

133  
201



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES ANTIBIÓTICOS  
EN LA COAGULACIÓN DE LA LECHE.**

**TESIS MANCOMUNADA**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
P R E S E N T A N

**FRANCISCO SANCHEZ ALARCON**  
**FERMIN CARRANZA VILCHIS**

**TESIS CON  
FOLIO DE ORIGEN**

México, D. F. 1990



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

|  | Pag. |
|--|------|
| INTRODUCCION.....                                      | 1    |
| CAPITULO I.-GENERALIDADES .....                        | 4    |
| CAPITULO II.-MATERIALES Y METODOS.....                 | 23   |
| CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSION                  |      |
| 3.1 CARACTERIZACION DE LA LECHE.....                   | 37   |
| 3.2 ACTIVIDAD DEL CUAJO.....                           | 38   |
| 3.3 SEGUIMIENTO DEL DESARROLLO DE LA CUA-<br>JADA..... | 39   |
| 3.4 CONSISTENCIA FINAL DE LA CUAJADA.....              | 51   |
| CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....     | 55   |
| BIBLIOGRAFIA .....                                     | 57   |
| APENDICE   |      |
| ANEXO I .....  | 66   |
| ANEXO II .....   | 74   |
| ANEXO III .....  | 77   |

## I N T R O D U C C I O N

### - Justificación

Uno de los principales productos de consumo diario es la leche, constituyéndose además en la materia prima fundamental para numerosos procesos tecnológicos. por lo tanto, es necesario que este producto presente excelentes condiciones sanitarias. Sin embargo, la realidad que se nos muestra no siempre es satisfactoria dados los deficientes sistemas de transportación, de manejo y de almacenamiento de la leche en la mayoría de los casos.

La legislación sanitaria mexicana de la leche señala que la presencia de antibióticos u otros compuestos bacteriostáticos se deben considerar como adulterantes (?), por lo que deben estar ausentes.

Los residuos de antibióticos presentes en la leche básicamente corresponden al resultado del tratamiento de la mastitis bovina, seguida de la venta del producto para su consumo sin

cubrir los periodos de eliminación recomendados para estos fármacos. Además, por ser la leche un producto altamente perecedero no es de extrañarse que se empleen diversos antibióticos, como agentes conservadores, aun en mínimas cantidades en el control del crecimiento de bacterias contaminantes.

En general los residuos de antibióticos presentes en la leche pueden ser la causa de varios problemas, siendo los mas serios los correspondientes al renglón de salud pública dada la respuesta de alergia manifestada en algunos consumidores o de la resistencia potencial que se va generando hacia estos fármacos. Otros problemas frecuentes se presentan a nivel industrial, como en el caso de una leche con trazas de antibióticos que podrían inhibir el crecimiento de los cultivos iniciadores afectando así el desarrollo adecuado de la acidez, el sabor y la textura de los diversos productos lácteos, repercutiendo en grandes pérdidas económicas, sobre todo en las industrias queseras y de fermentación láctica. Finalmente encontramos el problema relacionado a una posible interacción entre los componentes de la leche y los antibióticos que podrían afectar, parcial o totalmente, la formación de la cuajada durante la manufactura de quesos. También se ha observado una textura débil en las cuajadas que, en varias ocasiones, se ha ligado a la presencia de antibióticos.

- Objetivo

Con este estudio se pretende medir objetivamente la variación del comportamiento de la cuajada, desde el punto de vista textura, en la presencia de los principales tipos de antibióticos encontrados en la leche, adicionándolos *ex profeso* a un lote homogéneo de leche libre de antibióticos. Se contempla el establecimiento de la metodología para realizar el seguimiento del desarrollo de la cuajada, así como para medir, en cierta forma, el grado de firmeza alcanzado en cada condición de trabajo.

CAPITULO I  
GENERALIDADES

## I GENERALIDADES

### 1.1. Leche: definición y composición

La "leche de vaca" se ha definido como la secreción, excluyendo el calostro, que se puede obtener mediante los métodos normales de ordeño de la glándula mamaria lactante de vacas sanas, cuya finalidad en la naturaleza es la de servir de alimento exclusivo de sus crías jóvenes durante el periodo posterior a su nacimiento. (21,42) En contraposición a lo anterior encontramos que también es consumida por el hombre desde tiempos muy remotos.

La leche es una emulsión de materia grasa, en forma globular, en un líquido que presenta analogía con el plasma sanguíneo. A su vez este líquido representa una suspensión de proteínas (caseínas, lactoalbúmina, lactoglobulina, etc.) en un suero que contiene principalmente lactosa (azúcar de la leche) y sales minerales. Presenta además otros componentes menores en un número importante como por ejemplo: enzimas, vitaminas, nucleótidos, pigmentos, etc. (42)

La leche es un sistema fisicoquímico muy complejo en donde existe una gran interacción entre sus componentes para lograr

su estabilidad. Existen numerosos artículos referentes al estudio detallado de los componentes de la leche y seguramente

## CUADRO I

### COMPOSICION PROMEDIO DE LA LECHE DE VACA

| COMPONENTE | PORCENTAJE |
|------------|------------|
| Agua       | 87         |
| Grasa      | 3.5 - 3.7  |
| Lactosa    | 4.9        |
| Proteína   | 3.5        |
| Minerales  | 0.7        |

\* Walt (49)

también muchos trabajos de investigación aun no concluidos. La intención buscada en estos párrafos es sólo la de hacer más énfasis en las características fisicoquímicas de las caseínas, principal contenido protéico del queso y lugar en donde se lleva a cabo la coagulación por hidrólisis de un enlace peptídico particular resultando en la desestabilización del sistema micelar y la formación de la cuajada.

## 1.2 Caseínas

La principal proteína de la leche es la caseína, constituida por un 80 % del total, mientras que el 20 % remanente corresponde a las proteínas séricas lactoalbúmina y lactoglobulina. (cuadro 2)

### CUADRO 2

PRINCIPALES SUSTANCIAS NITROGENADAS  
EN LA LECHE DE VACA

|                         | PROPORCIONES RELATIVAS |     |
|-------------------------|------------------------|-----|
| Proteínas totales       | 100                    |     |
| Caseínas                | 78                     | 100 |
| $\alpha$ -caseína       |                        | 40  |
| $\beta$ -caseína        |                        | 30  |
| $\kappa$ -caseína       |                        | 15  |
| diversas                |                        | 15  |
| Proteínas suero         | 17                     | 100 |
| $\beta$ -lactoglobulina |                        | 50  |
| $\alpha$ -lactoalbúmina |                        | 22  |
| globulinas              |                        | 12  |
| proteosas-pepto-        |                        |     |
| nas                     |                        | 10  |
| sero-albúmina           |                        | 5   |

\* Alais C. (1)

Las caseínas son las proteínas de la leche más estudiadas y se definen por Whitney (50) como aquellas fosfoproteínas que precipitan de la leche por la acidificación a un pH de 4.6 a 20 °C. Existen al menos tres grupos de caseínas claramente definidos que son:  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína (clasificadas de acuerdo a su movilidad electroforética). Algunos autores reconocen como otro grupo a la  $\gamma$ -caseína, sin embargo generalmente se considera a estas proteínas como el resultado de una degradación o síntesis incompleta de la fracción  $\beta$ .

Estos grupos de caseínas forman entre sí complejos relativamente estables que, en presencia de calcio iónico, se reúnen para formar agregados heterogéneos llamados "micelas".

Una diferencia importante entre estas proteínas es su comportamiento frente al calcio: la  $\kappa$ -caseína se mantiene soluble en soluciones de calcio en las que precipitan todas las demás proteínas. La  $\kappa$ -caseína además estabiliza a las otras caseínas contra la precipitación por el calcio, por la formación de micelas coloidales en la leche fluida. Comparando su estructura con las otras caseínas encontramos que la  $\kappa$ -caseína presenta cadenas laterales de carbohidratos que, si además se toma en cuenta que también contiene residuos de cistina y una

proporción elevada de hidroxiaminoácidos, da como resultado una acumulación de grupos -OH hidrófilos explicando así su gran solubilidad.

La estabilidad micelar de las caseínas depende en gran parte del estado iónico que guarda el sistema, así por ejemplo, se ha encontrado que no se formarán micelas en ausencia de iones calcio, pero en altas concentraciones causan su precipitación (0.08-0.1 M). ( 1 ) Este efecto puede explicarse de la siguiente manera: la presencia de iones disminuye las interacciones de repulsión entre los monómeros de caseína, cargados negativamente, que forman la micela. ( 6,40 )

Las caseínas en general son muy reactivas debido a la gran cantidad de grupos polares libres que presentan (más de la mitad en la caseína entera) existiendo un notable exceso de grupos ácidos, por lo que se presentan en la leche como fosfocaseinatos ácidos de calcio.

La  $\alpha$ -caseína tiene un papel central en el fenómeno de la coagulación debido a que es el sustrato de ataque de la renina, enzima más usada para la elaboración de quesos.

### 1.3. El proceso de coagulación.

La coagulación de la leche básicamente corresponde a la desestabilización de la caseína micelar. Sin embargo al estudiar este fenómeno se encuentra que el resultado final puede ser debido a la suma de varios cambios en el sistema coloidal.(38) Este proceso se puede presentar por la adición o formación de ácido, o por hidrólisis enzimática, siendo esta última la característica en la producción de quesos.

La acidificación de la leche provoca la destrucción de las micelas sin fraccionar a la caseína entera, cuya precipitación es total hacia un pH de 4.7. Si la acidificación se desarrolla progresivamente en el medio, utilizando un cultivo bacteriano, se forma un coágulo homogéneo a causa de la fermentación láctica.( 1 )

La coagulación enzimática se lleva a cabo por la acción de enzimas proteolíticas en la que no intervienen modificaciones fisicoquímicas, como en el caso de la coagulación ácida, sino que existe una degradación de la propia proteína. Se han probado numerosas proteasas en la fabricación de queso, sin embargo la mayoría no son adecuadas ya que producen una excesiva hidrólisis de la proteína, lo que repercute en la calidad final del producto(23,40). Actualmente se emplea a la renina o quimosina [E.C.3.4.4.3], casi en forma exclusiva, en la manufactura

comercial de quesos bajo la forma llamada cuajo que se obtiene del abomasum de bovinos jóvenes. Las preparaciones del cuajo, sólidas o líquidas, que se usan comunmente presentan trazas de pepsina como impurezas, sin embargo se reportan niveles de 0-6 por ciento de actividad coagulante en la leche debida a la acción de esta enzima (1,21), por lo que se considera prácticamente que la mayor parte de la coagulación se debe a la renina.

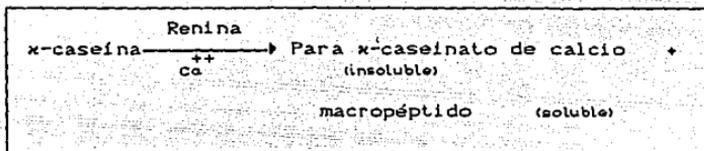
La coagulación de la leche por medio de la renina ocurre en dos fases: una fase primaria en que la enzima ataca a la  $\kappa$ -caseína en la unión de fenilalanina-105-metionina-106 lo que destruye su capacidad estabilizadora, y una fase secundaria no enzimática en la cuál el sistema desestabilizado de micelas modificadas coagula en la presencia de iones calcio. El fenómeno anterior es extremadamente dependiente de la temperatura, el pH y el balance iónico. (20) La cuajada que se genera está constituida por la fracción caseinato de la leche y la presencia de lactosa, proteínas del suero y la grasa es debida únicamente a un atrapamiento mecánico. (28)

Se ha sugerido una fase terciaria en la coagulación enzimática que consiste en una lenta y gradual hidrólisis de los componentes de la caseína que siguen a este proceso. Esto sin

embargo no es de gran importancia en los cambios totales mostrados. ( 38 )

FIG.1

ESQUEMA PROPUESTO PARA LA COAGULACION ENZIMATICA  
POR LA RENINA



La fase primaria o fase enzimática da como resultado la separación de la fracción hidrofílica soluble (macropéptido) de la fracción hidrofóbica insoluble (paracaseinato). La formación de la cuajada que sigue a la acción de la renina (fase secundaria) todavía es hasta la fecha poco entendida. Gran parte de este problema proviene de la confusión existente sobre la estructura micelar de las caseínas en la leche y los cambios que sufre durante la coagulación.

La separación de las dos fases de la coagulación es posible, ya que la primera fase puede llevarse a cabo a bajas temperaturas sin que ocurra la agregación de las partículas de caseína. Durante la segunda fase se da la agregación como un

efecto del incremento de la temperatura. Lo anterior es aplicable en el sistema de producción continua de queso. ( 5 )

#### 1.4 Antibióticos en la leche

El término antibiótico se refiere a una sustancia producida por un microorganismo o a un producto similar (creado total o parcialmente por síntesis química) el cual, en bajas concentraciones, inhibe el crecimiento de otros microorganismos. ( 19 )

En general las sustancias antibacterianas actúan mediante la interferencia hacia un metabolito esencial que toma parte *fundamental en la cadena de reacciones necesarias para el crecimiento del microorganismo.* Esta interferencia puede llevarse a cabo de tres formas:

- 1) por oxidación de alguna sustancia que requiere ser reducida,
- 2) por combinación molecular formando un producto inactivo, o
- 3) por la competencia de una enzima asociada hacia ese metabolito esencial. ( 13 )

La presencia de antibióticos puede ocasionar toxicidad y efectos nocivos sobre la salud pública, como resultado de los

residuos de estos fármacos en los productos de origen animal consumidos por el hombre, entre ellos la leche. Cierta número de medicamentos que se dan al ganado lechero en dosis terapéuticas pueden ser excretados en la forma de pequeñas cantidades durante periodos variables.

La mayoría de los antibióticos presentes en la leche soportan los tratamientos térmicos de pasteurización e inclusive la refrigeración y congelación. ( 2 ) No obstante se ha encontrado que algunos de estos fármacos en la leche pierden su poder bactericida en muestras almacenadas en refrigeración durante varios días, siendo más crítico para la penicilina. ( 28 47 )

Los antibióticos que más se usan para combatir la infección que aqueja al ganado lechero (mastitis) son la penicilina estreptomycin, dihidroestreptomycin, aureomicina (clorotetraciclina), tetraciclina y bacitracina. ( 46 ) Su administración se puede llevar a cabo mediante dos rutas: por infusión a través del canal de la ubre o bien por inyección intramuscular. Los residuos de antibióticos consecuentes a esta terapia se encuentran frecuentemente en la leche.

Las autoridades médicas han señalado a la penicilina, entre los antibióticos que pueden estar presentes en la leche, como

la principal causante de reacciones de alergia en la población sensible. ( 2 ) También fué la penicilina la primera de una serie de preparaciones antibacterianas empleada en la terapia de la mastitis en todo el mundo. Actualmente este antibiótico es el que más se usa debido a su efectividad en el control de *Streptococcus* y *Micrococcus*, microorganismos responsables de la mayoría de los casos de mastitis. ( 2 )

Velázquez *et al* (47) efectuaron un muestreo de residuos de antibióticos en leches consumidas en el área metropolitana de la Ciudad de México, reportando sus distribuciones por concentración, cuyos resultados se resumen en el cuadro 3.

### CUADRO 3

FRECUENCIAS Y NIVELES DE CONCENTRACION DE ANTI-BIOTICOS EN LECHE EN LA CIUDAD DE MEXICO.

| ANTIBIOTICO             | FRECUENCIA EN LAS MUESTRAS | NIVELES DE CONCENTRACION |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Penicilina [UI/ml]      | 60 %                       | 0.01 - 0.07              |
| Estreptomocina [mcg/ml] | 75 %                       | 0.10 - 0.46              |
| Tetraciclina [mcg/ml]   | 43 %                       | 0.10 - 0.38              |

\* Adaptado de Velázquez (47)

En un estudio similar se reportan niveles mayores para los

residuos de penicilina, encontrándose inclusive un valor promedio de 0.92 UI/ml. para leches clandestinas. (52)

#### CUADRO 4

NIVELES DE PENICILINA (UI/ml) ENCONTRADAS EN  
LECHES DE DIVERSAS CATEGORIAS SANITARIAS

| MINIMO | MAXIMO | PROMEDIO |
|--------|--------|----------|
| 0,04   | 5.0    | 0.425    |

• Zurita (52)

Existen pruebas de que el uso de algunos antibióticos como aditivos en la alimentación del ganado, poseen propiedades estimulantes que promueven su crecimiento, (44) pero numerosos estudios han indicado que la administración oral de estos medicamentos no contribuyen de manera significativa en los residuos encontrados en leche. ( 18,25,44 )

El mayor problema de las trazas de antibióticos presentes en la leche lo sufren las industrias que manufacturan alimentos derivados de la leche tales como la crema, yogurt, quesos, etc., ya que los antibióticos pueden inhibir el crecimiento de microorganismos iniciadores. Cantidades tan pequeñas como 0.05 UI de penicilina, pueden inhibir los cultivos de yogurt. ( 2 )

El mejor y más simple método para eliminar la presencia de cantidades detectables de antibióticos en leche consiste en realizar la separación del producto proveniente de las vacas en tratamiento de la recolección central. Con algunas excepciones, en general se recomienda eliminar la leche durante los tres días (72 hrs.) posteriores al tratamiento con antibióticos, ya que se ha establecido que el periodo de eliminación de estos fármacos en la leche varía de acuerdo a:

- 1) el tipo y concentración del antibiótico usado,
- 2) el estado de lactancia de la vaca,
- 3) la cantidad de leche producida y
- 4) la severidad de la infección. (27)

En México se señala que "la leche procedente de animales tratados con bacteriostáticos, bactericidas, hormonas o cualquier otra sustancia que pueda producir intoxicaciones, envenenamientos o alergias al ser humano, no podrá destinarse para el consumo público dentro de los periodos de eliminación que señalan los instructivos de la sustancia empleada". ( 8 )

También la restricción de la venta de antibióticos para el tratamiento de mastitis puede disminuir, en alguna forma, su uso inadecuado. Se han encontrado varias sustancias con capacidad de inactivar la penicilina presente en leche, pero no

tienen usos prácticos en virtud de su alta toxicidad. ( 2 ) Se han hecho ensayos con penicilinas que hidroliza a la penicilina hacia una forma inactiva (ácido penicilínico) pero su utilización resulta muy costosa a la vez que no ha sido contemplada su autorización por la legislación sanitaria.

### 1.5 Interacción proteínas-antibiótico.

Hasta ahora sólo se han estudiado las acciones moleculares de unos cuantos antibióticos encontrándose, casi de manera invariable, que toda la acción antibacteriana debe envolver la interacción del inhibidor con una macromolécula. Así por ejemplo, al estudiar la actividad de las penicilinas se encontró que algunas de ellas pueden unirse covalentemente a las proteínas de la membrana celular, aún cuando estas uniones no resulten siempre irreversibles. ( 13 )

Se sabe que las tetraciclinas forman enlaces con proteínas, DNA, polinucleótidos sintéticos, RNA de transferencia y con los ribosomas, y que únicamente aquel fármaco que se enlaza al ribosoma posee acción antimicrobiana. ( 13 ) También existen evidencias de que éste tipo de antibióticos interaccionan en forma general o con alguna fracción específica de las proteí-

nas lácteas. Por ejemplo tenemos que si se administran tetraciclinas oralmente son bien absorbidas en el tracto intestinal, sin embargo ésta absorción se afecta enormemente por los alimentos, particularmente si se trata de productos lácteos. (19) Martin y Harper (28), al dar una explicación sobre la pérdida de actividad de estos antibióticos con el tiempo, proponen que la descomposición de la leche origina grupos  $\text{NH}_2$  que pueden interaccionar con el fármaco, o bien existir una interacción directa de las tetraciclinas con la fase proteica total de la leche. (17)

Kohn (22) al estudiar el papel que desempeñan los iones metálicos divalentes en los enlaces formados entre tetraciclinas y proteína encontró que los cationes divalentes, como el  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Zn}^{++}$ , pueden actuar por enlace simultáneo entre las moléculas del antibiótico y sitios específicos de las macromoléculas, existiendo pocos enlaces, y en algunos casos ninguno, en la ausencia de estos cationes. También señala la existencia de una atracción electrostática de los quelatos tetraciclina-ion divalente dentro de la capa de hidratación de las macromoléculas. Finalmente propone la probabilidad de que estos iones metálicos sean los mediadores de este enlace, como un puente de conexión entre las proteínas y el antibiótico.

Al efectuar estudios instrumentales combinados, por ejemplo con la espectropolarimetría, para conocer la naturaleza de las interacciones proteína-antibiótico las lecturas generalmente se interpretan en términos del cambio de la conformación de las proteínas en el biopolímero, inducido éste como una consecuencia del enlace. (12.13)

Los juicios y evaluaciones sobre los diversos enlaces que se pueden formar al interaccionar los antibióticos con las proteínas se deben fundamentar en muchos trabajos de alta precisión, por lo que se manifiesta el gran desconocimiento que existe hasta la fecha respecto al tema.

#### 1.6 Reología de la cuajada

En la industria alimentaria es frecuente el estudio del comportamiento mecánico de diversos materiales y productos, utilizando procedimientos reológicos, que incluyen la medida de la deformación de los cuerpos aparentemente continuos y coherentes, o bien la fricción entre sólidos, el flujo de polvos e incluso la reducción a partículas. (29)

Durante la elaboración de quesos es necesaria la aprecia-

ción de las propiedades reológicas de la cuajada con la finalidad de determinar el punto en el que se alcanza la firmeza suficiente para llevar a cabo las operaciones de corte y desuerado de la manera más adecuada, lo que favorecerá enormemente, la textura final del producto.

El gel que se forma durante la coagulación de la leche se encuentra en un estado físico inestable, pudiendo producirse una sinéresis espontánea. En el momento de iniciarse la coagulación la cuajada es blanda y progresivamente va haciéndose más firme.

Las cuajadas que resultan ser muy blandas se desmenuzan al momento del corte, repercutiendo en un desuerado imperfecto, a la vez que hace disminuir el rendimiento quesero. ( 1 )

La composición química de la cuajada y su estructura determinarán en parte la estructura y textura final del queso, también puede afectarse, en cualquier variedad de queso, con una alteración de las materias primas usadas, por ejemplo con la adición de aditivos o la presencia de agentes contaminantes, así como en sus condiciones de manufactura. (26)

Frecuentemente se determina la firmeza deseada en la

cuajada por métodos tan subjetivos como apretarla con la mano o arrojarla al piso, ( 1,41 ) lo que no garantiza mucho su reproducibilidad, recomendándose el uso de métodos instrumentales reológicos.

Las medidas reológicas que se efectúan generalmente en una cuajada son dos: la tensión de la cuajada, asociada a la resistencia al corte, y la dureza o resistencia a la deformación. ( 1 ) Las mediciones de la tensión de la cuajada fueron originalmente usadas para seleccionar leches formadoras de cuajadas suaves, que se les consideraban de fácil asimilación y digestión. Pero cuando se hizo conocimiento de que las vacas con mastitis producían leche con esta característica se disminuyó la popularidad de este producto. Se ha demostrado con trabajos experimentales una franca independencia de la firmeza de la cuajada con su digestibilidad. (20) Ultimamente los métodos de la medición de la tensión de la cuajada se han utilizado, aparte del señalado para determinar el punto más conveniente de su corte, como prueba objetiva para ensayar la habilidad de algunas enzimas para ser usadas como sustitutos de la renina, aunque no se ha desarrollado todavía la evaluación ideal de estas enzimas proteolíticas como agentes viables en la elaboración de quesos. Lo único que está establecido es el uso de la renina como parámetro coagulante de comparación. ( 21, 37, 43, 51 )

La firmeza de la cuajada está influenciada por un delicado balance de numerosos factores que afectan la coagulación de la leche. Muchos de estos factores son aún desconocidos.

Los principales equipos que se emplean para la medición de la tensión de la cuajada, como control para el seguimiento del desarrollo de su estructura, son el Torsiómetro y el Trombelastógrafo. ( 51,37 ) Aún cuando también se trabaja con la medición continua y directa del Viscosímetro rotacional. (23,24,43 ) Otros equipos utilizados, por ejemplo para medir la firmeza en base a la fuerza requerida para sacar la cuajada a través de una celda de prueba o la energía requerida para comprimir ó cortar la cuajada, son los Texturómetros, siendo los de más aceptación el Instron Universal Testing Machine y el Ottawa Texture Measuring System (OTMS), entre otros. ( 24,41,48)

## CAPITULO II

# MATERIALES Y METODOS

## II MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Reactivos en general

- $H_2SO_4$  (Baker Analyzed'R.)
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (Baker An.R.)
- $Na_2SO_4$  (Química JVC)
- $NaOH$  (Baker An.R.)
- Zn polvo R. A.
- Ac. Tartárico (Merck)
- $K_2HPO_4$  (Monterrey)
- $KH_2PO_4$  (Monterrey)
- Eter etílico (Baker)
- Eter de petróleo (Baker)
- $NaCl$  Q.P.
- Ac. Picrico (Quím. JVC)
- Lactosa (Laitz)
- Fenolftaleína (T. Q.)
- Rojo de metilo (T. Q.)
- $Na_2CO_3$  (Baker An.R.)
- $CaCl_2$  (Baker An.R.)
- $NH_3OH$  (Baker An.R.)
- $CH_3CH_2OH$  98% (Baker)

### 2.2 Medios de cultivo

- a) Agar bilis rojo violeta (Merck).
- b) Agar papa dextrosa (Bioxón).
- c) Agar tripton extracto (Merck).
- d) Medio para antibióticos No.1 Grove & Randall (Agar para siembra) pH 6.6 (Bioxón).
- e) Medio para antibióticos No.2 Grove & Randall (Agar base) pH 6.6 (Bioxón).

- f) Medio para antibióticos No.5 Grove & Randall (Agar para siembra) pH 7.9 (Bioxón).
- g) Medio para antibióticos No.8 Grove & Randall (Agar para siembra) pH 5.7 (Bioxón).

### 2.3 Aparatos

- Viscosímetro Rotacional Brookfield Mod.LVT
- Baño "Colora" Ultra Thermostat.NB-35161.  $\pm 0.01$  °C.
- pH-Metro digital "Beckman"  $\phi$  41
- Fotocolorímetro "Espectronic 20 Bausch & Lomb"
- Estufa "Felisa" Equipar
- Mufla "Sybron Thermolyne"
- Thermobalanza digital "OHAUS MB 3011"
- Autoclave "Técnica Industrial"
- Centrifuga Clínica
- Parrilla-Agitador Magnético "Thermolyne Type 1000"

### 2.4 Microorganismos

Se utilizaron tres cepas bacterianas, las cuales se obtuvieron en el cepario del Departamento de Biología de la Facultad de Química:

- a) *Bacillus stearothermophilus* spp
- b) *Bacillus subtilis* ATCC-6633
- c) *Bacillus cereus* ATCC-11778

## 2.5 Antibióticos

Se emplearon tres tipos de antibióticos ya estandarizados y obtenidos de Química Hoechst de México, S.A. de C.V., División Farmacia con los siguientes títulos:

- a) Penicilina V potásica [1519.7 U.I./mg]\*
- b) Sulfato de estreptomina [981.7 mcg/mg]
- c) Clorhidrato de tetraciclina [983 mcg/mg]

## 2.6 Leche

Se trabajó con un lote homogéneo de leche descremada en polvo, elaborado por la Compañía Nestlé, S.A. de C.V., de la marca SVELTES<sup>MR</sup>.

### 2.6.1 Caracterización

#### 2.6.1.1 Análisis químico proximal

##### a) Humedad

Se determina por el método rápido de secado en termobalanza. (32)

##### b) Cenizas

Se determina por calcinación en mufla. (36)

##### b) Lactosa (30)

\* 1 UI de penicilina equivale a 0.6 mcg de penicilina  $\alpha$  sódica cristalina y pura (13)

**Procedimiento:**

Pesar 0.2 g de leche y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml. adicionados de 50 ml. de sol. sat. de ác. pícrico. Aforar con la misma solución, mezclar y filtrar a través de papel filtro. En un matraz Erlenmeyer de 125 ml. colocar 10 ml del filtrado más 10 ml de sol. sat. de ác. pícrico y 10 ml de la sol. de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 22%. En otro matraz hacer lo mismo que para la muestra, sólo que en lugar del filtrado adicionar 10 ml de sol. patrón de lactosa (1 mg/ml) en agua destilada. Mezclar los dos matraces simultáneamente y colocarlos en un baño maría en ebullición por 15- 25 min. Enfriar y transferir cuantitativamente a matraces aforados y aforar con agua destilada. Medir su D.O. a 520 nm.

$$\% \text{ lactosa} = \frac{\text{A de la muestra}}{\text{A del testigo}} \times 5$$

c) Grasa

Se basa en el método de Mojonnier para la determinación de grasa en leche en polvo. (33)

d) Nitrógeno total (36)

Se basa en el procedimiento macrokjeldalh. Para la conversión de nitrógeno a proteínas se emplea el factor  $F = 6.38$ .

### 2.6.1.2 Análisis microbiológico

- a) Cuenta de bacterias mesófilas aeróbias. (34)
- b) Cuenta de organismos coliformes. (35)
- c) Cuenta de hongos y levaduras. (11)

### 2.6.1.3 Determinación de residuos de antibióticos. ( 10,38 )

Se emplea el método microbiológico de cilindro en placa.

#### a) Valoración de residuos de penicilina

Procedimiento:

##### \* preparación del inóculo:

Un cultivo de *B. stearothermophilus* mantenido en agar inclinado de soya tripticase se inocula en 150 ml de caldo soya tripticase dentro de un matraz Erlenmeyer de 300 ml. (por triplicado) y se incuba a 55 - 64 °C hasta una suficiente esporulación (aprox. 72 hrs.). Posteriormente centrifugar 15 min a 2000 rpm. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en solución salina fisiológica. Recentrifugar dos veces más e ir decantando el sobrenadante. Finalmente suspender las células en 30 ml de sol. salina y almacenarlas a 4 °C.

##### \* Preparación solución estándar de penicilina

Se prepara una solución patrón de penicilina con una

concentración final de 1000 UI/ml en solución amortiguadora de fosfatos pH 6. (10)

\* Preparación de la solución patrón de leche con y sin antibiótico.

Se pesan 10 g de leche y se le adicionan 30 ml de solución amortiguadora de fosfatos al 1% pH 6. Posteriormente calentarla a 82 °C e inmediatamente enfriar en un baño agua-hielo. Una parte de esta solución se fracciona para ser utilizada como diluyente de la solución de antibiótico a las concentraciones de: 0.01, 0.025 y 0.05 UI/ml.

\* Preparación de las placas

Inocular en 100 ml del medio de Grove & Randall No.1 a 55°C con la suspensión de esporas del microorganismo en una cantidad de 0.5 a 1.0 ml. Vaciar 8 ml del agar inoculado en cajas de Petri y dejar solidificar. Colocar cuidadosamente los discos de papel impregnados con las soluciones de leche a las diferentes concentraciones de antibiótico juntos con los de la muestra (tres de cada dilución junto con tres de la muestra estándar en cada caso). Se invierten las cajas y se incuban a 64°C de 3 a 4 hrs. hasta que aparezcan claras las posibles zonas de inhibición alrededor de los discos que contienen penicilina.

b) Valoración de los residuos de tetraciclina y estreptomycinina

Procedimiento:

\* Preparación de los inóculos

Con las cepas de *B. cereus* y *B. subtilis* se hacen cultivos, por separado, de 24 hrs. en tubos inclinados con medio No.1, se resiembran en botellas de Roux con 250 ml del mismo medio y se cultivan durante 24 hrs. a 35 - 37 °C. Se recolectan con 50 ml de solución fisiológica. Seguidamente son calentadas durante 30 min. a 70°C con el objeto de producir esporulación. Se centrifugan a 1500 rpm durante 3 min. Se decantan los sobrenadantes y se recentrifugan dos veces más. Finalmente se resuspenden en 30 ml de solución fisiológica (suspensión madre de esporas) y se almacenan a 4°C.

\* Preparación de la soluciones estándar de antibióticos

Se prepara una solución de clorhidrato de tetraciclina en una solución amortiguadora de fosfato monobásico pH 4.5 a una concentración de 1000 mcg/ml y una de sulfato de estreptomycinina en solución amortiguadora de pH 8.0 a una concentración de 1000 mcg/ml.

\* Preparación de la solución estándar de leche

La solución de referencia de leche sin antibiótico se

prepara igual que en el caso de la penicilina. Tanto para las soluciones estándares de tetraciclina como para las de estreptomicina, se preparan las siguientes diluciones en leche: 0.025, 0.05 y 0.1.

\* Preparación de las placas

Para el ensayo de la tetraciclina se emplea el medio comercial para antibióticos No. 8 como agar base para el medio de inóculo (siembra) del *B. Cereus*, mientras que se usa el medio para antibiótico No. 5 para el de *B. subtilis*. El agar de inóculo se prepara con el medio para antibióticos No. 1, para ambos casos, inoculando en 100 ml a 50°C de 0.5 a 1.0 ml de la suspensión madre de esporas correspondiente. El medio de cultivo base se prepara el mismo día de la prueba y se vacían aproximadamente 21 ml en cada caja de Petri. Una vez solidificado el medio anterior se añaden 4 ml del medio de siembra ya inoculado. El medio se deja solidificar y se colocan en la superficie los penicilindros dentro de los cuales se añaden tanto las muestras de leche estándar sin antibiótico como los de las diluciones con antibiótico (se hace por triplicado en cada caso). Se incuban durante 24 hrs, de 35 a 37 °C y se procede a medir los halos de inhibición.

## 2.6.2 Reconstitución de la leche

### Procedimiento:

Se pesan 12 g de leche descremada en polvo y se mezclan con 84 ml de una solución 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 10 ml de agua desionizada, logrando así 100 ml de leche reconstituida. Se agita la leche aproximadamente 20 minutos para asegurar una completa disolución del polvo. Finalmente se mantiene en refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ) por espacio de una hora. ( 3 )

## 2.7 Cuajo

Se trabajó con un cuajo líquido elaborado por industrias CUAMEX, S.A. de C.V. y con un título de actividad rotulado en la etiqueta de 1:10,000.

### 2.7.1 Actividad del cuajo

Se estandarizó de acuerdo al método de la visualización de la aparición de los aglomerados de caseína. ( 1.30 )

### Procedimiento:

En un tubo de ensaye colocar 2 a 3 ml de agua destilada y adicionarle 1 ml del cuajo líquido. Calentar en baño maría a  $35^\circ\text{C}$  100 ml de leche a los que se le añaden toda la solución de cuajo preparada y agitar la leche por un momento. A partir del momento en que se añadió la solución del cuajo, comenzar a

contar el tiempo. Con un agitador se desliza suavemente la leche por las paredes del recipiente y observar la aparición de los aglomerados de caseína, momento en el cual se deja de contar el tiempo.

$$\text{Fuerza (F) cuajo líquido} = \frac{100 \text{ ml} \times 2400}{1 \text{ ml} \times t}$$

t = tiempo [s] transcurrido hasta la aparición de los copos caseosos

## 2.8 Seguimiento del desarrollo de la cuajada

### 2.8.1 Método viscosimétrico

Se emplea el viscosímetro rotacional Brookfield modelo LVT para el seguimiento continuo del desarrollo de la cuajada en función del tiempo.

Procedimiento:

a) Pipetear 1.2 ml del cuajo líquido homogéneo y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con agua desionizada. La solución anterior de renina se prepara momentos antes de llevar a cabo la prueba de coagulación.

b) Adicionar en un vaso Berzelliuss de 250 ml un volumen de 150 ml de leche reconstituida como se indica en 2.2.2 tanto para las muestras "blanco" (libres de antibiótico), como las adicionadas con el antibiótico respectivo a las diferentes concentraciones. Colocar el recipiente en el baño de temperatura controlada a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ , temperatura que se mantendrá durante todo el procedimiento.

c) Una vez alcanzada la temperatura referida, adicionar la solución enzimática en una relación del 5% v/v con respecto al volumen de leche, agitar vigorosamente a fin de lograr una distribución homogénea en toda la muestra. Comenzar a contar el tiempo posteriormente a la adición de la solución enzimática.

d) Inmediatamente después introducir la aguja No.1 del viscosímetro y ponerla a girar a 30 rpm.

e) Registrar los cambios de viscosidad que se presenten tomando una lectura en intervalos de 4 segundos.

f) Repetir tres veces el ensayo para cada condición.

Calcular la precisión del método realizando cinco veces el seguimiento del desarrollo de la viscosidad con muestras blanco, según el método descrito.

g) Las lecturas en la escala se pueden convertir a Centipoises (Cp) multiplicándolas por el factor 2.0, el cual se encuentra registrado en las tablas de factores ("Factor Finder") del aparato respectivo.

h) Graficar linealmente los cambios de viscosidad con respecto al tiempo.

### 2.8.2 Metodo consistométrico

El método desarrollado se refiere a la medición de la consistencia o "cuerpo" logrado por la cuajada en función del tiempo. Se basa en la plomada de Hilker-Guthrie. ( 4 )

#### Fundamento:

Un cuerpo cónico de peso constante se sitúa a una determinada altura sobre la superficie de la muestra y se deja caer libremente sobre la misma. El grado de penetración de la plomada después de un tiempo dado depende directamente de la consistencia que presente la muestra.

#### Procedimiento:

Las pruebas se realizan por triplicado.

a) Efectuar los pasos a, b y c del punto 2.8.1, pero en vez de utilizar 150 ml se trabaja con 200 ml de leche que se

distribuirán en tubos de ensayo de 22 X 175 mm a razón de 40 ml en cada uno colocados en el mismo baño maría.

b) Se sitúa una aguja cónica de material plástico de polietileno duro de 5.12 g de peso (fig. 2. A) a una altura de 4 cm sobre la superficie de la muestra.

c) Dejar caer libremente la aguja anterior sobre la muestra y leer, en la escala marcada, la parte que se introduce después de 15 segundos (fig. 2. B).

d) El procedimiento anterior se realiza en muestras diferentes a intervalos secuenciales de 5 min cada uno.

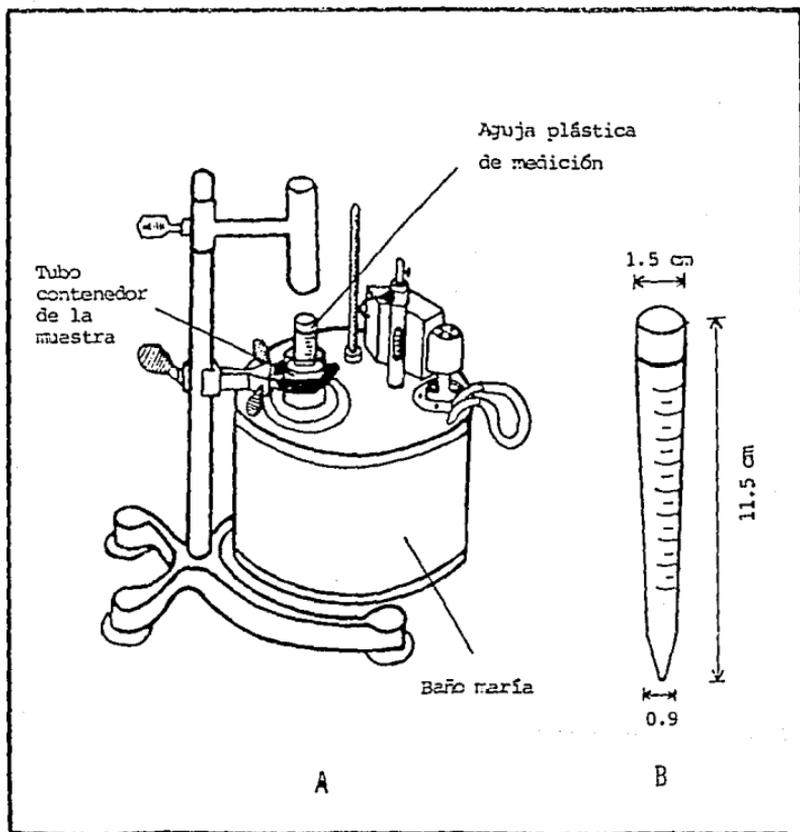
e) Graficar la distancia penetrada con respecto al tiempo.

## 2.9 Determinación de la consistencia final de la cuajada.

El procedimiento en este punto es similar al utilizado en el seguimiento del desarrollo de la cuajada por el método consistométrico (2.8.2), pero realizando todas las mediciones a los 50 min posteriores de la adición de la solución enzimática, tiempo promedio encontrado en el cual se alcanza la consistencia máxima de acuerdo a las lecturas obtenidas en el punto 2.8.2.

FIG.2

EQUIPO UTILIZADO PARA MEDIR LA CONSISTENCIA DE LA CUAJADA A.- APARATO COMPLETO MOSTRANDO LA AGUJA DENTRO DE UNA MUESTRA B.- AGUJA DE MEDICION CON LA ESCALA GRADUADA



## CAPITULO III

# RESULTADOS Y DISCUSION

### III RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 Caracterización de la leche

Los resultados de los análisis químico proximal, microbiológico y de la determinación de antibióticos se resumen en los cuadros 5, 6 y 7 respectivamente.

CUADRO 5

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LOS MACROCOMPONENTES EN LA LECHE EN POLVO DEL LOTE EMPLEADO

| COMPONENTE | PORCENTAJE |
|------------|------------|
| Lactosa    | 51.42      |
| Proteína   | 34.89      |
| Cenizas    | 8.02       |
| Humedad    | 4.20       |
| Grasa      | 1.51       |

CUADRO 6

RESULTADO DEL ANALISIS MICROBIOLÓGICO DEL LOTE DE LECHE COMPARADOS CON LA NOM RESPECTIVA

| Cuenta Bacteriana           | Colonias Presentes        | Límites NOM |
|-----------------------------|---------------------------|-------------|
| Mesófilos aeróbios<br>Col/g | 50<br>(no representativa) | 10,000      |
| Hongos y levaduras<br>Col/g | Negativa                  | Negativa    |
| Cuenta coliformes<br>Col/g  | Negativa                  | 10          |

## CUADRO 7

DETECCION DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN EL  
LOTE DE LECHE EN POLVO

| ANTIBIOTICO                               | CONCENTRACION | REFERENCIA <sup>†</sup> |
|---|---------------|-------------------------|
| Penicilina V Potásica<br>(UI/ml)          | $\leq 0.005$  | 0.1-0.07                |
| Clorhidrato de Tetra-<br>ciclina (mcg/ml) | $\leq 0.1$    | 0.10-0.46               |
| Sulfato de Estrepto-<br>micina (mcg/ml)   | $\leq 0.05$   | 0.1-0.36                |

† Valdézquez (47)

Se puede establecer, según los resultados obtenidos, que el lote de leche analizado presenta una composición media característica y una excelente calidad microbiológica conforme a la NOM para leche en polvo. (31) Con respecto a la presencia de antibióticos, no es posible detectarlos a concentraciones menores o iguales que las reportadas en el cuadro 7, ya que estas cantidades, corresponden a la sensibilidad del método empleado.

### 3.2 Actividad del cuajo

Al emplear el método de los aglomerados de caseína, se estableció un valor de actividad para el cuajo líquido de:

$$F = 4363.63 \text{ U}$$

El valor anterior resulta característico de los cuajos líquidos comerciales. ( 1 )

### 3.3 Seguimiento del desarrollo de la cuajada

#### 3.3.1 Método viscosimétrico

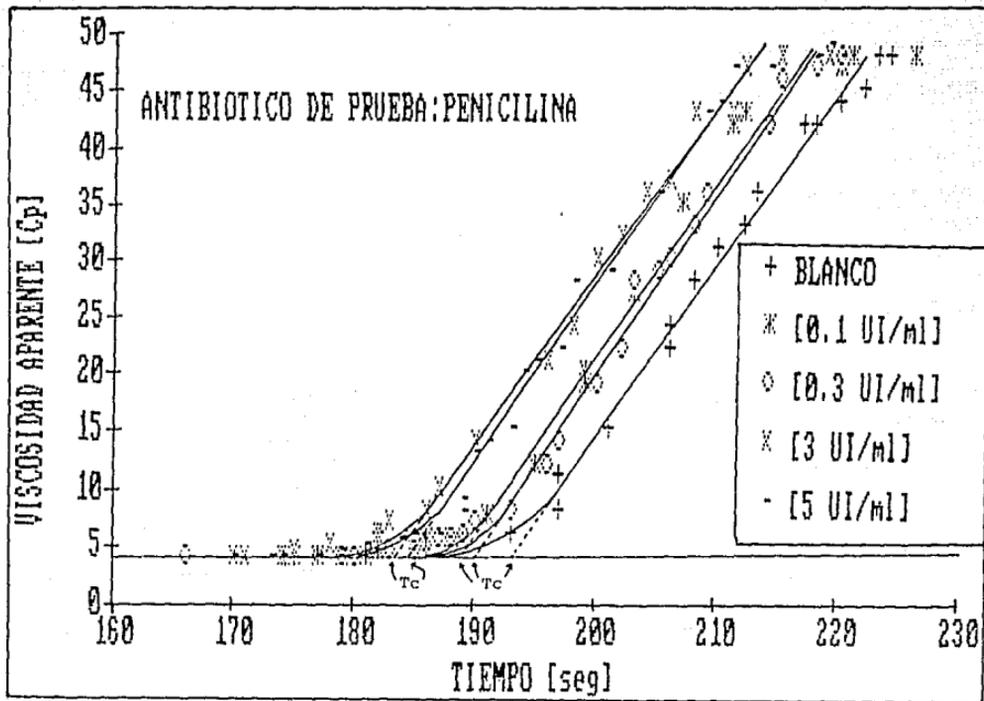
Al observar los resultados obtenidos de la viscosidad aparente en función del tiempo (gráficas 1,2 y 3) se encuentra un patrón característico: una línea base con valor de viscosidad constante, seguida de una pequeña curvatura en la zona inicial de transición, para finalmente presentar un incremento lineal de la viscosidad cuando se está llevando a cabo la coagulación. Esta última línea recta ascendente se obtuvo mediante procedimiento matemático de regresión lineal con los puntos experimentales en cada caso. Al prolongar la línea ascendente (línea punteada en las gráficas 1,2 y 3) hasta la intersección con la línea base de valor constante, permite definir gráficamente un parámetro de comparación. Este punto de cruce de las dos líneas rectas ( $T_c$ ) representa relativamente al tiempo inicial de la coagulación.

Al calcular la precisión del método con las muestras libres de antibióticos (blancos), se encontró un  $T_c$  promedio de 196.5215 seg. y con una desviación estandar de 2.6397 seg.

En el cuadro 8 se resumen los tiempos iniciales de

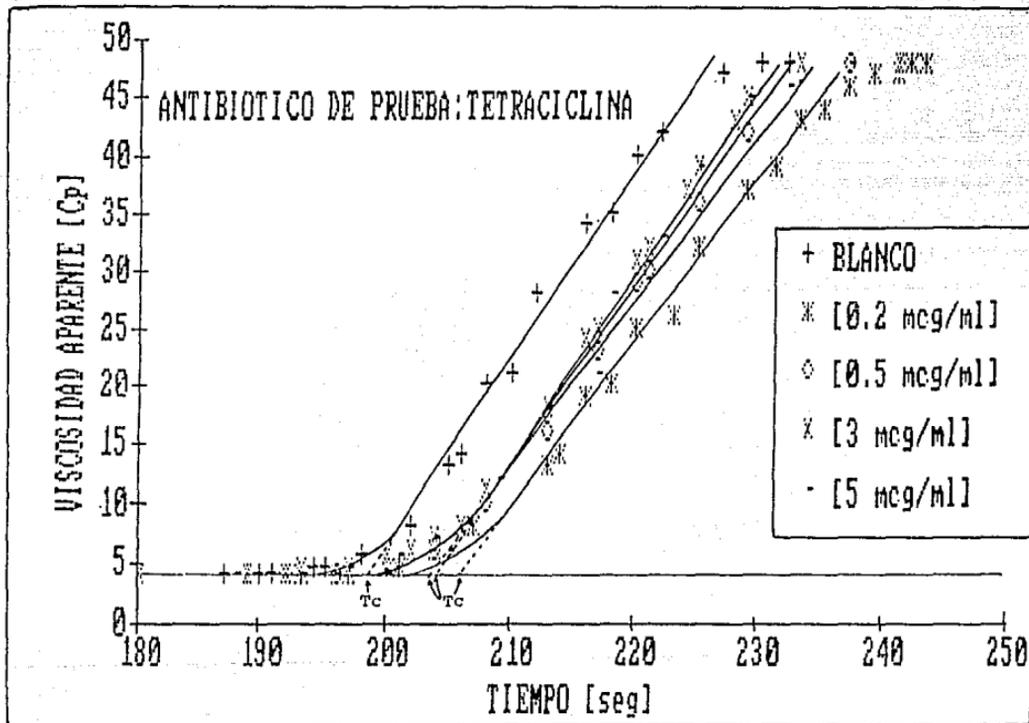
# GRAFICA I

SEGUIMIENTO VISCOSIMETRICO DEL DESARROLLO DE LA CUAJADA  
 EN PRESENCIA DE PENICILINA Y POTASICA  
 (  $T_c$  = TIEMPO INICIAL DE COAGULACION )



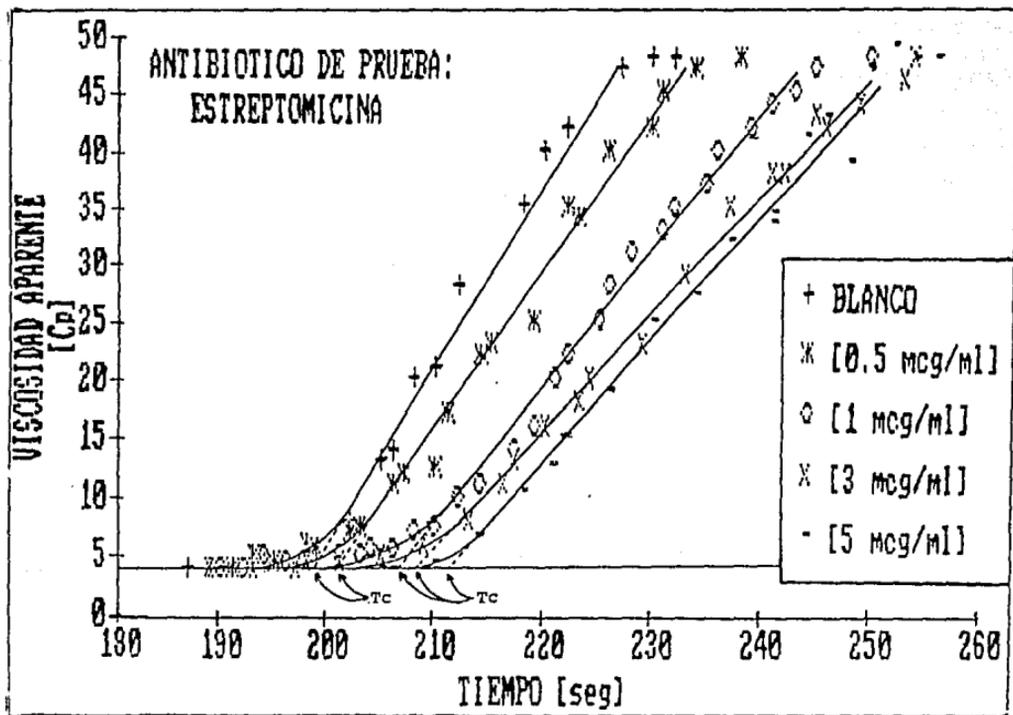
## GRAFICA 2

SEGUIMIENTO VISCOSIMETRICO DEL DESARROLLO DE LA CUAJADA  
 EN PRESENCIA DE CLORHIDRATO DE TETRACICLINA  
 (  $T_c$  = TIEMPO INICIAL DE COAGULACION )



GRAFICA 3

SEGUIMIENTO VISCOSIMETRICO DEL DESARROLLO DE LA CUAJADA  
 EN PRESENCIA DE SULFATO DE ESTREPTOMICINA  
 (  $T_c$  = TIEMPO INICIAL DE COAGULACION )



la coagulación (Tc) encontrados gráficamente para cada caso, así como las diferencias que guardan estos valores con respecto al Tc promedio de los blancos. Esta diferencia se representa como  $\Delta Tc$ , donde  $\Delta Tc = Tc \text{ muestra} - Tc \text{ promedio blancos}$

Las pruebas realizadas con las muestras conteniendo los diversos fármacos presentaron un desfase en el valor de Tc. Así los ensayos con penicilina aparentaron una coagulación

### CUADRO 8

COMPARACION DE Tc (TIEMPO INICIAL DE COAGULACION) DE CADA ANTIBIOTICO A SUS DIFERENTES CONCENTRACIONES CON RESPECTO AL BLANCO PROMDIO

| ANTIBIOTICO                | CONC. | Tc (S) | $\Delta Tc^*$ |
|----------------------------|-------|--------|---------------|
| Penicilina<br>(UI/ml)      | 0.1   | 188.63 | -7.90         |
|                            | 0.3   | 190.71 | -5.81         |
|                            | 3.0   | 183.07 | -13.45        |
|                            | 5.0   | 185.02 | -11.50        |
| Tetraciclina<br>(mcg/ml)   | 0.2   | 206.14 | 9.62          |
|                            | 0.5   | 203.62 | 7.09          |
|                            | 3.0   | 203.99 | 7.47          |
|                            | 5.0   | 203.36 | 6.84          |
| Estreptomicina<br>(mcg/ml) | 0.5   | 201.65 | 5.14          |
|                            | 1.0   | 207.13 | 10.61         |
|                            | 3.0   | 208.85 | 12.33         |
|                            | 5.0   | 213.81 | 17.29         |

\*  $\Delta Tc = Tc \text{ muestra} - Tc \text{ blanco prom.}$

anticipada en todos los casos.No obstante,al realizar un análisis estadístico en base a la prueba de Rango(40) sobre los puntos experimentales del blanco junto con los correspondientes a las concentraciones bajas de este fármaco (Anexo III), se encontró que no existe diferencia entre éstos puntos a una confiabilidad del 95%,mientras que si se manifestó una diferencia entre muestras con penicilina en altas concentraciones y el blanco. En el caso de las muestras con tetraciclina y estreptomocina se encontró un retraso en los tiempos iniciales de coagulación,siendo más drástico para la estreptomocina que se retardaron más al aumentar la concentración del antibiótico. lo que supone un aumento de viscosidad más lento y por consiguiente un desarrollo más retardado de la cuajada.

Cuando se adicionó tetraciclina,como ya se mencionó, se presentó un tiempo inicial de coagulación más retardado,pero que en este caso se mantuvo un Tc similar en todos los ensayos a pesar de adiciones mayores del antibiótico.

Al efectuar un análisis estadístico en base a la prueba de rango (Anexo III),no se encontró diferencia significativa entre las muestras con diferentes concentraciones de tetraciclina,pero sí se manifestó una diferencia significativa entre las muestras con antibiótico y la muestra blanco.

Para el caso particular de la estreptomina si se encontró una diferencia significativa entre las mismas muestras con antibiótico ( excepto entre 3.0 y 5.0 mcg/ml ) y a su vez en una comparación entre éstas muestras y el blanco.

Harper (17) al estudiar la alteración de la coagulación ácida en presencia de tetraciclina manifiesta la existencia de una interacción antibiótico-proteína-ion calcio . lo que interfiere en la formación de la cuajada aún cuando se obtenía un valor de acidéz igual o menor al punto isoelectrico de la caseína. Por lo expuesto, proponemos un efecto ocasionado por los antibióticos sobre las propiedades isoelectricas del sistema, ya que el para-x-casinato presenta básicamente porciones negativas e hidrofóbicas lo que le permite ser sitio de unión de diversos aditivos iónicos.

Lo anterior puede relacionarse con otros estudios en los que se ha sugerido que la reducción de las repulsiones electrostáticas entre las micelas modificadas, por ejemplo con una neutralización de la carga por la adición de aditivos cargados positivamente ( 15,16 ), pueden permitir la generación de fuerzas de atracción tipo van der Waals entre las partículas favoreciendo su agregación.

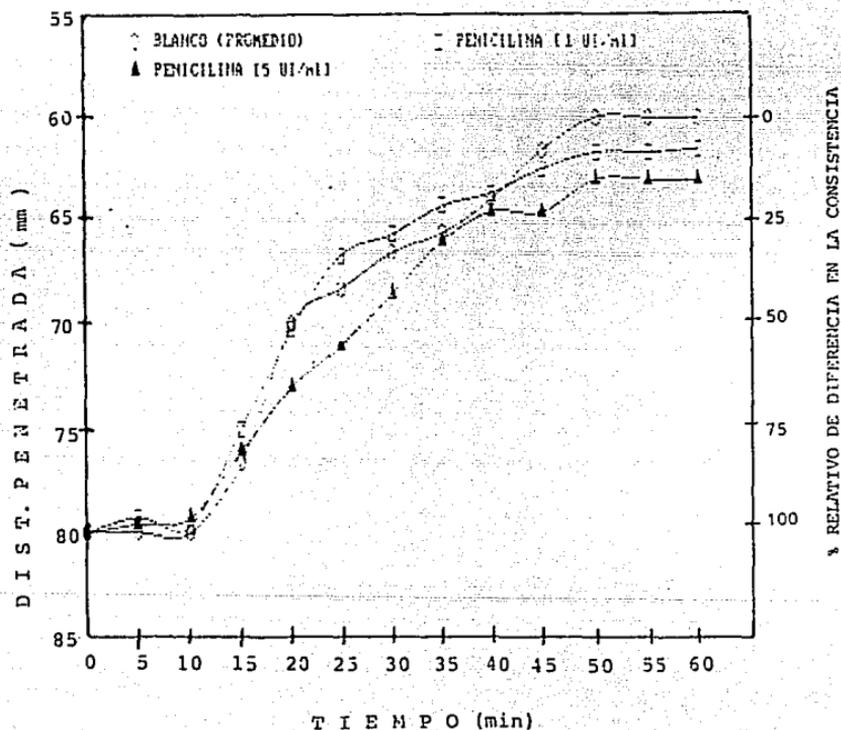
### 3.3.2 Método consistométrico

Las gráficas 4,5 y 6 corresponden al seguimiento realizado durante el desarrollo de la cuajada determinando la consistencia de las muestras en función del tiempo, en la presencia de cada antibiótico a dos concentraciones extremas y comparadas respectivamente con el blanco promedio.

El comportamiento general de las gráficas muestra una zona inicial, de 0 a 10 minutos, en la cual se mantiene prácticamente un valor constante, representado por la leche aún sin coagular. A este valor se le asignó 100 en la escala porcentual relativa de la diferencia en la consistencia máxima (%RDCM), dado que aquí se alcanzó la máxima penetración de la aguja de medición (figura 2,B). Conforme avanzó el tiempo la distancia penetrada disminuyó hasta un valor que se mantuvo constante, en general, a partir de los 50 minutos posteriores a la adición del cuajo. Este valor constante corresponde a la máxima rigidez del sistema representado por una distancia mínima de penetración. Para el comportamiento del blanco en el punto que se alcanzó la rigidez máxima se le asignó 0 %RDCM, ya que éste es nuestro parámetro de comparación. En mediciones posteriores se observó una discontinuidad en las lecturas y con claras

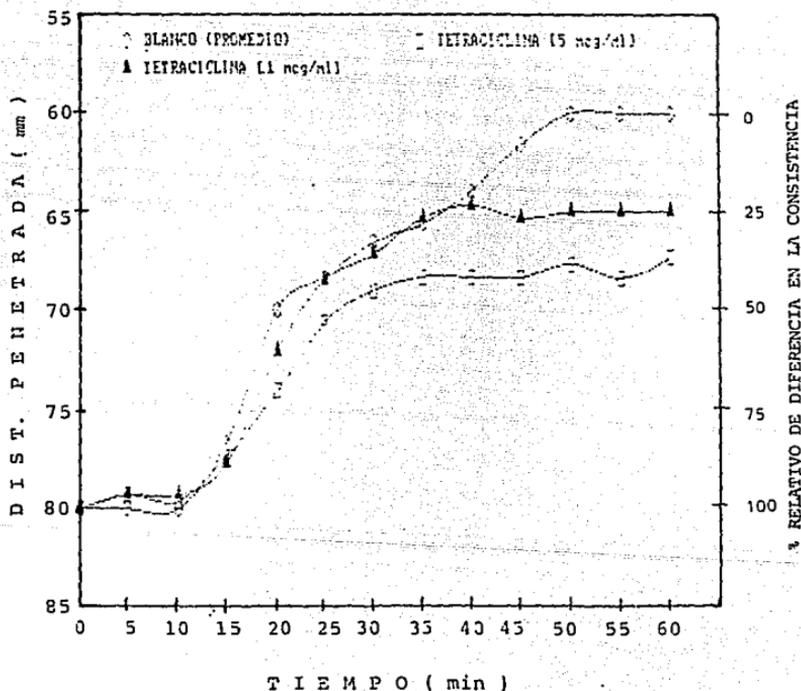
### GRAFICA 4

COMPORTAMIENTO DEL DESARROLLO DE LA CUAJADA DETERMINANDO SU CONSISTENCIA EN FUNCION DEL TIEMPO. SE COMPARAN LOS RESULTADOS PROMEDIO DE LAS MUESTRAS ADICIONADAS DE PENICILINA V POTASICA CON RESPECTO A UN BLANCO LIBRE DE ANTIBIOTICO.



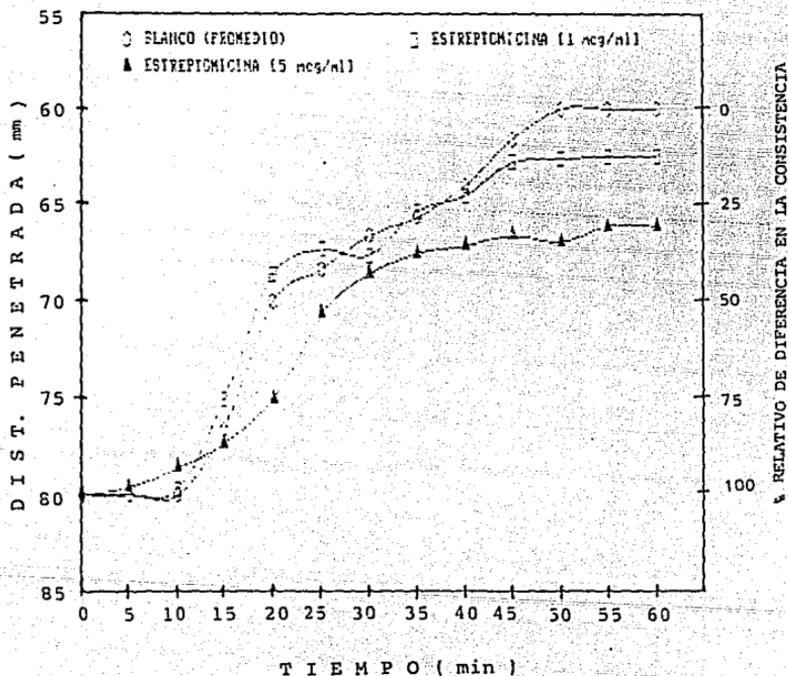
### GRAFICA 5

COMPORTAMIENTO DEL DESARROLLO DE LA CUAJADA DETERMINANDO SU CONSISTENCIA EN FUNCION DEL TIEMPO. SE COMPARAN LOS RESULTADOS PROMEDIO DE LAS MUESTRAS ADICIONADAS DE CLORHIDRATO DE TETRACICLINA CON RESPECTO A UN BLANCO LIBRE DE ANTIBIOTICO.



GRAFICA 6

COMPORTAMIENTO DEL DESARROLLO DE LA CUAJADA DETERMINANDO SU CONSISTENCIA EN FUNCION DEL TIEMPO. SE COMPARAN LOS RESULTADOS PROMEDIO DE LAS MUESTRAS ADICIONADAS DE SULFATO DE ESTREPTOMICINA CON RESPECTO A UN BLANCO LIBRE DE ANTIBIOTICO.



señales de sinéresis, por lo que se consideraron no representativas.

En el cuadro 9 se resumen los datos de %RDCM y de la distancia mínima de penetración correspondiente a la rigidez máxima del gel alcanzada en cada caso.

### CUADRO 9

DATOS DE COMPARACION CORRESPONDIENTES A LA CONSISTENCIA MAXIMA DEL GEL EN LAS DIFERENTES CONDICIONES

| MUESTRA                      | CONC. ANTIBIOTICO | DIST. MIN PENETRADA [mm] | %RDCM |
|------------------------------|-------------------|--------------------------|-------|
| Blanco                       | 0                 | 60.0                     | 0     |
| Penicilina<br>[UI/ml]        | 1.0               | 61.7                     | 8.5   |
|                              | 5.0               | 63.3                     | 16.5  |
| Tetraciclina<br>[mcg/ml]     | 1.0               | 65.0                     | 25.0  |
|                              | 5.0               | 67.3                     | 36.5  |
| Estreptomici-<br>na [mcg/ml] | 1.0               | 62.5                     | 12.5  |
|                              | 5.0               | 66.1                     | 30.5  |

%RDCM = porcentaje relativo de diferencia de la consistencia máxima

En general los resultados revelaron una consistencia más débil de la cuajada para las muestras que contenían antibióticos, siendo menos marcada para el caso de la penicilina, en la

que se logró una reducción de la rigidez final del gel de un 16.5 % a una concentración de 5.0 UI/ml, mientras que para el caso de la tetraciclina se alcanzó una reducción muy notoria de hasta un 36.5 % en la concentración de 5.0 mcg/ml.

Comparando esta disminución en la rigidez máxima entre las concentraciones extremas utilizadas, se encuentra que con el antibiótico tipo tetraciclina tiende ya a debilitarse la consistencia de la cuajada a un valor del 25 % RDCM, inclusive. Para los otros antibióticos no se encontró una disminución en la rigidez tan notoria a la concentración mínima manejada. También en el caso de estreptomycin se obtuvo un valor alto de %RDCM con 5.0 mcg/ml al igual que con tetraciclina.

#### 3.4 Consistencia final de la cuajada

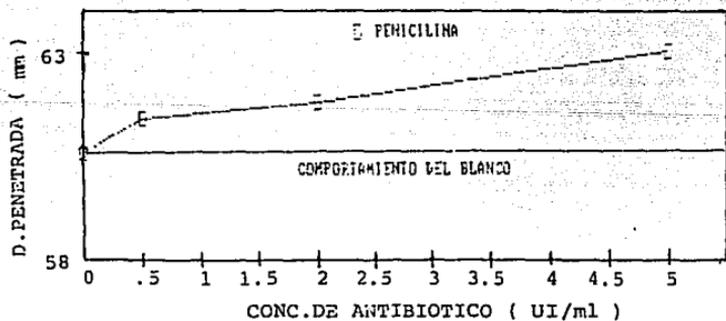
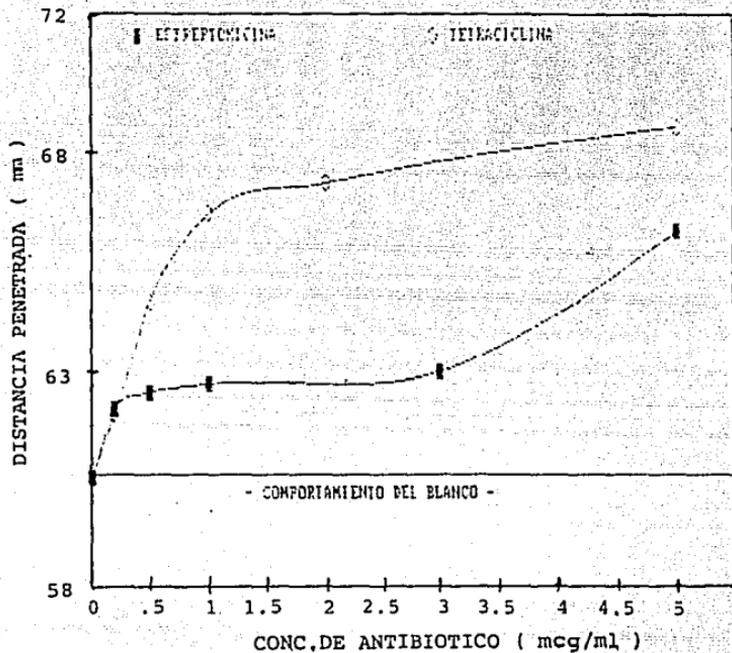
Esta sección presenta un complemento del punto anterior, ya que como se mencionó anteriormente se encontró un comportamiento semejante en todas las curvas (una meseta en sus perfiles) desde los 50 min posteriores a la adición de la enzima y que correspondió a la consistencia máxima lograda, por lo tanto se decidió registrar las lecturas sólo una vez transcurrido este tiempo para las diferentes concentraciones. Los resultados de este procedimiento se encuentran reflejados

en la gráfica 7, en la que se establece una comparación entre el comportamiento de las muestras con cada uno de los antibióticos a diferentes concentraciones y la consistencia máxima lograda por el blanco. Así encontramos que para el caso de la tetraciclina se presenta una disminución muy pronunciada en la consistencia del gel, dada por una mayor penetración de la aguja de prueba, para las concentraciones bajas del antibiótico, para posteriormente originar una menor disminución en la consistencia a pesar de incrementos posteriores en la concentración de tetraciclina. Para la estreptomycin se observa que sólo al inicio siguió un comportamiento semejante al caso de la tetraciclina para después dar lugar a un intervalo constante del valor de máxima penetración en concentraciones intermedias del antibiótico, y sólo al adicionar grandes concentraciones de estreptomycin se observa un mayor incremento en la distancia penetrada, es decir que a altas concentraciones de este tipo de antibiótico logra un gel más débil. Lo anterior corrobora lo determinado en el seguimiento del desarrollo de la cuajada en el punto anterior.

Finalmente al observar la respuesta dada por la penicilina diremos que su presencia logra sólo un ligero efecto en la disminución de la rigidez del gel, que se acentúa en altas concentraciones de este fármaco.

## GRAFICA 7

VARIACION DEL PUNTO MAXIMO DE PENETRACION (CONSISTENCIA MAXIMAL LOGRADO EN 55 MINUTOS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTIBIOTICOS



Cabe mencionar que en todos los casos se aparenta una disminución progresiva y lenta de la rigidez del gel pero principalmente en presencia de una alta concentración de los antibióticos en la leche, lo que francamente representa un caso muy poco probable a ocurrir en forma deliberada. Sin embargo se prevee que tal vez ésta disminución decae hasta un valor máximo para dar lugar a un comportamiento constante a pesar de mayor adición de antibiótico.

CAPITULO IV  
CONCLUSIONES  
Y  
RECOMENDACIONES

#### IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La presencia de antibióticos en la leche modifican tanto al tiempo de coagulación como a la textura final de la cuajada, lo que puede, en cierta forma, generar pérdidas económicas a nivel industrial que se manifiestan, en general, por un incremento en el tiempo del proceso, pero sobre todo por la disminución del rendimiento quesero a causa de la consistencia débil de la cuajada obtenida. Sobre todo para el caso de la tetraciclina, que en pequeñas cantidades logró disminuir la firmeza del gel considerablemente.

- Empleando el Viscosímetro Rotacional Brookfield sólo es posible detectar el comportamiento continuo del desarrollo de la cuajada correspondientes a los tiempos iniciales de la segunda etapa de la coagulación sin lograr determinar un valor de viscosidad máxima y constante, ya que se registran lecturas discontinuas transcurrido un tiempo dado, originadas por la ruptura y sinéresis del gel. Por lo tanto, este método sólo es útil para localizar el parámetro de comparación identificado como Tiempo inicial de Coagulación.

- El método establecido para observar la consistencia manifestada (distancia penetrada) por la cuajada en función del

tiempo, proporciona una descripción gráfica característica del comportamiento del desarrollo del gel, que permite establecer una comparación entre diferentes condiciones de coagulación, no sólo debidas a la ausencia o presencia de antibióticos como se usó en este caso particular, sino que se puede extender su uso por ejemplo: como prueba de calidad de la leche para coagular. También podría recomendarse para establecer las condiciones del punto de corte de la cuajada durante la elaboración del queso, siempre que se logre una consistencia máxima satisfactoria en la cuajada.

- Los resultados obtenidos refuerzan el principio teórico general que explica el fenómeno de coagulación en base al efecto electrostático o de neutralización sobre el  $\kappa$ -para-caseinato, ya que se sugiere que los antibióticos afectan el entorno iónico normal en la coagulación de la leche. Sin embargo esto es todavía una hipótesis a comprobar con métodos y aparatos más sensibles para concentraciones menores de antibiótico que permitan corroborar una interacción antibiótico-proteína ion calcio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alais, C.  
CIENCIA DE LA LECHE  
C. E. C. S. A. México. (1986) pp. 9, 119, 507, 512
2. Albright, J. L., Tuckey, S. L. y Woods, G. T. "Antibiotics in milk- A Review". J. Dairy Sci 59(2):779 (1961)
3. Berridge, N. J. "Rennin and the Clotting of Milk". Ad. Enz. 15, 423-449 (1954)
4. Bourne, M. C. (Ed.)  
FOOD TEXTURE AND VISCOSITY: CONCEPT AND MEASUREMENT  
Academic Press London/N.Y. (1982) pp. 153-155
5. Cheryan, M., Van Wyk, P. J., Olson, N. F. y Richardson, T.  
"Secondary Phase and Mechanism of Enzyme Milk Coagulation". J. Dairy Sci. 58:477 (1975)
6. Dalgleish, D. G. y Parker, I. G. "Binding of Calcium Ions to Bovine  $\alpha_{s1}$ -Casein and Precipitability of Protein Calcium ion Complexes". J. Dairy Res. 47:113 (1980)
7. Diario Oficial de la Federación: Reglamento de la ley ge-

- neral de salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios. Título cuarto "Leche, Productos y Derivados de la Leche, Sustitutos e imitaciones". Cap. I, Art. 248 Tomo CDXII No. 11 Méx. D.F., Lunes 18 de enero de 1988.
8. Diario Oficial de la Federación: Reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios. "Ordeña, Manejo y envasado de la leche". Cap. IV, Art. 299 Tomo CDXII No. 11 Méx. D.F., Lunes 18 de enero de 1988.
9. Ernstron, C. A. *Milk-Clotting Enzymes and Cheese Chemistry* en "Fundamentals of Dairy Chemistry". Webb, H. B., Johnson, A. H. y Alford, J. A. (Eds.), AVI Publishing Co. Connecticut, (1983) p. 2
10. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. "Determinación de antibióticos". 5<sup>a</sup> ed. Méx. (1988) p. 73-83
11. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. "Cuenta de hongos y levaduras". 5<sup>a</sup> ed. Méx. (1988) p. 206

12. Frère, J. M. y Ghuyssen, P.E. *Proteolytic Enzymes*, en "Methods in Enzymology", Lorand Laszlo, Vol. XLV Parte B, London (1976) p. 623
13. Gale, E. F., Cundliffe, E. R., Reynolds, P. E. y Richmond, M. H. THE MOLECULAR BASIS OF ANTIBIOTIC ACTION. John Wiley and Sons, 2<sup>o</sup> ed. Great Britain (1981), p. 594
14. Green, L.M. "On the Mechanism of Clotting by rennin". J. Dairy Res. 39: 55 (1972).
15. Green, L.M. y Marshall, R.J. *The Acceleration by Cationic Materials of the Coagulation of Casein Micells by Rennet*" J. Dairy Res. 44: 521 (1977)
16. Green, L.M. y Marshall, R.J. "Interaction of Ionic Materials with Casein Micelles". J. Dairy Res. 46: 365 (1979)
17. Harper, W.J. *Antibiotic Protein Interaction on the Acid Coagulation of Milk*, en "Antibiotics in milk—A Review" Albright, J.L., Tuckey, S. I. y Woods, G. t. J. Dairy Sci. 44(5): 779 (1961).
18. Huffman, C.F. "Dairy Feeds and Drug Additives as Related to Cattle Efficiency and Public Health" J. Dairy Sci. 42: 726 (1959).

19. Hugo, W. B. y Russell, A. D. (Eds.)  
FARMACEUTICAL MICROBIOLOGY  
Black Well Scientific Publications, Oxford/London (1977) p. 69
20. Jen, J. J. y Ashworth, U. S. "Factors Influencing the Curd Tension of Rennet Coagulated Milk. Salt Balance" J. Dairy Sci. 53(9):120 (1970).
21. Johnson, A. M. The Composition of Milk en "Fundamentals of Dairy Chemistry" Webb, H. B., Johnson, A. H. y Alford, J. A (Eds.) 2<sup>a</sup>ed. The AVI Publishing Company, Inc Connecticut (1983) p. 2
22. Kohn, K. W. "Mediation of Divalent Metal Ions in the Binding of the Tetracycline to Macromolecules". Nature. (1961) p. 101, 1156
23. Kopelman, I. J. y Cogan, U. "Determination of Clotting Power of Milk Clotting Enzymes" J. Dairy Sci. 52(2):196 (1975)
24. Lee, C., Imoto, E. M. y Rha, C. "Evaluation of Cheese Texture" J. Food Sci. 43(5):1600 (1978).
25. Magruder, N. D., Lofgren, C. E. y Reynolds, W. M. "Large-Scale Tests of Feeding Oxytetracycline to Lactating Dairy Cows" J. Dairy Sci. 43:891 (1960)

26. Marshall, R.J. y Green, L.M. "The Effect of the Chemical Structure of Additives on the Coagulation of Casein Micelle Suspensions by Rennet" J. Dairy Sci. 47:359 (1980)
27. Marth, E.H. y Ellickson, B.E. Antibiotics residues in milk and Milk Products en "Antibiotics in Milk-A Review". Albright, J.L., Turkey, S.L. y Woods, G.T. J. Dairy Sci. 44(5): 779 (1961).
28. Martin, J.H. y Harper, W.J. Factors Affecting the Loss of Antibiotic activity in Milk. en "Antibiotics in Milk-A Review" Albright, J.L., Turkey, S.L. y Woods, G.T. J. Dairy Sci. 44(5): 770 (1961).
29. Muller, H. G. (Eds)  
INTRODUCCION A LA REOLOGIA DE LOS ALIMENTOS  
Editorial ACRIBIA, España 1973 p. 7.13-14
30. Nieto, V. Z. (Ed)  
Manual de Tecnología de alimentos I  
Departamento : Tecnología de alimentos, División Ingeniería  
Fac. Química, UNAM 1987 p. 90-93
31. Norma Oficial Mexicana. ( NOM-F-26-1986 ). "Alimentos-Lácteos-Leche en Polvo." Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Dirección General de Normas.

32. Norma Oficial Mexicana. ( NOM-F-428-1982 ) "Alimentos- Determinación de Humedad (Método Rápido de la Termobalan- za)". Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Dirección General de Normas.
33. Norma Oficial Mexicana. ( NOM-F-210-1971 ) "Método de prueba para la Determinación de Grasa Butírica en leche en Polvo". Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Di- rección General de Normas.
34. Norma Oficial Mexicana. ( NOM-F-253-1986 ) "Cuenta de Bacterias Mesofílicas Aerobias". Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Dirección General de Normas.
35. Norma Oficial Mexicana. ( NOM-254-1986 ) "Cuenta de Orga- nismos Coliformes" Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Dirección General de Normas.
36. Official Methods Of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: 16.036, 16.135-16.137, 16.216 14<sup>th</sup> Ed. (1984).
37. Olson, N.F. y Bottazzi, V. "Rheology of Milk Gels Formed by Milk-Clotting Enzymes". J. Foods Sci. 42(3):659 (1977).

38. Parry, R. M. *Milk Coagulation and Protein Denaturation en "Fundamentals of Dairy Chemistry"* Webb, H. B., Johnson, A. H. y Alford, J. A. (Eds.) 2<sup>o</sup> Ed., AVI Publishing Co. Connecticut, (1983) p. 603.
39. Pedrero, F., D. L. y Pangborn, R. M. (Eds.)  
EVALUACION SENSORIAL DE LOS ALIMENTOS  
Ed. Alhambra Mexicana (1989) pp. 145-147
40. Pérez Gavilán E., J. y Pérez Gavilán E., J. P.  
BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA DE LA LECHE  
Ed. Limusa México (1984) p. 70
41. Perry, C. A., y Carrood, P. A. "Instrument for Texture of Small Curd Cottage Cheese and Comparison to Sensory Evaluation" J. Food Sci. 45: 798 (1980).
42. Potter, N. N. (Ed.)  
CIENCIA DE LOS ALIMENTOS  
EDUTEX S. A. (1978) pp. 379, 410
43. Richardson, G. H., Gandhi, N. R., Divatia, M. A. y Ernstron, C. A.  
"Continuous Curds Tension Measurements During Milk Coagulation" J. Dairy Sci. 54(2): 182 (1971).

44. Ross, R. H., Fourt, D. L., Bailey, J. W. y Thacker, D. L. "Effect of Feeding Low Levels of Chlorotetracycline upon the Health and Milk Production of Dairy Cows". J. Dairy Sci. 42:1740 (1959)
45. Schwabe, C. W. (Ed.)  
VETERINARY MEDICINE AND HUMAN HEALTH  
Williams & Wilkins. 3<sup>o</sup> Ed. Baltimore/London (1984) p.139
46. Vargas, G. R. Principales trastornos causados en la población por el consumo de productos alimentarios de origen animal contaminados con antibióticos. en "Problemática de los antimicrobianos en la medicina veterinaria". Memorias. Fac. M. V. y Z. UNAM México (1984) p.17
47. Velázquez, F., Pérez D., M. y González S., R. "Investigación de residuos de antibióticos en leche pasteurizada y envasada que se consume en el área metropolitana" Salud Pública de México. XXII: 91-99, (1980).
48. Voisey, P. W. y Emmons, D. B. "Modification of the Curd Firmness Test for Cottage Cheese". J. Dairy Sci. 49(1):93 (1966).

49. Watt, B. K. y Merri, A. L. Table 1.1 en "Fundamentals of Dairy Chemistry". Webb, H. B., Johnson, A. H. y Alford, J. A. (Eds.), AVI Publishing Co. Connecticut (1983) p. 6
50. Whitney, R. Mc. L., Brunner, J. R., Ebner, K. E., Farrel, H. M., Josephsons, R. V., Morr, C. V. y Swaisgood, H. E. "Nomenclature of Cow's Milk: Fourth Revision". J. Dairy Sci. 59:795 (1976)
51. Yun, S., Ohmiya, K., Kobayashi, T. y Shimizu, S. "Increase in Curd Tension of Milk Coagulation Prepared with Immobilized Proteases". J. Food Sci. 46(3):705 (1981).
52. Zurita D., J. "Determinación de antibióticos en leches de diferentes categorías sanitarias que se consumen en el Distrito Federal" UNAM Fac. M. V. y Z. (1967).

## ANEXO I

### DATOS DE VISCOSIDAD APARENTE EN FUNCION DEL TIEMPO

- Blanco A

| TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 186        | 4.0          | 210        | 25.0         |
| 190        | 4.0          | 213        | 30.0         |
| 192        | 4.5          | 213        | 29.0         |
| 194        | 4.5          | 217        | 36.0         |
| 195        | 6.0          | 220        | 43.0         |
| 196        | 8.0          | 222        | 44.0         |
| 200        | 11.0         | 223        | 48.0         |
| 202        | 15.0         | 224        | 48.0         |
| 206        | 21.0         |            |              |
| 208        | 25.0         |            |              |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.4829)X + (-285.1435) \quad r = 0.9939$$

- Blanco B

| TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 180        | 4.0          | 204        | 12.5         |
| 182        | 4.0          | 206        | 17.0         |
| 183        | 4.0          | 209        | 21.0         |
| 185        | 4.5          | 212        | 28.0         |
| 187        | 4.5          | 214        | 34.0         |
| 190        | 5.0          | 216        | 35.0         |
| 190        | 6.0          | 217        | 40.0         |
| 194        | 5.5          | 220        | 42.0         |
| 197        | 8.0          | 222        | 45.0         |
| 198        | 8.0          | 224        | 48.0         |
| 200        | 11.0         | 225        | 48.0         |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.5889)X + (-307.8955) \quad r = 0.9923$$

- Ensayo con penicilina:

a) blanco

| TIEMPO (s) | $\mu_{\alpha}$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_{\alpha}$ (Cp) |
|------------|---------------------|------------|---------------------|
| 177        | 4.0                 | 206        | 24                  |
| 181        | 4.0                 | 208        | 28                  |
| 185        | 4.5                 | 210        | 31                  |
| 186        | 4.5                 | 212        | 33                  |
| 189        | 5.0                 | 213        | 36                  |
| 182        | 6.0                 | 217        | 42                  |
| 193        | 6.0                 | 218        | 42                  |
| 197        | 8.0                 | 220        | 44                  |
| 197        | 11.0                | 222        | 45                  |
| 201        | 15.0                | 223        | 48                  |
| 206        | 22.0                | 224        | 48                  |

Correlación línea ascendente:

$$y = (1.5163)X + (-288.7718) \quad r = 0.9928$$

b) [0.1 UI/ml]

| TIEMPO (s) | $\mu_{\alpha}$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_{\alpha}$ (Cp) |
|------------|---------------------|------------|---------------------|
| 174        | 4.0                 | 199        | 20.0                |
| 175        | 4.0                 | 199        | 19.0                |
| 177        | 4.0                 | 203        | 27.0                |
| 179        | 4.0                 | 207        | 35.0                |
| 181        | 4.0                 | 211        | 42.0                |
| 182        | 4.5                 | 212        | 43.0                |
| 185        | 4.5                 | 215        | 46.0                |
| 186        | 5.5                 | 220        | 47.0                |
| 188        | 5.5                 | 221        | 48.0                |
| 189        | 5.5                 | 226        | 49.0                |
| 191        | 7.5                 | 227        | 48.0                |
| 195        | 12.0                | 229        | 47.0                |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.5719)X + (-292.5078) \quad r = 0.9824$$

c) [0.3 UI/ml]

| TIEMPO (s) | $\mu_{\alpha}$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_{\alpha}$ (Cp) |
|------------|---------------------|------------|---------------------|
| 166        | 4.0                 | 180        | 4.0                 |
| 179        | 4.0                 | 183        | 4.5                 |
| 174        | 4.0                 | 185        | 4.5                 |

|     |      |     |      |
|-----|------|-----|------|
| 187 | 5.5  | 203 | 29.0 |
| 188 | 5.0  | 205 | 29.0 |
| 189 | 6.0  | 206 | 30.0 |
| 190 | 7.0  | 208 | 33.0 |
| 193 | 8.0  | 209 | 36.0 |
| 196 | 12.0 | 214 | 42.0 |
| 197 | 14.0 | 215 | 46.0 |
| 200 | 19.0 | 218 | 47.0 |
| 202 | 22.0 | 220 | 48.0 |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.45082)X + (-261.6074) \quad r = 0.9939$$

d) [3 UI/ml]

| TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 170        | 4.0          | 200        | 30.0         |
| 171        | 4.0          | 202        | 32.0         |
| 174        | 4.0          | 204        | 36.0         |
| 175        | 4.5          | 206        | 37.0         |
| 178        | 5.0          | 208        | 43.0         |
| 182        | 6.0          | 211        | 43.0         |
| 183        | 7.0          | 212        | 47.0         |
| 186        | 8.0          | 215        | 49.0         |
| 187        | 10.0         | 216        | 48.0         |
| 190        | 14.0         | 217        | 48.0         |
| 196        | 21.0         | 219        | 47.0         |
| 198        | 24.0         | 220        | 49.0         |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.45082)X + (-261.6074) \quad r = 0.9939$$

e) [5 UI/ml]

| TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 170        | 4.0          | 185        | 6.0          |
| 173        | 4.0          | 187        | 6.0          |
| 174        | 4.0          | 189        | 8.0          |
| 177        | 4.0          | 189        | 9.0          |
| 179        | 4.5          | 190        | 13.0         |
| 181        | 5.0          | 191        | 14.0         |
| 184        | 5.5          | 193        | 15.0         |

|     |      |     |      |
|-----|------|-----|------|
| 194 | 20.0 | 209 | 43.0 |
| 195 | 21.0 | 210 | 44.0 |
| 197 | 22.0 | 211 | 47.0 |
| 198 | 29.0 | 214 | 47.0 |
| 201 | 29.0 | 218 | 49.0 |
| 205 | 36.0 | 220 | 47.0 |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.5948)X + (-291.0720) \quad r = 0.9923$$

- Ensayo con tetraciclina

a) Blanco

| TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 187        | 4.0          | 208        | 20.0         |
| 190        | 4.0          | 210        | 21.0         |
| 191        | 4.0          | 212        | 28.0         |
| 194        | 4.5          | 216        | 34.0         |
| 195        | 4.5          | 218        | 35.0         |
| 198        | 5.5          | 220        | 40.0         |
| 202        | 8.0          | 222        | 42.0         |
| 205        | 13.0         | 227        | 47.0         |
| 206        | 14.0         | 230        | 48.0         |
| 207        | 14.0         | 232        | 49.0         |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.6390)X + (-322.1151) \quad r = 0.9914$$

b) [0.2 mcg/ml]

| TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 189        | 4.0          | 220        | 25.0         |
| 192        | 4.0          | 223        | 26.0         |
| 193        | 4.0          | 225        | 32.0         |
| 196        | 4.0          | 229        | 37.0         |
| 197        | 4.0          | 231        | 39.0         |
| 200        | 4.5          | 233        | 43.0         |
| 201        | 4.5          | 235        | 44.0         |
| 204        | 6.0          | 237        | 46.0         |
| 207        | 8.0          | 239        | 47.0         |
| 213        | 13.0         | 241        | 48.0         |
| 214        | 14.0         | 242        | 47.0         |
| 216        | 19.0         | 243        | 48.0         |
| 218        | 20.0         | 244        | 47.0         |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.4071)X + (-286.075) \quad r = 0.9951$$

c) [0.5 mcg/ml]

| TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 190        | 4.0          | 220        | 29.0         |
| 192        | 4.0          | 221        | 30.0         |
| 196        | 4.0          | 225        | 36.0         |
| 200        | 5.0          | 229        | 42.0         |
| 204        | 6.0          | 233        | 47.0         |
| 208        | 10.0         | 237        | 48.0         |
| 213        | 16.0         | 240        | 47.0         |
| 217        | 23.0         | 241        | 46.0         |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.4767)X + (-296.6975) \quad r = 0.9975$$

d) [3 mcg/ml]

| TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 180        | 4.0          | 216        | 24.0         |
| 199        | 4.0          | 217        | 25.0         |
| 192        | 4.0          | 220        | 31.0         |
| 193        | 4.5          | 221        | 32.0         |
| 197        | 4.5          | 224        | 37.0         |
| 200        | 5.5          | 225        | 39.0         |
| 202        | 6.0          | 228        | 43.0         |
| 204        | 7.0          | 229        | 45.0         |
| 206        | 8.0          | 233        | 48.0         |
| 208        | 11.0         | 241        | 45.0         |
| 213        | 18.0         | 243        | 46.0         |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.6329)X + (-330.3269) \quad r = 0.9987$$

e) [5 mcg/ml]

| TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 188        | 4.0          | 200        | 4.0          |
| 190        | 4.0          | 201        | 5.5          |
| 193        | 4.0          | 204        | 7.0          |
| 194        | 4.0          | 205        | 6.0          |
| 196        | 4.5          | 209        | 12.0         |

|     |      |     |      |
|-----|------|-----|------|
| 213 | 18.0 | 225 | 39.0 |
| 217 | 21.0 | 229 | 45.0 |
| 219 | 28.0 | 232 | 46.0 |
| 222 | 33.0 | 237 | 48.0 |
| 222 | 33.0 | 240 | 47.0 |

Correlación línea ascendente:  
 $Y = (1.5310)X + (-307.3407)$   $r = 0.9918$

-Ensayo con estreptomicina

a) Blanco

| TIEMPO (s) | $\mu_{\alpha}$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_{\alpha}$ (Cp) |
|------------|---------------------|------------|---------------------|
| 187        | 4.0                 | 208        | 20.9                |
| 190        | 4.0                 | 210        | 24.2                |
| 191        | 4.0                 | 212        | 27.9                |
| 194        | 4.5                 | 218        | 37.4                |
| 195        | 4.5                 | 220        | 44.0                |
| 198        | 6.0                 | 222        | 47.6                |
| 202        | 8.5                 | 227        | 51.7                |
| 205        | 12.5                | 230        | 52.8                |
| 206        | 18.7                | 232        | 52.8                |

Correlación línea ascendente:  
 $Y = (1.6443)X + (-323.6975)$   $r = .9926$

b) [0.5 mcg/ml]

| TIEMPO (s) | $\mu_{\alpha}$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_{\alpha}$ (Cp) |
|------------|---------------------|------------|---------------------|
| 189        | 4.0                 | 211        | 17.0                |
| 191        | 4.0                 | 214        | 22.0                |
| 193        | 5.0                 | 215        | 23.0                |
| 195        | 5.5                 | 219        | 25.0                |
| 198        | 6.0                 | 222        | 35.0                |
| 199        | 5.5                 | 223        | 34.0                |
| 202        | 7.0                 | 226        | 40.0                |
| 203        | 7.5                 | 230        | 42.0                |
| 206        | 11.0                | 231        | 45.0                |
| 207        | 12.0                | 234        | 47.0                |
| 210        | 12.5                | 238        | 48.0                |

Correlación línea ascendente:  
 $Y = (1.39.05)X + (-303.9962)$   $r = 0.9897$

c) [1 mcg/ml]

| TIEMPO (S) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (S) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 190        | 4.0          | 219        | 16.0         |
| 190        | 4.0          | 221        | 20.0         |
| 192        | 4.0          | 222        | 22.0         |
| 194        | 5.0          | 225        | 25.0         |
| 196        | 4.5          | 226        | 28.0         |
| 198        | 4.5          | 228        | 31.0         |
| 201        | 5.0          | 231        | 33.0         |
| 203        | 5.0          | 232        | 35.0         |
| 204        | 5.5          | 235        | 37.0         |
| 206        | 5.5          | 236        | 40.0         |
| 208        | 7.0          | 239        | 42.0         |
| 210        | 7.5          | 241        | 44.0         |
| 212        | 10.0         | 243        | 45.0         |
| 214        | 11.0         | 245        | 47.0         |
| 217        | 14.0         | 250        | 48.0         |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.1870)X + (-241.87) \quad r = .9915$$

d) [3 mcg/ml]

| TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 189        | 4.0          | 224        | 20.0         |
| 193        | 4.0          | 229        | 23.0         |
| 197        | 4.0          | 233        | 29.0         |
| 198        | 4.5          | 237        | 35.0         |
| 201        | 4.5          | 241        | 38.0         |
| 205        | 5.0          | 242        | 38.0         |
| 209        | 6.0          | 245        | 43.0         |
| 213        | 8.0          | 246        | 42.0         |
| 216        | 11.0         | 249        | 44.0         |
| 217        | 13.0         | 253        | 46.0         |
| 220        | 16.0         | 254        | 49.0         |
| 223        | 18.0         |            |              |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.1396)X + (-233.6147) \quad r = 0.9960$$

e) (5 mcg/ml)

| TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) | TIEMPO (s) | $\mu_a$ (Cp) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 205        | 4.0          | 230        | 25.0         |
| 205        | 4.0          | 234        | 27.0         |
| 209        | 4.0          | 237        | 32.0         |
| 210        | 4.5          | 241        | 34.0         |
| 213        | 4.5          | 241        | 34.5         |
| 214        | 5.5          | 244        | 41.0         |
| 216        | 5.0          | 246        | 43.0         |
| 218        | 8.0          | 248        | 39.0         |
| 221        | 12.0         | 250        | 47.0         |
| 222        | 13.0         | 252        | 49.0         |
| 226        | 19.0         | 254        | 48.0         |
| 226        | 19.0         | 256        | 48.0         |

Correlación línea ascendente:

$$Y = (1.1933)X + (-251.1512) \quad r = .9951$$

## ANEXO 2

### DATOS DE LA MEDICION DE CONSISTENCIA

(Lecturas promedio)

- A. Blanco

| TIEMPO(min) | PENET (mm) | TIEMPO(min) | PENET (mm) |
|-------------|------------|-------------|------------|
| 0           | 8.0        | 35.0        | 6.56       |
| 5.0         | 8.0        | 40.0        | 6.40       |
| 10.0        | 8.0        | 45.0        | 6.16       |
| 15.0        | 7.66       | 50.0        | 6.0        |
| 20.0        | 7.0        | 55.0        | 6.0        |
| 25.0        | 6.83       | 60.0        | 6.0        |
| 30.0        | 6.66       |             |            |

- B. Penicilina [1 UI/ml]

| TIEMPO(min) | PENET (mm) | TIEMPO(min) | PENET (mm) |
|-------------|------------|-------------|------------|
| 0           | 8.0        | 35.0        | 6.43       |
| 5.0         | 7.93       | 40.0        | 6.37       |
| 10.0        | 7.97       | 45.0        | 6.25       |
| 15.0        | 7.50       | 50.0        | 6.17       |
| 20.0        | 7.03       | 55.0        | 6.17       |
| 25.0        | 6.67       | 60.0        | 6.15       |
| 30.0        | 6.57       |             |            |

- C. Penicilina [5 UI/ml]

| TIEMPO(min) | PENET (mm) | TIEMPO(min) | PENET (mm) |
|-------------|------------|-------------|------------|
| 0           | 8.0        | 35.0        | 6.60       |
| 5.0         | 7.96       | 40.0        | 6.46       |
| 10.0        | 7.93       | 45.0        | 6.40       |
| 15.0        | 7.61       | 50.0        | 6.40       |
| 20.0        | 7.30       | 55.0        | 6.30       |
| 25.0        | 7.10       | 60.0        | 6.33       |
| 30.0        | 6.86       |             |            |

- D. Tetraciclina [1 mcg/ml]

| TIEMPO(min) | PENET (mm) | TIEMPO(min) | PENET (mm) |
|-------------|------------|-------------|------------|
| 0           | 7.93       | 35.0        | 6.53       |
| 5.0         | 7.93       | 40.0        | 6.47       |
| 10.0        | 7.93       | 45.0        | 6.53       |
| 15.0        | 7.77       | 50.0        | 6.50       |
| 20.0        | 7.20       | 55.0        | 6.50       |
| 25.0        | 6.85       | 60.0        | 6.50       |
| 30.0        | 6.72       |             |            |

- E. Tetraciclina [5 mcg/ml]

| TIEMPO(min) | PENET (mm) | TIEMPO(min) | PENET (mm) |
|-------------|------------|-------------|------------|
| 0           | 8.0        | 35.0        | 6.83       |
| 5.0         | 7.93       | 40.0        | 6.83       |
| 10.0        | 7.96       | 45.0        | 6.76       |
| 15.0        | 7.73       | 50.0        | 6.83       |
| 20.0        | 7.40       | 55.0        | 6.73       |
| 25.0        | 7.06       | 60.0        | 6.73       |
| 30.0        | 6.90       |             |            |

- F. Estreptomicina [1 mcg/ml]

| TIEMPO(min) | PENET (mm) | TIEMPO(min) | PENET (mm) |
|-------------|------------|-------------|------------|
| 0           | 7.97       | 35.0        | 6.53       |
| 5.0         | 8.0        | 40.0        | 6.45       |
| 10.0        | 7.97       | 45.0        | 6.28       |
| 15.0        | 7.50       | 50.0        | 6.26       |
| 20.0        | 6.86       | 55.0        | 6.25       |
| 25.0        | 6.73       | 60.0        | 6.25       |
| 30.0        | 6.76       |             |            |

- G. Estreptomicina [5 mcg/ml]

| TIEMPO(min) | PENET (mm) | TIEMPO(min) | PENET (mm) |
|-------------|------------|-------------|------------|
| 0           | 7.96       | 35.0        | 6.75       |
| 5.0         | 7.96       | 40.0        | 6.71       |
| 10.0        | 7.86       | 45.0        | 6.66       |
| 15.0        | 7.73       | 50.0        | 6.69       |
| 20.0        | 7.50       | 55.0        | 6.61       |
| 25.0        | 7.06       | 60.0        | 6.61       |
| 30.0        | 6.86       |             |            |

- H. Penicilina

| CONC. (UI/ml) | DISTANCIA<br>PENETRADA (mm) |
|---------------|-----------------------------|
| 0             | 60.6                        |
| 0.5           | 61.4                        |
| 2.0           | 61.9                        |
| 5.0           | 63.0                        |

- I. Tetraciclina

| CONC. (mcg/ml) | DISTANCIA<br>PENETRADA (mm) |
|----------------|-----------------------------|
| 0              | 60.6                        |
| 0.2            | 62.0                        |
| 0.5            | 64.6                        |
| 1.0            | 66.6                        |
| 2.0            | 67.3                        |
| 5.0            | 68.6                        |

- J. Estreptomicina

| CONC. (mcg/ml) | DISTANCIA<br>PENETRADA (mm) |
|----------------|-----------------------------|
| 0              | 60.5                        |
| 0.2            | 62.1                        |
| 0.5            | 62.5                        |
| 1.0            | 62.7                        |
| 3.0            | 63.0                        |
| 5.0            | 66.0                        |

### ANEXO 3

ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN BASE A LA PRUEBA DE RANGO PARA DETERMINAR DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS AL 95% ENTRE:

- A) BLANCO PROMEDIO Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTIBIÓTICO.
- B) LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTIBIÓTICO

R = Rango = Valor mayor - Valor menor

F = Factor estadístico

$F_T$  = Teórico

$F_C$  = Calculado Si  $F_C > F_T$  hay diferencia significativa

#### I. - Penicilina

|                 | CONC. DE PENICILINA (UI/ml) |     |     |     |     |
|-----------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|
|                 | A                           | B   | C   | D   | E   |
|                 | BLANCO                      | 0.1 | 0.3 | 3.0 | 5.0 |
| $\mu_a$<br>[cp] | 15                          | 19  | 19  | 30  | 29  |
|                 | 22                          | 27  | 22  | 32  | 36  |
|                 | 24                          | 35  | 29  | 35  | 43  |
|                 | 29                          | 42  | 30  | 37  | 44  |
|                 | 31                          | 43  | 33  | 43  | 47  |
| R               | 16                          | 24  | 14  | 13  | 18  |
| $\Sigma \mu_a$  | 120                         | 186 | 133 | 178 | 199 |

$$\Sigma R = 99$$

$$F_{T \ 95\%} = 0.56$$

$$R \Sigma \mu_a = 79$$

$$F_c = \frac{R \Sigma \mu_a}{\Sigma R} = \frac{79}{99} = 0.79 \quad \therefore F_{T \ 95\%} < F_c$$

A) Blanco promedio y las diferentes concentraciones de antibióticos:

$$\frac{R \Sigma \mu_a \text{ AB}}{\Sigma R} = \frac{166-120}{99} = 0.46 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \Sigma \mu_a \text{ AC}}{\Sigma R} = \frac{13}{99} = 0.13 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \Sigma \mu_a \text{ AD}}{\Sigma R} = \frac{58}{99} = 0.58 \quad F_{T \ 95\%} < F_c$$

$$\frac{R \Sigma \mu_a \text{ AE}}{\Sigma R} = \frac{79}{99} = 0.79 \quad F_{T \ 95\%} < F_c$$

B) Entre las diferentes concentraciones de antibióticos:

$$\frac{R \Sigma \mu_a \text{ BC}}{\Sigma R} = \frac{33}{99} = 0.33 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_{\alpha} BD}{\sum R} = \frac{12}{99} = 0.12 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_{\alpha} BE}{\sum R} = \frac{33}{99} = 0.33 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_{\alpha} CD}{\sum R} = \frac{45}{99} = 0.45 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_{\alpha} CE}{\sum R} = \frac{66}{99} = 0.66 \quad F_{T \ 95\%} < F_c$$

I. - Tetraciclina

|                        | CONC. DE TETRACICLINA (mcg/ml) |     |     |      |      |
|------------------------|--------------------------------|-----|-----|------|------|
|                        | A                              | B   | C   | D    | E    |
|                        | BLANCO                         | 0.2 | 0.5 | 3.0  | 5.0  |
| $\mu_{\alpha}$<br>[cp] | 8                              | 4.5 | 4   | 5.5  | 4    |
|                        | 13                             | 4.5 | 5   | 6    | 5.5  |
|                        | 14                             | 6   | 6   | 7    | 7    |
|                        | 20                             | 8   | 10  | 8    | 6    |
|                        | 21                             | 13  | 16  | 11   | 12   |
|                        | 28                             | 14  | 23  | 18   | 18   |
| R                      | 20                             | 9.5 | 24  | 12.5 | 14   |
| $\sum \mu_{\alpha}$    | 104                            | 50  | 64  | 55.5 | 52.5 |

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

$$\Sigma R = 80$$

$$F_{T \ 95\%} = 0.47$$

$$R \Sigma \mu_a = 54$$

$$F_c = \frac{R \Sigma \mu_a}{\Sigma R} = \frac{54}{80} = 0.675 \quad \therefore \quad F_{T \ 95\%} < F_c$$

A) Blanco promedio y las diferentes concentraciones de antibióticos:

$$\frac{R \Sigma \mu_a \text{ AB}}{\Sigma R} = \frac{104-50}{80} = 0.675 \quad F_{T \ 95\%} < F_c$$

$$\frac{R \Sigma \mu_a \text{ AC}}{\Sigma R} = \frac{40}{80} = 0.50 \quad F_{T \ 95\%} < F_c$$

$$\frac{R \Sigma \mu_a \text{ AD}}{\Sigma R} = \frac{48.5}{80} = 0.60 \quad F_{T \ 95\%} < F_c$$

$$\frac{R \Sigma \mu_a \text{ AE}}{\Sigma R} = \frac{51.5}{80} = 0.64 \quad F_{T \ 95\%} < F_c$$

B) Entre las diferentes concentraciones de antibióticos:

$$\frac{R \Sigma \mu_a \text{ BC}}{\Sigma R} = \frac{14}{80} = 0.175 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_a}{\sum R} = \frac{5.5}{80} = 0.069 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_a}{\sum R} = \frac{2.5}{80} = 0.031 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_a}{\sum R} = \frac{8.5}{80} = 0.10 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_a}{\sum R} = \frac{11.5}{80} = 0.14 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_a}{\sum R} = \frac{3}{80} = 0.03 \quad F_{T \ 95\%} > F_c$$

I. - Estreptomycin.

|                 | CONC. DE ESTREPTOMICINA (mcg/ml) |       |      |      |      |
|-----------------|----------------------------------|-------|------|------|------|
|                 | A                                | B     | C    | D    | E    |
|                 | BLANCO                           | 0.5   | 1.0  | 3.0  | 5.0  |
| $\mu_a$<br>[cp] | 18.7                             | 11.0  | 5.5  | 5    | 4    |
|                 | 24.2                             | 12.5  | 7.5  | 6    | 4.5  |
|                 | 27                               | 22    | 11   | 8    | 8    |
|                 | 37                               | 23    | 16   | 13   | 12   |
|                 | 44                               | 25    | 20   | 16   | 13   |
|                 | 47.6                             | 35    | 22   | 18   | 19   |
| R               | 28.9                             | 24    | 16.5 | 12.5 | 15   |
| $\sum \mu_a$    | 198.5                            | 128.5 | 82   | 66   | 60.5 |

$$\Sigma R = 96.9 \quad F_{T \ 95\%} = 0.47$$

$$R \Sigma \mu_a = 138$$

$$F_C = \frac{R \Sigma \mu_a}{\Sigma R} = \frac{138}{96.9} = 1.42 \quad \therefore F_{T \ 95\%} < F_C$$

A) Blanco promedio y las diferentes concentraciones de antibióticos:

$$\frac{R \Sigma \mu_a^{AB}}{\Sigma R} = \frac{198.5 - 128.5}{96.9} = 0.71 \quad F_{T \ 95\%} < F_C$$

$$\frac{R \Sigma \mu_a^{AC}}{\Sigma R} = \frac{116.5}{96.9} = 1.20 \quad F_{T \ 95\%} < F_C$$

$$\frac{R \Sigma \mu_a^{AD}}{\Sigma R} = \frac{132.5}{96.9} = 1.36 \quad F_{T \ 95\%} < F_C$$

$$\frac{R \Sigma \mu_a^{AE}}{\Sigma R} = \frac{137.5}{96.9} = 1.41 \quad F_{T \ 95\%} < F_C$$

B) Entre las diferentes concentraciones de antibióticos:

$$\frac{R \Sigma \mu_a^{BC}}{\Sigma R} = \frac{46.5}{96.4} = 0.479 \quad F_{T \ 95\%} < F_C$$

$$\frac{R \sum \mu_a BD}{\sum R} = \frac{62.5}{96.9} = 0.64 \quad F_{T 95\%} < F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_a BE}{\sum R} = \frac{68}{96.9} = 0.70 \quad F_{T 95\%} < F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_a CD}{\sum R} = \frac{16}{96.5} = 0.16 \quad F_{T 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_a CE}{\sum R} = \frac{21.5}{96.9} = 0.22 \quad F_{T 95\%} > F_c$$

$$\frac{R \sum \mu_a DE}{\sum R} = \frac{5.5}{96.9} = 0.056 \quad F_{T 95\%} > F_c$$