdou, E., & Sorour, M. (2014). Preparation and characterization of starch/carrageenan edible films. *International Food Research Journal*, 21(1), 189–193.
- Aguilar, M. A., San Martín, E., Espinoza, N. L., Sánchez, M., Cruz, A., & Ramírez, M. E. (2012). Caracterización y aplicación de películas a base de gelatina-carboximetilcelulosa para la preservación de frutos de guayaba. *Superficies y Vacío*, 25(1), 1–7.
- Ali, A., Ambreen, S., Maqbool, Q., Naz, S., Shams, M. F., Ahmad, M., ... Zia, M. (2016). Zinc impregnated cellulose nanocomposites: Synthesis, characterization and applications. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 98, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2016.07.007>
- Ali, A., Haq, I. U., Akhtar, J., Sher, M., Ahmed, N., & Zia, M. (2016). Synthesis of Ag-NPs impregnated cellulose composite material: its possible role in wound healing and photocatalysis. *IET Nanobiotechnology*, 11(4), 477–484. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0086>
- Balasubramanian, D., Harper, L., Shopsis, B., & Torres, V. J. (2017). Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments. *Pathogens and Disease*, 75(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx005>
- Brandelli, A., Ritter, A. C., & Fonseca, F. (2017). Antimicrobial Activities of Metal Nanoparticles. *Metal Nanoparticles in Pharma*, 1–493. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-63790-7>
- Carreño Pineda, L. D., Caicedo Mesa, L. A., & Martínez Riascos, C. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 8(16), 307–335. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-

91652012000200012

- Cha, D. S., Choi, J. H., Chinnan, M. S., & Park, H. J. (2002). Antimicrobial films based on Na-alginate and κ -carrageenan. *LWT - Food Science and Technology*, *35*(8), 715–719. <https://doi.org/10.1006/fstl.2002.0928>
- Domínguez, M., & Jimenez, M. (2012). Películas comestibles formuladas con polisacáridos: propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, *6*(2), 110–121. Retrieved from mariaf.dominguezcy@udlap.mx
- Drobot, M., Grierosu, I., Radu, I., & Vasilescu, D. S. (2014). The effect of silver nanoparticles on the collagen secondary structure. *Key Engineering Materials*, *638*, 8–13. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.638.8>
- Elsupikhe, R. F., Shameli, K., Ahmad, M. B., Ibrahim, N. A., & Zainudin, N. (2015). Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentrations of κ -carrageenan. *Nanoscale Research Letters*, *10*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0916-1>
- García, V., Sendón, R., & Rodríguez, B. (2016). Antimicrobial Food Packaging Based on Biodegradable Materials. *Antimicrobial Food Packaging*, (Figure 1), 363–384. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00029-2>
- Golding, C. G., Lamboo, L. L., Beniac, D. R., & Booth, T. F. (2016). The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease. *Scientific Reports*, *6*(May), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep26516>
- Gullo, M., La China, S., Falcone, P. M., & Giudici, P. (2018). Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(16), 6885–6898. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9164-5>
- Heinze, T. (2015). *Cellulose: Structure and Properties*. https://doi.org/10.1007/12_2015_319
- Hermida, É. (2011). *Polímeros*. Retrieved from <http://www.inet.edu.ar/wp->

content/uploads/2012/11/09_Polimeros.pdf

- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). *Synthesis of Cellulose by Acetobacter xylinum*. 58, 345–352. <https://doi.org/10.1042/bj0580345>
- Lascombes, C., Agoda-Tandjawa, G., Boulenguer, P., Le Garnec, C., Gilles, M., Mauduit, S., ... Langendorff, V. (2017). Starch-carrageenan interactions in aqueous media: Role of each polysaccharide chemical and macromolecular characteristics. *Food Hydrocolloids*, 66, 176–189. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.025>
- Lavasani, P. S., Motevaseli, E., Shirzad, M., & Modarressi, M. H. (2017). Isolation and identification of komagataeibacter xylinus from Iranian traditional vinegars and molecular analyses. *Iranian Journal of Microbiology*, 9(6), 338–347.
- Lawton, J. W., & Fanta, G. F. (1994). Glycerol-plasticized films prepared from starch-poly(vinyl alcohol) mixtures: effect of poly(ethylene-co-acrylic acid). *Carbohydrate Polymers*, 23(4), 275–280. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90190-2](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90190-2)
- Lindh, M. (2007). Title : Role of Different Carbon Sources for Growth , Production and Community Composition of Bacterio- plankton. *Sciences, Applied Natural*, 23.
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., ... Che, C. M. (2007). Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(4), 527–534. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0208-z>
- Magro, M. (2017). *Elaboración de films de gelatina con nanopartículas de timol para la conservación de manzana* (Universidad de Oviedo). Retrieved from <http://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/43817>
- Malygin, A. (1998). *Effect of light on generation of colored silvercolloids in protein solutions*. Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117071, Russia.
- Maria, L. C. S., Santos, A. L. C., Oliveira, P. C., Valle, A. S. S., & Ribeiro, J. L. (2010). *Preparation and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Impregnated in*

Bacterial Cellulose. 20, 72–77.

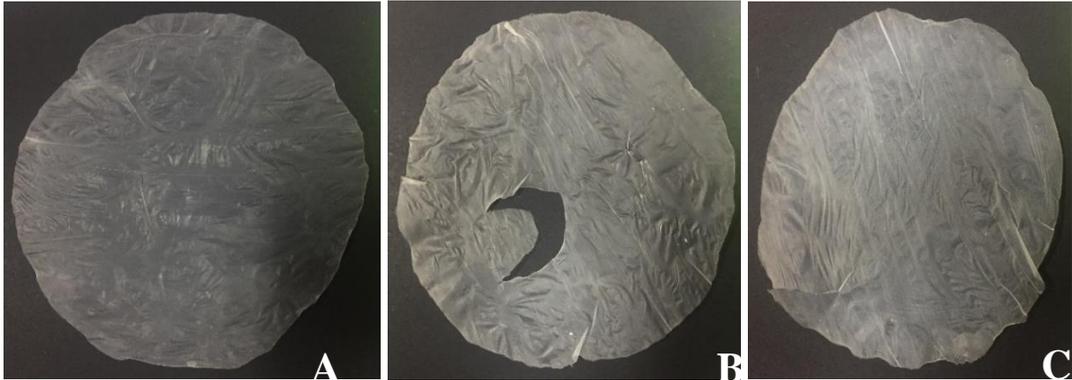
- Martins, J. T., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2013). Biocomposite Films Based on κ -Carrageenan/Locust Bean Gum Blends and Clays: Physical and Antimicrobial Properties. *Food and Bioprocess Technology*, 6(8), 2081–2092. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0851-4>
- Masmoudi, F., Bessadok, A., Dammak, M., Jaziri, M., & Ammar, E. (2016). Biodegradable packaging materials conception based on starch and polylactic acid (PLA) reinforced with cellulose. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(20), 20904–20914. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7276-y>
- Mirhosseini, M., Kheiri Hafshejani, B., Dashtestani, F., Hakimian, F., & Haghirosadat, B. F. (2018). Antibacterial activity of nickel and nickel hydroxide nanoparticles against multidrug resistance K. pneumonia and E. coli isolated urinary tract. *Nanomedicine Journal*, 5(1), 19–26. <https://doi.org/10.22038/nmj.2018.05.004>
- Mirjalili, F., & Yassini Ardekani, A. (2017). Preparation and characterization of starch film accompanied with ZnO nanoparticles. *Journal of Food Process Engineering*, 40(6). <https://doi.org/10.1111/jfpe.12561>
- Morales, M. A. (2011). *GENERALIDADES Y APLICACIÓN DE PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES EN LA CADENA HORTOFRUTÍCOLA*. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro.”
- Okiyama, D. C. G., Navarro, S. L. B., & Rodrigues, C. E. C. (2017). Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.007>
- Palacios, R. (2019). *Producción de biofilms a partir de Komagataeibacter xylinus, utilizando diferentes residuos agroindustriales*. 1(1), 1–65.
- Perumpuli, P. A. B. N., Watanabe, T., & Toyama, H. (2014). Identification and characterization of thermotolerant acetic acid bacteria strains isolated from coconut water vinegar in Sri Lanka. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 78(3), 533–

541. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.882758>

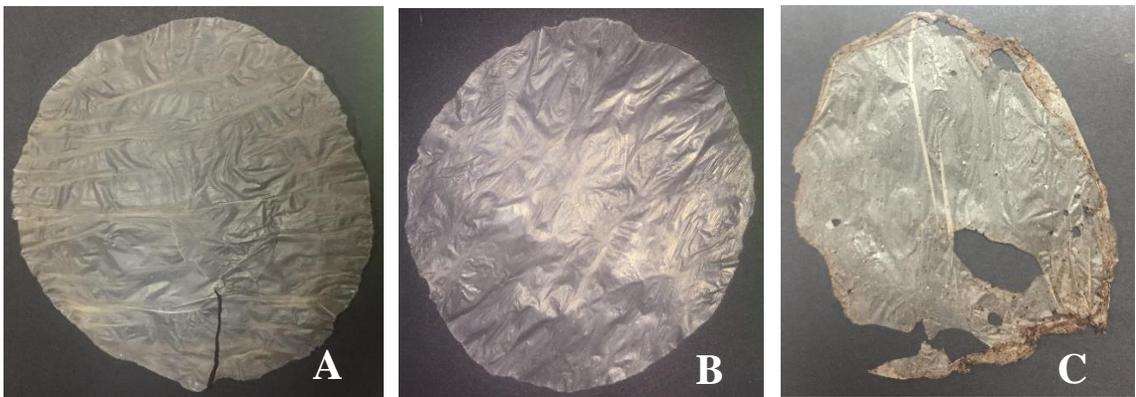
- Ramírez, C. (2012). La celulosa bacteriana: un mundo de nanoposibilidades. In *Revista Universidad Científica*. Retrieved from <https://revistas.upb.edu.co/index.php/universitas/article/viewFile/1582/1538>
- Redgwell, R., Trovato, V., Merinat, S., Curti, D., Hediger, S., & Manez, A. (2003). Dietary fibre in cocoa shell: Characterisation of component polysaccharides. *Food Chemistry*, *81*(1), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00385-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00385-0)
- Rivas, G., Cachile, M., & Francois, N. (2010). *Películas Formadas in Situ a Partir De Hidrogeles Biopoliméricos*. (1), 360–367.
- Salaheldin, H. I. (2018). Corrigendum: Optimizing the synthesis conditions of silver nanoparticles using corn starch and their catalytic reduction of 4-nitrophenol (Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology 9 (025013) DOI: 10.1088/2043-6254/aac4eb). *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, *9*(3). <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aac11>
- Sánchez, J. (2013). Evaluación energética de cáscaras de Cacao Nacional y CCN-51.
- Singhsa, P., Narain, R., & Manuspiya, H. (2018). Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. *Cellulose*, *25*(3), 1571–1581. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1699-1>
- Sousa, A. M. M., Sereno, A. M., Hilliou, L., & Gonçalves, M. P. (2010). Biodegradable agar extracted from *Gracilaria vermiculophylla*: Film properties and application to edible coating. *Materials Science Forum*, *636–637*, 739–744. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.636-637.739>
- System, E. A. (2018). La producción de cacao en Ecuador puede mejorar su calidad gracias a la ISO 2451. Retrieved from <https://www.acreditacion.gob.ec/cacao-en-ecuador-mejora-su-calidad/>
- Tabaïi, M. J., & Emtiazi, G. (2016). Comparison of bacterial cellulose production among

- different strains and fermented media. *Applied Food Biotechnology*, 3(1), 35–41. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i1.10582>
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Torres, C., Díaz, D. A., & Amaya, E. (2011). Biodegradability and mechanical properties of starch films from Andean crops. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(4), 603–606. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.01.026>
- Tye, Y. Y., Leh, C. P., Lai, T. K., Mohd Hafiidz, J., Banerjee, A., Syakir, M. I., ... Abdul Khalil, H. P. S. (2017). Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material. *Express Polymer Letters*, 11(4), 244–265. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2017.26>
- Vieira, M. G. A., Da Silva, M. A., Dos Santos, L. O., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>
- Villamizar, Y. L., Rodriguez, J. S., & León, L. C. (2017). Caracterización fisicoquímica , microbiológica y funcional de harina de cáscara de cacao (Theobroma cacao L .) variedad CCN-51 . 1 δ. *Cuaderno Activa*, (9), 65–75.
- Wu, Y., Geng, F., Chang, P. R., Yu, J., & Ma, X. (2009). Effect of agar on the microstructure and performance of potato starch film. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.031>
- Zarina, S., & Ahmad, I. (2015). Biodegradable composite films based on κ-carrageenan reinforced by cellulose nanocrystal from kenaf fibers. *BioResources*, 10(1), 256–271.

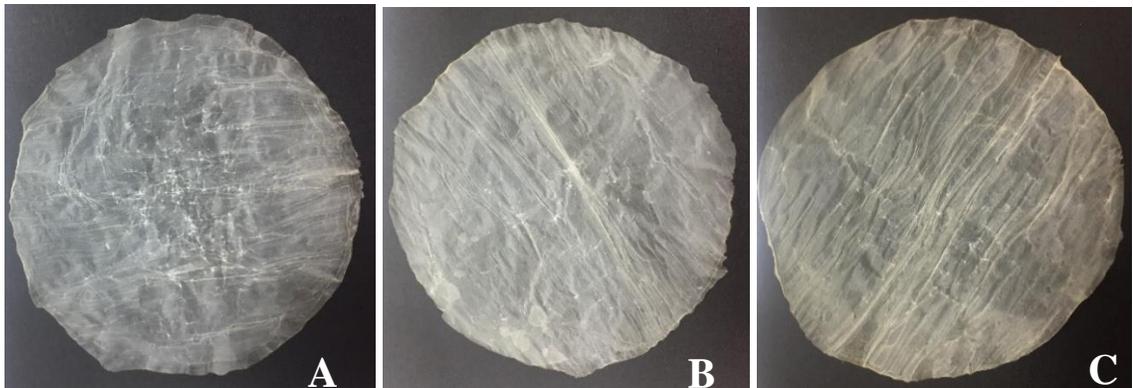
ANEXOS



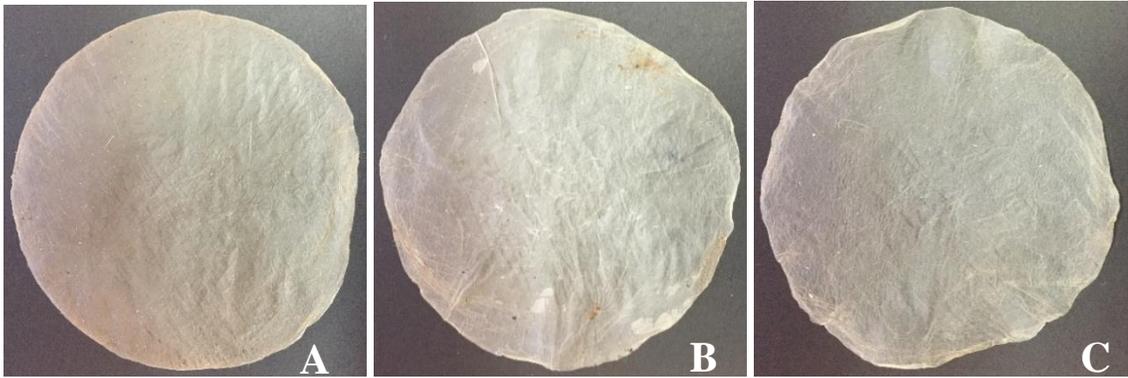
Anexo 1. Films de celulosa bacteriana producida con 30 ml de medio de cultivo H-S: (A) Glucosa/Almidón (B) Glucosa/Carragenato grado comercial (C) Glucosa/Gelatina.



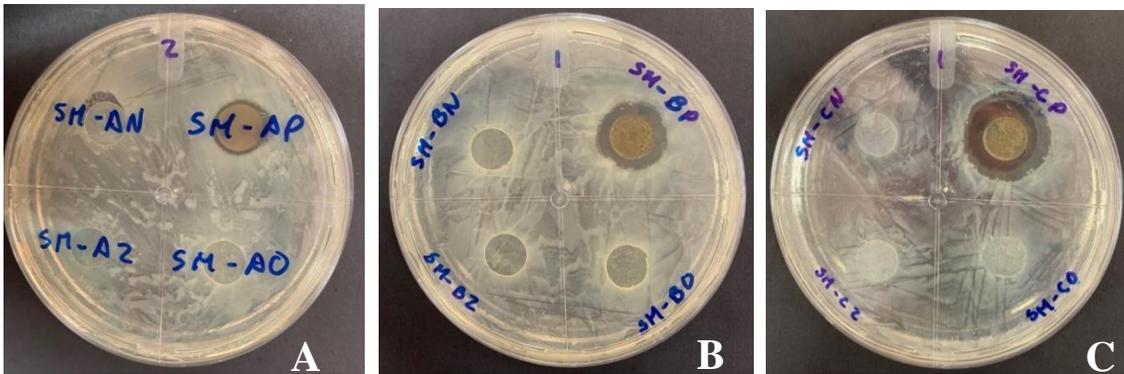
Anexo 2. Films de celulosa bacteriana producida con 30 ml de medio de cultivo H-S: (A) HCC/Almidón (B) HCC/Carragenato grado comercial (C) HCC/Gelatina.



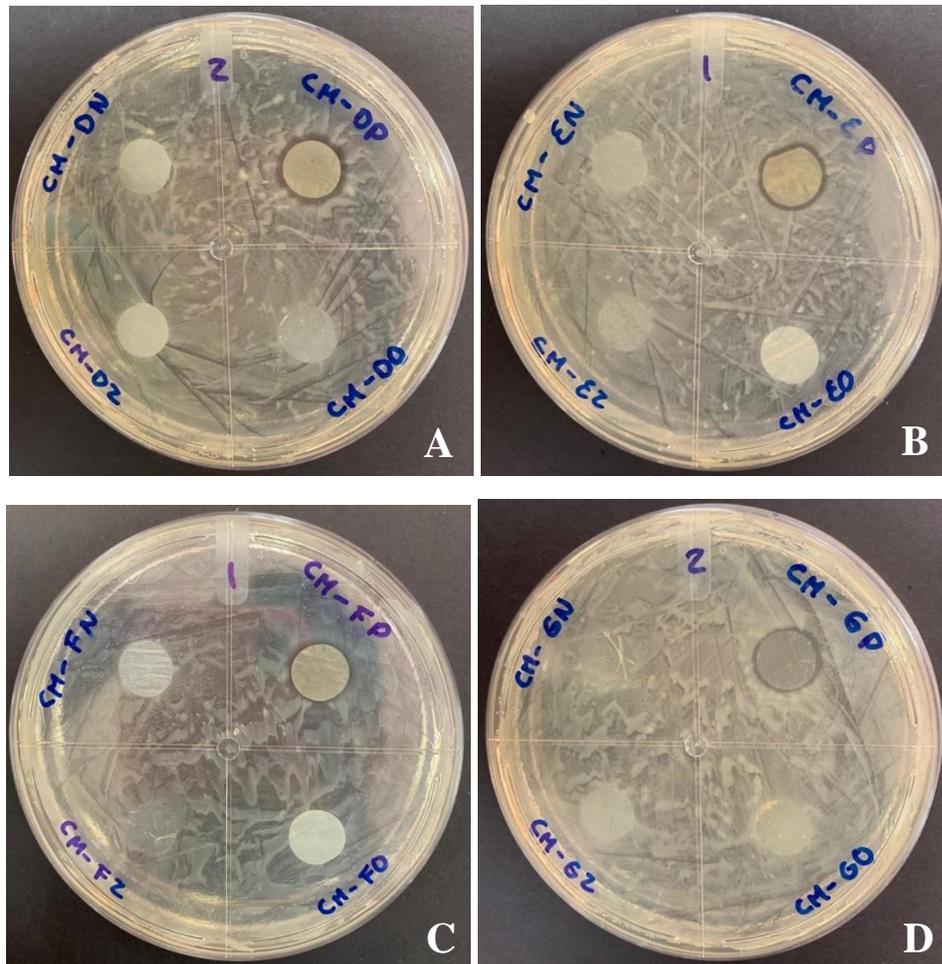
Anexo 3. Films de celulosa bacteriana producida con 50 ml de medio de cultivo H-S: (A) Glucosa/Almidón (B) Glucosa/Carragenato grado comercial (C) Glucosa/Gelatina.



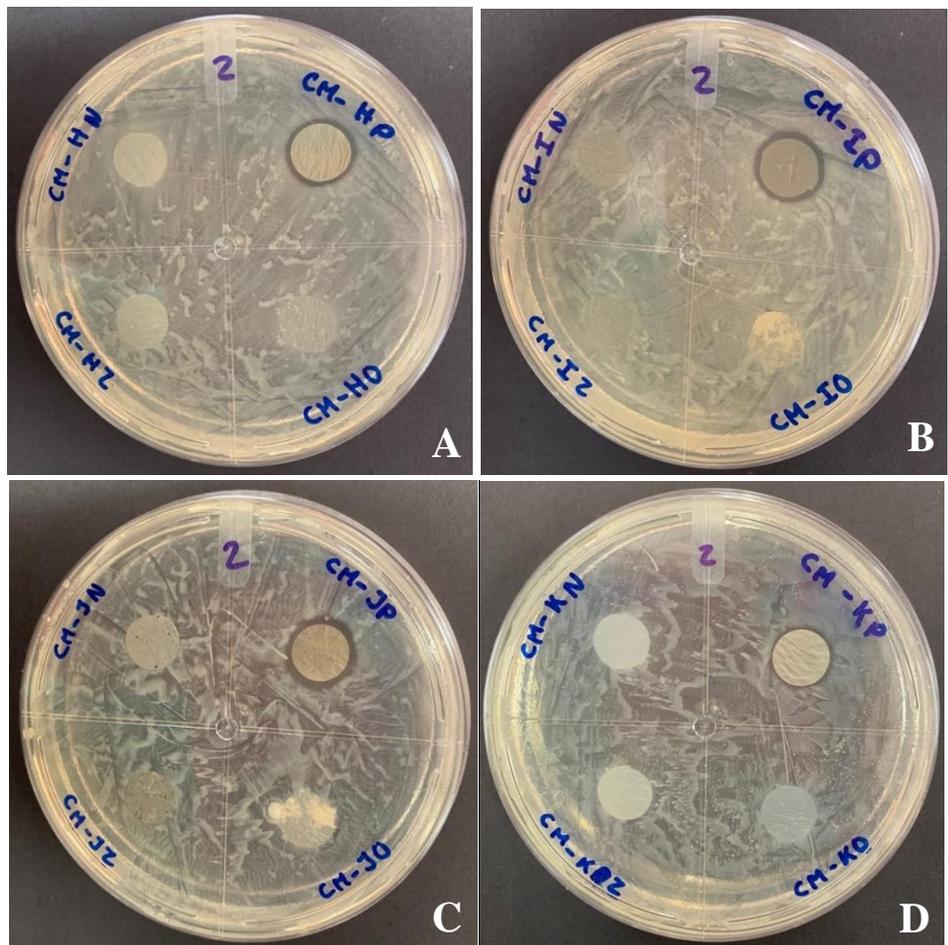
Anexo 4. Films de celulosa bacteriana producida con 50 ml de medio de cultivo H-S:
 (A) HCC/Almidón (B) HCC/Carragenato grado comercial (C) HCC/Gelatina.



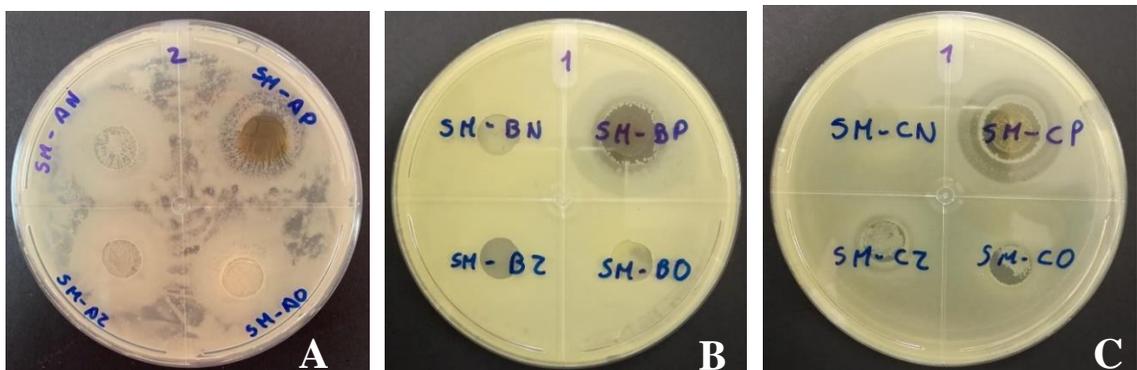
Anexo 5. Antibiogramas, films impregnados/sin microorganismo/evaluados en *E. coli*:
 (A) Agar/Almidón (B) Agar/Carragenato grado comercial (C) Carragenato/Almidón.



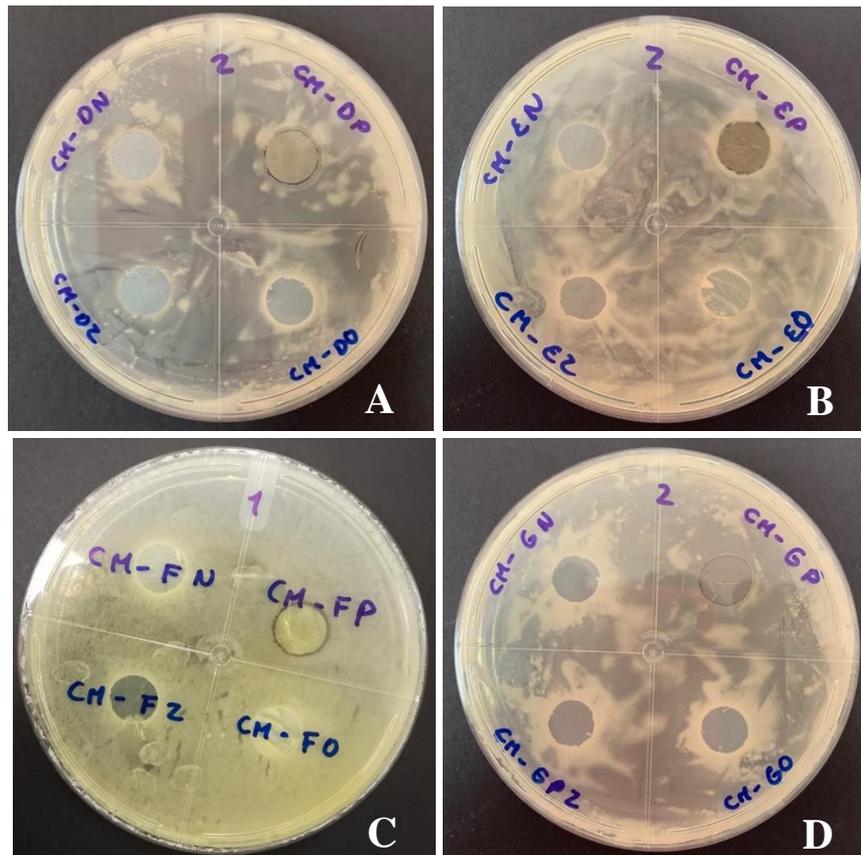
Anexo 6. Antibiogramas, films impregnados/celulosa bacteriana/evaluado en *E.coli*: (A) Glucosa/Almidón (B) Glucosa/Carragenato grado reactivo (C) Glucosa/Carragenato grado comercial (D) Glucosa/Gelatina.



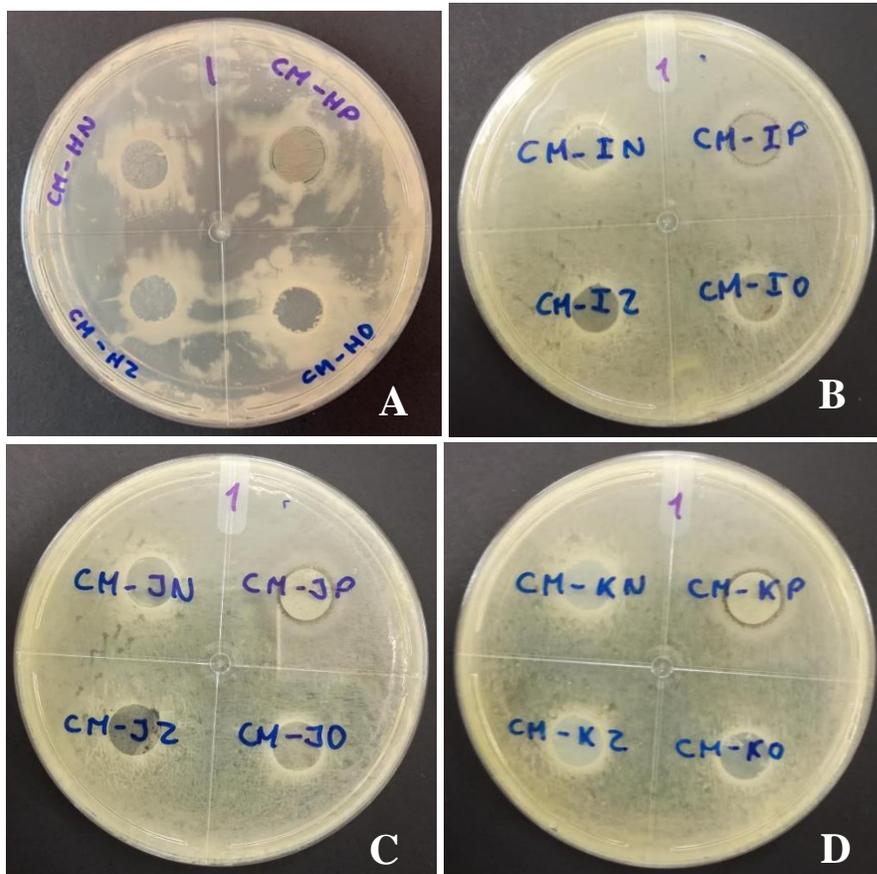
Anexo 7. Antibiogramas, films impregnados/celulosa bacteriana/evaluado en *E.coli*: (A) HCC/Almidón (B) HCC/Carragenato grado reactivo (C) HCC/Carragenato grado comercial (D) HCC/Gelatina.



Anexo 8. Antibiogramas, films impregnados/sin microorganismo/evaluados en *S. aureus*: (A) Agar/Almidón (B) Agar/Carragenato grado comercial (C) Carragenato/Almidón.



Anexo 9. Antibiogramas, films impregnados/celulosa bacteriana/evaluado en *S. aureus*:
 (A) Glucosa/Almidón (B) Glucosa/Carragenato grado reactivo (C) Glucosa/Carragenato grado comercial (D) Glucosa/Gelatina.



Anexo 10. Antibiogramas, films impregnados/celulosa bacteriana/evaluado en *S. aureus*:
 (A) HCC/Almidón (B) HCC/Carragenato grado reactivo (C) HCC/Carragenato grado comercial (D) HCC/Gelatina.

Combinación	Réplica	Halo (cm)	Halo con film (cm)
Control 1	1	0.246	1.74
Control 2	2	0.2	1.68
SM-AP	1	0.19	1.41
SM-AP	2	0.06	1.28
SM-BP	1	0.27	1.65
SM-BP	2	0.24	1.4
SM-CP	1	0.51	2.3
SM-CP	2	0.42	1.92
CM-DP	1	0.15	1.21
CM-DP	2	0.16	1.3
CM-EP	1	0.09	1.21
CM-EP	2	0.11	1.28
CM-FP	1	0.06	1.15
CM-FP	2	0.06	1.15
CM-GP	1	0.11	1.3
CM-GP	2	0.11	1.22
CM-HP	1	0.1	1.23
CM-HP	2	0.1	1.26
CM-IP	1	0.14	1.34
CM-IP	2	0.13	1.3
CM-JP	1	0.14	1.31
CM-JP	2	0.18	1.36
CM-KP	1	0.07	1.2
CM-KP	2	0.08	1.21

Anexo 11. Tamaño de halos de inhibición medidos en cultivos de *E. coli*.

Combinación	Réplica	Halo (cm)	Halo con film (cm)
Control 1	1	0.28	1.5
Control 2	2	0.14	1.33
SM-AP	1	0.4	1.92
SM-AP	2	0.54	1.8
SM-BP	1	0.224	1.42
SM-BP	2	0.17	2.01
SM-CP	1	0.28	1.5
SM-CP	2	0.14	1.33
CM-DP	1	0.05	1.16
CM-DP	2	0.06	1.17
CM-EP	1	0.07	1.12
CM-EP	2	0.06	1.1
CM-FP	1	0.1	1.19
CM-FP	2	0.2	1.21
CM-GP	1	0.05	1.13
CM-GP	2	0.07	1.13
CM-HP	1	0.04	1.1
CM-HP	2	0.06	1.09
CM-IP	1	0.07	1.14
CM-IP	2	0.06	1.1
CM-JP	1	0.01	1.23
CM-JP	2	0.06	1.17
CM-KP	1	0.01	1.24
CM-KP	2	0.13	1.29

Anexo 12. Tamaño de halos de inhibición medidos en cultivos de *S. aureus*.