

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería de Industria Alimentaria**



**“EFECTO BACTERICIDA Y CONSERVANTE DEL  
EXTRACTO DE ALGA (*Ulva spp.*) APLICADO EN  
CARNE DE VACUNO”**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Obando Gomez, Sofia del Mar**

para optar el título Profesional de:

**Ingeniera de Industria Alimentaria**

Asesor: Mgter. Salas Castro, Jorge Enrique

**Arequipa – Perú**  
**2019**



*Universidad Católica de Santa María*

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

**DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS  
(Jurado)**

Señor  
**Mgter. CARLOS MORI NUÑEZ**  
Director del E.P. de Ingeniería de Industria Alimentaria  
Presente.-

Mediante el presente, comunicamos a usted., que se ha procedido a revisar el BORRADOR de Tesis titulado:

**“EFECTO BACTERICIDA Y CONSERVANTE DEL EXTRACTO DE ALGA  
(Ulva spp.) APLICADO EN CARNE DE VACUNO”**

Presentado por el bachiller: **SOFIA DEL MAR OBANDO GOMEZ**  
Asesor: **Mgter. Jorge Salas Castro**

El jurado Dictaminador presidido por **Ing. Nicolas Ognio Solis, Ing. Jorge Salas Castro, Ing. Mario Paz Zegarra**

**DICTAMINAN**


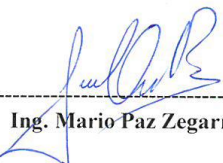
*PROCEDE*

**OBSERVACIONES**

*SIN OBSERVACIONES*

  
-----  
Ing. Nicolas Ognio Solis

Arequipa, 29 de MAYO de 2019

  
-----  
Ing. Jorge Salas Castro  
-----  
Ing. Mario Paz Zegarra

## PRESENTACIÓN

**SEÑOR DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS BIOLOGICAS Y QUIMICAS.**

**SEÑOR DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA DE INDUSTRIA ALIMENTARIA.**

**SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO DICTAMINADOR:**

De conformidad con las disposiciones del reglamento de grados y títulos de la Escuela Profesional de Ingeniería de Industria Alimentaria, pongo a su consideración el presente trabajo de investigación titulado: “EFECTO BACTERICIDA Y CONSERVANTE DEL EXTRACTO DE ALGA (ULVA SPP.) APLICADO EN CARNE DE VACUNO”, el cual merece su aprobación, que me permita optar el título Profesional de Ingeniera de Industria Alimentaria.

El presente trabajo consta de cuatro capítulos: Problema de investigación, Marco teórico, Planteamiento Operacional, Resultados y Discusiones.

Deseo manifestar mi agradecimiento a las autoridades de la Facultad De Ciencias E Ingeniería Biológicas y Químicas y en especial de la Escuela Profesional de Ingeniería De Industria Alimentaria, por el apoyo en el presente trabajo.

Arequipa, 29 de Mayo del 2019.

Atentamente.

Sofia del Mar Obando Gomez

N° de Matricula: 2012245662

Bachiller de Ingeniería de Industria Alimentaria



## DEDICATORIA

*A Dios por cada bendición, por tener unos padres admirables, unos hermanos que significan motivación, una familia que son la fuente esencial de mi felicidad, gracias a todos ustedes por ayudarme a dar tan importante paso en mi formación profesional.*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a la facultad de Ingenierías Biológicas y Químicas de la Universidad Católica de Santa María.*

*Agradezco con todo el corazón a los ingenieros Jorge Salas, Mario Paz y Nicolás Ognio por cada orientación, palabra, y experiencia brindada.*

*Agradezco con mi alma a Henry Obando e Yrma Gomez, mis padres y mis mayores ejemplos de vida y amor.*

*Agradezco a Eusebio Obando, mi guía, mi abuelo, mi sabiduría.*

*Agradezco a Lesly Obando, Valery Obando, German Obando, mis impulsos, por demostrarme que la vida debe ser simple y más feliz.*

*Agradezco a la hermanita Anita, mi segunda madre, jamás olvidare tus palabras, 2012: “Te estaba esperando”*

*Agradezco a Juan Carlos Cáceres, porque en los momentos más críticos tienes las palabras exactas de renacer.*

***Gracias.***

## INTRODUCCIÓN

El Perú en su esplendor se ha convertido en un país con potencias naturales indiscutibles, la tierra es una fuente de riquezas que desde tiempos remotos fue una alternativa de subsistencia, por su parte el mar, con características impresionantes tiende a ser un campo de estudio increíble cada año con recursos sorprendentes que solo con una investigación exhaustiva y dedicada se podrá deducir en mínima proporción, es esta última hacia donde pretende apuntar la presente investigación.

En primer lugar sabemos que desde tiempos inmemorables donde el hombre solo tenía a su disposición los recursos que el planeta le otorgaba busco herramientas para aliviar sus padecimientos convirtiéndolos en fuentes de vida, muchos de estos recursos han sido aislados directamente desde nuestros mares, conocemos que antes de nuestra existencia el instinto de supervivencia se hallaba basado en la generación de bioactivos que la propia materia orgánica derivaba, dichos procesos tardan pero sus efectos hoy los podemos evaluar, sin embargo, ¿Se le está otorgando la investigación necesaria a este campo? Esta fue la principal interrogante de motivación para derivar y centrar la evaluación en uno de los miles de recursos que ofrece nuestro litoral peruano, cito al alga *Ulva spp.* alga que en gran proporción podemos observar en costas de Paracas, así como, del norte peruano, y demás lugares del mundo.

Se puede hallar estudios donde se afirma que muchas algas inhiben no solo cepas de microorganismos de laboratorio, si no también hacen referencia a especies de bacterias que viven en el mar ayudando así a mantener un equilibrio en el ecosistema (Charzeddine & Fariñas, 2001), basando el estudio podemos correlacionar y someter el efecto que dichos bioactivos ofrecen y generar una alternativa de solución en la industria alimentaria.

Como no expresar que las algas son maravillosos laboratorios vivientes, ya que por sí mismas deben elaborar diferentes tipos de sustancias que aporten como medios de defensa contra ataques de microorganismos, insectos o predadores, cambios climáticos, oleaje, intensidad luminosa, etc., permitiendo adaptarse al lugar donde se encuentran, son estos metabolitos quienes ceden una opción viable y utilizable al ser humano.

Se entiende de muchas sustancias con impacto bioactivo, aisladas de algas marinas, quienes han recibido poca atención ya que en su mayoría los estudios han sido enfocados en la taxonomía, ecología y distribución, sin embargo los recursos vegetales gracias a procesos de supervivencia y maravillosos metabolismos constituye un verdadero arsenal químico, del cual se conoce mínimamente, solo es necesario entender lo que Theophrastus Bombast Von Hohenheim, más conocido como Paracelso (Padre de la Farmacología química) expreso “Las propiedades medicinales de las plantas radican en sus principios activos por técnicas alquímicas”, relacionando lo expresado encontramos la importancia de involucrar la industria alimentaria en estudios motivados por bioactivos aislados de algas halladas en nuestro litoral peruano, determinar el efecto bioactivo del alga *Ulva* spp. y certificar su efecto bactericida es un medio exitoso de alternativa para solventar la conservación de cualquier alimentos sin embargo la dirección de la investigación se basa en el campo cárnico, puesto que es uno de los segmentos más susceptibles a deterioro en la actualidad.



## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal la determinación del efecto bactericida y conservante del extracto del alga *Ulva* spp. aplicado en cortes de lomo veteado de carne de vacuno, evaluando variables de materia prima, proceso y del producto final.

La investigación se direcciona en el aprovechamiento de los beneficios de los recursos marinos vegetales hallados en el Perú a gran escala, las algas verdes, quienes representan un recurso natural aun no explorado desde el punto de vista científico e industrial.

El alga *Ulva* spp. se encuentra en mayor concentraciones en las playas del departamento de Ica, en la actualidad es poco estudiada en el Perú, sin embargo avances europeos y estudios de universidades adyacentes brindan información de su utilidad en producción de biomasa y compuestos bioactivos a través de la utilidad de sus pigmentos, por ser una clase de las *Ulvophyceas*, el género *Ulva* describe un elevado contenido de clorofila. El tipo de clorofila hallado en las algas es la clorofila b, este pigmento posee no solo un anillo de porfirina si no una cadena de fitol la cual conecta a las invaginaciones de la membrana celular, es el fitol un punto trascendental en la investigación, el enfoque está dado por ser una fuente de generación de apoptosis celular microbiana.

La materia prima, el alga *Ulva* spp. fue sometida a análisis fisicoquímico, químico proximal, microbiológico y organoléptico, para conocer sus características y la calidad de partida en la determinación del efecto bactericida obteniendo características atribuidas a diversas algas como *Macrocystis Integrifolia* Bory con pH 7, y acidez menor a 0.01%, por su parte el valor de clorofila determinada en el alga fue de 0.0141mg de clorofila b/ml valor que se encuentra en el rango establecido por investigaciones (Nanosalud).

Se procedió a realizar las extracciones, las cuales se realizaron por el método de percolación, se trabajó con tres componentes solubles, agua (disolvente polar), metanol (disolvente polar prótico) y etanol (disolvente polar prótico), se cuantifico el contenido de clorofila b por el método Machinney. Para la determinación de la sensibilidad bactericida del bioactivo se empleó el método de difusión en discos utilizando el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud – Serie de Normas técnicas N°30. En la

determinación del efecto bactericida y conservante el procedimiento se determinó por el método de recuento y siembra en superficie sobre muestras de lomo vetado.

Se obtuvo que la extracción hidroalcohólica con metanol 90° a 25°C presenta un mayor porcentaje de rendimiento y mayor cuantificación de clorofila b/ml de extracto, obteniendo un resultado de rendimiento de 3.3125% de extracto y una concentración de 0.05308 mg de clorofila b/ ml de extracto.

Los resultados obtenidos mostraron que la mayor sensibilidad frente a cepas de *Salmonella* spp. y *E. coli* se encuentra al trabajar a una concentración de extracto de 0.15% con un tamaño de halo de 11mm para *salmonella* spp y 18.23mm para *E.coli* lo cual muestra un efecto bactericida de grado elevado para *E.coli* e intermedio para *Salmonella* spp. según el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud – Serie de Normas técnicas N°30.

El mayor efecto bactericida registrado en cortes de lomo vetado de carne de vacuno se determinó a una concentración de 0.15% de extracto bioactivo y a un tiempo de exposición de 10 días conservado a 4°C logrando obtener hasta en 10 días resultados de ausencia en el recuento de *Salmonella* spp. y *E. Coli*, por su parte los resultados del análisis organoléptico llevado a cabo en panelistas semi entrenados demostraron la conservación del color, olor, sabor y textura del corte de lomo vetado hasta en 10 días trabajando a una concentración de 0.15% de extracto bioactivo.

Se ejecutó análisis fisicoquímico, químico-proximal, organoléptico y microbiológico al extracto con una concentración de 0.15% logrando obtener características propias encontradas en la mayoría de especies (Castro, Perez, & Carrilo, 1996), el contenido de clorofila b hallado fue de 0.0012mg/ml de extracto, afirmando la calidad del producto final.

Finalmente se aprueba la hipótesis establecida, comprobando el efecto bactericida y conservante del alga *Ulva* spp. y la aplicación en cortes de lomo vetado de carne de vacuno refrigerado y envasado en LPDE.

**Palabras Claves:** Bioactivo, fitol.

## ABSTRACT

The main objective of this research was to determine the bactericidal and preservative effect of the *Ulva* spp. applied in cuts of marbled beef loin, evaluating variables of raw material, process and the final product.

The research is focused on the exploitation of the benefits of marine plant resources found in Peru on a large scale, green algae, which represent a natural resource not yet explored from the scientific and industrial point of view.

The alga *Ulva* spp. It is found in higher concentrations on the beaches of the department of Ica, currently it is little studied in Peru, however, European advances and studies from adjacent universities provide information on its usefulness in the production of biomass and bioactive compounds through the utility of its pigments, being a class of the Ulvophyceas, the genus *Ulva* describes a high content of chlorophyll. The type of chlorophyll found in algae is chlorophyll b, this pigment has not only a porphyrin ring but a phytol chain which connects to the invaginations of the cell membrane, phytol is a transcendental point in the research, Approach is given by being a source of generation of microbial cellular apoptosis.

The raw material, the alga *Ulva* spp. was subjected to physicochemical, proximal chemical, microbiological and organoleptic analysis, to know its characteristics and the starting quality in the determination of the bactericidal effect, obtaining characteristics attributed to various algae such as *Macrocystis Integrifolia* Bory with pH 7, and acidity less than 0.01%, its part the value of chlorophyll determined in the alga was 0.0141mg of chlorophyll b / ml value that is in the range established by research (Nanosalud).

The extractions were performed, which were performed by the percolation method, worked with three soluble components, water (polar solvent), methanol (protic polar solvent) and ethanol (protic polar solvent), chlorophyll content was quantified b by the Machinney method. To determine the bactericidal sensitivity of the bioactive, the disk diffusion method was used using the Manual of Procedures for the Antimicrobial Sensitivity Test of the National Institute of Health - Technical Standards Series No. 30. In the determination of the bactericidal effect and preservative the procedure was determined by the method of counting and sowing on the surface on samples of veined loin.

It was obtained that the hydroalcoholic extraction with methanol 90 ° at 25 ° C presents a higher percentage of yield and greater quantification of chlorophyll b / ml extract, obtaining a yield result of 3.3125% extract and a concentration of 0.05308 mg of chlorophyll b / ml of extract.

The results obtained showed that the highest sensitivity to strains of Salmonella spp. and E. coli is found when working at an extract concentration of 0.15% with a halo size of 11mm for salmonella spp and 18.23mm for E. coli which shows a high degree bactericidal effect for E. coli and intermediate for Salmonella spp. according to the Manual of Procedures for the Antimicrobial Sensitivity Test of the National Institute of Health - Technical Standards Series No. 30.

The highest bactericidal effect recorded in cuts of veined beef loin was determined at a concentration of 0.15% of bioactive extract and at a time of exposure of 10 days conserved at 4 ° C, achieving up to 10 days of absence results in the count. of Salmonella spp. and E. Coli, on the other hand, the results of the organoleptic analysis carried out in semi-trained panelists demonstrated the conservation of the color, odor, taste and texture of the marbled loin cut up to 10 days working at a concentration of 0.15% of bioactive extract. .

Physicochemical, chemical-proximal, organoleptic and microbiological analysis was carried out on the extract with a concentration of 0.15%, obtaining specific characteristics found in most species (Castro, Perez, & Carrilo, 1996), the content of chlorophyll b found was 0.0012 mg / ml of extract, affirming the quality of the final product.

Finally the established hypothesis is approved, checking the bactericidal and preservative effect of the Ulva spp. and the application in cuts of veined loin of refrigerated beef and packed in LPDE.

**Keywords:** Bioactive, phytol

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPITULO I:.....</b>	<b>1</b>
<b>1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Enunciado del Problema:.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Descripción del problema.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Justificación de la investigación .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3.1. Aspecto social.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3.2. Aspecto científica – Tecnológica .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3.3. Aspecto Económico.....</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO II: .....</b>	<b>4</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Bases teóricas de la investigación .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1. Materia prima: Alga (Ulva spp.).....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2. CARNE.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Antecedentes.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.1. Antecedentes Nacionales.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.2. Antecedentes Internacionales.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3. Objetivos de la investigación.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.1. Objetivo General .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4. Hipótesis.....</b>	<b>32</b>
<b>CAPITULO III.....</b>	<b>33</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Ubicación espacial y temporal .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Metodología .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.1. Descripción general .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2. Descripción del proceso.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.3. Descripción del proceso de acopio de la carne de vacuno.....</b>	<b>38</b>

3.2.4. Diseños experimentales – Diseño Estadístico .....	41
CAPITULO IV .....	60
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	60
4.1. Evaluación de las pruebas experimentales .....	60
4.1.1. Materia prima: Alga (Ulva spp.).....	60
4.2. EXPERIMENTO N°1: EXTRACCIÓN DEL BIOACTIVO DEL ALGA ULVA SPP. ....	63
4.2.1. Resultados y Análisis de Resultados .....	63
4.2.2. Conclusión:.....	69
4.2.3. Materiales y Equipos.....	69
4.3. EXPERIMENTO N°2: SENSIBILIDAD BACTERICIDA DEL BIOACTIVO.....	70
4.3.1. Resultados y Análisis de Resultados .....	70
4.3.2. Conclusión:.....	73
4.3.3. Materiales y Equipos.....	74
4.4. EXPERIMENTO N°3: EFECTO BACTERICIDA EN CARNE DE VACUNO....	75
4.4.1. Resultados y Análisis de Resultados .....	75
4.4.2. Conclusión:.....	91
4.4.3. Materiales y Equipos.....	92
4.5. CARACTERIZACIÓN FINAL: EXTRACTO DEL ALGA ULVA SPP. ....	94
4.5.1. Análisis Físicoquímico.....	94
4.5.2. Análisis Organoléptico:.....	94
4.5.3. Análisis Químico – Proximal .....	95
4.5.4. Análisis Microbiológico.....	95
CONCLUSIONES.....	97
RECOMENDACIONES .....	98
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXOS.....	107

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO N° 1: Análisis Químico Proximal y Energía Bruta del Alga Ulva spp. (g/100g materia seca).....</b>	<b>9</b>
<b>CUADRO N° 2: Fracciones de Fibra del Alga Marina Ulva spp. (g/100g de materia seca) ..</b>	<b>9</b>
<b>CUADRO N° 3: Contenido De Clorofila B En Algas (mg/100g de materia seca).....</b>	<b>10</b>
<b>CUADRO N° 4: Comparación del Contenido de Minerales de Ulva spp. y otras algas marinas (g/100g de materia seca) .....</b>	<b>10</b>
<b>CUADRO N° 5: Comparación de Análisis Químico Proximal de Diferentes Algas Secas ..</b>	<b>11</b>
<b>CUADRO N° 6: Valores Microbiológicos Observados en las Carnes Frescas cuando se cumplieron las Buenas Prácticas de Faenamiento .....</b>	<b>25</b>
<b>CUADRO N° 7: Límites Establecidos por el Código Alimentario Argentino en los Art. 255, 302 y 286 bis para carne picada, chacinados frescos y fiambres .....</b>	<b>26</b>
<b>CUADRO N° 8: Producción Nacional Anual de Carne de Vacuno .....</b>	<b>26</b>
<b>CUADRO N° 9: Proyección Nacional Anual de Carne de Vacuno .....</b>	<b>27</b>
<b>CUADRO N° 10: Materiales y Reactivos para Determinaciones .....</b>	<b>42</b>
<b>CUADRO N° 11: Materiales y Equipos.....</b>	<b>48</b>
<b>CUADRO N° 12: Materiales y Equipos – Extracción de Bioactivo .....</b>	<b>52</b>
<b>CUADRO N° 13: Materiales y Equipos –Sensibilidad Bactericida .....</b>	<b>57</b>
<b>CUADRO N° 14: Resultados del Análisis Físicoquímico del Alga (Ulva spp.) .....</b>	<b>60</b>
<b>CUADRO N° 15: Resultados del Análisis Organoléptico del Alga (Ulva spp.).....</b>	<b>61</b>
<b>CUADRO N° 16: Resultados del Análisis Químico Proximal del Alga (Ulva spp.) en estado fresco .....</b>	<b>61</b>
<b>CUADRO N° 17: Resultados del Análisis Microbiológico del Alga (Ulva spp.) .....</b>	<b>62</b>
<b>CUADRO N° 18: Valores de Absorbancia Obtenidos en la Cuantificación de Clorofila B</b>	<b>63</b>
<b>CUADRO N° 19: Resultado de la Cuantificación de Clorofila B (Método de Machinney).</b>	<b>64</b>
<b>CUADRO N° 20: Datos de Pesos Obtenidos para la Determinación de Rendimiento .....</b>	<b>66</b>
<b>CUADRO N° 21: Resultados del Rendimiento de Extracto (%).....</b>	<b>66</b>
<b>CUADRO N° 22: Materiales y Equipos – Extracción de Bioactivo .....</b>	<b>69</b>
<b>CUADRO N° 23: Resultado de la Sensibilidad Bactericida del Bioactivo (Método Difusión en Discos) .....</b>	<b>70</b>

<b>CUADRO N° 24: Materiales y Equipos – Sensibilidad Bactericida .....</b>	<b>74</b>
<b>CUADRO N° 25: Resultado de Recuento de E.Coli y Salmonella spp. en carne de vacuno sin extracto (Método de Recuento y Siembra en Superficie) .....</b>	<b>75</b>
<b>CUADRO N° 26: Resultado de Recuento de E.Coli para el efecto Bactericida en Carne de Vacuno (Método de Recuento y Siembra en Superficie).....</b>	<b>76</b>
<b>CUADRO N° 27: Resultado del Recuento de Salmonella spp. para el Efecto Bactericida en Carne de Vacuno (Método de Recuento y Siembra en Superficie) .....</b>	<b>78</b>
<b>CUADRO N° 28: Resultado del Efecto Bactericida en Carne de Vacuno.....</b>	<b>80</b>
<b>CUADRO N° 29: Resultado del Efecto Bactericida en Carne de Vacuno.....</b>	<b>83</b>
<b>CUADRO N° 30: Resultado del Efecto Bactericida en Carne de Vacuno.....</b>	<b>86</b>
<b>CUADRO N° 31: Resultado del Efecto Bactericida en Carne de Vacuno.....</b>	<b>89</b>
<b>CUADRO N° 32: Materiales y Equipos – Efecto Bactericida .....</b>	<b>92</b>
<b>CUADRO N° 33: Resultados Del Análisis Físicoquímico Del Extracto De Alga Ulva spp ..</b>	<b>94</b>
<b>CUADRO N° 34: Resultados del Análisis Organoléptico del Extracto del Alga Ulva spp.</b>	<b>94</b>
<b>CUADRO N° 35: Resultados del Análisis Químico Proximal del Extracto del Alga Ulva spp. (0.15% de Extracto concentrado) .....</b>	<b>95</b>
<b>CUADRO N° 36: Resultados del Análisis Microbiológico del Extracto del Alga .....</b>	<b>95</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA N°1: Análisis de Varianza para Evaluar el Contenido de Clorofila b.....</b>	<b>66</b>
<b>TABLA N°2: Análisis de Varianza para Evaluar el Rendimiento de Bioactivo.....</b>	<b>68</b>
<b>TABLA N°3: Análisis de Factores - Experimento 1 .....</b>	<b>68</b>
<b>TABLA N°4: Análisis de Varianza para Evaluar el Tamaño de Halo.....</b>	<b>71</b>
<b>TABLA N°5: Análisis de Factores - Experimento 2.....</b>	<b>72</b>
<b>TABLA N°6: Análisis de Varianza para Evaluar el Color - Efecto Bactericida.....</b>	<b>81</b>
<b>TABLA N°7: Análisis de Varianza para Evaluar el Olor - Efecto Bactericida.....</b>	<b>84</b>
<b>TABLA N°8: Análisis de Varianza para Evaluar la Textura - Efecto Bactericida.....</b>	<b>87</b>
<b>TABLA N°9: Análisis de Factores - Experimento 3 - Textura.....</b>	<b>88</b>
<b>TABLA N°10: Análisis de Varianza para Evaluar el Sabor - Efecto Bactericida.....</b>	<b>90</b>

## INDICE DE DIAGRAMAS

<b>Diagramas N°1: Diagrama de Bloques para la determinación del Efecto bactericida y conservante del extracto de alga <i>Ulva</i> spp. aplicado en carne de vacuno</b> .....	<b>40</b>
--	-----------

## INDICE DE CARTILLAS

<b>CARTILLA N°1: Características para evaluar el Color</b> .....	<b>55</b>
<b>CARTILLA N°2: Características para evaluar el Olor</b> .....	<b>55</b>
<b>CARTILLA N°3: Características para evaluar la Textura</b> .....	<b>55</b>
<b>CARTILLA N°4: Características para evaluar el Sabor</b> .....	<b>56</b>
<b>CARTILLA N°5: Características para evaluar el Color – Efecto Bactericida</b> .....	<b>80</b>
<b>CARTILLA N°6: Características para evaluar el Olor – Efecto Bactericida</b> .....	<b>83</b>
<b>CARTILLA N°7: Características para evaluar la Textura – Efecto Bactericida</b> .....	<b>86</b>
<b>CARTILLA N°8: Características para evaluar el Sabor – Efecto Bactericida</b> .....	<b>89</b>

## INDICE DE GRAFICAS

<b>GRAFICA N°1: Resultados de la Cuantificación de la Clorofila b</b> .....	<b>64</b>
<b>GRAFICA N°2: Resultados de Rendimiento de Bioactivo (%)</b> .....	<b>67</b>
<b>GRAFICA N°3: Resultados de Sensibilidad Bactericida del Bioactivo</b> .....	<b>71</b>
<b>GRAFICA N°4: Resultados de Color – Experimento 3</b> .....	<b>81</b>
<b>GRAFICA N°5: Resultados de Olor – Experimento 3</b> .....	<b>84</b>
<b>GRAFICA N°6: Resultados de Textura – Experimento 3</b> .....	<b>87</b>
<b>GRAFICA N°7: Resultados de Sabor – Experimento 3</b> .....	<b>90</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA N°1: Alga Ulva spp. (Lechuga de Mar)</b> .....	<b>4</b>
<b>FIGURA N°2: Análisis del Alga Ulva spp.</b> .....	<b>60</b>
<b>FIGURA N°3: Valores de Absorbancia para determinación de Clorofila b en Alga Ulva spp. a 665nm y 650nm</b> .....	<b>61</b>
<b>FIGURA N°4: Concentraciones para determinar sensibilidad a 0.2%, 0.15% y 0.1% de Extracto Bioactivo</b> .....	<b>71</b>
<b>FIGURA N°5: Resultados del recuento de E.coli y Salmonella spp en los 10 días analizados en carne de vacuno sin extracto</b> .....	<b>76</b>
<b>FIGURA N°6: Concentraciones para determinar el Efecto Bactericida a 0.15%, 0.1% y 0.05% de Extracto Bioactivo</b> .....	<b>77</b>
<b>FIGURA N°7: Resultados de recuento de E.coli a los 1, 5 y 10 días en agar EMB</b> .....	<b>77</b>
<b>FIGURA N°8: Resultados de recuento de Salmonella a los 1, 5 y 10 días en agar Salmonella-Shiguela</b> .....	<b>79</b>
<b>FIGURA N°9: Producto Final – Extracto de Alga Ulva spp.</b> .....	<b>94</b>

## ANEXO

**ANEXO N°1: Métodos de Análisis para Alimentos**

**ANEXO N°2: Métodos de Proceso**

**ANEXO N°3: Prueba Sensorial**

**ANEXO N°4: Resultados de Análisis de Materia Prima y Constancia Especial del uso de laboratorios de la UCSM para el desarrollo de la tesis**

**ANEXO N°5: Resultados de Análisis del Producto Final**

**ANEXO N°6: Cálculos Desarrollados**

**ANEXO N°7: Productos Similares**

**ANEXO N°8: Etiqueta del Producto**

**ANEXO N°9: Fotos**

**ANEXO N°10: Antibiogramas**

## CAPITULO I:

### 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1. Enunciado del Problema:

“Efecto bactericida y Conservante del Extracto de Alga (*Ulva* spp.) Aplicado En Carne De Vacuno”

#### 1.2. Descripción del problema

El presente proyecto es en una investigación científica - tecnológica para determinar el efecto bactericida del extracto del alga *Ulva* spp. con la aplicación en un medio de carne de res, específicamente en cortes de lomo vetado refrigerado a 4°C, y la observación de su conservación en la misma, para ello se toma en consideración variables de materia prima, variables de procesos para la extracción de bioactivo, tomando como prioridad y eje central al fitol como principal bioactivo, luego se procederá a determinar la sensibilidad bactericida con concentraciones de extracto que nos orienten a la inhibición y de esta manera llegar al efecto bactericida del extracto de alga *ulva* spp. en cortes de lomo vetado refrigerados a 4°C y envasados en LPDE (Polietileno de Baja Densidad, termoplástico, reciclable).

El problema que se quiere dar solución se fundamenta en potenciar nuestros recursos vegetales y otorgarles valor agregado a nuestros productos alimentarios que a lo largo del tiempo no se han investigado en nuestro país como alternativas de solución ante problemáticas en la industria alimentaria, se buscará impulsar las bondades del alga *Ulva* spp. recolectadas del departamento de Ica, provincia de Nazca, distrito de Marcona.

Las algas en nuestro país constituyen una de las más ricas y pródigas fuentes de recursos marinos que aún el hombre no ha sabido utilizar a plenitud. Como todos los seres vivos, estas plantas poseen una diversidad de compuestos químicos, como carbohidratos y lípidos, necesarios para realizar sus funciones energéticas, y proteínas que cumplen las más diversas funciones. Analizar cada detalle de la vida en el mar nos demuestra las riquezas y con ella las diversas opciones que poseen para mantener el equilibrio del ecosistema inhibiendo de esta manera cepas de microorganismos no solo de laboratorio si no especies y así mantener la vida. Desde tiempos remotos el ser humano ha tratado de mitigar sus necesidades y prolongar su vida, hecho que lo venimos observando hasta nuestros días sin embargo en épocas donde el hombre

solo tenía a su disposición los recursos que el planeta le otorgaba ¿Cómo lograron obtener una vida saludable? E aquí la solución, sabemos que muchas sustancias con efectos bioactivos nacen desde nuestra naturaleza, sustancias desarrolladas a partir de su propia necesidad de sobrevivir, las algas en su instinto de subsistir ante cambios climáticos, mareas o depredadores, generan bioactivos, son estos bioactivos los que en la presente investigación se analizan como fuente inimaginable en la industria alimentaria.

En tal sentido, se ha demostrado que los extractos de varias especies de algas solubles en éter, inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Isassi, 1991), ante ello se plantea la extracción del bioactivo presente en el alga *Ulva*, spp, el fitol a través de la extracción de clorofila b, si bien el tipo de clorofila hallado en las algas es la clorofila b, este pigmento posee no solo un anillo de porfirina si no una cadena de fitol la cual conecta a las invaginaciones de la membrana celular, es el fitol el eje central en la presente investigación, el enfoque se basa en la generación de apoptosis celular microbiana a través de la inactivación de proteínas y enzimas importantes en microorganismos, así como la muerte celular oxidativa en microorganismos debido al aumento de ROS (oxígeno reactivo intracelular) y agotamiento transitorio del NADH, en consecuencia se genera la fracturación del ADN microbiano que a su vez genera el efecto bactericida.

La carne de res en el Perú es la segunda más consumida, viendo un ascenso en los últimos años, lo que promueve su estudio y cuidado alimentario, sin embargo se observa naturalmente manipulaciones perjudiciales que reducen su vida útil siendo la misma una problemática en la industria cárnica, el aporte que se busca hallar va en dirección de conservar más tiempo la carne de res generando su mayor manipulación y permaneciendo sus características organolépticas y microbiológicas óptimamente.

La oportunidad de obtener una carne con las mismas características óptimas en mayor tiempo es una gran solución en la industria ya que de esta manera se evita el riesgo de perder recursos económicos por contaminación microbiológica, o por preocupación de deterioro organoléptico. Es de esta manera que la presente investigación busca determinar el efecto bactericida y conservar las características en el tiempo de la carne de res siendo una solución de relevancia en la industria alimentaria e impulsar los recursos vegetales de nuestro país.

### **1.3. Justificación de la investigación**

#### **1.3.1. Aspecto social**

La presente investigación tiene como objetivo el promover el uso y desarrollo sostenible de los recursos naturales de nuestra biodiversidad, principalmente de aquellas plantas con propiedades benéficas para la salud.

El alga *Ulva* spp. se halla en la región de la costa Peruana a gran escala, de esta manera se convierte en una motivación para la obtención del principio activo durante todos los meses del año, la orientación siempre será el lograr obtener un bioconservante que garantice la calidad de los alimentos y prolongue su vida útil.

El presente trabajo, nos aporta una alternativa de solución social puesto a que con el uso del alga se podrá evitar el uso de aditivos artificiales que provoquen alteraciones en la salud del ser humano.

#### **1.3.2. Aspecto científica – Tecnológica**

La presente investigación permite otorgar soluciones ante la inadecuada manipulación de la carne de vacuno luego del sacrificio, aumentando su vida útil y generando menor riesgo microbiológico. La investigación que se realiza es sumamente importante desde el punto de vista tecnológico y científico, ya que se podrá incrementar la vida útil de un producto con problemas internos de almacenamiento e incentivar a realizar nuevos proyectos con la biodiversidad de algas con las que se cuenta a gran escala en el departamento de Ica y en nuestro país y sin costo alguno en nuestras costas peruanas.

La ventaja del presente bioconservante es la seguridad que emana, aquella que nos reducirá el uso de conservantes químicos elevando el bienestar humano y por su parte nos reducirá las pérdidas económicas debido a la contaminación alimentaria.

#### **1.3.3. Aspecto Económico**

Se propone con el presente estudio la transformación de materia prima en extracto suministrándole así un valor agregado que significa la implementación de algas y la creación de fuentes de trabajo directo e indirecto.

## CAPITULO II:

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Bases teóricas de la investigación

##### 2.1.1. Materia prima: Alga (*Ulva* spp.)

##### 2.1.1.1. Generalidades

Es un alga azul verdosa que pertenece a las clorofíceas, también conocida como “lechuga de mar”, por sus largas hojas verdes que le dan un aspecto similar al de la lechuga. (Troncoso, y otros, 2015)



**Figura N° 1.** Alga *Ulva* spp. (*Lechuga de Mar*)

##### 2.1.1.2. Ubicación taxonómica del alga (*Ulva* spp.)

Reino Plantae / Phylum Chlorophyta / Clase Ulvophyceae / Orden Ulvales / Familia Ulvaceae / Género *Ulva* / Especies: *angusta*, *californica*, *costata*, *dactylifera*, *expansa*, *lactuca*, *lobata*, *rigida*, *stenophyll*, *taeniata* (Guevara Matute, 2015).

El género *Ulva* fue uno de los primeros nombrado por Linnaeus. El nombre *Ulva* fue mantenido para algas verdes con talos que tienen dos capas de células y el de *Enteromorpha* Link fue establecido para las algas verdes con talos tubulares. Recientemente investigaciones basándose en datos moleculares (Quiroz, Leon Alvarez, & Rivas Acuña, 2017), redujeron el género

Enteromorpha a sinonimia de Ulva. A nivel mundial se registran 313 especies de Ulva, de las cuales 104 son las más comunes (Guiry & Dhonncha, 2007) .

### **2.1.1.3. Morfología**

Las especies de Ulva son morfológicamente muy simples y los talos pueden ser laminares o tubulares de formas muy diversas (irregulares, cuneados, alineados, lanceolados, o profundamente divididos dentro de una línea lanceolada); poseen texturas finas con bordes rizados, sus delicadas láminas son usualmente de 40 micrones de grosor.

Ulva spp. debe su color a la gran cantidad de pigmentos verdes (clorofila b), además, poseen otros tipos de pigmentos, como los carotenoides ( $\beta$  carotenos, de color amarillo), luteína, sinfonoxantina y una xantofila especial característica de las algas verdes cenocíticas, la cual se encuentra también en las especies de Ulva de aguas profundas (M, 1987).

Ulva spp. se fija por un disco basal ó filamentos rizoidales, a diferentes tipos de sustratos. U. fasciata y U. lactuca alcanzan aproximadamente 15 cm de altura cuando están adheridas al sustrato, rocas u otros objetos sólidos en fondos arenosos. En lugares tranquilos, se han encontrado talos de hasta 1 m de altura y 30 cm o 50 cm de ancho (Diaz & Lopez, Taxonomía, ecología y valor nutrimental de algas marinas cubanas I. ICIT, 1959). Según Cano (2008) los compuestos del nitrógeno y el fósforo en el agua de mar y las diferencias en la amplitud de variación de los mismos, justifican las diferencias en la morfometría y el estado nutricional (C, N, P) de U. fasciata.

### **2.1.1.4. Habitat**

Muchas especies del genero ulva son cosmopolitas, hallándose en gran pluralidad de hábitats, con grandes diferencias de salinidad, temperatura, turbidez y composición química; U. fasciata, por ejemplo, se extiende hasta las costas de Australia y Nueva Zelandia, las islas del Pacífico y Sudamérica (Hayden, y otros, 2003).

Es usual observar a las especies del género Ulva en zonas intermareales de la mayoría de los océanos del mundo, en su mayoría en áreas donde el sustrato tiene mayor disponibilidad de nutrientes, donde hay condiciones adecuadas de luz y temperatura, la fuerza de las olas es baja y las especies herbívoras son mínimas. Su presencia a menudo, indica entrada de agua fresca y su distribución puede ser limitada por concentraciones de nitrógeno (por sus altos requerimientos de este elemento, habilidad reducida para absorberlo y habilidad limitada para almacenarlo). En caso

de *U. fasciata*, menos concentraciones de nitrógeno favorecen la formación de gametos (es una célula que tiene una función reproductora); altas concentraciones de nitrógeno conducen al crecimiento vegetativo y reproducción asexual; en el caso de *U. lactuca*, deficiencias de nitrógeno suprimen su reproducción (Ministerio de Pesquería, 1994).

**a). Salinidad**

Es de recalcar que la fotosíntesis en las algas logra su máxima eficiencia a un determinado nivel de salinidad (Areces & Araujo, 1996) al igual que la respiración y el desarrollo (Cañedo Castro, 2015). Variaciones extremas en este indicador pueden causar pérdidas importantes en el funcionamiento o en la eficiencia de algunos procesos vitales de estos vegetales y en algunos casos provocan su muerte (Edding, Tala, & Vasquez, 2006).

**b). Temperatura**

Las especies del género *Ulva* son eurihalinas y euritermas (Etcheverry & Collantes, 1977) y soportan grandes variaciones de salinidad en flancos supralitorales. En estos lugares el contenido de sal alcanza un alto valor después de una intensa evaporación y las poblaciones que viven en el nivel más alto, durante el verano son cubiertas ocasionalmente por una capa de sal que se cristaliza durante el período en que el mar ha dejado la franja al descubierto (Yokoya & Oliveira, 1992).

La relación entre la vegetación marina y la temperatura del mar, sitúa las especies euritérmicas como es el caso de *Ulva* en los pisos supralitoral y mesolitoral y las estenotérmicas en las zonas sumergidas (Gil Rodríguez & De la Torre, 1980). Estos autores afirman que la temperatura que el agua alcanza en las charcas de marea altera el ciclo biológico de las algas, lo cual determina que algunas especies tengan una temporada crítica relacionada con la actividad reproductora. En latitudes medias o altas el intervalo de temperatura aceptable para algunas especies de *Ulva* se encuentra entre 6°C y 8°C, a partir de ese valor el alga se convierte en fértil y después se desintegra (Kopp, Kraft, & Waller, 2010). El hielo afecta a estas macroalgas, ya que toda la lámina se blanquea en pocos días después que se someten a las bajas temperaturas. La mayoría de las especies exigen condiciones de temperatura diferentes en distintas etapas de su ciclo reproductivo. Frecuentemente las fases del mismo no suelen presentarse en la misma estación del año en todas las macroalgas.

**c). Intensidad luminosa**

Al igual que la temperatura, la luz desempeña un papel importante en la distribución de las macroalgas, ya que su intensidad dependerá de la época del año, así como de la orientación y situación de la localidad. La luz es importante para la fotosíntesis y repercute directamente en el crecimiento, junto con otros factores como la temperatura, la disponibilidad de carbono inorgánico, el ritmo circadiano (que ocurre diariamente) y la edad del vegetal (Lobban & Harrinson, 1994). La tasa de crecimiento variará directamente con la intensidad lumínica, ya que la energía requerida para este proceso es obtenida a partir de la fotosíntesis (Hellebust, 1970). La periodicidad estacional, que implica cambios en la intensidad luminosa y en la temperatura acorde a la época del año, influye por tanto de forma determinante en la distribución de las algas marinas, en el crecimiento y la reproducción.

Una mayor intensidad luminosa provoca una mayor actividad fotosintética, y por ende tanto un aumento en el pH del medio acuoso como de su contenido de oxígeno (Casas-Valdez, Nuñez-Lopez, & Cruz-Ayala, 2000). En ambientes que se caracterizan por la rápida y amplia variación de la transparencia del agua debido a la resuspensión de los sedimentos provocados por el hidrodinamismo, la adaptación de las algas marinas a un amplio rango de intensidad luminosa es importante. La mayoría de las algas tienen un límite de tolerancia a la intensidad de la luz, muchas veces se decoloran cuando hay una elevada intensidad y dejan de crecer cuando es baja. La exposición a elevadas intensidades de luz se reporta para varias especies de *Ulva* (Murphy & J.P, 1962).

Algunas especies como *U. rígida* muestran una saturación fotosintética a alrededor de  $456 \mu\text{M s}^{-1} \text{m}^{-2}$ , pero la producción de oxígeno es solamente inhibida ligeramente a altas intensidades de luz (Riccardi & Solidoro, 1996)

**d). Sustrato**

La importancia del sustrato para las macroalgas radica principalmente en que la fijación de las mismas en un área determinada depende de la naturaleza de éste. La composición y textura de un sustrato rocoso afecta notablemente a las comunidades vegetales. Los representantes de *Ulva* se fijan a diferentes tipos de sustratos duros, como piedras, rocas, maderas, cuerdas entre otros.

En las regiones mesolitorales tropicales, las algas se fijan por lo general a sustratos compuestos por calizas parcialmente disueltas o fragmentadas. En sustratos irregulares o de complejidad estructural, la existencia de intersticios permite la supervivencia de plántulas y esporas, mientras que en pavimentos rocosos o sustratos con superficie lisa las posibilidades de sobrevivir son casi nulas (Dawes, 1986).

**e). Movimiento del agua**

Las corrientes, las mareas y el oleaje, actúan directamente sobre la vegetación marina, ejerciendo sobre ella una combinación muy variada de acciones físicas, químicas y biológicas. La influencia de las corrientes marinas y las olas, son determinantes para la distribución de las algas, por lo que existen especies típicas de zonas costeras batidas y especies típicas de zonas costeras protegidas (Gil Rodríguez & De la Torre, 1980).

La vegetación marina alcanza sus mayores tallas durante períodos de calma y en los períodos de tormenta, puede quedar podada o destruida. También las macroalgas en áreas de exposición a las olas, pueden presentar diferentes morfotipos, tales como: láminas, pequeños arbustos, césped de algas o formas incrustantes. Cada uno de estos morfotipos ofrece una resistencia mecánica particular al oleaje y determina la estrategia de supervivencia más apropiada para el sitio.

En el Perú, *Ulva papenfussi* se halla en: Huanchaco, Trujillo, Salaverry, Callao, Pucusana, y Pisco así como zonas ubicadas en el departamento de Ica. *Ulva costata* se encuentra en: Máncora, Lobitos, Talara, Paita, Huacho, Ancón, Callao, Pucusana, San Andrés, La Puntilla, Lagunillas, Laguna Grande, Punta Lomas y Mollendo (Ministerio de Pesquería, 1994).

Se conoce que una de las especies más representativas en la Bahía de Paracas, es *Ulva papenfussi*; sin embargo, también se reporta *Ulva costata* en Playa Atenas (Bahía de Paracas, Pisco), a 0 m. de profundidad (Arce Castro & Mendo, 2014).

2.1.1.5. Composición química

CUADRO N° 1

ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL Y ENERGÍA BRUTA DEL ALGA ULVA SPP.  
(G/100G MATERIA SECA)

FRACCIÓN	%
Proteína cruda	10.75
Energía bruta (kcal/g)	1.64 ± 0.00
Carbohidrato (por diferencia)	30.92
Cenizas	53.24 ± 0.36
Grasa	0.25 ± 0.04
Fibra cruda	4.84 ± 0.25

*Fuente:* (Castro Gonzales, Perez Gil, Perez Estrella, & Carrillo Dominguez, 1996)

CUADRO N° 2

FRACCIONES DE FIBRA DEL ALGA MARINA ULVA SPP. (G/100G DE MATERIA  
SECA)

FRACCIÓN	%
<i>Fibra neutro-detergente</i>	
Pared celular	44.52 ± 0.06
Contenido celular	55.48 ± 0.06
<i>Fibra acido-detergente</i>	
Lignina	3.07 ± 0.14
Celulosa	7.79 ± 0.37
Sílice	24.53 ± 0.32
Hemicelulosa (por diferencia)	8.67

*Fuente:* (Castro Gonzales, Perez Gil, Perez Estrella, & Carrillo Dominguez, 1996)

**CUADRO N° 3**

**CONTENIDO DE CLOROFILA B EN ALGAS (mg/100G DE MATERIA SECA)**

<b>ALGA</b>	<b>mg</b>
Alga AFA (Aphanizomenon Flos Aquae)	3.00 ± 0.00
Alga KBG	3.00 ± 0.00
Alga Chlorella	2.80 ± 0.00
Spirulina	1.15 ± 0.00

*Fuente:* (Nanosalud)

**CUADRO N° 4**

**COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE MINERALES DE ULVA SPP. Y OTRAS  
ALGAS MARINAS (G/100G DE MATERIA SECA)**

<b>Mineral</b>	<b>Pardas</b>			<b>Roja</b>	<b>Verde</b>
	<b>Macrocystis pyrifera</b>	<b>Sargassum sinicola</b>	<b>Ascophyllum nodosum</b>	<b>Rodhymenia palmata</b>	<b>Ulva spp.</b>
Calcio	1.2	3.8	2.1	0.47	0.84
Fosforo	0.25	2.7	0.1	0.32	0.14
Sodio	3.1	3.8	3.5	2.51	xx
Potasio	5.5	3.3	2.5	7.1	xx
Cloro	8.6	6	3.7	6.41	9.79
Magnesio	4.9	12.1	0.7	1.22	xx
Hierro (ppm)	355	1,287	575	1,500	6,600
Cobre	xx	xx	xx	xx	0.06
plomo	xx	xx	xx	xx	0.0138

*Fuente:* (Castro Gonzales, Perez Gil, Perez Estrella, & Carrillo Dominguez, 1996)

**CUADRO N° 5**  
**COMPARACIÓN DE ANÁLISIS QUIMICO PROXIMAL DE DIFERENTES ALGAS**  
**SECAS**

Alga	Componentes %					
	Humedad %	Ceniza %	Proteína %	Lípido %	Carbohidrato %	Fibra %
<b>Qochayuyo</b>	14.00	2.01	14.18	4.09	13.92	51.80
<b>Ulva spp.</b>	88.84	1.62	4.14	1.20	1.97	2.23
<b>Nostoc</b>	83.17	4.62	1.32	1.02	5.91	3.96

**Fuente:** (Food algae to improve the nutritional quality of meat product, 2014; Hollwich & Rambeck, 2002)

Las algas del género *Ulva* contienen una buena fuente de minerales, carbohidratos, fibra, aminoácidos esenciales, ácidos grasos Omega 3 y 6, betacarotenos y vitaminas (Marinas, 2014).

*Ulva spp.* está considerada como un alga alimentaria (CEVA, 2005). Al respecto, (Piña, Reis de Carvalho, & Goncalves, 2009) investigadores (Castro Gonzales, Perez Gil, Perez Estrella, & Carrillo Dominguez, 1996) mencionan que las algas verdes generalmente presentan, mayor contenido de proteína; su contenido es similar al del maíz, trigo y avena (7 a 15%) y superior a ingredientes usados en la alimentación animal como la paja (3%) y similar al heno (13 a 17%). En cuanto a aminoácidos, *U. fasciata*, por ejemplo, posee cantidades considerables de metionina, lisina, isoleucina, triptófano y cisteína (Diaz & Lopez, Taxonomía, ecología y valor nutrimental de algas marinas cubanas I. ICIT, 1959) inclusive se halló que la composición aminoacídica de *U. lactuca* cumple con los requerimientos del patrón (FAO, 1995) para niños de 2-5 años, con excepción del triptófano y la cisteína (Gonzalez, 1995).

(Vinoj & Kaladharan, 2007) Vinoj haciendo un trabajo parecido y usando el patrón de referencia de la FAO (FAO/OMS, 1994) hallaron que *U. lactuca* tiene más alto contenido de treonina que la proteína de huevo, leche de vaca y leche humana.

En polisacáridos, *Ulva* contiene uno llamado *Ulvan*, el cual contiene en sus moléculas grupos poliurónicos (Chavez, Fortificación para bebés prematuros con alga Lechuga de Mar (*Ulva fasciata* forma *costata*), 1995).

En fitoesteroles, el más abundante en *Ulva* es el isofucosterol (R & Lupatsch, 2012) sin embargo, en algunos casos, el esteroles predominante puede ser el fucosterol según las características del lugar y la época del año en que se cosecha (Popov, Marekov, Konaklieva, Panayotova, & Dimitrova-Komaklieva, 1985).

La cantidad de vitamina A encontrada en esta alga es sólo comparada con la presente en las coles (100 UI); su contenido de vitamina C, va de un rango de 27 – 28 mg / 199 g. de peso fresco. Otros autores han reportado valores de vitamina C de 2200 mg / kg en *U. fasciata*, de vitamina A valores de 600–1500 mg / kg para *Ulva* spp. de vitamina E de 239 mg/ kg para *E. compressa* (Marshall & Garcia, 2006).

Una de las principales características nutritivas de las algas es su alto contenido de antioxidantes. Según Taboada y Millán, citados por Lordan (Lordan, Ross, & Stanton, 2011) *Ulva* spp. además de vitamina C, contiene carotenoides, que actúan como provitamina A (pueden ser convertidos en la vitamina A por el cuerpo humano); al ser solubles en lípidos, se unen a las grasas y circulan unidos a diferentes lipoproteínas, previniendo la formación de especies oxígeno reactivas, dando protección potencial contra la peroxidación lipídica, aterogénesis, la oxidación de ADN y el cáncer.

En la variedad de componentes con efectos positivos a investigar encontramos a moléculas cuya función preliminar fue la reproducción o subsistencia del alga, sin embargo este será inducido para agregarle valor en la industria alimentaria.

#### a). **Clorofila**

El género *Ulva* conocida comúnmente como laminilla es un alga verde incluida entre las lechugas de mar, su color particular verde es característico del pigmento en su mayoría, la clorofila, biomolécula extremadamente relevante en la fotosíntesis del alga, en su estructura podemos hallar dos partes: un anillo de porfirina que contiene magnesio y cuya función es absorber la luz, y una cadena de fitol cuya función es mantener la clorofila integrada en la membrana fotosintética.

##### ○ **Fitol**

El fitol es un alcohol diterpénico acíclico que puede usarse como precursor para la fabricación de formas sintéticas de vitamina E y vitamina K1. En los rumiantes, la fermentación

intestinal de materiales vegetales ingeridos libera fitol, un componente de la clorofila, que luego se convierte en ácido fitánico y se almacena en las grasas.

El fitol (3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-EN-1-OL) es un miembro importante de la cadena ramificada insaturada, es un terpeno, y es un producto del metabolismo de la clorofila en plantas. Curiosamente, el fitol puede inhibir los microbios (Mohammad Taghi, Hassan , Ali, Seyedhossein, & Mohammad, 2015).

#### **\*Efecto del fitol**

➤ El fitol como diterpeno también cumple una función de aumentar la fijación de algunas proteínas a las membranas celulares incluyendo las bacterianas de esta manera provocan la aglutinación y la posterior apoptosis. Investigaciones aseguran que la inactivación de proteínas y enzimas es una de los importantes mecanismos de inactivación de los microbios.

➤ La Facultad de ciencias naturales, Kyungpook National University, Daegu, Republic of Korea, en el 2016 aseguraron la actividad antibacteriana del fitol y su mecanismo que induce la muerte celular oxidativa en *Pseudomonas aeruginosa*. En las células tratadas con fitol, se observaron niveles elevados de especies de oxígeno reactivo intracelular (ROS) y agotamiento transitorio de NADH. Estos resultados demostraron que el fitol indujo la acumulación de ROS y que la cadena de transporte de electrones estuvo involucrada en el aumento de ROS. Debido a esta generación de ROS, el desequilibrio se desarrolló entre las ROS intracelulares y el sistema de defensa antioxidante, lo que lleva a la disminución del glutatión reducido (GSH). Además, se demostró daño grave en el ADN después del tratamiento con fitol. Se realizó una electroforesis de ADN y un ensayo de marcaje de extremo (DUNP) de desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) con un tratamiento previo con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) para evaluar la causa del daño en el ADN. En las células pre tratadas, el daño se confirmó y apoya que el fitol induce la fracturación del ADN mediado por el estrés oxidativo. En conclusión, el fitol ejerce la propiedad antibacteriana mediante la inducción de la respuesta al estrés oxidativo (Free, 2016).

#### ○ ***Metil Fenilquinolina***

Las quinoleínas son compuestos orgánicos heterocíclicos formados por la unión de un núcleo derivado del benceno y otro piridínico; además estos compuestos poseen un isómero denominado isoquinoleína. Estos compuestos provienen de la naftalina y sólo habría que cambiar un átomo de nitrógeno por un grupo CH.

Se ha estudiado la relación de la cadena con el aumento de la citotoxicidad, provocando de esta manera de destrucción celular (Santivañes-Veliz, Elsa, Monge, & Peres-Silanes, 2013).

#### **2.1.1.6. Características microbiológicas**

Respecto a los estudios farmacológicos de esta especie se ha observado la capacidad antibacteriana contra gérmenes como parásitos, microorganismos gram positivos (staphylococcus aureus, staphylococcus epidermis, bacillus subtilis, staphylococcus faecalis y streptococcus beta-hemoliticus) y gram negativo (ghigella flexneri), salmonella enteritidis, Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa y actividad antifungica contra candida albicans y trichophyton mentagrophytes.

#### **2.1.1.7. Usos**

Las comunidades indígenas americanas durante siglos y hasta el día de hoy hacen del alga una rutina gastronómica interesante. En Perú se ha extraído desde las costas y secado en paquetes que, gracias a su bajo peso, son transportados al interior del país. Existen muchos platos americanos que usan esta alga, formando parte de guisos, ensaladas, pasteles y sopas, fabricándose incluso, saborizada con frutas. Sin embargo, en los últimos años su consumo ha disminuido. A los alimentos que contienen esta alga, se les atribuyen efectos antiescrofulosos, digestivos y tónicos (Magallanes, Cordova , & Orozco, 2003).

##### **a). En la alimentación humana**

(Noriega, Algas comestibles del Perú. Pan del Futuro, 2011) Noriega reporta que, en Perú las algas de mayor consumo popular son tres de origen marino (Gigartina chamisoi, Porphyra columbina, Ulva costata) y dos de agua dulce (Monostroma cuaternaria y Cladophora glomerata). Por su parte (Acleto, 1996) menciona que en Chile y Argentina un reducido número de personas consume ulva fresca en tortillas, budines, bocadillos, etc., o desecadas y molidas como condimentos en diversos alimentos.

Se utiliza Ulva en la industria gastronómica en países como Chile, Filipinas, Jamaica, Perú, Escocia, Hong Kong y Taiwán (Marshall & Garcia, 2006).

Algunas especies como *U. lactuca* y *U. compressa* poseen un alto contenido de fibra dietética, especialmente de fibra soluble; razón por la cual, se recomiendan para la preparación de dietas ricas en este componente (Sallib & Araski, 1978).

La lechuga de mar, *Ulva lactuca*, está entre las diez algas aprobadas para el consumo humano en Francia (Fleurence, 2003).

Se halló (Torres, 1991) que formulaciones con el deshidratado del alga *Ulva fasciata* tienen una evaluación sensorial aceptable, recomendando preparar dietas y hacer pruebas usando el alga como materia prima en la elaboración de productos procesados.

*U. lactuca* y *U. compressa* poseen alto contenido de fibra dietética, especialmente fibra soluble; razón por la cual se recomiendan para la preparación de dietas ricas en este componente (Lahaye & Jegou, 1993).

Según el Ministerio de Pesquería (1994) en Perú solo hay 4 especies que se consumen como alimento: dos especies de *Ulva* (*Ulva papenfussi* y *Ulva costata*), así como *Caulerpa filiformis* y *Porphyra columbina*.

En Perú, se caracterizó (Chavez, Fortificación para bebés prematuros con alga Lechuga de Mar (*Ulva fasciata* forma *costata*), 1995) la Lechuga de Mar (*Ulva fasciata* forma *costata*), hallando que la fortificación óptima alga-leche es de 5/99 para cubrir los requerimientos calóricos y nutricionales de bebés prematuros; además reportó que en Piura, La Libertad, Lima, Ica y otros, se usa *Ulva fasciata* forma *costata* howe, en forma de picante y ensalada.

Las algas verdes más utilizadas para la alimentación pertenecen a los órdenes Ulvales y Caulerpales; entre ellas se destacan los géneros *Ulva*, *Gayralia* Vinogradova (*Monostroma*) Thuret y *Caulerpa* Lamouroux (Okasaki, 1971).

(Pacheco, Zertuche, Chee, & Arroyo, 2002) Pacheco menciona el uso potencial de algas de importancia económica, localizadas en Bahía de los Ángeles (Golfo de California, México) y zonas aledañas, entre ellas: *Ulva clathrata*, *Ulva compressa*, *Ulva intestinalis*, *Ulva lactuca*, *Ulva linza*, *Ulva prolifera* y *Ulva rígida*, útiles como alimento para humanos y animales.

Por su composición química, Carrillo et al. (2002) también recomiendan *Ulva* spp. para consumo humano y animal.

(Aguila, Casas, & Hernandez, 2005) Emplearon *Ulva* spp. y *Enteromorpha* spp. al 4 % para la elaboración de pan de calabaza, de zanahoria y de manzana (dietético). Cincuenta jueces

entrenados evaluaron 300 muestras para determinar el grado de aceptación de acuerdo con el sabor de los 06 tipos de panes; la mayor aceptación la tuvo el pan de zanahoria elaborado con Ulva y con una buena aceptación resultaron los panes de calabaza cocinados con Ulva y los de zanahoria con *Enteromorpha*. Se concluyó que por el alto grado de aceptación de los panes, su contenido de minerales, aminoácidos y ácidos grasos de estas algas, y por la calidad sanitaria de las mismas, se puede promover la comercialización de estos productos.

(Farfan, 2005) Al estudiar una mezcla de *Ulva fasciata* (23.1%), cañihua (*Chenopodium pollidicaule*. Aellen), 27.1% y quinua (*Chenopodium quinoa*. Wild), 49.8%, destinada a niños escolares, halló que la mezcla era de buena calidad en cuanto a peso / g proteína consumida, pero de baja digestibilidad (por la fibra cruda).

Águila et al. (2005) mencionan que las especies *Ulva lactuca*, *U. rigida* C. Agardh, *U. clathrata* (Roth) C. Agardh, *U. intestinalis* Linnaeus, *U. prolifera* Muller y *U. flexuosa* Wulfen, son consumidas en varios países.

Para usos tecnológicos en nutrición humana, Fundación Chile (2007) utilizó *Ulva* spp. para elaborar el “producto A”, que se administró a pacientes, para evaluar los efectos beneficiosos de la fibra soluble. Se hallaron efectos positivos sobre la calidad de la evacuación y ausencia de fenómenos adversos, concluyéndose que el producto obtenido de las algas no indujo alteraciones del funcionamiento del tubo digestivo.

(Durmaz, y otros, 2008) Estudiaron el valor nutricional, composición de ácidos grasos y  $\alpha$ tocopherol de *Cystoseira* sp., *Ulva* sp. y *Zostera* sp. en la Bahía de Sinop del Mar Negro, hallando que el contenido de ácido linolénico 18:3 (n-3) fue 1.13, 6.11 y 4.51% respectivamente, de peso seco. Los carotenoides totales (mg g<sup>-1</sup>) hallados en *Ulva* sp. fueron  $0.31 \pm 0.03$ , asimismo, el más alto nivel de clorofila fue observado en *Ulva* sp. ( $0.71 \pm 0.07$  mg g<sup>-1</sup>). Se concluyó que las 3 plantas marinas pueden ser usadas como ingredientes en alimentos funcionales para consumo humano y también en dietas balanceadas para nutrición animal.

(Carvalho, y otros, 2009) Evaluaron *Ulva fasciata* Delile como fuente alternativa de fibra alimentaria en ratas, para lo cual usaron una dieta con harina de alga y otra con celulosa como fuente de fibra. La dieta con harina de alga mantuvo bajos los niveles de colesterol total, sin causar ningún aumento indeseable de LDL-C (lipoproteínas de baja densidad colesterol); además las ratas mostraron un volumen fecal más alto (13 g) que aquellas alimentadas con dietas que contenían

celulosa (7 g) ( $p < 0.05$ ). Se concluyó que las algas tienen el potencial de ser utilizadas en tecnología de alimentos para alimentos bajos en calorías, lo que puede ser importante para controlar el peso corporal, la reducción de colesterol en sangre total y el LDL-C, pero también en la prevención enfermedades gastrointestinales. No se encontraron componentes tóxicos y / o antinutricionales en la harina de algas.

En el Perú, las algas se consumen desde hace 6 450 años (Noriega, Algas comestibles del Perú., 2011)

(Frikha, y otros, 2011) Hallaron que algas recolectadas del Golfo de Gabes (Túnez): *Ulva rigida*, *Codium bursa*, *Cystoseira barbata* y *Ceramium diaphanum*, son fuente potencial de alimento saludable; contienen concentraciones altas de minerales y azúcares totales, concentración moderada de proteínas y bajo contenido de lípidos.

(Bravo, 2012) Propuso el desarrollo de una tostada de maíz con *U. clathrata*. Caracterizó la harina del alga y luego elaboró el alimento funcional (tostada), sustituyendo harina de maíz con harina de *U. clathrata* a concentraciones de 8, 10, 12 y 15%. En base a los resultados sensoriales, se utilizó la concentración de 8% para el producto final. La tostada se evaluó sensorialmente usando un control (tostada con 100% de maíz), encontrándose 87.5% de aceptación general para la tostada sustituida con *U. clathrata* y 80% para el control. Se concluyó que la tostada con *U. clathrata* tuvo aceptación y es una buena fuente de fibra soluble y de carotenoides.

#### **b). En la alimentación animal**

En Argentina se usó *Macrocystis* sp., *Codium* sp., *Lessonia* sp., *Ulva* spp., y *Gigartina* sp., en la elaboración de harina, como suplemento en la alimentación de pollos y gallinas ponedoras, ovinos y bovinos (E, 2004).

También se utilizó *Ulva* sp. en América del Norte, Europa y Japón, como complemento en la alimentación de pollos, ovinos y bovinos (Marshall & Garcia, 2006).

*Ulva* spp. es comparable con un forraje de calidad media para los rumiantes, su proteína tiene baja degradabilidad ruminal (Aldon, 2008). Por otra parte, tiene alto contenido de fibra dietética insoluble (glucanos) y fibras solubles (xylorhamnoglycuronans sulfatos), pudiendo incluirse tan alto como 20% en la dieta, sin ninguna disminución en la palatabilidad.

Para (Herber & Van, 1996) el uso de algas deshidratadas como complemento alimenticio ha dado buenos resultados en bovinos y aves; en las últimas, aumenta los niveles de pigmentación de la

yema de huevo (Strand, Herstad, & Liaaen-Jensen, 1998) y los niveles de ácidos grasos insaturados, especialmente el docohexaenoico.

(Castro & Carrillo, 1996) Hallaron que *Ulva lactuca*, recolectada en la ensenada de La Paz, B.C.S. (México), por su composición química (principalmente, el elevado contenido de minerales), sus grandes volúmenes en la zona de recolección y ausencia de factores antinutriciosos que afecten su empleo por parte de los animales, puede ser empleada como fuente de minerales en la alimentación de aves y rumiantes.

En las islas Canarias, *Ulva lactuca* fue analizada como materia prima para cabras y resultó comparable a plantas forrajeras de calidad media con altos niveles de proteína (Ventura, Castanon, & McNab, 1998).

En un estudio sobre la crianza de tilapia (*Oreochromis niloticus*), orientado a sustituir parcialmente ingredientes importados en su dieta, se evaluaron cinco algas: tres fanegóramas (*Ruppia maritima*, *Posidonia oceanica* y *Cymodocea nodosa*) y dos algas verdes (*Ulva rigida* y *Chaetomorpha linum*). Se reveló la conveniencia nutricional de *Ulva rigida*, por su contenido adecuado de proteína y fibra (Mensi, Jamel, & Amor, 2005).

Durante la Primera Guerra Mundial, la escasez de avena y forraje, dieron lugar a la primera utilización de algas marinas en Francia (CEVA, 2005).

#### **c). En la producción de biomasa**

(H & Ryther, 1984) Hallaron que *U. lactuca*, por contener glúcidos y proteínas, se fermenta rápidamente y genera más metano que otras materias primas.

#### **d). Fuente de abono**

*Ulva* spp. se emplea para la elaboración de compost (abono orgánico), como una estrategia de gestión ambiental (Mendo, 2004). Además, (Diaz & Plascencio, 2009) hicieron un estudio para la instalación de una planta procesadora de fertilizantes a base de *Ulva fasciata*.

#### **e). En la cosmetología**

Los extractos de *Ulva* spp., son de gran interés como fuente de sustancias capaces de retardar o prevenir los efectos del envejecimiento; además sirven como regeneradores de la fibra colágeno (Rodríguez, 2000).

En los tratamientos de salud, belleza y en la talasoterapia las macroalgas también pueden ser empleadas por sus aportes en vitaminas y minerales. Estos vegetales son adicionados a sales de baño, lociones, cremas, jabones como tónico hidratante de la piel, en el tratamiento de la celulitis y la obesidad (Siddhanta, Goswani, Shanmugam, Mody, & Ramavat, 2002)

**f). En la producción de compuestos bioactivos**

(Simopoulus & Siddanta, 1991) Identificaron compuestos antibacterianos en macroalgas, dando como conclusión la actividad en todos los complejos de *Ulva*, respuesta hallada a partir del fitol 3, 7, 11, 15-tetrametil-2-hexadeceno-1-ol, atribuyéndole actividades antibacterianas y antimicóticas así como antivirales, en el complejo de *Ulva* extraído en extracto crudo de acetato se observó la presencia de metil-2-fenilquinolina descrita como molécula antimicrobiana, en los extractos de acetato de etilo y diclorometano se detectó la molécula de neofitadieno, compuesto identificado como antimicrobiano y antiviral, así mismo Simopoulus, identificó cadenas alifáticas insaturadas de 16 y 43 carbonos (C); hexadecano, heptadecano, octadecano, nonadecano, eicosano, ácido palmítico y ácido  $\alpha$ -linoleico metil ester (Troncoso, y otros, 2015).

(Da Silva, y otros, 2010) Evaluaron la actividad antiviral de *Ulva fasciata* recogida en las playas del Horno y Rasa, en Buzios, Rio de Janeiro (Brasil), en relación a la reproducción de metapneumovirus humano (HMPV). Los extractos de esta alga se prepararon utilizando tres metodologías diferentes; en base a los hallazgos, podría inferirse que el bioensayo guiado por fraccionamiento y purificación de extractos activos de *U. fasciata*, puede producir compuestos bioactivos potentes.

(Plaza, Cinofuentes, & Ibañez, 2008) Algunas algas marrones (*Cystoseira* sp.) y verdes (*Ulva* spp.), son fuentes naturales de proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas, con bajos niveles de lípidos; pudiendo ser usadas como ingredientes funcionales.

**g). Como suplemento en la industria alimentaria y farmacéutica**

(Frikha, y otros, 2011) Evaluaron la composición química y propiedades biológicas de cuatro algas (*Ulva rigida*, *Codium bursa*, *Cystoseira barbata* y *Ceramium diaphanum*), recolectadas en el Golfo de Gabes (Túnez). Halló que *Ulva rigida* tuvo el mayor efecto secuestrante de radicales libres (23%), comparada con *C. barbata* y *C. diaphanum*, con valores de 2.4% y 0.8%, respectivamente;

La actividad antioxidante de los extractos algales se midió en función del secuestro de radicales libres, usando el método de 2,2– difenil–1–picrilhidrazil (DPPH).

(Plaza, Cinofuentes, & Ibañez, 2008) Mencionaron que *Ulva* spp. puede ser una fuente natural interesante de ingredientes funcionales (esteroles), cuyo efecto posible en la salud es reducir el colesterol total y colesterol LDL.

(Fredriksson, Pickova, & Elvinger, 2006) Hallaron que algas recolectadas del Golfo de Gabes (Túnez): *Ulva rigida*, *Codium bursa*, *Cystoseira barbata* y *Ceramium diaphanum*, pueden ser consideradas como fuente valiosa de PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados) esenciales, los cuales tienen efectos benéficos en humanos y animales.

#### **h). Para obtención de gas combustible**

Díaz (2010) usando *Ulva lactuca* como sustrato, demostró ventajas que hacen factible su uso para obtención de gas combustible: no contiene lignina en cantidades que obstruyan el proceso de bioconversión, no es necesario hacer un pretratamiento, se ahorra en reguladores de pH y en adición de nutrientes. De otro lado, Briones (2012) produjo etanol a partir de *Ulva* rígida (biocombustible de tercera generación).

#### **2.1.1.8. Estadísticas de producción**

Debido a que esta es una planta acuática y no necesita sembrarse, no se cuenta con datos de producción.

#### **2.1.2. CARNE**

##### **2.1.2.1. Descripción**

Según el código alimentario, es la parte comestible de los músculos de la vaca sacrificados en condiciones higiénicas declarados aptos para el consumo humano.

El consumo de este tipo de carne es muy elevado en los países desarrollados y representa el 20% de la ingesta calórica.

**a). Color**

La musculatura de los animales vivos, con un aporte de oxígeno suficiente, tiene un aspecto de rojo brillante, después del sacrificio y ante el consumo de oxígeno los músculos tienen un color púrpura oscuro (Emilio, 2016).

**2.1.2.2. Características Físico-químicas****a). Estructura Anatómica****o Tejido muscular**

En él se encuentra la mioglobina que es un pigmento que le da su color característico que en contacto con el aire cambia y esto hace que el corte exterior sea más oscuro que la zona interior. La mayor o menor intensidad en el color rojo no afecta ni al valor nutritivo ni a su digestibilidad.

La unidad anatómica del tejido muscular es la célula o fibra muscular, existiendo tres tipos de fibras:

*Fibras lisas:* Presentan una fina estriación longitudinal y carecen de estrías transversales.

*Fibras cardíacas:* Presentan estrías longitudinales y transversales imperfectas.

*Fibras esqueléticas:* Presentan estrías longitudinales y transversales, cuyo origen es la fusión de mioblastos (células precursoras de las fibras musculares)

En la estructura de la fibra muscular se puede distinguir:

- El sarcolema o membrana muscular: Presenta una serie de invaginaciones, denominadas túbulos T, que se prolongan hasta situarse en estrecha relación con el retículo endoplasmático.
- El sarcoplasma: Se caracteriza de las otras células por poseer una proteína con capacidad de fijar oxígeno transportado por la sangre (mioglobina) y que le confiere a la fibra su característico color rojo, almacenan hidratos de carbono en forma de glucógeno.
- Las miofibrillas: Son finas estructuras cilíndricas de una micra de diámetro de naturaleza proteica, son las responsables de la contracción muscular. Están dispuestas paralelamente al eje longitudinal de la fibra, a la que recorren en toda su extensión, uniéndose finalmente al sarcolema

- ***Tejido graso***

Puede ser visible ó invisible (grasa interfascicular). Cuanta más cantidad de grasa tenga una carne, menor contenido de agua tiene. La cantidad de grasa influye en su valor nutritivo y en la digestibilidad.

- ***Tejido conectivo***

Separa o recubre los grandes músculos y también los tendones. Su cantidad depende del grupo muscular, aumenta con la edad y el ejercicio que haya realizado el animal, haciendo que la carne sea más dura.

### **2.1.2.3. Características Bioquímicas**

Tiene un alto contenido de proteínas, baja proporción de carbohidratos y sustancias solubles de menor peso molecular, y una  $a_w = 0,99$ . El contenido en vitaminas del músculo es muy elevado (unos 60  $\mu\text{g/g}$ ) y comprende a tiamina, riboflavina, niacina, ácido fólico, ácido pantoténico, B6, B12 y biotina.

El tejido muscular está recubierto por sus fascias protectoras y las miofibrillas contenidas dentro del sarcolema.

### **2.1.2.4. Características microbiológicas**

Las carnes son un medio de cultivo excepcional para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos.

Una vez que han sido descuartizadas las reses, gran parte de su protección inicial se destruye y durante el picado desaparece por completo. Los alimentos de origen animal poseen sustancias inhibitoras como las inmunoproteínas, muy específicas en su acción pero con un reducido espectro de actividad antimicrobiana, que no proveen protección práctica alguna.

Todos los animales transportan grandes cantidades de microorganismos. Numerosas bacterias, además de mohos y levaduras, están presentes en el cuero, los pelos y las pezuñas de los vacunos, y son transmitidos a la carcasa luego del sacrificio (Audisio, 2007). Los restos de estiércol en la pelambre suelen acceder al músculo, así como el contenido intestinal si la evisceración no se hace

cuidadosamente. Por otra parte, las bacterias también pueden proceder de los pisos, paredes, mesadas, cuchillos y manos de los operadores en la planta de faena.

**a). Microorganismos hallados en la superficie de la carne**

En la superficie de la carne bovina suelen encontrarse varios tipos de Escherichia Coli, algunas especies de Enterobacter y Serratia, Pantoea agglomerans, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Yersinia enterocolitica, Enterococcus, Listeria, Salmonella, Campylobacter, Clostridium, Streptococcus, Corynebacterium, Staphylococcus, Bacillus, bacterias lácticas, mohos y levaduras.

**2.1.2.5. Microorganismos de estudio**

**a). Escherichia Coli**

Es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria, su presencia es un índice de malas prácticas de manufactura.

- **Características Morfológicas:**

Es un Bacilo Gram negativo, no forma esporas y sus cepas son móviles, con flagelos peritricos cuyo tamaño es  $0.5\mu$  de ancho por  $3\mu$  de largo, siendo catalasa positiva y oxidasa negativo, reduce de nitrato a nitrito y produce vitamina B y K.

- **Características Nutricionales:**

Fermenta la glucosa y lactosa con producción de gas, es anaerobio facultativo.

- **Características Coloniales:**

Las colonias de E coli en un medio EMB (Eosina y Azul de Metileno) tienen 2 a 4 mm de diámetro, con un centro grande de color oscuro e incluso negro y tienen verde metálico cuando se observan con luz refleja.

La importancia de eliminar E.coli se fundamenta por la producción de la toxina Shiga quien puede causar graves enfermedades por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda y hortalizas, así como semillas germinadas crudas contaminadas. La enfermedad causada por E. coli productora de toxina Shiga conduce a calambres abdominales y la diarrea progresando en algunos casos a diarrea sanguinolenta (colitis

hemorrágica), con inclusión de fiebre y vómitos (OMS, 2018). El periodo de incubación está comprendido entre tres a ocho días. Es de relevancia impedir la contaminación de alimentos con E.coli buscando soluciones directas y naturales a los alimentos, aplicando medidas de control y así imposibilitar que afecten la industria y en consecuencia al ser humano.

**b). Salmonella spp.**

El género Salmonella pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Son bacterias Gram negativas no esporuladas, anaerobias facultativas, mesófilas con una temperatura óptima de crecimiento de 35 – 37 °C y un rango de 5 - 46 °C. Desde el punto de vista epidemiológico Salmonella spp. Se puede clasificar en tres grupos:

- a) Las que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis.
- b) Las que infectan sólo al hombre: Salmonella Typhi, Salmonella Paratyphi A y Salmonella Paratyphi C y que se transmiten en forma directa o indirecta de una persona a otra.
- c) Las que están adaptadas a un huésped en especies animales: S. Abortusovis, a los ovinos; S. Abortusequi, a los equinos y S. Gallinarum, a las aves.

- Características Morfológicas:

Es un género de la familia Enterobacteriaceae que agrupan bacilos gram negativos, móviles con pocas excepciones.

- Características Nutricionales:

Es catalasa positivo y oxidasa negativo (Salmonella typhi es una excepción importante que no produce gas y es citrato de Simmons negativo)

- Características Coloniales:

Las colonias de Salmonella spp. en un medio Salmonella y Shiguella (S.S) presentan coloraciones rosadas a fucsia con el reflejo de la luz.

Se halla en el ambiente a partir de las cuales se pueden contaminar los alimentos y el agua. Este microorganismo es el agente causal de varias enfermedades infecciosas entre las que se encuentran las fiebres entéricas, gastroenteritis, toxiinfecciones alimentarias y la fiebre tifoidea (Weng Aleman , Alvarez Molina, Diaz Rosa, & Rodriguez Salazar, 2003).Debido a la envergadura

epidemiológica de la Salmonella spp, su aislamiento, estudio y eliminación es una de las tareas primordiales del sistema de vigilancia de la calidad de los alimentos en el Perú.

**2.1.2.6. Normas de controles máximos bacterianos en carne**

**CUADRO N° 6**

**VALORES MICROBIOLÓGICOS OBSERVADOS EN LAS CARNES FRESCAS CUANDO SE CUMPLIERON LAS BUENAS PRÁCTICAS DE FAENAMIENTO**

<b>Tipos de carnes</b>	<b>Media res y cuartos mayoristas*</b>	<b>Deshuesada congelada**</b>	<b>Cortes minorista*</b>	<b>Carne picada ***</b>
Recuento de colonias a 30°C	10 <sup>5</sup> ufc/ 100 cm <sup>2</sup>	10 <sup>6,5</sup> ufc/ 1 ml	10 <sup>6</sup> ufc/ 100 cm <sup>2</sup>	10 <sup>7</sup> ufc/g
Enterobacteriaceae	10 <sup>3</sup> ufc/ 100 cm <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup> ufc/ml	10 <sup>4</sup> ufc/ 100 cm <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> ufc/g
Salmonella	1 ufc/100 cm <sup>2</sup>	0,1 ufc/ml	10 ufc/ 100 cm <sup>2</sup>	1 ufc /g
S. aureus	na	na	na	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> ufc/g
Presencia ausencia de E. Coli	70% positivo/ 10 cm <sup>2</sup> 20% positivo/ 1 cm <sup>2</sup>	na	50% positivo/ 1 cm <sup>2</sup>	na

na: no aplicable, \* muestreo por hisopado, \*\* jugo exprimido manualmente, \*\*\*depende del tipo y origen, además de la preparación en la carnicería

**Fuente:** (Audisio, 2007)



**CUADRO N° 7**

**LÍMITES ESTABLECIDOS POR EL CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO EN LOS  
ART. 255, 302 Y 286 BIS PARA CARNE PICADA, CHACINADOS FRESCOS Y  
FIAMBRES**

ANÁLISIS	CARNE PICADA	FIAMBRES
Recuento de aerobios mesófilos/g	n=5 c=3 m=10 <sup>6</sup> M=10 <sup>7</sup>	-
Recuento de E.coli/g	n=5 c=2 m=100 M=500	<10ufc/g
E. Coli O157:H7/NM	n=5 c=0 ausencia en 65 g*	ausencia en 25 g
Salmonella spp.	N=5 c=0 ausencia en 10 g*	ausencia en 25 g
Coliformes totales	-	<10ufc/g

*Fuente:* (Audisio, 2007)

**2.1.2.7. Estadísticas de producción y proyección**

**CUADRO N° 8**

**PRODUCCIÓN NACIONAL ANUAL DE CARNE DE VACUNO**

AÑO	PRODUCCIÓN T.M
2009	164 704,00
2010	171 872,00
2011	179 084,00
2012	186 617,00
2013	190 569,00
2014	196 232,00
2015	196 015,00
2016	190 226,00
2017	190 345,00
2018	210 456,00

*Fuente:* (INEI, 2019)

Modelo óptimo de proyección: modelo doble-logarítmico

- Ecuación de modelo doble-logarítmico:  $\log Y = a + b \log X$

- Con un  $R^2=0.97$

### CUADRO N° 9

#### PROYECCIÓN NACIONAL ANUAL DE CARNE DE VACUNO

Año	Producción T.M
2020	200 789,00
2021	201 422,00
2022	230 596,00
2023	267 985,00
2024	249 456,00
2025	276 986,00
2026	278 098,00
2027	285 980,00
2028	276 002,00
2029	298 012,00

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

## 2.2. Antecedentes

### 2.2.1. Antecedentes Nacionales

**a. Autor:** LIBERTAD ALZAMORA, LILIANA MORALES, LOURDES ARMAS, GILMA FERNANDEZ.

**Título:** ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE LOS ACEITES ESENCIALES EXTRAIDOS DE ALGUNAS PLANTAS AROMATICAS INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ANTONIO RAIMONDI -FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS – UNMSM. LABORATORIO DE QUÍMICA FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA – 2001.

**Resumen:** Esta es una investigación en la cual se utilizan bioactivos de cinco plantas medicinales en Medicina Tradicional en el Perú: Eucalyptus globulus, Labill eucalipto; Cymbopogon citratus, (DC) Staff “hierba luisa”; Tagetes pusilla Lag. Anis serrano, senecio tephrosioides, Turcz huamanripa y Lepechinia meyenii, (Walp) Epling salvia, Estos bioactivos son obtenidos por

destilación por arrastre de vapor, enfrentándose a *S. enteritidis* INS, *Vibrio Cholerae* ATCC E6539, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* INS.

**b. Autor:** BRITA ANAYA GONZALES, ELBERT HERMOZA VALDIVIA

**Título:** ALGAS ALIMENTICIAS PARA MEJORAR LA CALIDAD NUTRITIVA DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS, UNIVERSIDAD NACIONAL SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA, PERU – 2014.

**Resumen:** La presente investigación establece la influencia de las algas como medio de mejora en las condiciones nutricionales de la carne de res, cordero, cerdo, alpaca, las algas que se emplearon fue el Qochayuyo, el alga *Ulva* sp. Y el *Nostoc*, las comparaciones dieron como resultado, la mejora de las condiciones nutricionales al ser expuestas las carnes, el contenido de proteína se elevó a gran escala, el contenido de carbohidratos y fibra de igual manera teniendo como validación la influencia positiva del alga *ulva* sp.

**c. Autor:** ROSARIO ROJAS, BEATRIZ BUSTAMANTE, OLGA LOCKA.

**Título:** ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SELECTED PERUVIAN MEDICINAL PLANTS - JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY 88 – PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL PERÚ – 2003.

**Resumen:** El presente artículo es una investigación que utiliza 24 plantas las cuales se utilizan aquí en Perú para tratar enfermedades infecciosas e inflamatorias. Se evaluó la actividad antimicrobiana de 36 extractos de etanol de 24 plantas, todas ellas usadas actualmente en la medicina tradicional peruana para el tratamiento de trastornos infecciosos e inflamatorios, se prueba en la presente investigación mediante ensayos de difusión en agar-pozo contra cuatro bacterias, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y cuatro hongos, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* y *Sporothrix schenckii*, de los cuales 25 extractos mostraron un alto grado de actividad antimicrobiana contra al menos un microorganismo, dando como orientación a la óptima utilización de agar pozo para la veracidad de sensibilidad bactericida.

### 2.2.2. Antecedentes Internacionales

**a. Autor:** NICOLAS TRONCOSO, RICARDO SAAVEDRA, ALEX OLIVARES.

**Título:** IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS EN MACROALGAS PRESENTES EN LA REGION DEL BIOBIO, CHILE. UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN,

GIBMAR, 2015.

**Resumen:** En la presente investigación se argumenta la actividad antibacteriana del alga *Ulva* spp. Aislada con tratamientos alcohólicos, señalando su efecto positivo en bacterias como *E. Coli*. Determina y expresa bioactivos tales como el fitol argumentando en él, el efecto antibacteriano sobre el mencionado microorganismo. Las macroalgas utilizadas fueron recolectadas desde 3 praderas naturales ubicadas en la Provincia de Concepción, Región del Biobío, Chile. Se obtuvo *Gracilaria chilensis* desde Caleta Lengua (36°45'S; 73°10'O); *Lessonia spicata*, *Durvillaea antarctica* y *Macrocystis pyrifera* desde Caleta Chome (36°46'S; 73°12'O); y el Complejo *Ulva* (compuesto por *U. rigida* y *U. lactuca*, en proporciones no determinadas) desde Caleta Cocholgüe (36°35'S; 72°58'O). Las muestras frescas fueron almacenadas en bolsas plásticas y transportadas a una temperatura de  $10 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**b. Autor:** NURBY R., GERARDO M., JOSE J., CARLS Y., MARIA Y., MARIA L., MARIA G.

**Título:** ACTIVIDAD ANTIBACTERINA Y ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE ALGAS MARINAS VENEZOLANAS, UNMSM, FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-2009.

**Resumen:** En la presente investigación se evaluaron las propiedades bioactivas antibacterianas y antimicóticas de 33 extractos (etanol, diclorometano, hexano) obtenidos de 11 especies de algas marinas. La actividad antibiótica y antimicótica de los extractos se evaluó mediante la aparición de halos de inhibición contra bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia Coli*) y el hongo *Candida albicans*. De los 33 extractos ensayados sólo 17 presentaron actividad antibacteriana (5 con etanol, 6 con diclorometano y 6 con hexano), resultando activos 14 frente a las especies Gram(-) y 4 contra la especie Gram(+). Las especies algales que mostraron actividad antibacteriana fueron: *Acanthophora* sp., *Bryothamnion triquetrum*, *Gracilaria* sp., *Gelidium* sp., *Caulerpa mexicana*, *Caulerpa* sp., *Caulerpa* spp., *Halimeda incrassata*, *Ulva* sp., *Codium decorticatum*, *Sargassum* sp.

**c. Autor:** DRA. YOLANDA FREILE PELEGRÍN.

**Título:** ALGAS EN LA BOTICA, INVESTIGADORA ADJUNTA DEL DEPARTAMENTO DE RECURSOS DEL MAR DE LA UNIDAD MÉRIDA DEL CINVESTAV- UNAM

**Resumen:** Especifica cada una de las estrategias de adaptación de las algas en situaciones de estrés, y su influencia de los mismos en contextos medicinales, así mismo menciona compuestos

activos potenciales, ante cada estrategia, como los compuestos osmoreguladores, filtros naturales y antioxidantes, mucilagos y fibras elásticas, y metabolitos secundarios en respuestas de microorganismo predadores, estos últimos apoyando y dando sustento a la presente investigación que se pretende ejecutar.

**d. Autor:** SE-KWON KIM.

**Título:** AVANCES EN LA INVESTIGACIÓN ALIMENTARIA Y NUTRICIONAL, DEPARTMENT OF CHEMISTRY, PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY, REPUBLIC OF KOREA – 2011.

**Resumen:** Menciona acerca del aporte de las algas en sus distintas composiciones frente a la medicina y nutrición, basándose en las paredes celulares de los vegetales marinos o las algas marinas quienes son ricas en polisacáridos sulfatados (SP), como los fucoidans en las algas pardas, las carrageninas en las algas rojas y las ulvasas en las algas verdes. Estos SP exhiben diversas actividades biológicas, como actividades anticoagulantes, antivirales, antioxidantes y anticancerígenas quienes dotan de posibles beneficios para la salud. Por lo tanto asegura que los SP derivados de los vegetales marinos tienen un gran potencial para un mayor desarrollo como nutracéuticos y alimentos medicinales.

**e. Autor:** TANG YU-QING, KAISER MASHMOOD.

**Título:** ULVA LACTUCA AND ITS POLYSACCHARIDES: FOOD AND BIOMEDICAL ASPECT, FUJIAN AGRICULTURE AND FORESTRY UNIVERSITY, FUZHOU-350002, CHINA – 2016.

**Resumen:** La presente investigación relata acerca de los efectos antimicrobianos, antivirales y antioxidantes, teniendo como análisis a la salmonella spp. en su investigación también relata el aporte de la difusión en discos para la observación del efecto inhibitorio, considerando optimo los extractos con metanol, etanol, acetona, éter dietílico, comparando algas frescas y algas secas, teniendo como resultado el mayor efecto de las algas en su estado fresco.

**f. Autor:** AJIT KANDALE, A K MEENA.

**Título:** MARINE ALGAE: AN INTRODUCTION, FOOD VALUE AND MEDICINAL USES, NATIONAL INSTITUTE OF AYURVEDIC PHARMACEUTICAL, INDIA – 2010.

**Resumen:** Expresa las amplias gamas de posibilidades terapéuticas internas y externas de las algas, clasifica a las algas según su estructura y pigmentación y nivela cada uno de los efectos antimicrobianos.

**g. Autor:** H. BALAJI.

**Título:** ANTIHEPATOTOXIC NATURE OF ULVA RETICULATA (CHLOROPHYCEAE) ON ACETAMINOPHEN-INDUCED HEPATOXICITY IN EXPERIMENTAL RATS, OFFICIAL JOURNAL OF THE KOREAN SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION. KOREA-2004

**Resumen:** Expresa como resultado el tratamiento en ratas con un extracto de Ulva en agua caliente, dando como conclusión la eliminación de radicales libres lo que sugiere una actividad antihepatotóxica, por lo que es eficaz para reducir el estrés oxidativo en el ser humano.

**h. Autor:** CONCEPCIÓN GARCIA, AURORA MARTINES.

**Título:** COMPONENTES QUÍMICOS Y SU RELACIÓN CON LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ALGUNOS EXTRACTOS VEGETALES UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO, MÉXICO-2010.

**Resumen:** Anuncia cada uno de los compuestos secundarios de extractos vegetales, mencionando al fitol como uno de los compuestos principales en productos con concentraciones elevadas de clorofila como extractos del perejil y extractos de la ruda, expresa el tratamiento óptimo inclinado por un análisis de extracción alcohólica, y los efectos en los rendimientos positivos que encuentra.

**i. Autor:** CEPEDA PACA MARCIA ALEXANDRA.

**Título:** DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE Y BACTERICIDA EN EXTRACTOS OBTENIDOS DE ALGAS Y LÍQUENES ADQUIRIDOS EN LA ZONA DE LA LAGUNA DE OZOGOCHÉ EN EL PERÍODO JUNIO – OCTUBRE DEL 2016.

**Resumen:** En la presente investigación se corrobora la presencia de lectinas en líquenes con efectos bactericidas, considerando que un líquen es una combinación de un alga verde (o una cianobacteria) y un hongo la investigación narra sobre como los mismos acumulan alta concentración de metabolitos que almacenan en su talo, muchos de los cuales están involucrados en su actividad antimicrobiana. Los extractos utilizados fueron, Cladonia sp., Peltigera sp., Parmelia sp., Cora sp., Vallisneria sp., y Egeria sp.

## 2.3. Objetivos de la investigación

### 2.3.1. Objetivo General

El objetivo principal de la presente investigación es determinar el efecto bactericida del extracto de Alga *Ulva* spp. frente a *Escherichia Coli* y *Salmonella* spp. aplicado como bioconservante en corte de lomo vetado de carne de vacuno refrigerado y envasado en LDPE (Polietileno de baja densidad, material plástico con buena resistencia química y con una gran barrera de vapor de agua).

### 2.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar las características físico-químicas, químico proximal, microbiológico y organoléptico de la materia prima.
- Determinar el óptimo medio de extracción de bioactivo del alga *Ulva* spp.
- Determinar la mejor concentración de bioactivo con mayor sensibilidad bactericida frente a *Escherichia Coli* y *Salmonella* spp.
- Determinar el efecto bactericida y conservante del extracto de alga *Ulva* spp. en corte de lomo vetado de carne de vacuno refrigerado y envasado en LPDE.

## 2.4. Hipótesis

Dado que el alga *Ulva* spp. tiene propiedades bactericidas y germicidas (Tang Yu-Qing & Mahmood, 2016), es posible su utilización en cortes de lomo vetado de carne de vacuno refrigerado y envasados en LPDE, logrando generar la conservación de sus características organolépticas y microbiológicas.

## CAPITULO III

### 3. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

#### 3.1. Ubicación espacial y temporal

El desarrollo del presente proyecto de investigación tuvo como direccionamiento ser llevado durante los meses comprendidos entre Abril y Mayo del presente año; y específicamente en la ciudad de Arequipa donde se desarrolló parte de los análisis en los laboratorios de Fisicoquímica y Microbiología de la Universidad Católica de Santa María, contando a su vez con el traslado a la ciudad de Ica en donde se extrae la materia prima, el alga.

Científicamente, el proyecto se encuentra enmarcado dentro del área de la Ingeniería de Industria Alimentaria aplicando conocimientos de las siguientes áreas:

- Microbiología.
- Biotecnología.
- Ficología.
- Filogenia (Giribet, 2010).
- Botánica.
- Tecnología de Productos cárnicos.
- Farmacología.
- Control de calidad.

#### 3.2. Metodología

##### 3.2.1. Descripción general

##### 3.2.1.1. Extracción por percolación – hidroalcohólica:

Son procesos donde incluye a la lixiviación, en la presente investigación se plantea el uso del embudo de decantación como percolador, el mismo que recibirá al alga triturada previamente macerada con su 20% p/v de solvente (4ml de agua, metanol o etanol) seguidamente se prepara el percolador insertando el algodón como primer filtro (0.61g de algodón) encima de él se coloca papel filtro con un diámetro de 2cm, se introduce a continuación el alga agregando 100ml de solvente, cubrirlo con papel filtro y perlas de vidrio para ejecutar peso, abrir la llave del embudo y observar el menstuo (solvente con principios activos), es importante cubrir el matraz con papel

de aluminio, esperar las 24h para obtener el producto percolado, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (Gonzales Villa, 2004).

**NOTA** Se describe a detalle los pasos en el **ANEXO N°2**.

### 3.2.1.2. Método para cuantificar Clorofila: Aislamiento e identificación de pigmentos foto sintetizantes (Rivero, y otros, 2005)

Los vegetales ciertas bacterias y algunos protozoarios autotróficos, poseen dispositivos apropiados para realizar reacciones de síntesis orgánica que por hacerse a expensas de energía luminosa se denomina fotosíntesis. Incluye todos los procesos por los que la luz absorbida se utiliza para impulsar la biosíntesis, el CO<sub>2</sub> es reducido hasta glucosa por las plantas y el agua es oxidada hasta liberar oxígeno, en las plantas existen cloroplastos que son estructuras especializadas en cuyo interior se encuentran pigmentos capaces de utilizar los fotones para producir energía química.

**Nota:** La descripción general del método se adjunta en **ANEXO N°2**.

#### ▪ Método de Warburg

- La densidad óptica del extracto de metanol y etanol se determina a 578nm en una cubeta de 1cm
- Cálculos:

$$\frac{\text{Densidad optica a } 578\text{nm}}{740} = \text{mg de clorofila /ml}$$

#### ▪ Método de Machinney

- La densidad óptica del metanol y etanol se determina a 665 nm (DO 665) y a 650 nm (DO 650), que es la absorción máxima para la clorofila a y clorofila b.
- Cálculos:

$$\frac{0.0338 \times DO\ 650 - 0.0125 \times DO\ 665}{1} = \text{mg de clorofila b / (ml de extracto)}$$

$$\frac{0.0165 \times DO\ 665 - 0.0083 \times DO\ 650}{1} = \text{mg de clorofila a / (ml de extracto)}$$

### 3.2.1.3. Método para determinar la sensibilidad antibacteriana

#### a). Método de prueba convencional: difusión con discos

El estudio de la sensibilidad antimicrobiana de las diferentes bacterias aisladas en muestras biológicas tiene 2 objetivos fundamentales: guiar al clínico en la elección del mejor tratamiento individual, y monitorizar la evolución de la resistencia bacteriana con objeto de revisar el espectro del antimicrobiano y poder actualizar los tratamientos empíricos. Este estudio se realiza mediante el antibiograma, que mide la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes antimicrobianos in vitro y a partir de estos resultados predice la eficacia in vivo. Con un antibiograma se pueden obtener resultados cualitativos que indican si la bacteria es sensible o resistente a un antibiótico, o cuantitativos que determinan la concentración mínima (CMI) de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano (en  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o en  $\text{mg}/\text{l}$ ). La interpretación de los resultados del antibiograma (sensible, intermedio o resistente) se realiza en función de los valores establecidos por diferentes comités, como el Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión en Perú (MINSA, 2002), y Clinical and Laboratory Standards Institute en Estados Unidos (Picazo, 2000).

Las técnicas de difusión emplean discos de papel impregnados con una solución estandarizada de antibiótico que se disponen sobre la superficie de un medio sólido previamente inoculado en su superficie con una suspensión bacteriana. Tras un período de incubación de 18 h, el diámetro del halo formado está en relación con el grado de sensibilidad del microorganismo. La carga del disco está ajustada para que los halos de inhibición permitan diferenciar los microorganismos sensibles de los resistentes y pueda establecerse una correlación con los valores de CMI: halos pequeños se relacionan con valores altos de CMI (resistentes) y halos grandes con CMI bajas (sensibles). Otra técnica de difusión es el E-test, que además permite la determinación directa del valor de la CMI. Utiliza tiras de plástico impregnadas con un antibiótico en concentraciones decrecientes. Al contacto de la tira con el agar, el antibiótico difunde e impide el crecimiento del microorganismo. Después de la incubación se observa una zona de inhibición en forma de elipse: el valor de la CMI es el punto de intersección de la elipse con la tira y está indicado en la escala impresa sobre la superficie de la tira. Esta técnica puede utilizarse directamente sobre muestras clínicas para obtener resultados preliminares en menos de 24 h, que siempre deben confirmarse mediante pruebas de sensibilidad estandarizadas con bacterias en cultivo puro.

#### 3.2.1.4. Método de difusión en discos (Kirby-Bauer)

El método Kirby-Bauer (Método de difusión en discos) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas.

Sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton (Medio de cultivo rico, diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad) se inocula una cantidad estandarizada de bacterias, bacterias que deben de ser analizadas por una escala de Mc Farland quien nos indica que nos encontramos con una dilución de  $10^8$ ufc o en la fase logarítmica de la cepa bacteriana, sembrándolas de forma uniforme para obtener después de la inoculación un "césped" bacteriano. A continuación se colocan discos de papel de filtro impregnados con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos. La elección de los antibióticos a probar depende del germen y del foco de infección. El antibiótico difundirá desde el papel filtro al agar de forma radial. Se incuba la placa durante 15-18 horas a 35 °C (respetar este parámetro, porque temperaturas menores pueden disminuir la velocidad del crecimiento del germen y la difusión del antibiótico, dando halos irregulares difíciles de medir), y luego se miden los halos de inhibición de desarrollo, interpretándose de acuerdo a tablas confeccionadas previamente. Los resultados se expresan como: Sensible (S), Intermedio o Moderadamente sensible (I) y Resistente (R).

#### 3.2.2. Descripción del proceso

##### a. Recepción

La materia prima procederá de la provincia de Nazca (Distrito de Marcona, a 27 m.s.n.m), del departamento de Ica, embaladas en sacos de polietileno, debidamente rotulados, desplazada a temperatura de refrigeración (4°C).

En este proceso el alga se examinará para observar las características que tiene, de esta manera verificar si son aptas para el proceso de elaboración del producto, una vez que se hacen los análisis respectivos y se le da el visto optimo pasa a un ambiente de almacenamiento donde se mantiene a

temperatura y humedad óptima de refrigeración (4°C) para que ese no sufra ninguna alteración hasta su uso.

#### **b. Selección**

En esta fase se retira todas las impurezas que se encuentren asociadas al alga así como la eliminación de organismos epibiontes o partículas extrañas y procedemos a colocarlo en bolsas limpias y así poder procesarla.

#### **c. Acondicionado**

El alga ya seleccionada es lavada, utilizando agua a temperatura ambiente, debemos tomar en consideración que el utilizar agua a temperatura elevada puede perjudicar la clorofila b, procedemos al pesado.

#### **d. Triturado**

Luego de ejecutar el lavado exponemos nuestra alga a la fractura de partículas llegando hasta un diámetro de 1mm.

#### **e. Extracción por percolación**

La extracción por percolación se inicia con la maceración hidroalcohólica, el solvente es adicionado al alga triturada en un 20% p/v se aísla con papel aluminio por un tiempo de 4h, seguidamente se humedece (con el solvente a utilizar) el algodón y se instala en el embudo del percolador posteriormente se implanta papel filtro por encima del algodón para luego ser añadida el alga macerada adicionamos solvente 5 veces el peso del alga, envolvemos con papel aluminio el matraz donde se obtiene el extracto percolado y dejamos el proceso de extracción por 1 día, luego de transcurrido el tiempo retiramos la masa semihumeda del embudo del percolador y la prensamos para obtener la extracción final de la alga, el alga prensada será macerada en solvente por 48h y así llevar a cabo la extracción total del bioactivo (Lizcano Ramon & Vergara Gonzalez, 2008).

#### **f. Destilación por rotavapor**

Se termina la purificación del extracto bioactivo aplicando el proceso de destilación por rotavapor a una temperatura de 40°C para evitar la degradación de la clorofila b, logrando separar por medio de evaporación a una presión de 60kpa el disolvente que acompaña el extracto.

El baño de calefacción debe cubrir el extracto y el tiempo empleado para la rotación es de 4h a una rotación de nivel cuatro, luego de tiempo transcurrido se analiza los rendimientos.

**g. Acondicionamiento**

Se analizará el extracto obtenido llevando a cabo los análisis de determinación de clorofila b y rendimiento de extracto bioactivo.

**h. Sensibilidad bactericida del bioactivo**

Se determinara la sensibilidad antibacteriana del alga en extracto frente a E. Coli y salmonella spp. dos de las bacterias gran negativas más observadas en la carne de vacuno, para ello se mide el tamaño de los halos de inhibición en mm formados alrededor de los discos después de la incubación de las bacterias citadas en agar Mueller Hinton para E. Coli y para salmonella spp. (Rivera Butron, 2015)

**i. Efecto bactericida del bioconservante**

Una vez evaluada a través de la sensibilidad antibacteriana y determinada la mejor concentración del alga en extracto para tal efecto, se utilizará la mejor concentración para determinar el efecto bactericida en la carne de vacuno, se requerirá de cortes de lomo veteadado (100g c/u con dimensiones promedio de 9cm x 6cm x 1cm) la edad de la vaca es de 3 años (promedio) y la raza es Holstein. Los resultados serán expuestos a través de las pruebas microbiológicas en cultivos en agar EMB para E.coli y S.S (Salmonella Shigella) para Salmonella spp.

**3.2.3. Descripción del proceso de acopio de la carne de vacuno**

Para la evaluación del efecto del extracto de alga Ulva spp. como bactericida se requerirá la carne de vacuno en cortes de lomo veteadado (100g c/u) y se realizará el acopio óptimo del mismo así se acrecentará la garantía de los resultados.

**a. Recepción de la carne de vacuno**

Las vacas a utilizar fueron criadas en el fundo Matuare del anexo Uchumallo – Provincia de Camaná, con un tiempo de vida de 3 años promedio, la raza con la que se trabajará es Holstein, de las mismas se aprovechara los cortes de lomo veteadado.

**b. Corte -Troceado**

Se procederá al corte del lomo vetado, corte que será utilizado por ser uno de los cortes más consumidos en nuestro país, así como una zona vulnerable a degradación por su contenido de grasa elevada, se proseguirá con el troceado para someterlo al análisis, se requerirá de cortes de 100g cada uno por experimento con dimensiones promedio de 9cm x 6cm x 1cm.

**c. Lavado**

Posteriormente se efectuara el lavado de cada corte de lomo vetado, la temperatura del agua debe ser menor a 10°C.

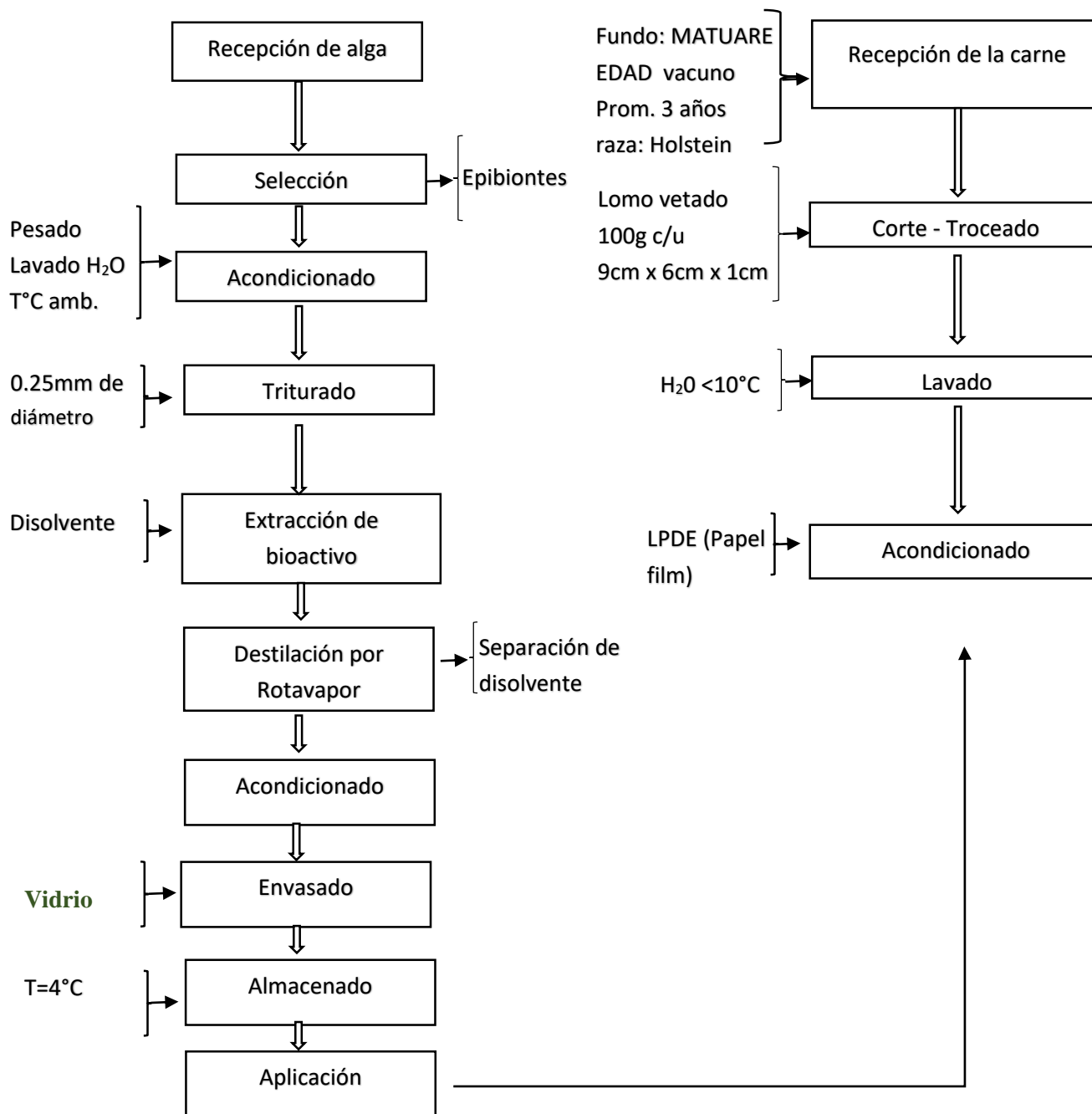
**d. Aplicación de bioactivo**

Los cortes de lomo serán expuestos a inmersión en un medio de extracto bioactivo de alga *Ulva* spp. en una cantidad de 40ml de extracto bioactivo por cada 100g de corte de lomo vetado, la aplicación de los extractos es en la superficie para ello el corte de lomo será sumergido por 1min en el extracto (según el porcentaje correspondiente), seguidamente el corte de lomo es escurrido y se procede a envasar.

**e. Acondicionamiento de Temperatura**

Consiste en acondicionar los cortes en LPDE y controlar la temperatura de los mismos hasta que esta tuviera un valor de 4°C, con la finalidad de obtener un transporte en las mejores condiciones.

**Diagrama N°1:**  
**DIAGRAMA DE BLOQUES**



### 3.2.4. Diseños experimentales – Diseño Estadístico

#### 3.2.4.1. De la materia prima

##### a). Alga *ulva* spp.

Se describe al alga azul verdosa que pertenece a las clorofíceas, también conocida como “Lechuga de mar”, por sus largas hojas verdes translúcidas que le dan aspecto similar a la lechuga, fue identificada por primera vez por Linneo en 1753, desde entonces muchos taxónomos han sido involucrados en la identificación de especies de ulva que son difícilmente de clasificar por su morfología es por ello que se utiliza de características como color verde brillante en sus hojas.

En la industria alimentaria su estudio ha sido exiguo, por lo que su estudio abre un panorama en la rama ficológica portentosa para soluciones futuras.

En el presente experimento se realizará el análisis Físicoquímico, microbiológico y organoléptico del alga *Ulva* spp. Como materia prima, la misma que será evaluada a temperatura ambiente, así mismo el alga *Ulva* spp. Debe de hallarse en un estado fresco para la evaluación inicial y después del proceso de extracción.

##### ➤ **Análisis físico-químico del alga (*Ulva* spp.)**

Será realizado en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María según sus parámetros establecidos tomando en cuenta las siguientes especificaciones.

##### ▪ **Análisis químico proximal**

- Proteína (%) – Método Kjeldahl
- Grasa (%) – Método Gravimétrico
- Humedad (%) – Official Methods of Analysis. 1990.
- Ceniza (%) – Método Gravimétrico
- Fibra cruda (%) – Método Adaptado de NTP 205.003.1980
- Hidratos de carbono (%) – Por cálculo de diferencia
- Contenido calórico (Kcal %) – Por calculo
- Contenido de Clorofila b (mg de clorofila b/ml de extracto) – Método Machinney

- **Análisis físico químico**
  - °Brix – Método Refractométrico
  - % Acidez – Método A.O.A.C Official Method 942.15
  - Ph – Método Potenciométrico
  - Densidad – Método Gravimétrico

**CUADRO N° 10**  
**MATERIALES Y REACTIVOS PARA DETERMINACIONES**

Determinación	Materiales	Reactivos
Determinación de proteína	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Matracas kjeldahl de 500 y/o 800 cm<sup>3</sup></li> <li>▪ Balanza analítica con +/- 0.1 mg de sensibilidad</li> <li>▪ Digestor y destilador kjeldahl</li> <li>▪ Papel indicativo</li> <li>▪ Mechero</li> <li>▪ Bureta de 25ml</li> <li>▪ Erlenmeyer de 250ml</li> <li>▪ Pipeta de 2 y 10ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ácido sulfúrico concentrado</li> <li>▪ Sulfato de cobre pentahidratado</li> <li>▪ Zinc granulado</li> <li>▪ Hidrato de sodio: disolver con 500cm<sup>3</sup> de agua 500g de hidróxido de sodio</li> <li>▪ Sulfato de sodio anhidro</li> <li>▪ Ácido bórico al 2%</li> <li>▪ Solución de ácido clorhídrico 0.1N</li> <li>▪ Indicador shiro tashiro: disolver 0.2g de rojo de metilo en 60cm<sup>3</sup> con agua. Mezclar 2 partes de rojo de metilo y una de azul de metileno.</li> </ul>
Determinación de grasa	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Estufa con regulador de temperatura a 100°C +/- 2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ácido clorhídrico</li> <li>▪ Éter de petróleo</li> </ul>

	<p>(con ventilación normal o aire forzado)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Planchas de calentamiento</li> <li>▪ Equipo de extracción tipo soxhlet con balón de capacidad de 250ml</li> <li>▪ Vasos precipitados de 300ml o 500ml</li> <li>▪ Probeta graduada de 100ml</li> <li>▪ Luna de reloj</li> <li>▪ Embudos de vidrio</li> <li>▪ Dedales para extracción</li> <li>▪ Papel filtro cualitativo de filtración media</li> <li>▪ Desecador de vidrio con agente desecante</li> </ul>	
Determinación de humedad	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Balanza de determinación de humedad equipada con una lámpara infrarroja de 250W</li> <li>▪ Fuente de potencia tipo 120V</li> <li>▪ Amperímetro de 120V</li> </ul>	
Determinación de pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Potenciómetro</li> <li>▪ Beacker de 250ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Solución tampón (pH:4)</li> <li>▪ Agua destilada</li> </ul>
Determinación de °Brix	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Vaguetas</li> <li>▪ Beacker de 250ml</li> <li>▪ Refractómetro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agua destilada</li> </ul>
Determinación de ceniza	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Crisoles de porcelana</li> <li>▪ Balanza analítica con resolución de 0.1mg</li> </ul>	

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cocinilla, mechero o plancha de calentamiento</li> <li>▪ Horno mufla para ser usado de 550°C a 600°C</li> <li>▪ Estufa</li> <li>▪ Desecador con agente desecante</li> </ul>	
Determinación de fibra cruda	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Crisoles o gooch</li> <li>▪ Frasco lavador</li> <li>▪ Dos vasos de 600cm<sup>3</sup></li> <li>▪ Papel de filtro whatman N1 o equivalente</li> <li>▪ Papel de filtro tarado whatman N42 o equivalente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Solución de ácido sulfúrico 1.25%</li> <li>▪ Solución de hidróxido de sodio al 1.25% libre de carbonatos</li> <li>▪ Alcohol etílico al 5%</li> <li>▪ Éter etílico o éter de petróleo</li> </ul>
Determinación de hidratos de carbono	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Balanza analítica de capacidad de 210 gramos</li> <li>▪ Pipeta de 5 y 10ml</li> <li>▪ Matraces aforados de 100ml</li> <li>▪ Tubos de ensayo</li> <li>▪ Pipetas automáticas de 1000 y 100ul</li> <li>▪ Dispensador</li> <li>▪ Erlenmeyer de 100 y 500ml</li> <li>▪ Baño maría</li> <li>▪ Espectrofotómetro de absorción</li> <li>▪ Agitador vibrador</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Disolución de patrón de glucosa 100mg/l</li> <li>▪ Agua desahonizada destilada</li> <li>▪ Ácido sulfúrico concentrado</li> <li>▪ Fenol al 80%</li> </ul>
Recuento de microorganismos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Frascos</li> <li>▪ Tubos en placas con agar S-S</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 225ml de caldo lactosado</li> <li>▪ 1ml de la muestra</li> </ul>

aerobios mesofilos viabiles	▪ Tubos de ensayo	
Recuento de coliformes totales	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tubos de ensayo</li> <li>▪ Pipetas de 1 y 10ml</li> <li>▪ Placas petri</li> <li>▪ Matraz Erlenmeyer</li> <li>▪ Estufa de incubación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Buffer pH7</li> <li>▪ Coloración Gram catalasa</li> <li>▪ Agar plate count</li> <li>▪ Agua peptonada</li> </ul>

*Fuente: Elaboración propia - Arequipa 2019.*

➤ **Análisis microbiológico del alga (*Ulva spp*)**

Será realizado en el laboratorio de microbiología de la Universidad Católica de Santa María según sus parámetros establecidos tomando en cuenta las siguientes especificaciones.

▪ **Análisis Microbiológico:**

- Recuento de Microorganismo Aerobios Mesofilos Viabiles. – Método ICSM Vol I Ed.II
- Recuento de E. Coli – Método ICSM Vol I Ed.II Met. 1 Pag. 132-134

➤ **Análisis organoléptico del alga (*Ulva spp*)**

Será realizado en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María.

▪ **Análisis organoléptico:**

- Color – Método Descriptivo
- Olor – Método Descriptivo
- Textura – Método Descriptivo
- Sabor – Método Descriptivo

### 3.2.4.2. Experimento N°1

○ *Extracción del Bioactivo del alga Ulva spp.*

#### a). Descripción

En este experimento se trabajará con el alga *Ulva spp.* ya triturada (0.25mm de diámetro) y se realizará a través del método de Machinney y el método de Warburg para la determinación de clorofila b.

La muestra debe tener un tamaño de trituración de 0.25mm, la extracción se lleva a cabo por método de percolación la misma que fue descrita en la descripción del proceso, el tiempo máximo de percolación es de 48h, controlando la temperatura del extracto para evaluar rendimientos luego de ser expuesta al rotavapor. La extracción se inicia con una maceración hidroalcohólico, el solvente se agrega en un 20% en función al alga a percolar.

El rendimiento de bioactivo se describe como la cantidad de masa extraída a partir de masa triturada ingresada al sistema de percolación, para determinar el rendimiento es importante la ejecución del rotavapor.

*Nota: La descripción del método se halla en ANEXO N°2, observar para mayor detalle.*

#### b). Objetivo

- Determinar el medio óptimo para la extracción de bioactivo del alga (*Ulva spp.*).
- Determinar el solvente y la temperatura adecuada para el mayor rendimiento de clorofila b en la extracción y el rendimiento del extracto bioactivo.

#### c). Variables

Para la extracción del alga (*Ulva spp.*) se evaluarán las siguientes variables:

- Solventes: S

S<sub>1</sub>=Agua

S<sub>2</sub>=Metanol 90°

S<sub>3</sub>= Etanol 96°

- Temperatura de percolación: t

$t_1=25^{\circ}\text{C}$

$t_2=4^{\circ}\text{C}$

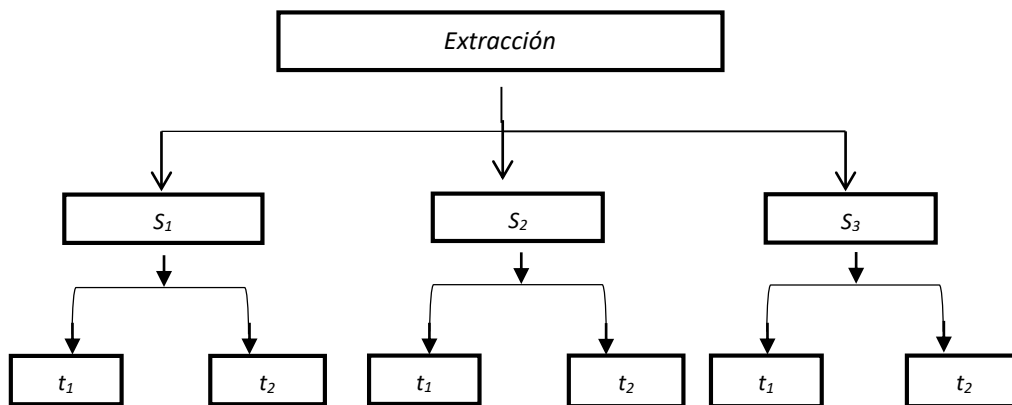
**d). Resultado**

- Cuantificación de clorofila b (mg de clorofila b /ml de extracto) – Método Machinney
- Rendimiento de Extracto Bioactivo (%)

**e). Diseño experimental: Análisis estadístico**

Se plantea un experimento factorial completamente al azar con arreglo de 3 x 2 aplicando Análisis de Varianza (ANVA), si existiera una diferencia significativa entre los tratamientos se aplicará una prueba de comparación de medias (Duncan y Tuckey).

**f). Diagrama Experimental**



✓ Leyenda:

$S_1$ =Agua

$S_2$ =Metanol 90°

$S_3$ = Etanol 96°

$t_1=25^{\circ}\text{C}$

$t_2=4^{\circ}\text{C}$

**g). Materiales y Equipos**

- Materiales: materia prima Alga (*Ulva* spp.)
- Maquinaria y equipo

**CUADRO N° 11  
MATERIALES Y EQUIPOS**

<b>Equipo / Materiales</b>	<b>Marca / Modelo</b>	<b>Especificaciones técnicas</b>
Alga <i>Ulva</i> spp.	-	-
Metanol	-	90 grados RQ 0044
Etanol	-	96 grados
Licuadaora	Marca: Philips	Volumen: 5L
Rotavapor	Marca: Rotavapor® BUCHI Modelo: R II	Presión máxima: 30mmHg Niveles de rotación: 10 Temperatura máxima: 100°C
Espectrofotómetro	Marca: Shimadzu Modelo:UV-160A	Intervalo espectral: 190.0 – 1100.0 nm
Embudo de Decantación	Pyrex	Material : Vidrio
Soporte universal		Material : Metal
Balanza analítica	Marca: Scout Pro Ohaus Modelo: SP202	Sensibilidad : 0.001g
Matraz Erlenmeyer	Pyrex	Volumen 500ml Material : Vidrio
Tapón para Matraz	-	Material : Sílice
Perlas de vidrio	-	Material : Vidrio
Beacker	-	Material : Vidrio Volumen: 500ml

Probeta	-	Material : vidrio Volumen: 10ml
varilla	-	Material : vidrio
Termómetro de mercurio	-	Máxima 100°C +/- 0.1°
Cronometro	-	Digital
Otros	-	Hielo, colador, papel filtro, pulverizador, etc.

*Fuente: Elaboración propia - Arequipa 2019.*

### 3.2.4.3. Experimento N°2

○ *Sensibilidad bactericida del bioactivo:*

#### a). Descripción

En este experimento se trabajará siguiendo los parámetros del método de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión instruido por el Manual De Procedimientos Para La Prueba De Sensibilidad Antimicrobiana Del Instituto Nacional Del Salud, 2002 (MINS, 2002). Se trabajará con los extractos ya obtenidos anteriormente, la dilución será ejecutada en agua destilada para obtener diferentes porcentajes (Castro & Estrella, 1996), los cultivos donde se aplicará el extracto será *Escherichia Coli* y *Salmonella spp.* el método a ejecutar será método de difusión en discos (Kirby-Bauer), la siembra se llevará a cabo a 35°C en un rango de tiempo de 15-18h en incubación, luego de transcurrido el tiempo se observará el tamaño del halo formado en la periferia del disco con el extracto, comprobando la sensibilidad bactericida.

La determinación del tamaño de halo se ejecuta sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton (medio de cultivo rico, diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad), donde en primera instancia se inocula una cantidad estandarizada de *E.coli* y otra para *Salmonella spp.* comparándolas con la escala de Mc Farland, escala que corrobora la existencia de cepas en cantidad de 10<sup>8</sup> ufc, la escala de turbidez (Mc Farland) indica a su vez la fase logarítmica en la que se halla la cepa bacteriana, las mismas que serán sembradas de forma uniforme con apoyo de una Micropipeta, para obtener después de la inoculación un "césped" bacteriano. A continuación se colocan discos de papel de filtro (6mm de diámetro) inmersas con concentraciones de diferentes

extractos (0.2%, 0.15%, y 0.1%). El extracto difundirá desde el papel filtro al agar de forma radial. Se incuba la placa durante un rango de tiempo de 15-18 horas a 35 °C (respetar este parámetro, porque temperaturas menores pueden disminuir la velocidad del crecimiento de la bacteria y la difusión del extracto, dando halos irregulares difíciles de medir), y luego se miden los halos de inhibición de desarrollo, interpretándose de acuerdo a tablas. Los resultados se expresan clasificándolos como Sensible (S), Intermedio o Moderadamente sensible (I) y Resistente (R) (Instituto Nacional de Salud, 2016).

**NOTA:** Para descripción antibiogramas para Enterobacteriaceae **VER ANEXO N°10.**

### b). **Objetivo**

- Sembrar las cepas *Escherichia Coli* y *salmonella* spp.
- Determinar la sensibilidad bactericida del extracto bioactivo ante cepas de *Escherichia Coli* y *Salmonella* spp.
- Determinar la concentración mínima para la inhibición y efecto bactericida en cepas de *Escherichia Coli* y *Salmonella* spp.

### c). **Variables**

Las variables a evaluar para el análisis de la sensibilidad son:

- Cepas de bacterias: A

A<sub>1</sub>=*Salmonella* spp.

A<sub>2</sub>=*Escherichia Coli*

- Concentración de extracto bioactivo : CEA

CEA<sub>1</sub>=0.20% de Extracto bioactivo

CEA<sub>2</sub>=0.15% de Extracto bioactivo

CEA<sub>3</sub>=0.10% de Extracto bioactivo

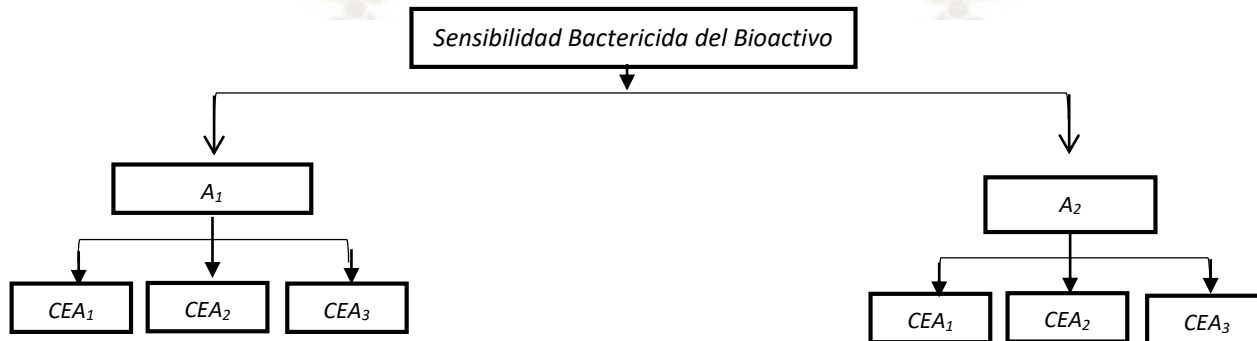
### d). **Resultado**

- Tamaño de halo (mm) – Método de Difusión en discos

e). **Diseño experimental: Análisis estadístico**

Se plantea un experimento factorial completamente al azar con arreglo de 2 x 3 aplicando Análisis de Varianza (ANVA), si existiera una diferencia significativa entre los tratamientos se aplicará una prueba de comparación de medias (Duncan y Tuckey).

f). **Diagrama experimental**



✓ **Leyenda**

A<sub>1</sub>=Salmonella spp.

A<sub>2</sub>=Escherichia Coli

CEA<sub>1</sub>=0.20% de Extracto bioactivo

CEA<sub>2</sub>=0.15% de Extracto bioactivo

CEA<sub>3</sub>=0.10% de Extracto bioactivo

g). **Materiales y Equipos**

**CUADRO N° 12**

**MATERIALES Y EQUIPOS – EXTRACCIÓN DE BIOACTIVO**

<b>Material / Equipo</b>	<b>Marca / Modelo</b>	<b>Especificaciones técnicas</b>
Extracto bioactivo	-	0.2% de extracto bioactivo 0.15% de extracto bioactivo 0.1% de extracto bioactivo
Suero fisiológico	-	-
Balanza analítica	Marca: Scout Pro Ohaus Modelo: SP202	Sensibilidad : 0.001g
Estufa	Marca: FANEM Modelo: 002CB	Temperatura : 0 – 100°C
Autoclave	Marca: Easter Medical	Horizontal con reciclador de agua
Cocina	-	Eléctrica
Extracto bioactivo	0.2, 0.15, 0.1%	Alga (Ulva spp)
Escala de Mc Farland 0.5	-	Ácido sulfúrico + hidróxido de bario
Micropipeta	-	Material : Plástico Volumen: 0.001 – 1ml
Matraz Erlenmeyer	Pyrex	Material : vidrio Volumen: 100ml
Beacker	Pyrex	Material : vidrio Volumen: 200ml
Probeta	Pyrex	Material : vidrio Volumen: 100ml

Placas Petri	Pyrex	Material : vidrio diámetro : 9.5cm
Discos de difusión	-	Material : papel diámetro : 6mm
Tubos de Ensayo	Pyrex	Material : vidrio
Gradilla	-	Material : metal
Varilla	-	Material : vidrio
Pisetas	-	Material : Plástico
Agar en polvo	Necesaria	Agar Mueller Hinton DM1173
Asa driglasky	-	Material : vidrio
Suero fisiológico	-	-
Caldo peptonado	-	Bactopeptona
Papel filtro	-	-
Otros	-	Parafilm, hisopos, papel filtro, detergente, alcohol.

*Fuente: Elaboración propia - Arequipa 2019.*

#### 3.2.4.4. Experimento N°3

○ *Efecto del bactericida en cortes de lomo vetado de carne de vacuno*

##### a). Descripción

En este experimento se utiliza cortes de lomo vetado de carne de vacuno, se utilizará 100g de corte por muestra con dimensiones de 9cm x 6cm x 1cm aproximadamente, las muestras previamente serán tratadas a temperatura de refrigeración (4°C) y envasadas en LDPE. Posteriormente se aplicará los extractos de alga 0.15%, 0.1%, y 0.05% formulados con agua destilada (40ml de extracto formulado para inmersión en 100g de carne) en diferentes porcentajes sobre los cortes de lomo vetado de carne de vacuno, la aplicación de los extractos es en la superficie de cada corte de lomo vetado, para ello el lomo será sumergido por 1min en el extracto formulado (según el porcentaje correspondiente), seguidamente el corte se somete a escurrido para luego ser envasado en LPDE y almacenado a 4°C para definir el efecto posterior a los tiempos de análisis.

El método que se aplicará para la determinación de recuento de microorganismos (*E. Coli* y *Salmonella spp.*) es el método de recuento y siembra en superficie, cuyo procedimiento incluye un medio selectivo en medio sólido.

**NOTA:** La descripción detallada del método se halla en **ANEXO N°2**.

**b). Objetivo**

- Determinar el efecto bactericida del extracto bioactivo en cortes de lomo vetado de carne de vacuno.
- Determinar el efecto de conservación del extracto bioactivo en cortes de lomo vetado de carne de vacuno.

**c). Variables**

Las variables a evaluar para el análisis del efecto bactericida son:

- Concentración de extracto bioactivo : CEA

CEA<sub>1</sub>=0.15% de Extracto bioactivo

CEA<sub>2</sub>=0.1% de Extracto bioactivo

CEA<sub>3</sub>=0.05% de Extracto bioactivo

- Tiempo de exposición a 4°C y envasado en LPDE: T

T<sub>1</sub>=1 día

T<sub>2</sub>=5 días

T<sub>3</sub>=10 días

**d). Resultado**

- Recuento de microorganismos de salmonella spp. – Método de Recuento y Siembra en Superficie
- Recuento de *Escherichia coli*. – Método de Recuento y Siembra en Superficie
- Color – Método Escalar con escala de categoría (Espinosa Manfugas, 2007).
- Olor – Método Escalar con escala de categoría.
- Textura – Método Escalar con escala de categoría.

- Sabor – Método Escalar con escala de categoría.

**Cartilla N°1**

**CARACTERÍSTICAS PARA EVALUAR EL COLOR**

<b>CRITERIO</b>	<b>PUNTUACIÓN</b>
Muy bueno	5
Bueno	4
Aceptable	3
Regular	2
Malo	1

**Cartilla N°2**

**CARACTERÍSTICAS PARA EVALUAR EL OLOR**

<b>CRITERIO</b>	<b>PUNTUACIÓN</b>
Muy agradable	5
Agradable	4
Aceptable	3
Regular	2
Desagradable	1

**Cartilla N°3**

**CARACTERÍSTICAS PARA EVALUAR LA TEXTURA**

<b>CRITERIO</b>	<b>PUNTUACIÓN</b>
Muy buena	5
Bueno	4
Aceptable	3
Regular	2
Malo	1

**Cartilla N°4**

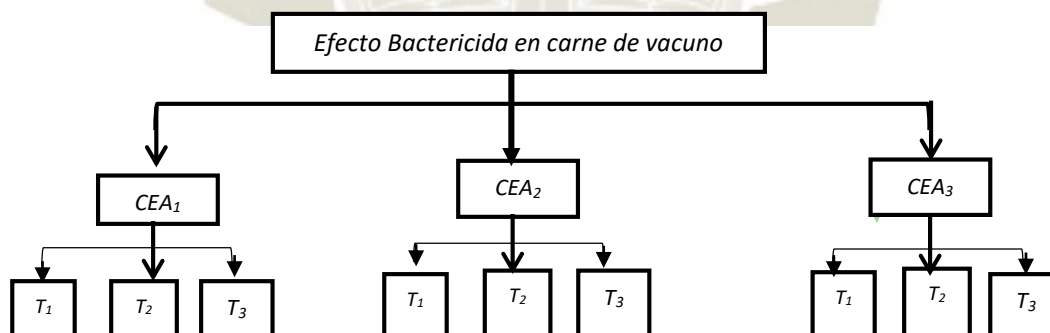
**CARACTERÍSTICAS PARA EVALUAR EL SABOR**

CRITERIO	PUNTUACIÓN
Muy agradable	5
Agradable	4
Aceptable	3
Regular	2
Desagradable	1

**e). Diseño experimental: Análisis estadístico**

El experimento se plantea de acuerdo a un diseño estadístico Factorial de bloques completamente al azar con 10 panelistas semi entrenados (Ver protocolo en **ANEXO N°3**) con aplicación de Análisis de Varianza (ANVA), si existiera una diferencia significativa entre los tratamientos se aplicará una prueba de comparación de medias (Duncan y Tuckey).

**f). Diagrama experimental**



✓ **Leyenda**

CEA<sub>1</sub>=0.15% de Extracto bioactivo

CEA<sub>2</sub>=0.1% de Extracto bioactivo

CEA<sub>3</sub>=0.05% de Extracto bioactivo

T<sub>1</sub>=1 día

T<sub>2</sub>=5 días

T<sub>3</sub>=10 días

**g). Materiales y Equipos**

**CUADRO N° 13**

**MATERIALES Y EQUIPOS –SENSIBILIDAD BACTERICIDA**

<b>MATERIAL / EQUIPO</b>	<b>MARCA / MODELO</b>	<b>ESPECIFICACIONES TÉCNICAS</b>
Extracto bioactivo	-	0.15% de extracto 0.1% de extracto 0.05% de extracto
Suero fisiológico	-	-
Balanza analítica	Marca: Scout Pro Ohaus Modelo: SP202	Sensibilidad : 0.001g
Contador de colonias	Marca: Quebec	-
Estufa	Marca: FANEM Modelo: 002CB	Temperatura : 0 – 100°C
Autoclave	Marca: Easter Medical	Horizontal con reciclador de agua
Cocina	-	Eléctrica
Extracto bioactivo	0.15%, 0.1%, 0.05%	Alga (Ulva spp)
Escala de Mc Farland 0.5	-	Ácido sulfúrico + hidróxido de bario
Micropipeta	-	Material : Plástico Volumen: 0.001 – 1ml
Matraz Erlenmeyer	Pyrex	Material : vidrio Volumen: 100ml
Beacker	Pyrex	Material : vidrio

		Volumen: 200ml
Probeta	Pyrex	Material : vidrio Volumen: 100ml
Placas Petri	Pyrex	Material : vidrio diámetro : 9.5cm
Mortero	-	Material : cerámica
Tubos de Ensayo	Pyrex	Material : vidrio
Gradilla	-	Material : metal
Varilla	-	Material : vidrio
Pisetas	-	Material : Plástico
Agar en polvo	-	Agar EMB 1039.00 Agar S.S 1.07667.0500
Suero fisiológico	-	-
Asa driglasky	-	Material : vidrio
Caldo peptonado	-	RQ0191
Papel filtro	-	-
Otros	-	Parafilm, hisopos, LPDE. Envases de vidrios, etc.

*Fuente: Elaboración propia - Arequipa 2019.*

### 3.2.4.5. Experimento final: Extracto de Alga *Ulva* spp.

#### a). Resultado químico proximal

- Proteína (%) – Método Kjeldahl
- Grasa (%) – Método Gravimétrico
- Humedad (%) – Official Methods of Analysis. 1990.
- Ceniza (%) – Método Gravimétrico
- Fibra cruda (%) – Método Adaptado de NTP 205.003.1980
- Hidratos de carbono (%) – Por cálculo de diferencia
- Contenido calórico (Kcal %) – Por cálculo
- Contenido de Clorofila b (mg de clorofila b/ml de extracto) – Método Machinney

**b). Resultados fisicoquímicos**

- °Brix – Método Refractométrico
- % Acidez – Método A.O.A.C Official Method 942.15
- Ph – Método Potenciométrico
- Densidad – Método Gravimétrico

**c). Resultado Microbiológico:**

- Recuento de Microorganismo Aerobios Mesofilos Viables. – Método ICSM Vol I Ed.II
- Recuento de E. Coli – Método ICSM Vol I Ed.II Met. 1 Pag. 132-134

**d). Análisis organoléptico:**

- Color – Método Descriptivo
- Olor – Método Descriptivo
- Textura– Método Descriptivo
- Sabor– Método Descriptivo

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1. Evaluación de las pruebas experimentales

##### 4.1.1. Materia prima: Alga (*Ulva spp.*)



**Figura N° 2.** Análisis del alga *Ulva spp.*

##### 4.1.1.1. Análisis Físicoquímico del alga (*Ulva spp.*)

#### CUADRO N° 14

#### RESULTADOS DEL ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL ALGA (*ULVA SPP.*)

CARACTERÍSTICAS	MAGNITUD
°BRIX	2.96 °Brix
% Acidez	< 0.01%
pH	7.04 pH
Densidad	1.0191 g/ml

*Fuente:* Elaboración Propia - Arequipa 2019.

**Nota:** La determinación del porcentaje de acidez fue realizado en el Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María, 2019. **VER ANEXO N°4.**

4.1.1.2. Análisis Organoléptico del alga (*Ulva* spp.)

CUADRO N° 15

RESULTADOS DEL ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DEL ALGA (*ULVA* SPP.)

CARACTERÍSTICAS	EVALUACIÓN
Color	Verde claro
Olor	Característico a alga
Sabor	Neutro
Textura	Lisa - Suave

Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.

4.1.1.3. Análisis Químico – Proximal del alga (*Ulva* spp.)

CUADRO N° 16

RESULTADOS DEL ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DEL ALGA (*ULVA* SPP.) EN ESTADO FRESCO

COMPONENTE	RESULTADO
Proteína (%)	2.37
Grasa (%)	3.49
Humedad (%)	88.69
Ceniza (%)	3.05
Fibra cruda (%)	0.93
Hidrato de carbono (%)	1.47
Contenido calórico (KCAL %)	46.77
Contenido de Clorofila b (mg de Clorofila b/ml de extracto)	0.0141

Fuente: Los análisis de Proteína, Grasa, Humedad, Ceniza, Fibra Cruda, Hidrato de Carbono y Contenido calórico fueron ejecutados en el Laboratorio de Control de Calidad de U.C.S.M., 2019.

El análisis del contenido de Clorofila b es Elaboración Propia – Laboratorio H-104 U.C.S.M., 2019.

**Nota:** Ver en el ANEXO N°4 los informes de ensayo realizados en el laboratorio de la Universidad Católica de Santa María y ANEXO N°6 para observar los cálculos desarrollados para la determinación de clorofila b en la materia prima.

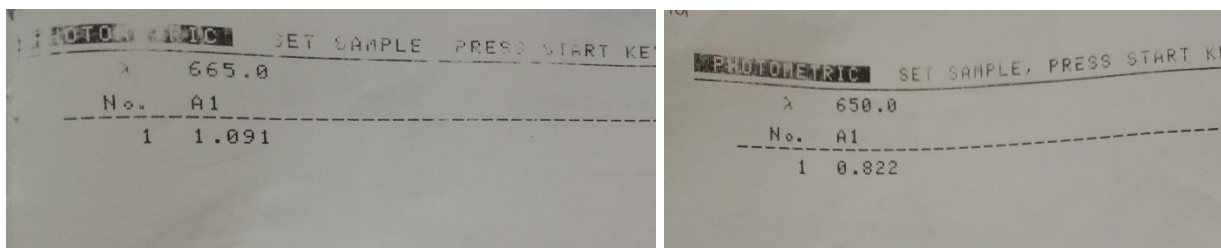


Figura N° 3. Valores de Absorbancia para la determinación de Clorofila b en alga *Ulva* spp. a 665nm y 650nm.

#### 4.1.1.4. Análisis Microbiológico del alga (*Ulva* spp.)

##### CUADRO N° 17

##### RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL ALGA (*ULVA* SPP.)

ANÁLISIS	RESULTADO
Numeración de <i>E. Coli</i> (Ufc/g)	< 3
Numeración de Microorganismos Aerobios Mesofilos Viables (Ufc/g)	<10

*Fuente:* Laboratorio de Control de Calidad de U.C.S.M, 2019.

**Nota:** Ver en el **ANEXO N°4** los informes de ensayo realizados en el laboratorio de la Universidad Católica de Santa María.

**Apreciación Crítica:** Los Análisis microbiológicos, acidez y Químico Proximal para el Alga *Ulva* spp. Fueron realizados en el laboratorio de control de calidad de la U.C.S.M. ver **ANEXO N°4**.

#### ✓ Interpretación de Resultados

Los resultados determinados para el análisis fisicoquímico expuesto en el **Cuadro N°14** demuestra características del alga encontradas en la mayoría de estas especies, tal es el caso de la investigación ejercida por el Departamento Académico de Química de la Facultad de Ciencias (Cuizano, Llanos, Chang, & Navarro, 2007) quien evidencia el grado de equivalencia del alga *Macrocystis Integrifolia* Bory con un pH 7 el cual se le atribuye a distintos grupos funcionales como a diferentes propiedades químicas, la investigación afirma la naturaleza del alga y su estado óptimo al hallarse en neutralidad, el porcentaje de acidez menor a 0.01% se le atribuye a algas con un estado sin degradación lo que indica la calidad de la especie. El análisis organoléptico del alga *Ulva* spp. declara a través de sus resultados características propias de la lechuga de mar, una textura suave y lisa, un color verde claro característico al género *Ulva* y de la división Chlorophyta. En el análisis Químico proximal desarrollado al alga en estado fresco se reafirma lo expuesto en el **Cuadro N°5** (Food algae to improve the nutritional quality of meat product, 2014) donde se plantea valores de humedad, ceniza, proteína, lípido, carbohidrato, y fibra con valores de 88.84%, 1.62%, 4.14%, 1.20%, 1.97% y 2.23 respectivamente para el alga *Ulva* spp. en la presente investigación se obtuvo un porcentaje de humedad de 88.69%, así como valores de ceniza, proteína, lípido, carbohidrato, y fibra cruda que generan semejanza, los resultados demuestran la identidad del género y su paridad, el resultado de cuantificación de clorofila b hallado en la materia prima afirma el porcentaje de clorofila b que se debe hallar en un alga expuesto en el **Cuadro N°3** el mismo que describe cantidades de 1 a 3mg en 100g de alga, el resultado obtenido demuestra un valor de 1.4mg de clorofila b en 100ml de extracto puro de alga *Ulva* spp., es decir sin someter a un proceso de percolado (sistema que podría aumentar su contenido por arrastre de bioactivo con solventes), es importante dar a conocer que la técnica analítica Macchiney no presenta percolación, por lo que un sistema de percolado así como el trabajar con solventes con mayor arrastre y a diferentes temperaturas puede elevar el rendimiento y generar mayor arrastre de clorofila b (R & Lupatsch, 2012).

Los resultados del análisis microbiológico tanto en la numeración de *E. coli* como en la detección de Microorganismo Aerobios Mesofilos Viables demuestran la mínima medida detectada por el Método ICSM Vol I Ed.II Met. 1 Pag. 132-134 (Trad. 1978) Reimp 2000, Ed Acribia y el Método

ICSM Vol I Ed.II Met. 1 Pag. 120-124 (Trad. 1978) Reimp 2000, Ed Acribia lo que contribuye a la calidad inocua de la materia prima.

#### 4.2. EXPERIMENTO N°1: EXTRACCIÓN DEL BIOACTIVO DEL ALGA ULVA SPP.

##### 4.2.1. Resultados y Análisis de Resultados

Se determina el medio (solvente y temperatura) óptimo para la extracción de mayor contenido de clorofila b (quien presenta una relación directa con el fitol) de cada extracto y el rendimiento de bioactivo.

- **Cuantificación de clorofila b**

**CUADRO N° 18**  
**VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS EN LA CUANTIFICACIÓN DE**  
**CLOROFILA B**

Rep.	Extracción del bioactivo de alga Ulva spp.											
	S <sub>1</sub>				S <sub>2</sub>				S <sub>3</sub>			
	t <sub>1</sub>		t <sub>2</sub>		t <sub>1</sub>		t <sub>2</sub>		t <sub>1</sub>		t <sub>2</sub>	
	650 nm	665 nm	650 nm	665 nm	650 nm	665 nm	650 nm	665 nm	650 nm	665 nm	650 nm	665 nm
<b>1</b>	1.585	2.388	0.863	1.470	2.493	2.495	2.091	2.495	0.198	2.322	0.545	0.933
<b>2</b>	1.586	2.396	0.863	1.467	2.493	2.495	2.493	2.495	0.196	2.330	0.545	0.935
<b>3</b>	1.585	2.396	0.864	1.465	2.493	2.495	2.493	2.495	0.194	2.329	0.546	0.935

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

✓ **Leyenda :**

S<sub>1</sub>=Agua

S<sub>2</sub>=Metanol 90°

S<sub>3</sub>= Etanol 96°

t<sub>1</sub>=25°C

t<sub>2</sub>=4°C

**Nota:** Los resultados de las absorbancias fueron impresos por el espectrofotómetro utilizado, cuyas imágenes se encuentran en **ANEXO N°9**.

**CUADRO N° 19**

**RESULTADO DE LA CUANTIFICACION DE CLOROFILA B (Método de Machinney)**

Prueba	Rep.	Extracción del bioactivo de alga <i>Ulva</i> spp.					
		S <sub>1</sub>		S <sub>2</sub>		S <sub>3</sub>	
		t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>
Cuantificación de clorofila b (mg de clorofila b /ml de extracto)	1	0.02372	0.01079	0.05308	0.03949	0.02233	0.00676
	2	0.02366	0.01083	0.05308	0.05308	0.02250	0.00673
	3	0.02362	0.01089	0.05308	0.05308	0.02256	0.00677
	$\bar{x}$	0.02367	0.01084	0.05308	0.04855	0.02246	0.00675

Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.

✓ **Leyenda :**

S<sub>1</sub>=Agua

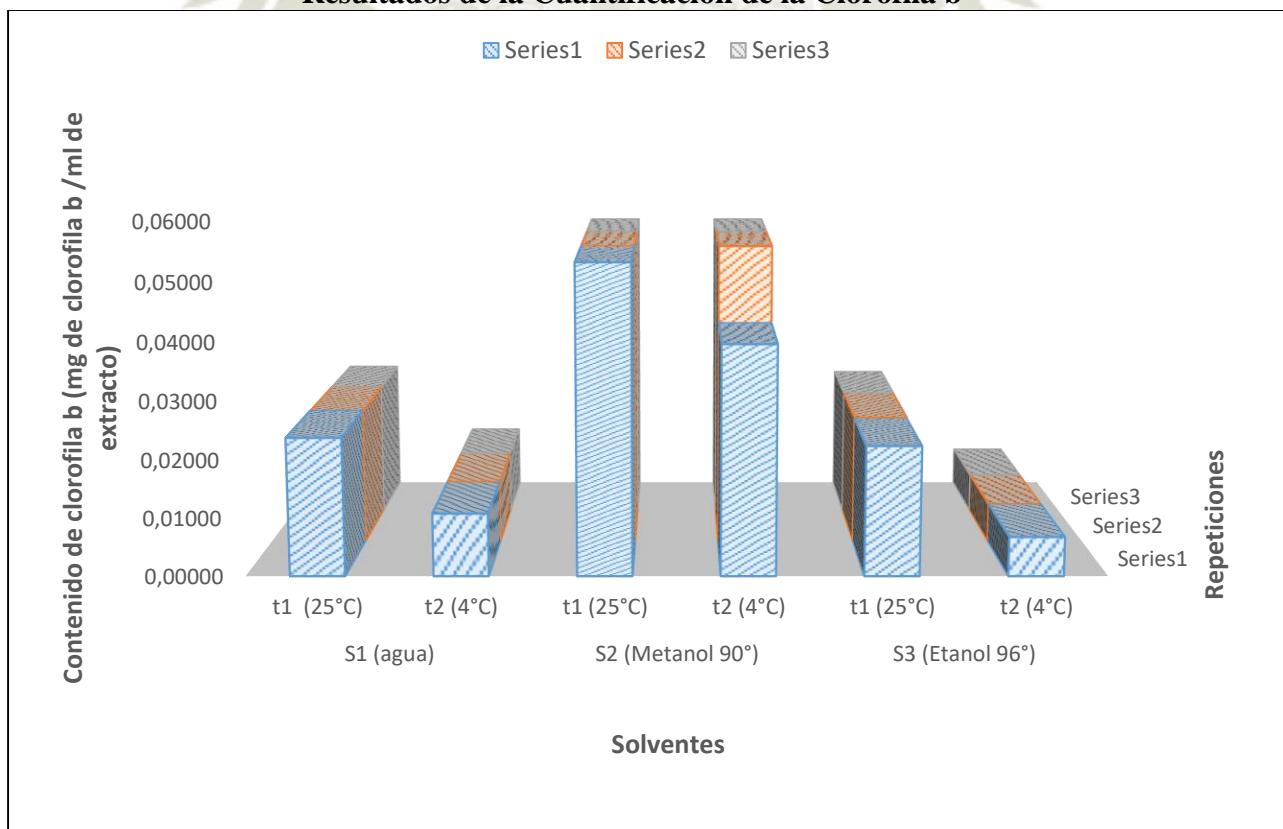
S<sub>2</sub>=Metanol 90°

S<sub>3</sub>= Etanol 96°

t<sub>1</sub>=25°C

t<sub>2</sub>=4°C

**GRAFICA N°1:  
Resultados de la Cuantificación de la Clorofila b**

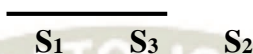


**Tabla N°1: Análisis De Varianza Para Evaluar El Contenido De Clorofila B.**

ANVA	GL	SC	CM	Fc	Ft (1%)
<b>Solvente</b>	2	0.00489	0.00244	238.19075	6.93
<b>Temperatura</b>	1	0.00055	0.00055	53.28747	9.33
<b>S x t</b>	2	0.00010	0.00005	4.92648	6.93
<b>Error Exp.</b>	12	0.00012	0.00001		
<b>TOTAL</b>	17	0.00566			

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Tuckey para el solvente:**



✓ **Interpretación de los Resultados**

Como se puede observar en la tabla de ANVA para la extracción con solventes con agua, metanol y etanol se presentan diferencia altamente significativa, por lo que se hace una prueba Tuckey. En la interacción de medias se obtiene que el solvente agua y el solvente etanol son iguales, en el **Cuadro N°19** se observa los valores mínimos de absorbancia en ambos casos.

Se puede predecir el uso del metanol como principal medio de extracción de clorofila b, los valores de absorbancia detectaron el mayor contenido de analitos en la extracción con metanol, tomando en cuenta la relación directamente proporcional de absorbancia y concentración de analito. En el estudio deducimos que la extracción de clorofila b a 25°C y a 4°C presentan diferencias.

Ante lo expuesto luego de realizar las interacciones y observando los resultados se deduce como optimo al solvente metanol 90°, el mismo que presenta los mayores valores de absorbancia y bajo la conversión se obtiene los valores de clorofila b, en mg de clorofila b por mililitro de extracto.

La utilidad del solvente metanol se justifica dado que la característica de los analitos en el alga ulva spp. es en su mayoría de carácter hidrolcolhólico cuyos pigmentos clorofílicos presentan alta afinidad con solventes orgánicos, el metanol presentan una cualidad extractante ante ello su capacidad para obtener mayor contenido de clorofila b, lo que genera un arrastre de mayor nivel y en un tiempo reducido.

Es importante mencionar que el contenido de clorofila b en extracto de agua y de etanol fueron iguales estadísticamente con resultados bajos, sin embargo se observa diferencia con el extracto obtenido del metanol a 25°C ello se justifica por la capacidad polar de la clorofila b y su fácil actuación a temperaturas moderadas (Areces & Araujo, 1996), por ello que los resultados a 25°C fueron más favorables que a 4°C en todos los solventes, teniendo como argumento, la actuación del anillo de porfirina a temperaturas medias (Arce Castro & Mendo, 2014), por otro lado se rescata el uso, en el Experimento N°1, de la temperatura de 25°C debido al argumento del método Machinney quien indica trabajar a 20 o temperaturas mayores a 20°C y el trabajar a 4°C se aplica debido a la tesis de conservar pigmentos a temperaturas bajas por refrigeración (Areces & Araujo, 1996) por lo que bajo estos dos sustentos se proyectó obtener mayor contenido de clorofila b.

Se demuestra cuantitativamente que la energía absorbida corresponde a la cantidad necesaria para promover un electrón de un orbital a otro en una molécula conjugada, esto tiene lugar ya que la espectrofotometría fue realizada con radiación UV, obteniendo la región máxima de absorbancia registrada por el fotómetro de 0.0531mg de clorofila b en un ml de extracto.

Es el fitol el principal eje en la presente investigación por ello se le da importancia a la cuantificación de clorofila b como recurso de identificación de fitol, quien forma parte de la

estructura de la clorofila b como cadena lineal, siendo este el bioactivo que argumenta el efecto bactericida.

▪ **Rendimiento de Extracto Bioactivo (%)**

**CUADRO N° 20**

**DATOS DE PESOS OBTENIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTO**

Rep.	PESOS (g)											
	S <sub>1</sub>				S <sub>2</sub>				S <sub>3</sub>			
	t <sub>1</sub>		t <sub>2</sub>		t <sub>1</sub>		t <sub>2</sub>		t <sub>1</sub>		t <sub>2</sub>	
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>
<b>1</b>	105.49	1.444	95.01	1.907	112.84	3.78	111.89	2.707	75.6	1.576	86.6	1.476
<b>2</b>	104	1.078	94.01	1.998	112.57	3.50	110.57	2.789	71.55	1.549	83.01	1.401
<b>3</b>	105.01	1.315	95.19	1.489	112.78	3.92	111.45	2.723	70.4	0.556	87.26	1.456

*Fuente: Elaboración propia – Arequipa 2019.*

*P<sub>1</sub>: Representa el peso inicial que ingresa al rotavapor.*

*P<sub>2</sub>: Representa al peso final que sale del rotavapor, extracto final.*

✓ **Legenda :**

S<sub>1</sub>=Agua

S<sub>2</sub>=Metanol 90°

S<sub>3</sub>= Etanol 96°

t<sub>1</sub>=25°C

t<sub>2</sub>=4°C

**CUADRO N° 21**

**RESULTADOS DEL RENDIMIENTO DE EXTRACTO (%)**

Prueba	Rep.	Extracción del bioactivo de alga <i>Ulva</i> spp.					
		S <sub>1</sub>		S <sub>2</sub>		S <sub>3</sub>	
		t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>
<b>Rendimiento de Extracto Bioactivo%</b>	<b>1</b>	1.3689	2.0072	3.3499	2.4193	2.0847	1.7044
	<b>2</b>	1.0365	2.1253	3.1118	2.5224	2.1649	1.6877
	<b>3</b>	1.2523	1.5642	3.4758	2.4432	0.7898	1.6686
	<b><math>\bar{x}</math></b>	1.2192	1.8989	3.3125	2.4617	1.6798	1.6869

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

✓ **Leyenda :**

S<sub>1</sub>=Agua

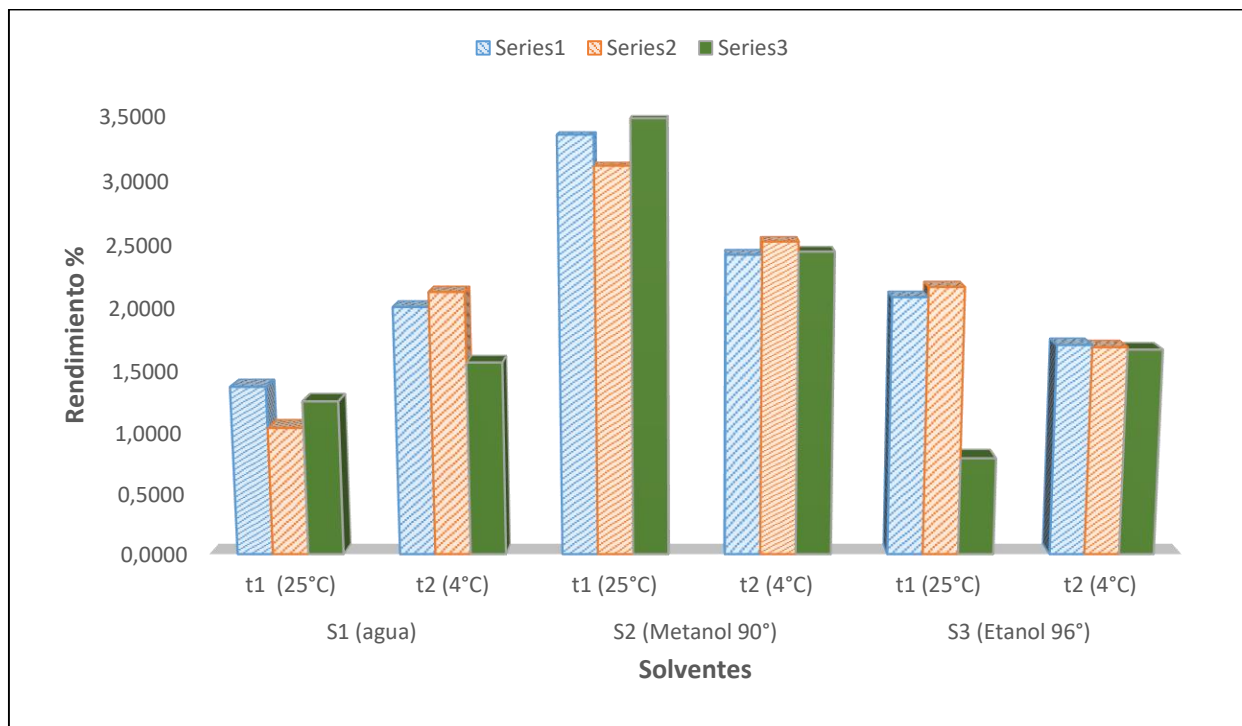
S<sub>2</sub>=Metanol 90°

S<sub>3</sub>= Etanol 96°

t<sub>1</sub>=25°C

t<sub>2</sub>=4°C

**GRAFICA N°2:**  
**Resultados de Rendimiento de Extracto (%)**



**Tabla N°2 Análisis De Varianza Para Evaluar El Rendimiento De Extracto**

ANVA	GL	SC	CM	Fc	Ft (1%)
<b>Solvente</b>	2	6.4561	3.2281	25.8588	6.93
<b>Temperatura</b>	1	0.0135	0.0135	0.1078	9.33
<b>S x t</b>	2	1.7655	0.8827	7.0713	6.93
<b>Error Exp.</b>	12	1.4980	0.1248		
<b>TOTAL</b>	17	9.7331			

Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.

**Tuckey para el solvente:**

S<sub>1</sub> S<sub>3</sub> S<sub>2</sub>

**Tabla N°3 Análisis de Factores**

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (1%)
<b>S<sub>1</sub>T</b>	2	0.6930	0.3465	2.7755	6.93
<b>S<sub>2</sub>T</b>	2	1.0859	0.5430	4.3494	6.93
<b>S<sub>3</sub>T</b>	2	0.0001	0.0000	0.0003	6.93
<b>T<sub>1</sub> S</b>	1	7.2597	7.2597	58.1550	9.33
<b>T<sub>2</sub> S</b>	1	0.9619	0.9619	7.7052	9.33
<b>Error Exp.</b>	12	1.4980	0.1248		

Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.

✓ **Interpretación de los Resultados**

Se puede observar en la tabla de ANVA que estadísticamente se presenta diferencias altamente significativas para los solventes en el rendimiento de bioactivo por lo que se hace una prueba de Tuckey.

Para la interacción entre solventes y temperaturas existe diferencia altamente significativa, por lo que se hace un análisis de factores

Al ejecutar Tuckey para solventes se obtiene que los resultados de rendimiento de extracción con solvente agua y etanol no presentan diferencias altamente significativas obteniendo resultados de rendimiento similar, por su parte el metanol presenta resultados más elevados de rendimiento en la extracción.

En los resultados de la Prueba Tuckey; lo solventes agua y etanol obtuvieron valores bajos de rendimiento ello también ocurre si lo comparamos con el control de contenido de clorofila b, ante este panorama tenemos la plena justificación que mientras el espectrofotómetro determinaba valores de absorbancia vertidos en contenido de analitos, dentro de ello el fitol, el rendimiento determinado luego del rotavapor genera resultados similares ya que ambos arrojan conclusiones de contenido de bioactivo.

Luego de realizar el análisis de factores, podemos observar que para la interacción temperatura 1 y solventes hay diferencia altamente significativa, en las demás interacciones no existió diferencia altamente significativa.

Se observa valores de rendimiento mayores al trabajar con el solvente metanol ello debido a la interacción que tiene con los compuestos polares y alcohólicos, teniendo el efecto de arrastre para la obtención de mayor contenido de bioactivo, es el caso del metanol a 90° quien obtuvo mayores

resultados en el rendimiento, ante ello se deduce la optimización del proceso con el uso del disolvente metanol.

La extracción ejecutada con los solventes agua y etanol obtuvieron los resultados más bajos al trabajar a 25°C y a 4°C comparados con el solvente metanol.

El solvente etanol a 96°, obtuvo resultados bastante interesantes, con valores altos al trabajar a 25°C sin embargo no ocurre lo mismo a 4°C ello se justifica debido que el etanol genera mayor movimiento electrostático a altas temperaturas, produciendo un mayor arrastre a 25°C.

El metanol con su efecto de extracción a 25°C resulto obtener la mayor extracción que el trabajar a 4°C, obteniendo mayor rendimiento en peso de bioactivo.

En el **Cuadro N°3** se plantea un valor máximo de 3% de clorofila b en 100g de algas como KBG, Chlorella y AFA, en la presente investigación se logra justificar a través del **Cuadro N°21** como el porcentaje en rendimiento de clorofila puede aumentar hasta un 3.3125% si se trabaja con un solvente de mayor arrastre, metanol 90° a una temperatura de extracción de 25°C.

#### 4.2.2. Conclusión:

Estadísticamente de acuerdo a lo analizado anteriormente podemos concluir que el medio de extracción óptimo para el alga *Ulva spp.* es con el solvente metanol a 25°C, por lo tanto es el tratamiento que se escoge por presentar contenidos de clorofila b y rendimiento de extracción elevado, en su consecuencia el obtener mayor contenido de clorofila b nos asegura un mayor contenido de fitol, el principal bioactivo de estudio.

#### 4.2.3. Materiales y Equipos

**CUADRO N° 22**

**MATERIALES Y EQUIPOS – EXTRACCIÓN DE BIOACTIVO**

EQUIPO / MATERIALES	MARCA / MODELO	ESPECIFICACIONES TÉCNICAS
Alga <i>Ulva spp.</i>	-	-
Metanol	-	90 grados RQ 0044
Etanol	-	96 grados
Licuadora	Marca: Philips	Volumen: 5L
Rotavapor	Marca: Rotavapor® BUCHI Modelo: R II	Presión máxima: 30mmHg Niveles de rotación: 10 Temperatura máxima: 100°C
Espectrofotómetro	Marca: Shimadzu Modelo:UV-160A	Intervalo espectral: 190.0 – 1100.0 nm
Embudo de Decantación	Pyrex	Material : Vidrio
Soporte universal		Material : Metal
Balanza analítica	Marca: Scout Pro Ohaus Modelo: SP202	Sensibilidad : 0.001g

Matraz Erlenmeyer	Pyrex	Volumen 500ml Material : Vidrio
Tapón para Matraz	-	Material : Sílice
Perlas de vidrio	-	Material : Vidrio
Beacker	-	Material : Vidrio Volumen: 500ml
Probeta	-	Material : vidrio Volumen: 10ml
varilla	-	Material : vidrio
Termómetro de mercurio	-	Máxima 100°C +/- 0.1°
Cronometro	-	Digital
Otros	-	Hielo, colador, papel filtro, pulverizador, etc.

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

### 4.3. EXPERIMENTO N°2: SENSIBILIDAD BACTERICIDA DEL BIOACTIVO

#### 4.3.1. Resultados y Análisis de Resultados

Se determina la concentración óptima para observar la sensibilidad bactericida en cepas de Escherichia Coli y salmonella spp. expuestas a difusión en discos con los extractos.

- **Tamaño de halo (mm)**

#### CUADRO N° 23

#### RESULTADO DE LA SENSIBILIDAD BACTERICIDA DEL BIOACTIVO

(Método Difusión en Discos)

Prueba	Rep.	Sensibilidad bactericida del bioactivo					
		A <sub>1</sub>			A <sub>2</sub>		
		CEA <sub>1</sub>	CEA <sub>2</sub>	CEA <sub>3</sub>	CEA <sub>1</sub>	CEA <sub>2</sub>	CEA <sub>3</sub>
Tamaño de halo (mm)	1	11	11	9	22	17.2	11
	2	11.5	11	7	20	20	11
	3	12	11	9.5	20.5	17.5	10.7
	$\bar{x}$	11.5	11.0	8.5	20.8	18.2	10.9

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

✓ **Leyenda :**

A<sub>1</sub>=Salmonella spp.

A<sub>2</sub>=Escherichia Coli

CEA<sub>1</sub>=0.20% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0022mg clorofila b/ml de extracto)

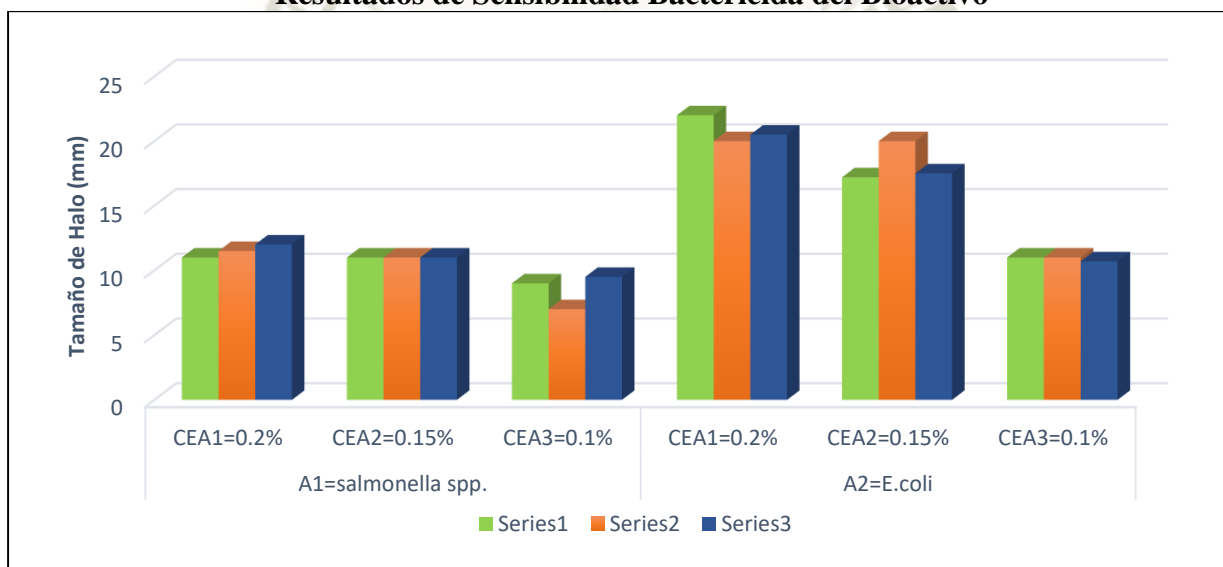
CEA<sub>2</sub>=0.15% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0012mg clorofila b/ml de extracto)

CEA<sub>3</sub>=0.10% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0007mg clorofila b/ml de extracto)



**Figura N° 4.** Concentraciones para determinar sensibilidad a 0.2%, 0.15% y 0.1% de Extracto bioactivo

**GRAFICA N°3:**  
**Resultados de Sensibilidad Bactericida del Bioactivo**



**Tabla N°4: Análisis De Varianza Para Evaluar El Tamaño De Halo**

ANVA	GL	SC	CM	Fc	Ft (1%)
<b>Cepas de bacterias</b>	1	179.867	179.8672	197.0548	9.33
<b>Concentración de extracto bioactivo</b>	2	136.7878	68.3939	74.9294	6.93
<b>A x CEA</b>	2	37.9211	18.9606	20.7724	6.93
<b>Error Exp.</b>	12	10.9533	0.9128		
<b>TOTAL</b>	17	365.5294			

Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.

**Tuckey para la concentración:**

CEA<sub>1</sub> CEA<sub>2</sub> CEA<sub>3</sub>

**Tabla N°5 Análisis de Factores**

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (1%)
A CEA <sub>1</sub>	1	130.6667	130.6667	143.1528	6.93
A CEA <sub>2</sub>	1	78.4817	78.4817	85.9811	6.93
A CEA <sub>3</sub>	1	8.6400	8.6400	9.4656	6.93
A <sub>1</sub> CEA	2	15.5000	7.7500	8.4906	9.33
A <sub>2</sub> CEA	2	159.2089	79.6044	87.2112	9.33
<b>Error Exp.</b>	12	10.9533	0.9128		

Fuente: *Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

✓ **Interpretación de los Resultados**

Se puede observar estadísticamente en la tabla ANVA que existe diferencia altamente significativa para las cepas de bacterias y para las concentraciones, por lo que se hace una prueba de Tuckey para las concentraciones debido a que las cepas solo cuenta con dos factores.

Para la interacción cepas de bacterias y concentraciones de extracto existe diferencia altamente significativa por lo que se hace un análisis de factores.

En el análisis Tuckey para concentraciones se demuestra que las concentraciones de 0.2% y 0.15% de extracto bioactivo no presenta diferencia altamente significativa, ello se demuestra al observar los resultados en el **Cuadro N°23** donde los tamaños de halos en cepas de salmonella spp. al trabajar a 0.2% y 0.15% son 11.5mm y 11mm respectivamente lo mismo sucede si se trabaja con cepas de E.coli las concentraciones de 0.2% y 0.15% de extracto bioactivo presentan resultados similares de 20.8mm y 18.2mm corroborando que la sensibilidad seria la misma al trabajar con cualquiera de las dos concentraciones.

En la prueba de comparación de medias Tuckey; la concentración 1 y la concentración 2 son iguales, y la concentración 3 es diferente.

La sensibilidad bactericida expuesta como resultados en tamaño de halo, es observada notoriamente en la concentración de 0.2% y 0.15% de extracto bioactivo expuestas ante cepas de Escherichia Coli, siendo la concentración mínima inhibitoria la concentración de 0.15% de extracto bioactivo ello se justifica ya que los antibiogramas (**Ver Anexo N°10**) para enterobacteriaceae demuestran valores que se deben cumplir para generar inhibición, tal es el caso de un tamaño de halo de 17mm para una inhibición óptima (MINSa, 2002), este valor es observado al trabajar con concentraciones de 0.2% y 0.15% de extracto bioactivo en un medio de cultivo que ha sido sometido a la escala de Mc Farland es decir que está en un rango superior de 10<sup>8</sup> ufc, o en su consecuencia bacterias que se hallan en su fase logarítmica, por lo que estos dos valores (0.2% y 0.15%) son tomados como los óptimos para generar inhibición, lo que motiva a trabajar en el experimento N°3 (efecto bactericida) a partir de la concentración de 0.15% debido a que la muestra de partida (corte de lomo vetado) con la que se trabajará en el experimento N°3 no podría tener un grado de contaminación de 10<sup>8</sup> ufc de E. coli o de salmonella spp., ya que esto la convierte en una muestra riesgosa, el experimento N°2 si trabaja con la escala de Mc Farland para brindar un panorama de simulación de lo que sería trabajar con diversas concentraciones, se determinó que el trabajar a 0.2% y 0.15% de extracto bioactivo no presenta diferencias altamente

significativas por lo tanto tomamos el menor de ellos (0.15%) para optimizar el experimento N°3 tanto en la calidad como económicamente.

Luego de realizar el análisis de factores, podemos observar que para la interacción de cepa de bacteria 1 (*Salmonella* spp.) y concentraciones no existe diferencia altamente significativa, en las demás interacciones si existió diferencia altamente significativa.

Los resultados de tamaño de halo para cepas de *salmonella* spp. expuestas a concentraciones de 0.2%, 0.15% y 0.1% de extracto bioactivo, demuestra valores de tamaño de halo intermedio, valores que van en un rango de 11mm a 7mm, lo que manifiesta una sensibilidad de grado Intermedio descrito en el Manual de Procedimientos para la Prueba De Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión comparado con un antibiótico aminoglicosido, por lo tanto se define un efecto de sensibilidad intermedia para la cepa de *Salmonella* spp, y un efecto de sensibilidad alta para la cepa de *E. coli*.

#### 4.3.2. Conclusión:

Posterior a realizar las evaluaciones estadísticas podemos concluir que las cepas de *E. coli* presentaron un grado de sensibilidad elevado y las cepas de *salmonella* spp. presentaron un grado de sensibilidad intermedio al ser expuestas a las concentraciones de extractos bioactivos. Se logró obtener la concentración óptima para conseguir la sensibilidad elevada en cepa de *E.coli* y una sensibilidad intermedia para cepas de *salmonella* spp, siendo la concentración de 0.15% teniendo en cuenta que es la concentración mínima inhibitoria, donde se alcanzaron los tamaños de halos (mm) promedio de 18.2 mm para *E Coli.*, con este parámetro ya fijado se asegura obtener un efecto bactericida en una fase logarítmica de bacterias enterobacteriaceae.

Se determina el grado de sensibilidad intermedia antibacteriana de los extractos ante un medio de *Salmonella* spp concluyendo que la sensibilidad existe, sin embargo ante una fase logarítmica ( $10^8$  ufc) de la bacteria *salmonella* spp. el efecto del extracto en las tres concentraciones es de grado Intermedio.

### 4.3.3. Materiales y Equipos

CUADRO N° 24

#### MATERIALES Y EQUIPOS – SENSIBILIDAD BACTERICIDA

MATERIAL / EQUIPO	MARCA / MODELO	ESPECIFICACIONES TÉCNICAS
Extracto bioactivo	-	0.2% de extracto bioactivo 0.15% de extracto bioactivo 0.1% de extracto bioactivo
Suero fisiológico	-	-
Balanza analítica	Marca: Scout Pro Ohaus Modelo: SP202	Sensibilidad : 0.001g
Estufa	Marca: FANEM Modelo: 002CB	Temperatura : 0 – 100°C
Autoclave	Marca: Easter Medical	Horizontal con reciclador de agua
Cocina	-	Eléctrica
Extracto bioactivo	0.2, 0.15, 0.1%	Alga (Ulva spp)
Escala de Mc Farland 0.5	-	Ácido sulfúrico + hidróxido de bario
Micropipeta	-	Material : Plástico Volumen: 0.001 – 1ml
Matraz Erlenmeyer	Pyrex	Material : vidrio Volumen: 100ml
Beacker	Pyrex	Material : vidrio Volumen: 200ml
Probeta	Pyrex	Material : vidrio Volumen: 100ml
Placas Petri	Pyrex	Material : vidrio diámetro : 9.5cm
Discos de difusión	-	Material : papel diámetro : 6mm
Tubos de Ensayo	Pyrex	Material : vidrio
Gradilla	-	Material : metal
Varilla	-	Material : vidrio
Pisetas	-	Material : Plástico
Agar en polvo	Necesaria	Agar Mueller Hinton DM1173
Asa driglasky	-	Material : vidrio
Suero fisiológico	-	-
Caldo peptonado	-	Bactopeptona
Papel filtro	-	-
Otros	-	Parafilm, hisopos, papel filtro, detergente, alcohol.

Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.

#### 4.4. EXPERIMENTO N°3: EFECTO BACTERICIDA EN CARNE DE VACUNO

##### 4.4.1. Resultados y Análisis de Resultados

Se determina el efecto bactericida y conservante aplicado en cortes de lomo veteadado de carne de vacuno. Se halla la concentración y tiempo óptimo donde el efecto bactericida y conservante otorga mejores características organolépticas y microbiológicas.

- Recuento de salmonella spp.
- Recuento de Escherichia Coli.
- Color
- Olor
- Textura
- Sabor

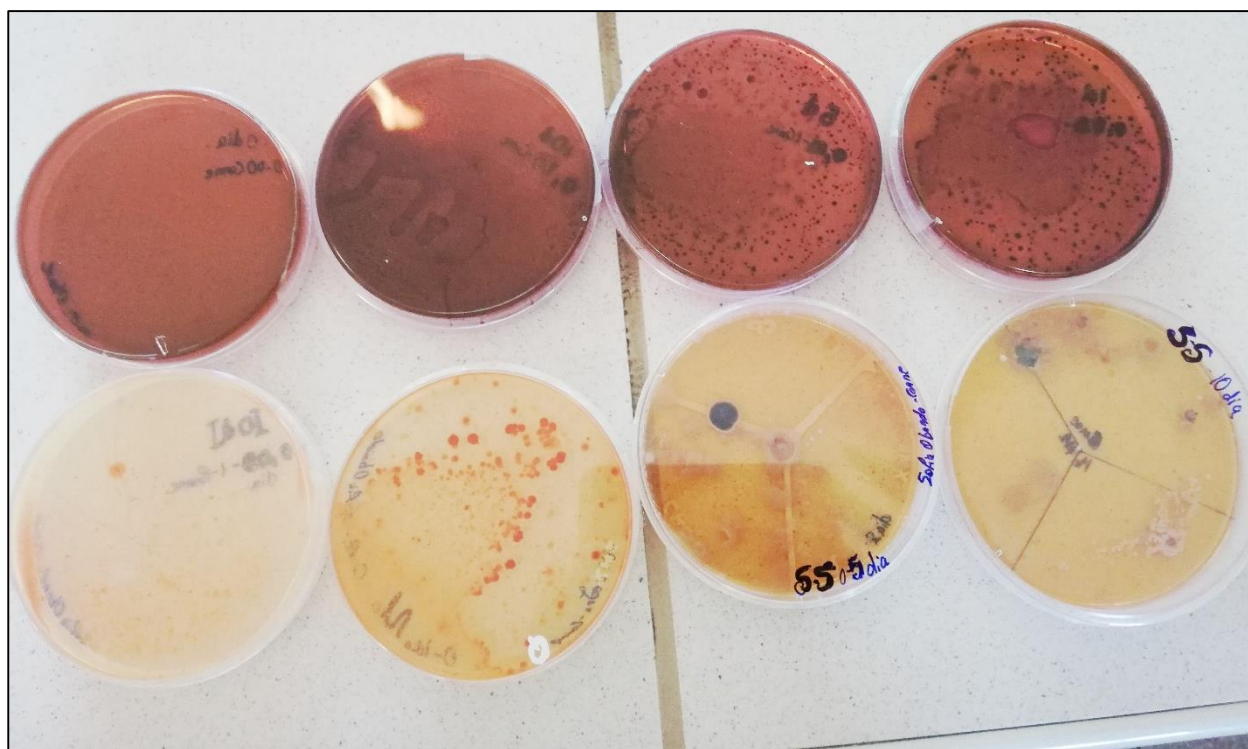
CUADRO N° 25

#### RESULTADO DE RECUESTO DE E.COLI Y SALMONELLA SPP. EN CARNE DE VACUNO SIN EXTRACTO (Método de Recuento y Siembra en Superficie)

Microorganismos	0 días	1 día	5 días	10 días
E. coli	0 ufc/g	0 ufc/g	3 ufc/g	10 ufc/g
	0 ufc/g	0 ufc/g	3 ufc/g	10 ufc/g
	0 ufc/g	0 ufc/g	3 ufc/g	10 ufc/g
	$\bar{x}$ 0 ufc/g	0 ufc/g	3 ufc/g	10 ufc/g
Salmonella spp.	0 ufc/g	0 ufc/g	1 ufc/g	2 ufc/g
	0 ufc/g	0 ufc/g	1 ufc/g	2 ufc/g
	0 ufc/g	0 ufc/g	1 ufc/g	2 ufc/g
	$\bar{x}$ 0 ufc/g	0 ufc/g	1 ufc/g	2 ufc/g

*Fuente:* Elaboración Propia - Arequipa 2019.

**Nota:** Valores referenciales para los Cuadros N°26 y N°27. El método aplicado es el Método de Siembra y Recuento en Superficie VER ANEXO N°2.



**Figura N° 5.** Resultados del recuento de *E.coli* y *salmonella spp.* en los 10 días analizados en carne de vacuno sin extracto.

▪ **Recuento de Escherichia Coli**

**CUADRO N° 26**

**RESULTADO DE RECUESTO DE E.COLI PARA EL EFECTO BACTERICIDA EN CARNE DE VACUNO (Método de Recuento y Siembra en Superficie)**

Control	Re p.	Efecto bactericida del bioactivo								
		CEA <sub>1</sub>			CEA <sub>2</sub>			CEA <sub>3</sub>		
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
<b>Recuento de E.coli</b>	<b>1</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	<b>2</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	<b>3</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Nota:** El método aplicado es el Método de Siembra y Recuento en Superficie **VER ANEXO N°2.**

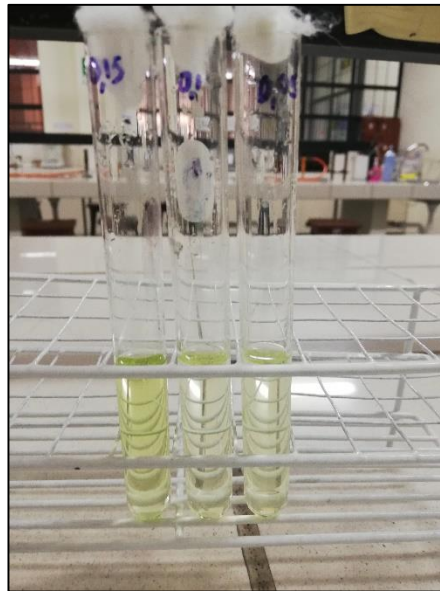
✓ **Leyenda:**

CEA<sub>1</sub>=0.15% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0012mg clorofila b/ml de extracto)

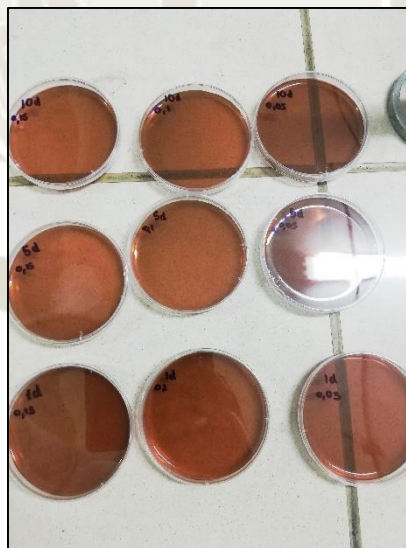
CEA<sub>2</sub>=0.10% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0007mg clorofila b/ml de extracto)

CEA<sub>3</sub>=0.05% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0001mg clorofila b/ml de extracto)

T<sub>1</sub>=1 día  
T<sub>2</sub>=5 días  
T<sub>3</sub>=10 días



**Figura N° 6.** Concentraciones para determinar el Efecto Bactericida a 0.15%, 0.1% y 0.05% de Extracto Bioactivo



**Figura N° 7.** Resultados de recuento de *E.coli* a los 1, 5 y 10 días en agar EMB

✓ **Interpretación de los Resultados**

Se puede observar cada uno de los resultados de recuento de *E.coli* en muestras de corte veteados refrigerados a concentraciones diferentes y analizadas a días distintos (1, 5 y 10 días), obteniendo que el efecto bactericida es óptimo dado que los resultados de recuento al primer día, al quinto día y al décimo día fueron de ausencia, comparado con los datos de referencia del **Cuadro N°25** de recuento de *E.coli* en carne sin extracto donde al día quinto en la carne se observó un valor de 3ufc

de E.coli/g de carne y al día 10 el valor fue de 10ufc de E.coli/g por lo que se observa una degradación de la carne al estar expuesta sin ningún tipo de conservante, a través de ello se asegura el efecto bactericida y conservante del extracto bioactivo argumentando que sin la aplicación del extracto la carne estaría expuesta a degradación por presencia de E.coli, ante ello se asegura la protección del corte de lomo y elevar la inocuidad de la carne con el empleo del extracto bioactivo. E Coli es una bacteria gran negativa que se halla a gran escala en la superficie de carne sin embargo la Norma (Audisio, 2007) establece un grado de ausencia como calificación a los recuentos de E.coli en carnes que se encuentran cumpliendo Buenas Prácticas de Manufactura, en este caso el uso del extracto de bioactivo género protección y el efecto deseado en las tres concentraciones. Si bien en el Experimento N°2 se demuestra la sensibilidad en un grado óptimo con valores elevados para cepas de E Coli en una fase logarítmica que representa valores de  $10^8$  ufc/ml, ahora nos encontramos con un panorama de corte veteado cuya calidad es inicialmente optima, lo que demuestra que la carne se encuentra tratada con buenas prácticas de manufactura, al ser sometidos los cortes a diferentes concentraciones de extractos le brinda una sobreprotección generando un efecto bactericida ello se comprueba con los resultados observados en el cuadro anterior.

▪ **Recuento de Salmonella**

**CUADRO N° 27**

**RESULTADO DEL RECUENTO DE SALMONELLA SPP. PARA EL EFECTO BACTERICIDA EN CARNE DE VACUNO (Método de Recuento y Siembra en Superficie)**

Control	Rep	Efecto bactericida del bioactivo								
		CEA <sub>1</sub>			CEA <sub>2</sub>			CEA <sub>3</sub>		
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Recuento de Salmonella	1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	3	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Nota:** El método aplicado es el Método de Siembra y Recuento en Superficie. (VER ANEXO N°2)

✓ **Leyenda:**

CEA<sub>1</sub>=0.15% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0012mg clorofila b/ml de extracto)

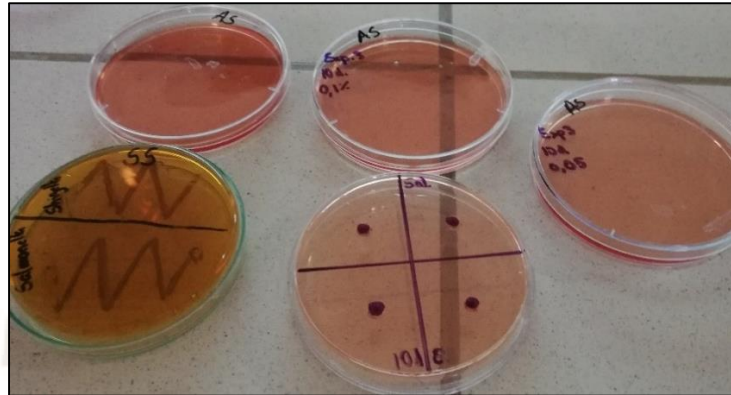
CEA<sub>2</sub>=0.10% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0007mg clorofila b/ml de extracto)

CEA<sub>3</sub>=0.05% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0001mg clorofila b/ml de extracto)

T<sub>1</sub>=1 día

T<sub>2</sub>=5 días

T<sub>3</sub>=10 días



**Figura N° 8.** Resultados de recuento de *Salmonella* a los 1, 5 y 10 días en agar *Salmonella-Shiguella*

✓ **Interpretación de los Resultados**

Se puede observar cada uno de los resultados de recuento de *Salmonella* spp. en muestras de corte veteadado refrigerado a concentraciones diferentes y analizadas a días distintos, obteniendo que el efecto bactericida es óptimo dado que los resultados de recuento al primer día, al quinto día y al décimo día fueron de ausencia al igual que con los resultados de recuento de *E.coli*.

*Salmonella* spp. es una bacteria enterobacteriaceae que se halla en la superficie de la carne luego del beneficio de la vaca por contaminación cruzada o malas prácticas de manufactura, en este caso el uso del extracto de bioactivo genero protección y el efecto deseado con resultados iguales en las tres concentraciones.

El recuento de *Salmonella* spp. desarrollado en carne sin inmersión en extracto (**Ver cuadro N°25**) demostró una contaminación al quinto día con un valor de 1 ufc de salmonella spp./g de carne y en el décimo día 2 ufc de salmonella spp./g de carne por lo que se plantea la contaminación de la carne al no estar expuesta al extracto, se tiene en cuenta que el valor máximo de ufc que se permite en la carne es de 1ufc/g (Audisio, 2007) por lo que la carne excedió este límite e inicia un grado de riesgo para el consumidor, ante el panorama se asegura la utilidad del extracto como medio de protección a la seguridad de la carne con el efecto bactericida del extracto bioactivo y la inocuidad de la carne con su empleo.

Los resultados cumplen con el Manual de Microbiología de los Alimentos (Audisio, 2007) quien narra un límite máximo de 1ufc/cm<sup>2</sup> en carnes frescas con Buena Práctica de manufactura, por lo tanto el resultado obtenido se halla por debajo del parámetro permitido.

▪ **Color**

**CUADRO N° 28**

**RESULTADO DEL EFECTO BACTERICIDA EN CARNE DE VACUNO**

Control	Rep.	Efecto Bactericida en Carne de Vacuno								
		CEA <sub>1</sub>			CEA <sub>2</sub>			CEA <sub>3</sub>		
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Color	1	5	4	4	5	4	4	5	4	4
	2	4	4	4	4	5	4	5	5	4
	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	3	4	4	3	4	5	3
	5	4	4	3	4	4	3	4	4	3
	6	5	5	3	5	4	3	5	4	4
	7	5	5	3	5	4	4	4	4	3
	8	5	4	4	5	4	3	5	4	4
	9	4	4	3	4	5	4	5	4	3
	10	5	4	4	4	5	3	5	4	4
	$\bar{x}$	4.5	4.2	3.5	4.4	4.3	3.5	4.6	4.2	3.6

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Cartilla N°5**

**CARACTERÍSTICAS PARA EVALUAR EL COLOR – EFECTO BACTERICIDA**

CRITERIO	PUNTUACIÓN
Muy bueno	5
Bueno	4
Aceptable	3
Regular	2
Malo	1

✓ **Leyenda:**

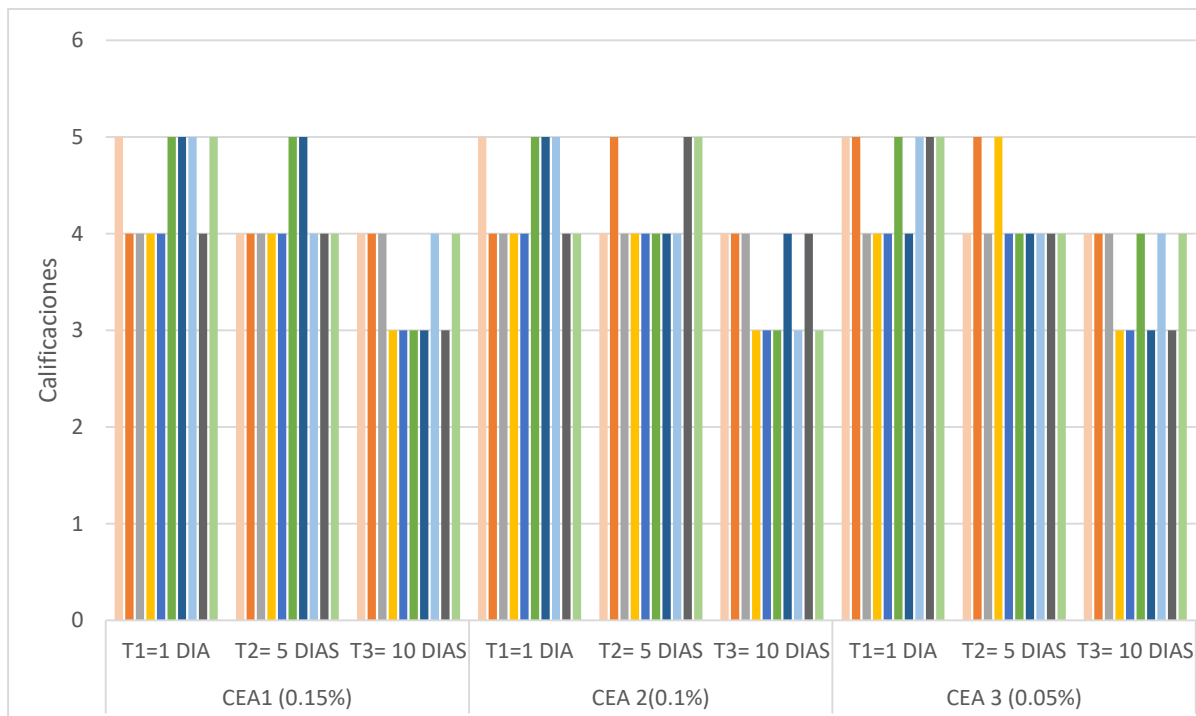
CEA<sub>1</sub>=0.15% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0012mg clorofila b/ml de extracto)

CEA<sub>2</sub>=0.10% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0007mg clorofila b/ml de extracto)

CEA<sub>3</sub>=0.05% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0001mg clorofila b/ml de extracto)

T<sub>1</sub>=1 día  
T<sub>2</sub>=5 días  
T<sub>3</sub>=10 días

**GRAFICA N°4:  
Resultados de Color – Experimento 3**



**Tabla N°6: Análisis De Varianza Para Evaluar Color**

ANVA	GL	SC	CM	Fc	Ft (1%)
<b>Concentración de extracto de alga</b>	2	0.0889	0.0444	0.2022	4.912
<b>Tiempos de exposición</b>	2	14.9556	7.4778	34.0281	4.912
<b>CEA x T</b>	4	0.2444	0.0611	0.2781	3.592
<b>Bloque</b>	9	4.1778	0.4642	2.1124	2.664
<b>Error Exp.</b>	72	15.8222	0.2198		
<b>TOTAL</b>	89	35.2889			

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Nota:** Los valores de Ft (1%) fueron calculados por interpolación **VER ANEXO N°6.**

**Tuckey para el tiempo:**

**T<sub>1</sub>   T<sub>2</sub>   T<sub>3</sub>**

### ✓ Interpretación de los Resultados

Se puede observar estadísticamente en la tabla ANVA que existe diferencia altamente significativa para los tiempos, por su parte no existe diferencia altamente significativa en las concentraciones, por lo que se hace una prueba de Tuckey para los tiempos.

En la interacción de medias se demuestra que los tiempos  $T_1$  y  $T_2$  son iguales, es decir no presentan diferencias altamente significativas.

En la prueba de comparación de medias Tuckey; los tiempos  $T_1$  y  $T_2$  son iguales, y el tiempo  $T_3$  es diferente.

El control de color de corte de lomo veteadado de vacuno, analizado a diferentes concentraciones de extracto y a diferentes tiempos, demuestra la influencia de tiempo para generar menos calificaciones en el agrado del corte, ello se manifestó en cada una de las calificaciones de los panelistas semi entrenados (Panelistas que recibieron un entrenamiento teórico **Ver Anexo N°3**).

En el día uno se observaron calificaciones de agradable y muy agradable para cada corte teniendo una leve disminución de calificaciones en la concentración de 0.05%, ello se justifica ya que el extracto del alga puede ser no solo un agente de protección al corte de lomo si no también potenciador de color y conservación del mismo, por ello la calificación menor en un corte cuyo tratamiento fue de 0.05%.

En el día cinco, se manifestó calificaciones de agradable y muy agradable para las tres concentraciones, este es el reflejo de lo que demuestra la tabla ANVA para las concentraciones, debido a que a 0.15%, 0.1% y 0.05% no se observaron diferencias altamente significativas, lo que conlleva a manifestar que el primer y quinto día presentaron resultados iguales.

En el día diez, se observó calificaciones de indiferente para concentraciones de 0.15%, 0.1% y 0.05%, lo que permite justificar el uso de la concentración de 0.15% de extracto para una mayor conservación del color en un tiempo de 10 días.

El extracto de ulva spp. presenta bioactivos tales como el fitol, un alcohol diterpénico que se halla en la cadena de la clorofila b, el fitol no solo puede ser utilizado como un agente bactericida si no también un conservante ello es demostrado en el presente estudio estadístico, por su parte el color de la carne está determinado por el estado de la mioglobina, su principal pigmento, el color también se ve afectado por la evolución del pH post mortem, la carne inició su descenso de pH a partir de 6.8, la intervención de la clorofila b esta hallada justo en este punto, cuando la carne producto de la degradación del glucógeno, se encuentra generando ácido láctico en las primeras 24h, empieza a descender su pH, el extracto del alga presenta un pH neutro lo que permite que la devaluación del pH de la carne no se acelere y de esta manera se conserve las características de la mioglobina y posteriormente la producción óptima de ferrihemocromo.

▪ **Olor**

**CUADRO N° 29**

**RESULTADO DEL EFECTO BACTERICIDA EN CARNE DE VACUNO**

Controles	Rep.	Efecto Bactericida en Carne de Vacuno								
		CEA <sub>1</sub>			CEA <sub>2</sub>			CEA <sub>3</sub>		
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Olor	1	5	3	3	4	4	2	5	4	2
	2	4	4	3	4	4	3	4	3	3
	3	4	4	4	4	3	2	4	3	2
	4	4	4	3	4	3	3	5	3	3
	5	4	4	3	4	4	3	4	3	3
	6	5	4	3	4	3	3	4	3	3
	7	4	4	3	4	4	3	4	3	3
	8	4	4	3	4	4	3	4	3	3
	9	4	3	3	4	4	3	4	3	3
	10	4	4	3	5	4	2	4	3	3
	$\bar{x}$	4.2	3.8	3.1	4.1	3.7	2.7	4.2	3.1	2.8

Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.

**Cartilla N°6**

**CARACTERÍSTICAS PARA EVALUAR EL OLOR – EFECTO BACTERIDA**

CRITERIO	PUNTUACIÓN
Muy agradable	5
Agradable	4
Aceptable	3
Regular	2
Desagradable	1

✓ **Leyenda:**

CEA<sub>1</sub>=0.15% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0012mg clorofila b/ml de extracto)

CEA<sub>2</sub>=0.10% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0007mg clorofila b/ml de extracto)

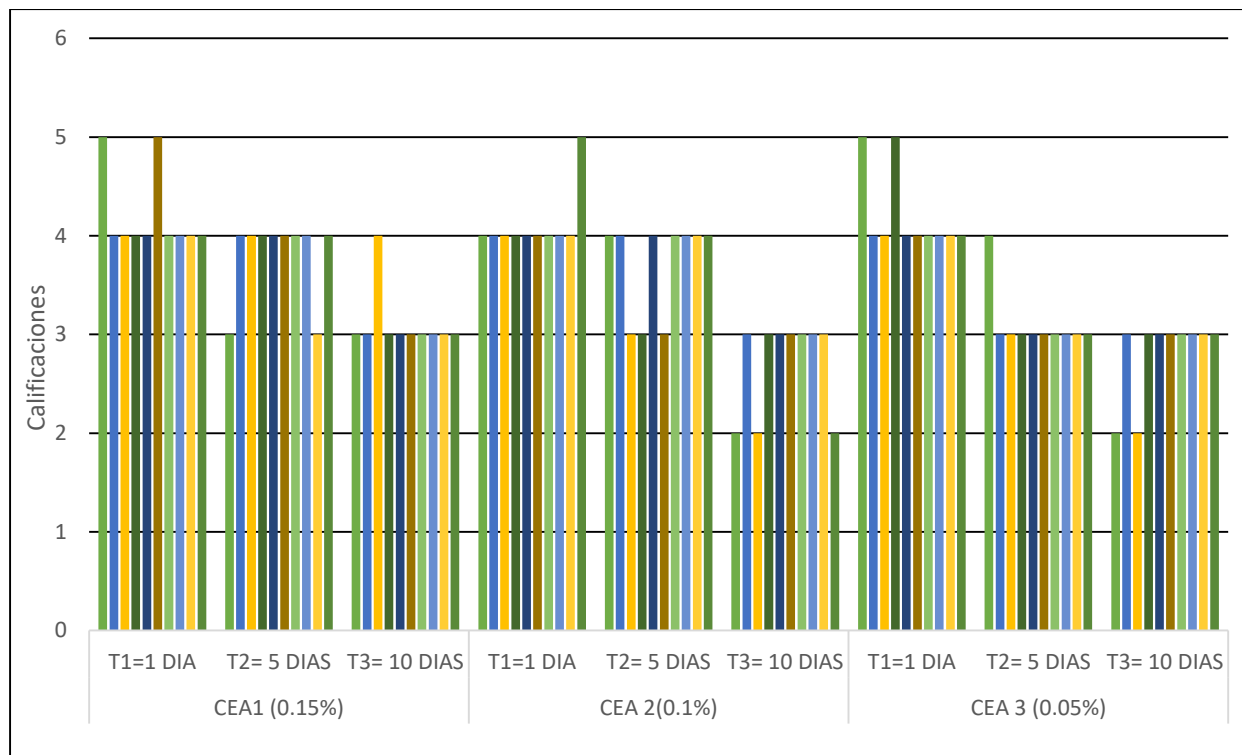
CEA<sub>3</sub>=0.05% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0001mg clorofila b/ml de extracto)

T<sub>1</sub>=1 día

T<sub>2</sub>=5 días

T<sub>3</sub>=10 días

**GRAFICA N°5:  
Resultados de Olor – Experimento 3**



**Tabla N°7: Análisis De Varianza Para Evaluar Olor**

ANVA	GL	SC	CM	Fc	Ft (1%)
<b>Concentración de extracto de alga</b>	2	1.6889	0.8444	4.7336	4.912
<b>Tiempos de exposición</b>	2	25.3556	12.6778	71.0657	4.912
<b>CEA x T</b>	4	2.1111	0.5278	2.9585	3.592
<b>Bloque</b>	9	0.4556	0.0506	0.2837	2.664
<b>Error Exp.</b>	72	12.8444	0.1784		
<b>TOTAL</b>	89	42.4556			

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Nota:** Los valores de Ft (1%) fueron calculados por interpolación **VER ANEXO N°6.**

**Tuckey para el tiempo:**

**T<sub>1</sub>    T<sub>2</sub>    T<sub>3</sub>**

✓ **Interpretación de los Resultados**

Se puede observar estadísticamente en la tabla ANVA que existe diferencia altamente significativa entre los tiempos, por su parte no existe diferencia altamente significativa en las concentraciones, por lo que se hace una prueba de Tuckey para los tiempos.

Los resultados del análisis Tuckey demuestran que los tiempos  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$  son diferentes, es decir presentan diferencias altamente significativas.

El control de olor de corte de lomo vetado de vacuno, analizado a diferentes concentraciones de extracto y a diferentes tiempos, demuestra la influencia de tiempo para generar mayores calificaciones en el agrado del corte, ello se manifestó en cada una de las calificaciones de los panelistas semi entrenados (Panelistas que recibieron un entrenamiento teórico).

En el día uno se observaron calificaciones de agradable y muy agradable para las tres concentraciones, ello se justifica ya que el alga puede ser no solo un agente de protección al corte de lomo si no también un agente de conservación del aroma de la carne.

En el día cinco, se manifestó calificaciones de agradable e indiferente, permitiendo demostrar la influencia de las concentraciones en las calificaciones dado que para las tres concentraciones los resultados fueron los mismos, lo que sustenta la protección del aroma de la carne.

En el día diez, se observó calificaciones de desagrado para las concentraciones de 0.1% y 0.05%, lo que permite justificar el uso de la concentración de 0.15% para una mayor conservación del olor en un tiempo de 10 días.

Es importante exponer que los olores de la carne se ven influenciados por compuestos que en general son derivados de proteínas, grasas, el estado de la carne, edad, raza, tipo de musculo, para especificar, la carne con la que se trabajó se halla en conocimiento óptimo de una adecuada manipulación, la carne se derivó del beneficio de una vaca cuya raza es Holstein (con un contenido de grasa de 3.7%) y cuyo tiempo de vida es de 3 años, y el corte que se obtuvo es de lomo vetado iniciándose en la cuarta costilla y finalizando en la novena costilla, con una veta de grasa principal, si bien el corte del lomo contiene alto contenido de grasa, este punto es necesario argumentar debido a que la grasa es un medio de conservación de aroma, y el extracto de alga puede sumarse en este punto como medio extra para evitar la degradación de la misma, ante el panorama descrito se propone la interacción del extracto sobre la grasa directamente ello se deduce a partir de los resultados de los panelistas, a mayor concentración del extracto en el día 10 los resultados fueron óptimos, comparados con la concentración menor de 0.1% y 0.05%, de esta manera se determina la concentración de 0.15% de extracto bioactivo para optimizar la característica de olor en la carne.

▪ **Textura**

**CUADRO N° 30**

**RESULTADO DEL EFECTO BACTERICIDA EN CARNE DE VACUNO**

Controles	Rep.	Efecto Bactericida en Carne de Vacuno								
		CEA <sub>1</sub>			CEA <sub>2</sub>			CEA <sub>3</sub>		
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
<b>Textura</b>	<b>1</b>	4	4	3	4	3	3	4	3	3
	<b>2</b>	4	4	3	4	3	3	5	3	3
	<b>3</b>	4	4	4	4	3	3	4	3	3
	<b>4</b>	4	4	4	4	3	3	4	3	3
	<b>5</b>	5	4	4	5	3	2	4	3	3
	<b>6</b>	5	4	3	5	3	3	4	3	2
	<b>7</b>	5	4	3	5	3	3	5	3	3
	<b>8</b>	5	5	3	5	4	3	5	4	3
	<b>9</b>	5	5	3	4	3	3	5	3	3
	<b>10</b>	5	4	3	4	3	2	4	3	2
<b><math>\bar{x}</math></b>		4.6	4.2	3.3	4.4	3.1	2.8	4.4	3.1	2.8

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Cartilla N°7**

**CARACTERÍSTICAS PARA EVALUAR LA TEXTURA – EFECTO BACTERICIDA**

CRITERIO	PUNTUACIÓN
Muy buena	5
Bueno	4
Aceptable	3
Regular	2
Malo	1

✓ **Leyenda:**

CEA<sub>1</sub>=0.15% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0012mg clorofila b/ml de extracto)

CEA<sub>2</sub>=0.10% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0007mg clorofila b/ml de extracto)

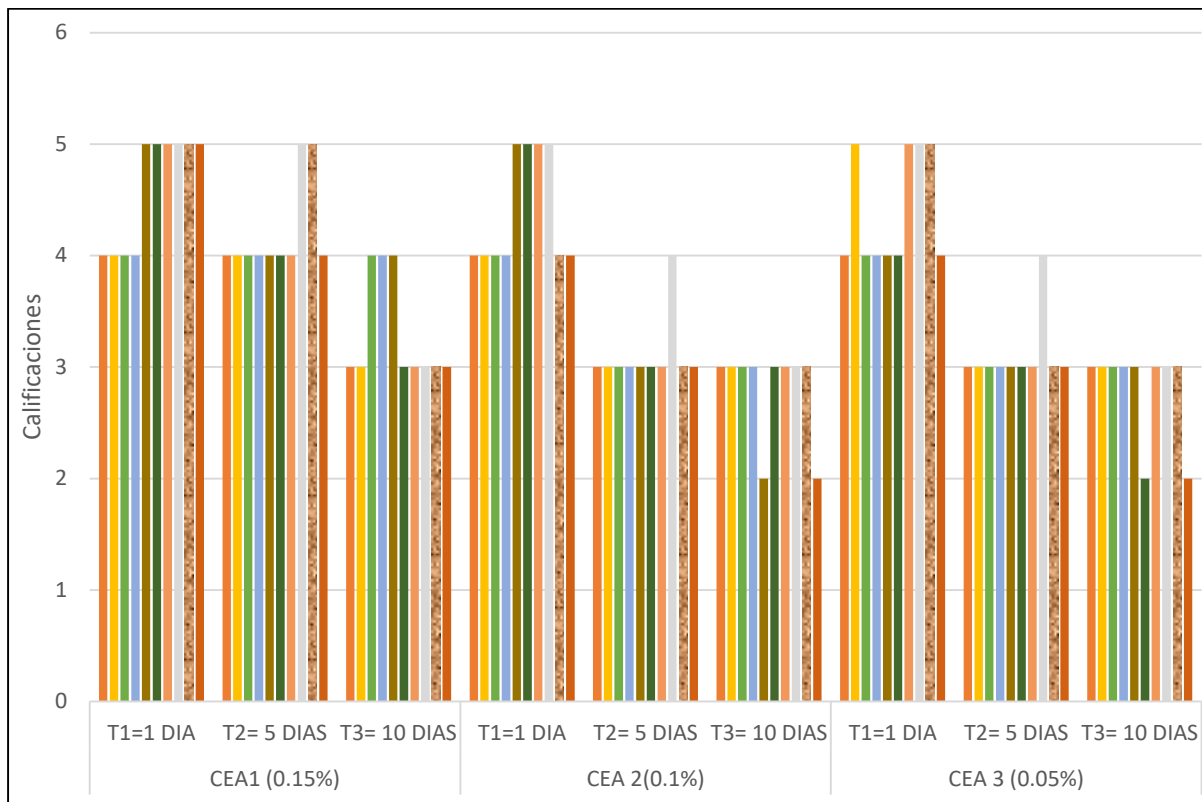
CEA<sub>3</sub>=0.05% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0001mg clorofila b/ml de extracto)

T<sub>1</sub>=1 día

T<sub>2</sub>=5 días

T<sub>3</sub>=10 días

**GRAFICA N°6:  
Resultados de Textura – Experimento 3**



**Tabla N°8: Análisis De Varianza Para Evaluar Textura**

ANVA	GL	SC	CM	Fc	Ft (1%)
<b>Concentración de extracto de alga</b>	2	7.2000	3.6000	21.4018	4.912
<b>Tiempos de exposición</b>	2	35.0000	17.5000	104.0367	4.912
<b>CEA x T</b>	4	2.8000	0.7000	4.1615	3.592
<b>Bloque</b>	9	3.7889	0.4210	2.5028	2.664
<b>Error Exp.</b>	72	12.1111	0.1682		
<b>TOTAL</b>	89	60.9000			

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Nota:** Los valores de Ft (1%) fueron calculados por interpolación **VER ANEXO N°6**

**Tuckey para la Concentración**

CEA<sub>1</sub> CEA<sub>2</sub> CEA<sub>3</sub>

## Tuckey para el Tiempo

T<sub>1</sub> T<sub>2</sub> T<sub>3</sub>

**Tabla N°9 Análisis de Factores**

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (1%)
CEA <sub>1</sub> T	2	29.5556	14.7778	87.8532	4.912
CEA <sub>2</sub> T	2	48.2222	24.1111	143.3394	4.912
CEA <sub>3</sub> T	2	48.2222	24.1111	143.3394	4.912
CEAT <sub>1</sub>	2	0.8889	0.4444	2.6422	4.912
CEA T <sub>2</sub>	2	26.8889	13.4444	79.9266	4.912
CEA T <sub>3</sub>	2	5.5556	2.7778	16.5138	4.912
<b>Error Exp.</b>	72	12.1111	0.1682		

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Nota:** Los valores de Ft (1%) fueron calculados por interpolación **VER ANEXO N°6**

### ✓ Interpretación de los Resultados

Se puede observar estadísticamente en la tabla ANVA que existe diferencia altamente significativa entre los tiempos y las concentraciones, por lo que se hace una prueba de Tuckey para las concentraciones y para los tiempos.

Para la interacción entre concentraciones y tiempos existe diferencia altamente significativa, por lo que se hace un análisis de factores.

La prueba Tuckey para concentraciones demuestra que las concentraciones CEA<sub>2</sub> y CEA<sub>3</sub> son iguales, es decir no presentan diferencias altamente significativas, y que la concentración CEA<sub>1</sub> es diferente.

En la prueba Tuckey para los tiempos se demuestra que los tiempos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> son diferentes.

Las concentraciones de 0.1% y 0.05% presentaron calificaciones menores para la textura en los tres días analizados.

La concentración de 0.15% de extracto bioactivo mantuvo calificaciones óptimas para los tres días analizados.

Luego de realizar el análisis de factores, podemos observar que para la interacción tiempo 1 y concentraciones no existe diferencia altamente significativa, en las demás interacciones si existió diferencia altamente significativa.

En el día uno se observa calificaciones de muy agradable y agradable de los panelistas, la textura es bien aceptada en las tres concentraciones a la que fue expuesta la carne.

En el día cinco, se determinó calificaciones altas de 4 y 5 para los análisis a partir de la carne inmersa en una concentración de 0.15% de extracto bioactivo, a diferencia de las muestras de carne que fueron analizadas a 0.1% y 0,05% de extracto bioactivo, teniendo calificaciones de indiferencia en ambos panoramas.

En el día diez, se observó calificaciones de indiferente y desagrado de 2 y 3 para concentraciones de 0.1% y 0.05%, lo que permite justificar el uso de la concentración de 0.15%, quien si obtuvo

calificaciones de agrado con valores de 4 y 3, para una mayor conservación de la textura del corte de lomo vetado.

La textura está influenciada por las condiciones de degradación de las proteínas de la carne, contenido graso, contenido de colágeno, etc, dentro de las mencionadas, se argumenta lo siguiente, si bien la carne es expuesta a un medio de inmersión de extracto, este medio humecta la carne en su superficie lo que impide la sequedad del mismo y con ello prevenir una textura inadecuada, el extracto brinda un medio de conservación no solo por generar una atmosfera optima si no por impedir la degradación rápida de las proteínas por acción de bacterias patógenas.

▪ **Sabor**

**CUADRO N° 31**

**RESULTADO DEL EFECTO BACTERICIDA EN CARNE DE VACUNO**

Controles	Rep.	Efecto Bactericida en Carne de Vacuno								
		CEA <sub>1</sub>			CEA <sub>2</sub>			CEA <sub>3</sub>		
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
<b>Sabor</b>	<b>1</b>	4	4	3	4	4	3	4	4	3
	<b>2</b>	5	4	4	5	4	4	5	4	4
	<b>3</b>	4	5	4	4	4	4	4	4	4
	<b>4</b>	5	4	5	5	4	5	4	3	4
	<b>5</b>	5	4	5	5	4	5	5	4	3
	<b>6</b>	5	4	4	5	4	4	4	4	3
	<b>7</b>	5	5	4	5	4	4	4	3	3
	<b>8</b>	5	5	4	5	4	4	4	4	3
	<b>9</b>	5	5	4	5	4	4	4	3	4
	<b>10</b>	5	4	4	4	3	4	4	4	3
	<b><math>\bar{x}</math></b>	4.8	4.4	3.9	4.7	4	3.9	4.2	3.6	3.5

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Cartilla N°8**

**CARACTERÍSTICAS PARA EVALUAR EL SABOR – EFECTO BACTERICIDA**

CRITERIO	PUNTUACIÓN
Muy agradable	5
Agradable	4
Aceptable	3
Regular	2
Desagradable	1

✓ **Legenda:**

CEA<sub>1</sub>=0.15% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0012mg clorofila b/ml de extracto)

CEA<sub>2</sub>=0.10% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0007mg clorofila b/ml de extracto)

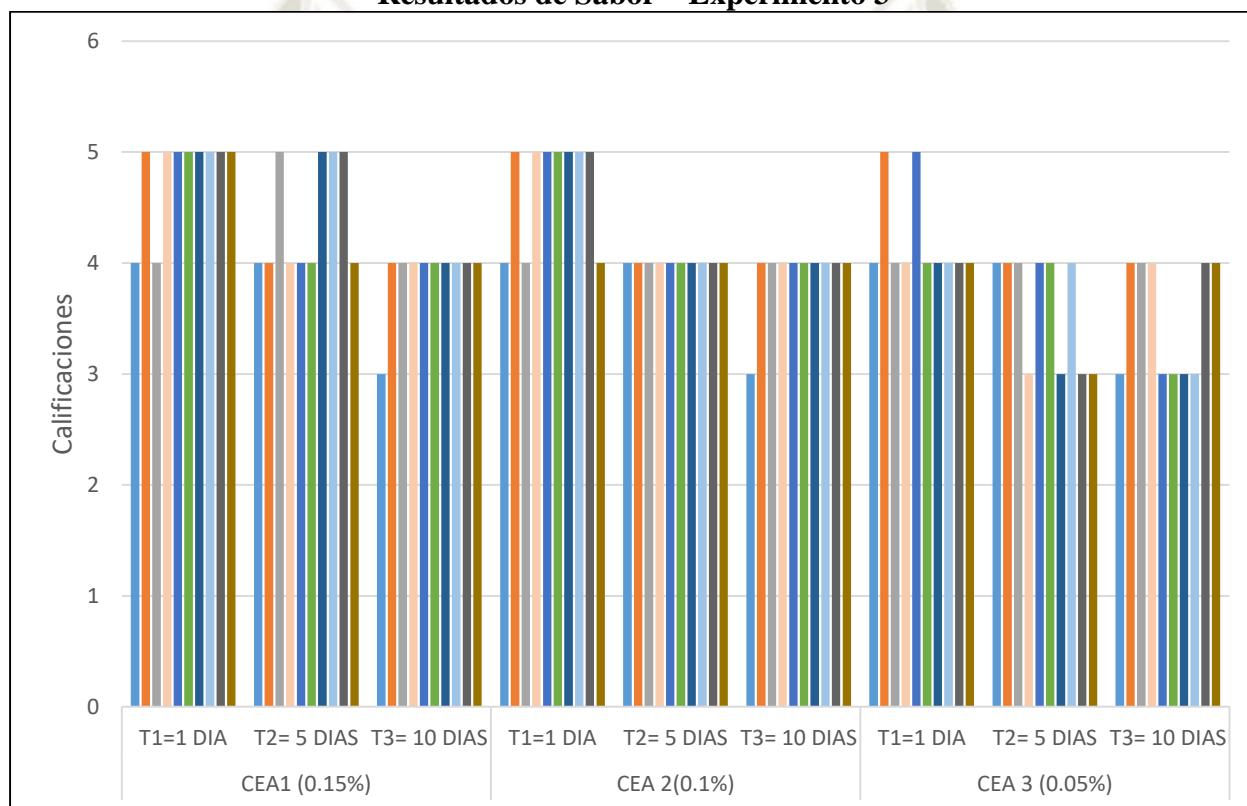
CEA<sub>3</sub>=0.05% de Extracto bioactivo (contiene: 0.0001mg clorofila b/ml de extracto)

T<sub>1</sub>=1 día

T<sub>2</sub>=5 días

T<sub>3</sub>=10 días

**GRAFICA N°7:**  
**Resultados de Sabor – Experimento 3**



**Tabla N°10: Análisis de varianza para evaluar Sabor**

ANVA	GL	SC	CM	Fc	Ft (1%)
<b>Concentración de extracto de alga</b>	2	5.7556	2.8778	17.6591	4.912
<b>Tiempos de exposición</b>	2	10.1556	5.0778	31.1591	4.912
<b>CEA x T</b>	4	0.5778	0.1444	0.8864	3.592
<b>Bloque</b>	9	2.6667	0.2963	1.8182	2.664
<b>Error Exp.</b>	72	11.7333	0.1630		
<b>TOTAL</b>	89	30.8889			

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Nota:** Los valores de Ft (1%) fueron calculados por interpolación **VER ANEXO N°6.**

### Tuckey para la Concentración

CEA<sub>1</sub> CEA<sub>2</sub> CEA<sub>3</sub>

### Tuckey para el Tiempo

T<sub>1</sub> T<sub>2</sub> T<sub>3</sub>

#### ✓ Interpretación de los Resultados

Se puede observar estadísticamente en la tabla ANVA que existe diferencia altamente significativa entre los tiempos y las concentraciones, por lo que se hace una prueba de Tuckey para las concentraciones y para los tiempos.

En la prueba de Tuckey para las concentraciones se demuestra que las concentraciones CEA<sub>1</sub> y CEA<sub>2</sub> son iguales, es decir no presentan diferencias altamente significativas, y que la concentración CEA<sub>3</sub> es diferente.

En la prueba de comparación de medias Tuckey para los tiempos se demuestra que los tiempos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> son iguales y el tiempo T<sub>1</sub> es diferente.

Las concentraciones de 0.15% y 0.1% presentaron calificaciones altas para los tres días en comparación de la concentración de 0.05% de extracto bioactivo.

En el día uno se observa calificaciones de muy agradable y agradable emitido por los panelistas, el sabor es bien aceptado en las tres concentraciones.

El día quinto muestra calificaciones de agradable y muy agradable para concentraciones de 0.15% y 0.1%, observando en la concentración de 0.05% calificaciones de indiferencia.

El día decimo presenta calificaciones de indiferente para muestras de corte de lomo sometidas a inmersión de extracto en 0.05% de extracto bioactivo lo que justifica la elección de la concentración de 0.15% de extracto bioactivo para asegurar el agrado del sabor en la carne.

Si bien el sabor de la carne está directamente relacionada con el contenido graso del mismo, se argumenta que el corte con el que se trabaja ya presenta un contenido alto de grasa (3.7% aproximadamente) lo que permite elevar el sabor, el extracto brinda un nivel de protección y conservación a la grasa permitiendo su estabilidad y mantenerla en el tiempo.

#### 4.4.2. Conclusión:

En el recuento de microorganismos se determinó que en el tiempo de 10 días la ausencia de E Coli se mantuvo y el recuento de salmonella spp. de igual manera por ello, se concluye que las tres concentraciones cumplen un efecto bactericida y conservante para el corte de lomo veteados de carne de vacuno refrigerado.

Luego del análisis de cada experimento para el efecto bactericida sobre la cortes de lomo veteados de carne de vacuno, se concluye que la mejor concentración para obtener el efecto bactericida y conservante es de 0.15% con un tiempo de exposición de 10 días, dicha concentración y tiempo nos permiten obtener optimas características de sabor, olor, textura y hasta un color muy bien recepcionado por los jueces.

El análisis del color dio como resultado la igualdad de efecto en las tres concentraciones y la igualdad en resultados para el día uno y cinco, determinando que la aplicación de extracto a 0.15% mantiene las características de color al décimo día.

El análisis del olor dio como resultado la igualdad de efecto en las tres concentraciones, y la diferencia de resultados en los tres días analizados, determinando que las calificaciones más altas al décimo día se halló con la aplicación de la concentración de 0.15%. El aroma del alga originariamente es neutral lo que justifica la anosmia en el extracto.

El análisis de textura presentó diferencias para resultados de concentración y tiempo, determinando que en la concentración de 0.15% de extracto bioactivo los resultados fueron de calificaciones de 5 y 4 en su mayoría, ante ello se define la concentración de 0.15% como la concentración óptima para conservar la textura hasta el día decimo.

El sabor presento diferencias de resultados en las concentraciones y tiempos, concluyendo que la concentración de 0.15% y 0.1% muestran resultados iguales en los tres días analizados. Se define la aplicación del extracto de 0.15% para asegurar la conservación del sabor a los 10 días.

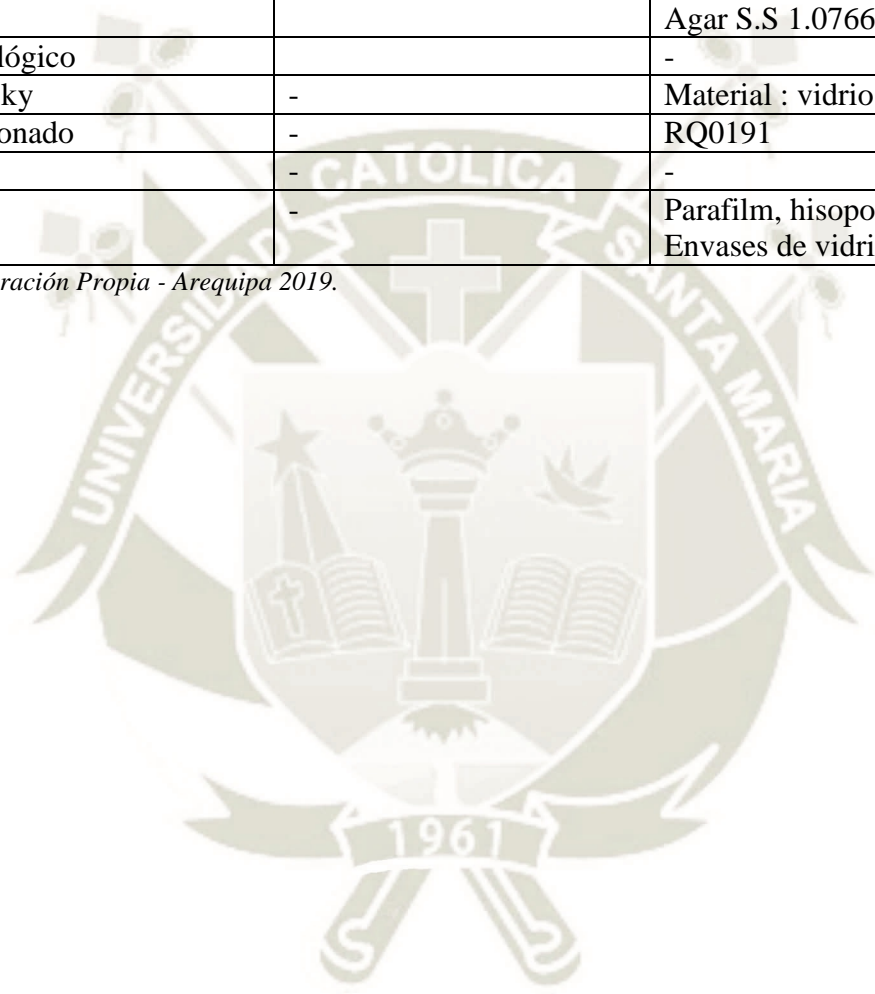
#### 4.4.3. Materiales y Equipos

**CUADRO N° 32**  
**MATERIALES Y EQUIPOS – EFECTO BACTERICIDA**

<b>MATERIAL / EQUIPO</b>	<b>MARCA / MODELO</b>	<b>ESPECIFICACIONES TÉCNICAS</b>
Extracto bioactivo	-	0.15% de extracto 0.1% de extracto 0.05% de extracto
Suero fisiológico	-	-
Balanza analítica	Marca: Scout Pro Ohaus Modelo: SP202	Sensibilidad : 0.001g
Contador de colonias	Marca: Quebec	-
Estufa	Marca: FANEM Modelo: 002CB	Temperatura : 0 – 100°C
Autoclave	Marca: Easter Medical	Horizontal con reciclador de agua
Cocina	-	Eléctrica
Extracto bioactivo	0.15%, 0.1%, 0.05%	Alga (Ulva spp)
Escala de Mc Farland 0.5	-	Ácido sulfúrico + hidróxido de bario
Micropipeta	-	Material : Plástico Volumen: 0.001 – 1ml
Matraz Erlenmeyer	Pyrex	Material : vidrio Volumen: 100ml
Beacker	Pyrex	Material : vidrio Volumen: 200ml
Probeta	Pyrex	Material : vidrio Volumen: 100ml

Placas Petri	Pyrex	Material : vidrio diámetro : 9.5cm
Mortero	-	Material : cerámica
Tubos de Ensayo	Pyrex	Material : vidrio
Gradilla	-	Material : metal
Varilla	-	Material : vidrio
Pisetas	-	Material : Plástico
Agar en polvo	-	Agar EMB 1039.00 Agar S.S 1.07667.0500
Suero fisiológico	-	-
Asa driglasky	-	Material : vidrio
Caldo peptonado	-	RQ0191
Papel filtro	-	-
Otros	-	Parafilm, hisopos, LPDE. Envases de vidrios, etc.

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*



#### 4.5. CARACTERIZACIÓN FINAL: EXTRACTO DEL ALGA ULVA SPP.

##### 4.5.1. Análisis Físicoquímico

CUADRO N° 33

#### RESULTADOS DEL ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE ALGA ULVA SPP

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS	REFERENCIA
°BRIX	1.5 °Brix	1.3-1.6 °Brix
%Acidez	< 0.01 %	-
pH	6.92 pH	-
Densidad (gr/ml)	1.0001 (gr/ml)	En función a la materia prima

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

**Nota:** La determinación del porcentaje de acidez fue realizado en el Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María, 2019. **VER ANEXO N°5.**



**Figura N° 9.** *Producto Final – Extracto de Alga Ulva spp.*

##### 4.5.2. Análisis Organoléptico:

CUADRO N° 34

#### RESULTADOS DEL ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DEL EXTRACTO DEL ALGA ULVA SPP.

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
Color	Verde traslucido
Olor	Ligeramente a alga
Sabor	Característico al alga
Textura	Líquido

*Fuente: Elaboración Propia - Arequipa 2019.*

#### 4.5.3. Análisis Químico – Proximal

CUADRO N° 35

#### RESULTADOS DEL ANÁLISIS QUIMICO PROXIMAL DEL EXTRACTO DEL ALGA ULVA SPP. (0.15% de Extracto concentrado)

COMPONENTE	RESULTADO
Determinación de Proteína (%)	3.25
Determinación de Grasa (%)	0.15
Determinación de Humedad (%)	93.20
Determinación de Ceniza (%)	0.90
Determinación de Fibra cruda (%)	1.27
Determinación de Hidrato de carbono (%)	1.23
Contenido calórico (KCAL %)	19.27
Contenido de Clorofila b (mg de clorofila b/ml de extracto)	0.0012

*Fuente:* Los análisis de Proteína, Grasa, Humedad, Ceniza, Fibra Cruda, Hidrato de Carbono y Contenido calórico fueron ejecutados en el Laboratorio de Control de Calidad de U.C.S.M, 2019.

*El análisis del contenido de Clorofila b es Elaboración Propia – Laboratorio H-104 U.C.S.M, 2019.*

**Nota:** Ver en el ANEXO N°5 los informes de ensayo realizados en el laboratorio de la Universidad Católica de Santa María y ANEXO N°6 para observar los cálculos desarrollados para la determinación de clorofila b en la materia prima.

#### 4.5.4. Análisis Microbiológico

CUADRO N° 36

#### RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO DEL ALGA

ANÁLISIS	RESULTADOS
Numeración de E. Coli (Ufc/g)	< 3
Detección de Microorganismos Aerobios Mesofilos Viables (UFC/g)	< 10

*Fuente:* Laboratorio de Control de Calidad de U.C.S.M. 2019.

**Nota:** Ver en el ANEXO N°5 los informes de ensayo realizados en el laboratorio de la Universidad Católica de Santa María.

**Apreciación Crítica:** Los Análisis microbiológicos, acidez y Químico Proximal para el extracto de alga ulva spp. fueron realizadas en el laboratorio de control de calidad de la U.C.S.M. ver ANEXO N°5.

#### ✓ Interpretación de Resultados

Los resultados determinados para el análisis fisicoquímico expuesto en el Cuadro N°32 demuestra características propias de un extracto alga encontradas en la mayoría de estas especies (Castro, Perez, & Carrilo, 1996). La caracterización demuestra a través del valor de °Brix el efecto de la dilución disminuyendo la cantidad de solidos totales originariamente. Como se mencionó el porcentaje de acidez menor a 0.01% se le atribuye a extractos con un estado sin degradación lo que

indica la calidad de la especie, ello si lo trasladamos al extracto de alga *Ulva* spp. permite concluir su óptimo estado. El análisis organoléptico del extracto de alga *Ulva* spp. declara a través de sus resultados características propias del extracto de alga sometida a dilución, un color verde translucido producido por intervención de la clorofila b (0.12mg en 100ml de producto) característico al género *Ulva* y de la división Chlorophyta.

En el análisis Químico proximal desarrollado en el extracto de alga *Ulva* spp. se afirma los porcentajes de proteína, grasa, ceniza y fibra, halladas en extractos similares de algas y líquenes (Charzeddine & Fariñas, 2001), el resultado de cuantificación de clorofila b hallado en el producto final, el extracto de alga *Ulva* spp., demuestra un alto porcentaje de clorofila b siendo este 0.12mg en 100ml producto.

Los resultados del análisis microbiológico tanto en la numeración de *E. coli* como en la detección de Microorganismo Aerobios Mesofilos Viables demuestran la mínima medida detectada por el Método ICSM Vol I Ed.II Met. 1 Pag. 132-134 (Trad. 1978) Reimp 2000, Ed Acibia y el Método ICSM Vol I Ed.II Met. 1 Pag. 120-124 (Trad. 1978) Reimp 2000, Ed Acibia, lo que contribuye a la calidad inocua del producto final. Los resultados muestran que el producto está dentro de los valores permisibles que señala la Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo Humano.

## CONCLUSIONES

1. Se logró conocer las características fisicoquímicas, químico-proximales, organolépticas y microbiológicas del alga *Ulva* spp.
2. El alga que se utilizó fue extraída de las costas de Marcona-Ica-Perú.
3. El mejor parámetro para la extracción de clorofila b y rendimiento de bioactivo es empleando el solvente metanol 90°, a una temperatura de 25°C, obteniendo un valor de 0.05308mg de clorofila b/ml de extracto del alga *Ulva* spp. y un rendimiento del 3.3125%.
4. Se logró conocer la concentración óptima para inhibir cepas de *E.coli* y *Salmonella* spp. concluyendo que a partir de 0.15% de extracto bioactivo se obtiene un tamaño de halo de 11mm para *Salmonella* spp y 18.23mm para *E.coli*. generando una sensibilidad alta en cepas de *E.coli*, para las cepas de *Salmonella* spp. se determinó la sensibilidad en grado intermedio, lo que acredita en ambas cepas el efecto bactericida.
5. Se determinó el efecto bactericida en cortes de lomo vetado expuestos a tres concentraciones, concluyendo que en los días 1, 5, y 10, no se observó crecimiento de *E.coli* ni presencia de *Salmonella* spp.
6. La concentración óptima para generar la conservación de las características organolépticas de color, olor, sabor y textura de la carne de vacuno, en corte de lomo vetado, es de 0.15% de extracto bioactivo por un tiempo de 10 días.
7. El extracto de alga *Ulva* Spp. aporta una cantidad de 0.0012mg de clorofila-b en un ml de extracto y con ello de fitol, quien se halla en su estructura primaria, brindando un beneficio bactericida para la industria alimentaria.
8. El efecto del extracto de alga *Ulva* spp. frente a las características organolépticas fueron evaluados por panelistas semi entrenados quienes aseguran una influencia óptima en cortes de lomo vetado de carne de vacuno.
9. La investigación realizada demuestra que la hipótesis formulada en el Marco teórico, la probabilidad de obtener un extracto con efecto bactericida y que conserve las características organolépticas de la carne de vacuno, queda totalmente confirmada.
10. Por lo tanto el efecto bactericida y conservante se sitúa como una alternativa de solución en la industria alimentaria, y acepta a las algas como agentes bioactivos óptimos para resolver problemas en la industria.

## RECOMENDACIONES

1. Para la determinación del efecto bactericida y conservante, el alga *Ulva* spp. debe de encontrarse en condiciones óptimas, sin presentar rastros de deterioro o falta de maduración.
2. La ubicación del alga es muy importante, el género *Ulva*, se halla en las rocas justo donde el mar golpea y a un tamaño determinado, ello ayudará a prevenir la depredación de las algas en un estadio equivoco y con ello su escasez.
3. El alga debe ser lavada a temperatura media esto evitara la degradación de la clorofila b por altas temperaturas, el traslado debe ser en refrigeración (4°C).
4. Luego de ejecutar la extracción y proceder con la destilación por el rotavapor se obtuvo el extracto bioactivo y el solvente, es necesario recomendar la reutilización del solvente el mismo que se recupera en su totalidad luego del rotavapor, su reutilización aumentaría la rentabilidad del producto.
5. Se recomienda el estudio de la materia residual que deriva de la percolación como medio nutritivo y futuras investigaciones en el campo alimentario.
6. El fitol es el principal bioactivo del alga *Ulva*, por lo que al ser una cadena de fácil degradación a altas temperaturas el medio donde se traslade el alga debe de cuidarse, tal es el caso de evitar, cartón, papel, tela, o medios que generen un caldo de cultivo de fácil desarrollo bacteriano.
7. Realizar investigaciones acerca de otros bioactivos del alga *Ulva* spp. tal es el caso de Polifenoles, terpenos, etc.
8. Proponer nuevas investigaciones orientadas al uso de las algas del mar Peruano con motivo de generar recursos y potenciar soluciones a la industria alimentaria.
9. Investigar acerca del efecto orientado a otros cultivos gran negativos, con miras a extender la investigación y profundizar el campo de la microbiología preventiva en la industria alimentaria.
10. Los proyectos elaborados a base de productos naturales son grandes alternativas de empresa en nuestra ciudad y país, por lo tanto se recomienda aplicar un exhaustivo conocimiento en la rama de la ficología ya que es esta rama una fuente de alternativas a procesos industriales.
11. Ampliar la focalización del efecto, ya sea en frutas, lácteos, etc., otorgándole a las algas un poder de generar soluciones naturales alternas.
12. Las algas son fuentes naturales poco estudiadas y en ellas encontramos soluciones inexplicables, bioactivos de gran magnitud y sin costo alguno, se recomienda ampliar las investigaciones para empoderar la industria alimentaria generando una cadena de resultados cíclicos y sostenibles.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acleto, C. (1996). *Algas de Agua dulce de las Cascadas de Barranco*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Aguila, R., Casas, M., & Hernandez, C. (2005). Biomasa de *Ulva* sp. (Chlorophyta) en tres localidades del malecón de La Paz, Baja California Sur. *Biología Marina y Ocenografía*, 55-61.
- Aldon, D. (2008). *Estrategia ambiental de aprovechamiento de la macroalga Ulva lactuca (lechuga de mar) a través del proceso de ensilaje*. UNALM, Lima.
- Arce Castro, D., & Mendo, J. (2014). *Efecto de Ulva spp. sobre el crecimiento y supervivencia de Argopecten purpuratus en la bahía de Paracas*. Universidad Agraria La Molina, Departamento Académico de Biología, Lima-Peru.
- Areces, & Araujo. (1996). *Influencia de la salinidad y la temperatura sobre el crecimiento de algas*. Instituto de Oceanología, de Bentos, La Habana.
- Audisio, M. (2007). *Manual de Microbiología de los Alimentos*. UNSA. Obtenido de <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/10%20carnes%20rojas.pdf>
- Bravo, G. (2012). *Caracterización de una tostada elaborada con maíz y alga Ulva clathrata*. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos.
- Cañedo Castro, B. I. (2015). *Crecimiento de Ulva spp. En respuesta al Enriquecimiento Con Nutrientes en Condiciones de Laboratorio*. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Zootecnia, La Paz.
- Carvalho, F., Portela, C., Sousa, M., Martins, F., Rocha, F., Farias, D., & Feitosa, P. (2009). *Physiological and physico-chemical characterization of dietary fibre from the green seaweed Ulva fasciata Delile*. Obtenido de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-)
- Casas-Valdez, M., Nuñez-Lopez, & Cruz-Ayala. (2000). *Biodiversity and biogeographic affinities of the algal flora of Baja California Sur*. Mexico.
- Castro, M., & Carrillo, S. (1996). *Composición química del alga verde Ulva lactuca*. Nutrición Animal. Zuribán: Ciencias Marinas.
- Castro Gonzales, M. I., Perez Gil, F., Perez Estrella, S., & Carrillo Dominguez, S. (1996). *Composición Química Del Alga Verde Ulva Lactuca*. 22(2).
- Castro, M., & Estrella, S. (1996). *Composición química del alga verde Ulva spp Lactuca*. 209-207.
- Castro, Perez, F., & Carrillo, S. (1996). *Composición química del alga verde Ulva lactuca*. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador, Departamento de Nutrición Animal, Zuribán-Mexico.

- CEVA. (2005). *Algues et alimentation animale*. Obtenido de <https://www.ceva-algues.com/wp-signup.php?new=www.ceva.fr>
- Charzeddine, L., & Fariñas, M. (2001). Propiedades Bioactivas de Algas Marinas del Nororiente de Venezuela.
- Chavez, C. (1995). *Fortificación para bebés prematuros con alga Lechuga de Mar (Ulva fasciata forma costata)*. UNALM, Lima.
- Cuizano, N., Llanos, B., Chang, L., & Navarro, A. (2007). Equilibrio ácido-base de algas marinas del litoral peruano elucida su alta afinidad por contaminantes ambientales. 1-7. Obtenido de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2007000200003](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2007000200003)
- Da Silva, G., Ribeiro, A., Otaviano, F., Maciel, M., Soares, S., Yoneshigue, Y., . . . Villela, M. (2010). *Antiviral activity of the green marine alga Ulva fasciata on the replication of human metapneumovirus*. São Paulo - Brasil. Obtenido de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652010000100001&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652010000100001&lang=pt)
- Dawes, C. (1986). *Botanica Marina*. Lunnusa.
- Diaz, & Lopez. (1961). *Taxonomía, ecología y valor nutrimental de las algas*. Instituto Cubano de Investigaciones Tecnológicas, Boletín Técnico, Cuba.
- Diaz, & Lopez, M. (1959). *Taxonomía, ecología y valor nutrimental de algas marinas cubanas I. ICIT*. Serie de Estudios sobre Trabajos de Investigación.
- Diaz, E., & Plascencio, M. (2009). *Estudio técnico-económico para la instalación de una planta procesadora de fertilizantes, a base de macroalgas marinas (Ulva fasciata)*. .
- Durmaz, Y., Duyar, H., Gokpinar, S., Taskaya, L., Ogretmen, Y., Bandarra, N., & Nunes, M. (2008). *Fatty Acids,  $\alpha$ -tocopherol and Total Pigment Contents of Cystoseira sp., Ulva sp. and Zostera sp. from Sinop Bay (Turkey)*. International Journal of Natural and Engineering Sciences .
- E, B. (2004). *Microalgae in human and animal nutrition*. Oxford: Hansbook of microalgal culture.
- Edding, M., Tala, F., & Vasquez, J. (2006). Fisiología Vegetal. Chile, La Serena.
- Emilio, G. C. (15 de Abril de 2016). <https://e.net/maemgoca/2estructura-de-la-carne-msculo>.
- Espinosa Manfugas, J. (2007). *Evaluación Sensorial de Alimentos*. (R. T. Morales, Ed.)
- Etcheverry, H., & Collantes, G. (Junio de 1977). Cultivo Artificial del Luche, Porphyra Columbina.
- FAO. (1995). (Food and Agriculture Organization, IT).
- FAO/OMS. (1994). *Fats and Oils in Human Nutrition. Report of a Joint Expert Consultation*.

- Farfan, L. (2005). *Obtención de una mezcla alimenticia a base de alga Lechuga de Mar (Ulva fasciata), Cañihua (Chenopodium pallidicaule. Aellen) y Quinoa (Chenopodium quinoa.Wild.)*. UNALM, Lima.
- Fleurence. (2003). *R-Phycoerythrin from red macroalgae : Strategies for extraction and potential application in Biotechnological area*. University of Nantes.
- Flores Vera, N. (Noviembre de 2015). “Entrenamiento de un Panel de Evaluación Sensorial, para el Departamento de Nutricion de la. Obtenido de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/137798/Entrenamiento-de-un-panel-de-evaluacion-sensorial-para-el-Departamento-de-Nutricion-de-la-Facultad-de-Medicina-de-la-Universidad-de-Chile.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Food algae to improve the nutritional quality of meat product. (2014).
- Fredriksson, S., Pickova, A., & Elvinger, K. (2006). *Fatty Acid and Carotenoid Composition and Egg Yolk as an Effect of Microalgae Addition to Feed Formula for Laying Hens*. Swedish. University of Agricultural Sciences.
- Free, R. R. (Diciembre de 2016). Phytol has antibacterial property by inducing oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*.
- Frikha, M., Kammoun, N., Hmami, R., Mchirgui, L., Belbahri, Y., Gargouri, N., . . . Ben-Rebah. (2011). *Composición química y algunas actividades biológicas de algas marinas recolectadas en Túnez*. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-38802011000200001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802011000200001)
- Gil Rodriguez, M. C., & De la Torre, W. (1980). *Contribución al estudio de la vegetacion ficologica del litoral canario*. Canaria.
- Giribet, G. (2010). Una Revision Critica de la posicion de los arthropodos en el reno animal. Obtenido de [https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Artropodos%20IV\\_2.pdf](https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Artropodos%20IV_2.pdf)
- Gonzales Villa, A. A. (2004). *Obtencion de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas*. Universidad Nacional de Colombia-Departamento de Ingenieria Quimica, Manizales, Colombia. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandregonzalezvilla.2004.pdf>
- Gonzalez, N. (1995). *Estudio de al calidad proteica de la macroalga Ulva lactuca*. Universidad de La Habana, Instituto de Farmacia y Alimento, La Habana.
- Guevara Matute, J. M. (2015). Contenido de Minerales y Acidos Grasos Omega 3 en Huevos de Gallina Ponedoras, Alimentadas con Harina de Algas. Lima, Peru.
- Guiry, & Dhonncha. (Febrero de 2007). Obtenido de <http://www.algaebase.org>

- H, H., & Ryther, J. (1984). *Methane production from the anaerobic digestion of some marine macrophytes*.
- Hayden, H., Blomster, J., Maggs, Silva, P., Stanhope, M., & Waaland, J. (2003). *Linnaeus was right all along: Ulva and Enteromorpha are not distinct genera*.
- Hellebust, J. A. (1970). *Marine Ecology* (Vol. 1). (Kinne, Ed.) Londres.
- Herber, S., & Van, E. M. (1996). *Dietary marine algae promotes efficient deposition of n-3 fatty acids for the production of enriched shell eggs*.
- Hollwich, & Rambeck, W. (2002). Supplementation of algae to the diet of pigs: a new possibility to improve the iodine content in the meat. 32. Obtenido de <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2002.00363.x>
- INEI. (2019). (*Instituto Nacional de Estadística e Informática*). Obtenido de Perú: Consumo per cápita : <https://www.inei.gob.pe/>
- Instituto Nacional de Salud. (2016). Presentación del manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión. Obtenido de <http://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/827>
- Isassi, L. (Noviembre de 1991). Propiedades Antibióticas de Algunas Especies de Algas Marinas Bénticas. 1.
- Kopp, L., Kraft, & Waller. (2010). *Investigations in southern Australian Ulva (Ulvophyceae, Chlorophyta) taxonomy and molecular phylogeny indicate both cosmopolitanism and endemic cryptic species*.
- Lahaye, M., & Jegou, D. (1993). *Características químicas y físico-químicas de las fibras dietéticas de Ulva lactuca (L.) Thuret y Enteromorpha compressa (L.)*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1007/BF00004017#page-1>
- Lizcano Ramon, J. A., & Vergara Gonzalez, J. L. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperometes ferrugines, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos*. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Lobban, C. S., & Harrison. (1994). *Seaweed Ecology and Physiology*. University Press, Cambridge.
- Lordan, S., Ross, P., & Stanton, C. (2011). *Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases*. doi:10.3390/md9061056
- M, D. (1987). *Biología de las algas. Enfoque fisiológico*. Universidad de Georgia, Departamento de Botánica. Mexico: Limusa S.A.

- Magallanes, C., Cordova , C., & Orozco, R. (2003). Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Peruana de Biología*. Obtenido de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332003000200003](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332003000200003)
- Marinas, C.-C. I. (25 de Junio de 2014). Aves más saludables alimentadas a base de algas marinas. Obtenido de <http://www.actualidadavipecuaria.com/noticias/aves-massaludables-alimentadas-a-base-de-algas-marinas.html>
- Marshall, & Garcia, P. (2006). “*Nutrición Humana*”. Valencia: Univ. Politéc. Valencia. Obtenido de [http://books.google.com.pe/books?id=Y1\\_WtSayNscC&dq=cromo+micronutriente&hl=es&so](http://books.google.com.pe/books?id=Y1_WtSayNscC&dq=cromo+micronutriente&hl=es&so)
- Mendo, T. (2004). *Aprovechamiento del alga Ulva sp. en la elaboración del compost como una estrategia de gestión ambiental en la Bahía de Paracas*. UNALM.
- Mensi, F., Jamel, K., & Amor, E. (2005). *Potential use of seaweeds in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) diets*. Zarazoga.
- Ministerio de Pesquería. (1994). *Cultivo de Macro Algas Marinas*. Dirección Nacional de Acuicultura, Lima.
- MINSA. (2002). Manual de Procedimientos Para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. *Serie de Normas Técnicas N°30*, 30-36.
- Mohammad Taghi, G., Hassan , E., Ali, J., Seyedhossein, H., & Mohammad, M. (2015). Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel. 2(1), 13-16.
- Murphy, J., & J.P, R. (1962). *A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters* (Vol. 27). Chim.
- Nanosalud. (s.f.). Conasi. Obtenido de <https://www.conasi.eu/algas-ecologicas/1949-alga-salvaje-klamath.html>
- Noriega, C. (2011). *Algas comestibles del Perú*. Obtenido de <http://www.youtube.com/watch?v=kvld7aNvrps>
- Noriega, C. (2011). *Algas comestibles del Perú. Pan del Futuro*. Universidad de San Martín de Porres, Lima.
- Okasaki, A. (1971). *Seaweeds and theirs uses in Japan*. University Press, Tokai.
- OMS. (18 de Febrero de 2018). E. Coli. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/e-coli>
- Pacheco , I., Zertuche, J., Chee, A., & Arroyo, E. (2002). *Biomasa and potencial comercial utilization of Ulva lactuca (Chlorophyta, Ulvaceae) beds along the north-west coast of the Gulf of California*. Phycologia .

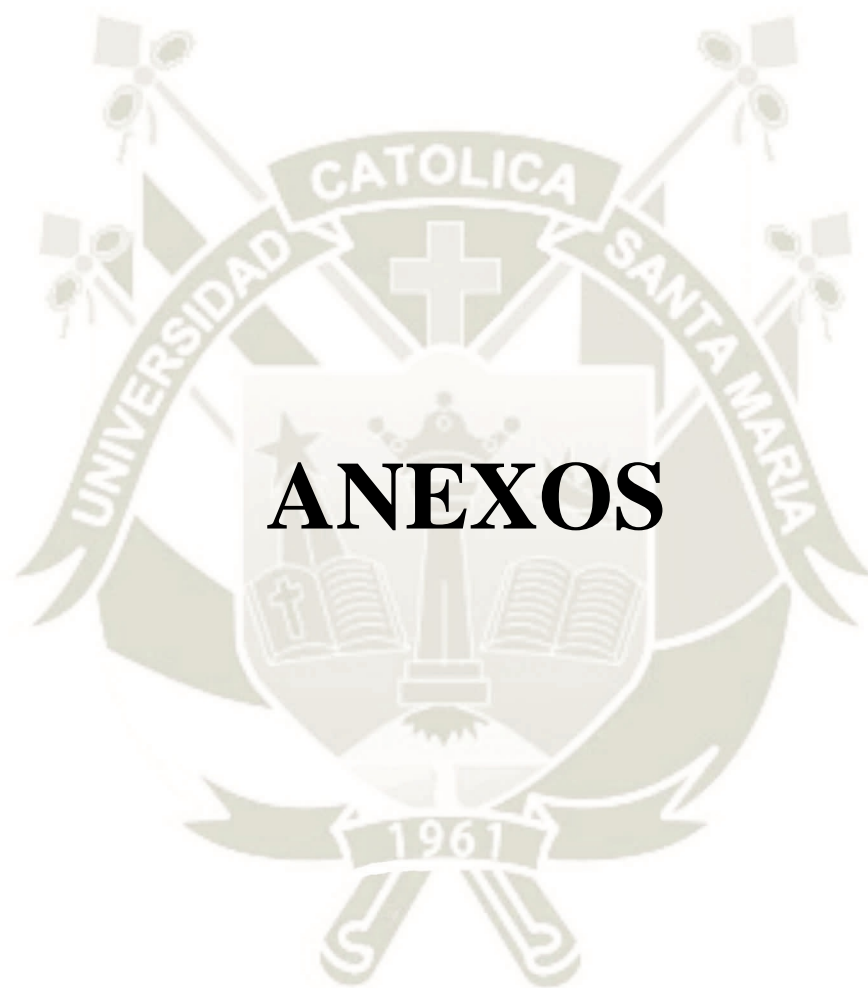
- Picazo , J. J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades.
- Piña, E., Reis de Carvalho, P., & Goncalves, M. (2009). *Egg's Enrichment: Utilization of fish oils and marine algae as sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids in hen's diet*. Journal of Animal and Veterinary Sciences.
- Plaza, M., Cinofuentes, A., & Ibañez, E. (2008). *In the search of new functional food ingredients from algae and microalgae*.
- Popov, Marekov, Konaklieva, M., Panayotova, M., & Dimitrova-Komaklieva, S. (1985). *Sterols from some black sea ulvaceae*. Phytochemistry.
- Quiroz, N., Leon Alvarez, D., & Rivas Acuña, G. (Enero de 2017). Nuevos registros de algas verdes marinas (Ulvophyceae) para Tabasco.
- R, S., & Lupatsch, I. (2012). *Algae for aquaculture and animal feeds*. UK, Centre for Sustainable Aquatic . Obtenido de [http://www.tatup-journal.de/downloads/2012/tatup121\\_shlu12a.pdf](http://www.tatup-journal.de/downloads/2012/tatup121_shlu12a.pdf)
- Riccardi, N. C., & Solidoro. (1996). *The influence of environmental variables on Ulva rigida C. Ag. growth and production*. Bot.Mar.
- Rivera Butron, B. (2015). *Efecto de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos hidroalcoholicos a base de llanten (Plantago mayor) y te verde (Camellia sinensis), a la concentracion del 25% 50% y 100% sobre streptococos mutans*. UCSM, Arequipa - Peru.
- Rivero, C., Zapata, A., Pinilla, G., Donato, J., Chaparro, B., & Jimenez, P. (2005). *Comparacion de la estimacion de la clorofila-a mediante los metodos espectrofotometricos y fluometrico*. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, Colombia.
- Rodriguez, R. (2000). *Manejo de alternativas alimenticias para aves de postura destinadas a la obtención de huevos con bajo contenido de colesterol*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Colima. .
- Sallib, & Araski. (1978). *Bases Biologicas de Ulva Fasciata*. La Habana. Obtenido de <https://www.oceandocs.org>
- Santivañes-Veliz, M., Elsa, M.-V., Monge, A., & Peres-Silanes, S. (2013). Quinoxalinas como potenciales agentes Antimycobacterium tuberculosis: una revisión. *Scielo*, 79. Obtenido de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2013000300010](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000300010)
- Siddhanta, A., Goswani, A., Shanmugam, M., Mody, K., & Ramavat, B. (2002). *Sterols from marine green algae of Indian waters*. Indiam.
- Simopoulus, A., & Siddanta, A. (1991). *Omega 3 fatty acids and health and disease and in growth and development*.
- Strand, A., Herstad, O., & Liaaen-Jensen, S. (1998). *Fucoxanthin metabolites in egg yolks of laying hens*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*.

- Tang Yu-Qing, & Mahmood, K. (2016). *Ulva Lactuca* and Its Polysaccharides: Food and Biomedical Aspects. 6(1).
- Torres, D. (1991). *Caracterización del alga Lechuga de Mar (Ulva fasciata), deshidratada por aire caliente y por rodillo*. UNALM.
- Troncoso, N., saavedra, R., Olivares, A., Farias, J., San Martin, S., Urrutia, H., & Agurto, C. (Abril de 2015). Identificación de compuestos antibacterianos en macroalgas presentes en la Región del Biobío, Chile. 50.
- Ventura, M., Castanon, J., & McNab, J. (1998). *The nutritive value of seaweed (Ulva lactuca) for goats. Small ruminant*.
- Vinoj, & Kaladharan, P. (2007). *Amino acids in the seaweeds as an alternate source of protein for animal feed. Journal of the Marine Biological Association of India*. India.
- Weng Aleman , Z., Alvarez Molina, I., Diaz Rosa, O., & Rodriguez Salazar, M. (3 de Julio-Septiembre de 2003). Rocobrado de Salmonella sp. conservada por metodo simple a temperatura ambiente. 1-6. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v12n3/vac01303.pdf>
- Yokoya, N., & Oliveira, E. C. (1992). *Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters*. Applied Phycology, Brazilia.

#### Páginas de internet:

- <https://www.benchfly.com/video/1534/kirby-bauer-disc-diffusion-assay/>
- [https://alojamientos.uva.es/guia\\_docente/uploads/2013/470/45820/1/documento43.pdf](https://alojamientos.uva.es/guia_docente/uploads/2013/470/45820/1/documento43.pdf)
- <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/10%20carnes%20rojas.pdf>
- <https://www.ecured.cu/Carne>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27667264>
- [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S071819572015000200007&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S071819572015000200007&script=sci_arttext&tlng=en)
- <http://acuisurperu.com/pf/ulva-lactuca/>
- <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3241>
- [http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1799/Q04\\_G8\\_T%20BAN%20UNALM.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1799/Q04_G8_T%20BAN%20UNALM.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- <https://andina.pe/agencia/noticia-conozca-gran-diversidad-biologica-existe-la-bahia-paracas-664510.aspx>

- [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2077-99172018000100008](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172018000100008)
- [http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/macro\\_algas/arch\\_macroal/INFORME%20ALGAS%20MARCONA%202010.pdf](http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/macro_algas/arch_macroal/INFORME%20ALGAS%20MARCONA%202010.pdf)
- <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v39n4/art14.pdf>
- <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/bitstream/123456789/2179/1/INF%20EXT.%20II.pdf>
- <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/3429/65.1510.FB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- <https://mdmcientifica.com/caldo-bhi-infusion-cerebro-corazon/>
- <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/3352/64.2565.O.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [https://alojamientos.uva.es/guia\\_docente/uploads/2013/470/45820/1/Documento43.pdf](https://alojamientos.uva.es/guia_docente/uploads/2013/470/45820/1/Documento43.pdf)
- <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/3734/1/UNACH-EC-FCS-LAB-CLIN-20117-0006.pdf>
- <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>
- <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-TaninosOPolifenolesVegetales-4812570.pdf>
- <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/3352/64.2565.O.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/3745238/2\\_algas.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1544923470&Signature=UJZAFJZZ8D%2BCe4wP7YvuqP5YRuk%3D&response-contentdisposition=inline%3B%20filename%3DAlgas\\_en\\_la\\_botica.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/3745238/2_algas.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1544923470&Signature=UJZAFJZZ8D%2BCe4wP7YvuqP5YRuk%3D&response-contentdisposition=inline%3B%20filename%3DAlgas_en_la_botica.pdf)
- <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BIBACL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=034757>
- <http://www.minag.gob.pe>



# ANEXOS



**ANEXO N°1:  
MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA  
ALIMENTOS**

### A. Determinación de Proteína

**Método:** Método kjeldahl, nmx-f-068-s-1980

**Fundamento:**

Este método se fundamenta en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico. El hidrógeno y el carbón de la materia orgánica se oxidan para formar agua y bióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en  $\text{SO}_2$ , el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio. El amoniaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una disolución al 2% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una disolución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. En este método de Kjeldahl-Gunning se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión.

Es aconsejable la utilización de reactivos ya preparados, especialmente el HCl (o  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) de valoración. Cualquier error en su preparación puede afectar directamente al resultado de la determinación.

**Procedimiento:**

- Determinar la masa, en la balanza analítica, de aproximadamente un Gramo de muestra y pasarla cuantitativamente a un matraz Kjeldahl, añadirle 2 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de sodio anhidro,  $25 \text{ cm}^3$  de ácido sulfúrico y unas perlas de vidrio.
- Colocar el matraz en el digestor y calentar cuidadosamente a baja temperatura hasta que todo el material esté carbonizado, aumentar gradualmente la temperatura hasta que la disolución esté completamente clara y dejar por 30 minutos más a esa temperatura.
- Enfriar y añadir de 400 a  $450 \text{ cm}^3$  de agua para disolver completamente la muestra, agregar 3 ó 4 gránulos de zinc, un poco de parafina cuando sea necesario y  $50 \text{ cm}^3$  de hidróxido de sodio 1:1.
- Inmediatamente conectar el matraz a un sistema de destilación, el cual previamente se le ha colocado en la salida del refrigerante un matraz Erlenmeyer de  $500 \text{ cm}^3$  que contenga  $50 \text{ cm}^3$  de ácido bórico y unas gotas del reactivo Shiro Tashiro como indicador.
- Destilar hasta que haya pasado todo el amoniaco, que unas gotas de destilado no den alcalinidad con el papel tornasol, aproximadamente  $300 \text{ cm}^3$ .

NOTA: Las primeras gotas de destilado deben hacer virar el color del indicador de violeta a verde.

- Retirar el matraz receptor y titular el destilado con ácido clorhídrico 0.1 N.

### B. Determinación de humedad:

**Método:** Gravímetro, NMX-F-428-1982

**Fundamento:**

La humedad es tomada como la pérdida de peso al secado, usando un instrumento de humedad, el cual emplea una balanza de torsión sensible para pasar la muestra y una lámpara infrarroja para secar.

**Procedimiento:**

- Soltar el sujetador del plato para muestra, revisándolo para asegurarse de que el plato corre libremente sobre su soporte finamente punteado, y que esté limpio y seco.
- Ajustar al 0 y 100 %.
- Determinar 5 g de la muestra pesada en la misma balanza y distribuirla cuidadosamente y uniformemente en el platillo.
- Con la fuente de potencia debidamente ajustada, bajar la tapa de la balanza. La muestra comenzará a perder humedad y la manecilla se moverá hacia arriba.
- Después de pasado un tiempo de 10 a 20 minutos, deberá tomarse la lectura, y si ésta permanece estable durante 2 minutos se registrará como porcentaje total de humedad.

**C. Determinación de grasa**

**Método:** Método gravimétrico

**Fundamento:**

El método está basado en la hidrólisis de la muestra con ácido clorhídrico y extracción de la grasa con solvente éter de petróleo (método soxhlet) previamente hidrolizada con ácido clorhídrico.

**Procedimiento:**

- Pesar 4 g-5 g de muestra en un vaso de precipitación de 300 ml – 500 ml.
- Agregar lentamente mientras se agita, 45 ml de agua hirviendo para lograr una buena homogeneización.
- Adicionar 55 ml de ácido clorhídrico 8 M y agitar.
- Cubrir con una luna de reloj con agua destilada (aproximadamente 100 ml)
- Filtrar a través de papel filtro de porosidad media, enjuagando el vaso de precipitación tres veces con agua destilada.
- Continuar lavando el filtro hasta que el agua de lavado no de reacción acida.
- Transferir el papel húmedo a una placa pero o a un vaso pequeño y secar por un tiempo de 2 horas a 100 C en un estufa con ventilación natural o aire forzado.
- Secar el balón de 250 ml por 1 hora a 100C, enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar.
- Hacer un cartucho con el papel más el residuo de la muestra y colocarlo en el dedal de extracción. Colocar el dedal de extracción que contiene la muestra, en el soxhelt y añadir éter de petróleo (120 ml a 150 ml, según la capacidad del soxhelt).
- Colocar a reflujo en el deal y refluja la muestra 4 horas, ajustando el calor de modo que el extractor sifonee más de 30 veces. Recuperar el solvente para su desecho.
- Secar el balón con la grasa extraída a 100 C por 1 hora y luego 30 minutos cada vez hasta peso constante (considerar peso constante cuando periodos sucesivos de secado de 1 hora muestran perdidas adicionales de grasa menor al 0.05%).
- Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar.
- Realizar las determinaciones por duplicado. Dichas determinaciones deben estar dentro del 0.1 % de grasa.

#### **D. Determinación de ceniza**

**Método:** El método utilizado es el Gravimétrico

**Fundamento:**

Se basa en la incineración para destruir la materia orgánica, tales como proteínas, grasa, carbohidratos y fibra, finalidad es obtener cenizas blancas que es el material inorgánico en el que se hallan los minerales.

**Procedimiento:**

- Se pesa aproximadamente 3 Gramos de la muestra y se colocan en crisoles previamente tarados, se lleva a una mufla a 550C por espacio de 2 -3 horas.
- Luego se lleva al desecador una vez que las cenizas dan un color blanco – grisáceo se procede a pesar.

#### **E. Determinación de fibra cruda**

**Método:** Método para determinar la fibra cruda, NTP 205.003.

**Fundamento:**

El residuo proveniente de la extracción de grasas de una muestra, se somete a una doble hidrólisis ácida y alcalina. El filtrado se seca en una estufa y se pesa. Se lleva a ignición en una mufla hasta destrucción de la materia orgánica y se vuelve a pesar. La diferencia entre ambas pesadas, da el contenido de fibra cruda, que se expresa en 100 g de muestra seca.

**Procedimiento:**

- Se determina exactamente una masa de 2 g a 5 g de la muestra con aproximación de 0,0001 g.
- Se extrae la grasa de la muestra con éter de petróleo o éter etílico hasta que el solvente quede incoloro.
- Se seca la muestra hasta evaporar el solvente y se transfiere al vaso de 600 cm<sup>3</sup>. Se añade 200 cm<sup>3</sup> de la solución de ácido sulfúrico caliente y se hierve durante 30 minutos contados desde el momento en que empieza la ebullición manteniéndose el volumen inicial.
- Se filtra en caliente, utilizando el papel de filtro (7.2.4), y se lava el residuo con agua caliente destilada, hasta neutralidad del líquido del lavado.
- Se filtra en caliente en el crisol o sobre el papel filtro (7.2.6). Con ayuda de un chorro fino de agua destilada, se pasa todo el residuo del vaso al filtrado. Se sigue lavando el vaso y el filtro hasta que el líquido cristalino no de reacción alcalina. Luego se lava con por los menos 2 porciones de 100 cm<sup>3</sup> de alcohol etílico de 95 %.
- Se seca en estufa a 130 °C. Se deja enfriar en desecador y se determina la masa. Se repite este proceso hasta obtener masa constante. Descontada la tara, la cifra obtenida representa la masa de la fibra bruta
- Se calcina hasta cenizas blancas, se enfría en desecador y se determina la masa. Descontada la tara, la cifra obtenida representa la masa de las cenizas de la fibra.

**F. Determinación de hidratos de carbono:**

**Método:** Método del espectrofotométrico del año 1956.

**Fundamento:**

Los carbohidratos reaccionan en presencia de un ácido fuerte y calor para generar derivador del furano, los cuales se condensan con el fenol para dar lugar a compuestos estables de color amarillo-dorado, cuya concentración se puede determinar espectrofotométricamente.

**Procedimiento:**

Disoluciones:

- Disoluciones patrón de glucosa de 100 mg/L
- Fenol al 80% m/m en agua. Prepárese por adición de 20 Gramos de agua de a 80 Gramos de fenol bidestilado, cristalizado.
- Ácido sulfúrico concentrado. Haciendo uso de una disolución patrón de glucosa (de 100 mg de glucosa/L) y agua desionizada destilada se transfiere con la pipeta alícuotas de patrón de glucosa a tubos de ensayo de modo que los tubos contengan 0-100  $\mu$ L de glucosa en un volumen total de 2 ml. Estos tubos se utilizaran para construir una curva de calibrado, con valores de 0-100  $\mu$ g de glucosa/ 2 ml de muestra (0, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ g de glucosa/ 2 ml). Se vierte aproximadamente 100 ml de muestra en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, luego se agita suavemente. La muestra debe contener de 20 – 100  $\mu$ g de glucosa/ 2 ml, para ello se recomienda una dilución 1:2000. Luego se adiciona 0.05 ml de fenol al 80% a los tubos patrón y al tubo con la muestra, se mezcla con un agitador vibrador para tubos de ensayo. Después se adiciona 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a cada tubo y se mezcla. Se deja reposar durante 10 minutos y se colocan en un baño a 25C durante 10 minutos, se agitan nuevamente antes de la lectura de absorbencia. Se pone a cero el espectrofotómetro con la muestra de la curva de calibrado que contiene 0  $\mu$ g de glucosa/ 2 ml, se leen las absorbancia de las demás muestras a 490 nm. Se toma la lectura de los tubos patrón para la curva de calibrado desde la concentración inferior a la superficie y seguidamente la de la muestra.

**G. Determinación del pH**

**Método:** Potenciómetro

**Fundamento:**

Este método se basa en la medición de la diferencia electromotriz y luego convertirla a valores pH, en una solución, usando el potenciómetro.

**Procedimiento:**

Se prepara una solución problema y se le vierte en un vaso o beacker, se coloca el electrodo en la muestra, se le en la escala la medición de pH una vez que el valor observado se estabilice y sea constante.



**ANEXO N°2:  
MÉTODOS DEL PROCESO**

## 1. METODO DE PERCOLACIÓN:

El uso de la percolación es más efectivo que el de maceración por la difusión de soluto solvente.

### PREPARACION DE ALGA:

- Triturar el alga hasta un diámetro de 0.25mm
- Macerar 4h el alga triturada, 20g de alga triturada con su 20% p/v de solvente (4ml agua, metanol o etanol), cubrirlo con papel aluminio.

### PROCESO DE PERCOLACIÓN:

- Preparar embudo de decantación en el soporte universal, colocar el tapón (de corcho o silicona) en el matraz para evitar pérdidas, asegurar la aguja al embudo de decantación, observar que la llave del embudo este cerrada.
- Con el aspersor humedecer el algodón.
- Colocar el algodón (0.61g) en la parte inferior del embudo de decantación ayudarse de una varilla ello ayudara que las impurezas no pasen a la llave del embudo, encima del algodón agregar papel filtro con un diámetro de 2cm.
- Introducir en el percolador (embudo de decantación) el alga macerada (20g de alga macerada)
- Agregar un papel filtro encima del alga macerada (3cm de diámetro)
- Anadir peso con perlas de vidrio colocadas encima del alga.
- Agregar 100ml de solvente (etanol, metanol o agua)
- Abrir la llave del embudo, se ira observando el menstuo cada 8 segundos una gota (solvente más principios activos del alga).
- Cubrir el matraz con papel de aluminio y mantener la temperatura de 4°C o 25°C (en baño María) según sea necesario.
- Luego de transcurrido 24h para la percolación, sacar el residuo seco, para ello empujar con una varilla el residuo y apoyarse de una lengua o cuchara.
- Posteriormente el residuo es prensado y colarlo hasta obtener el extracto final. (Eliminar el algodón)
- Añadir el extracto obtenido luego del prensado en el matraz del percolador.
- Hacer un último lavado con 20ml de solvente, colocar el residuo en un beacker agregarle 20ml de solvente, taparlo, agitar, colar con un papel de filtro y embudo, finalmente prensar.
- Anadir el extracto resultante al matraz de percolación.

- Realizar finalmente una filtración de todo el extracto para evitar algún excedente.

### PROCESO DE DESTILACION

1. Realizarlo a 40°C para evitar que se dañe se extracto
2. Introducir el extracto en el balón de evaporación (por debajo de la mitad)
3. Montar un vacío débil de 60 kpa alimentar el balón de evaporación vía la válvula de alimentación por debajo del cuello de balón.
4. Cerrar el protector contra salpicaduras.
5. Seleccionar la temperatura de 40°C para baño de calefacción, e iniciar calefacción.
6. Detener la rotación cuando el goteo del serpentín refrigerante sea mínimo.

Disolvente	Formula	Masa molar en g /mol	Energía de evaporación en J/g	Punto de ebullición a 1013mbar	Densidad en g/cm <sup>3</sup>	Vacío nmbar para punto de ebullición a 40°C
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46.0	879	79	0.789	175
Metanol	CH <sub>4</sub> O	32	1227	65	0.791	337

## 2. METODO DE SEPARACION DE LOS PIGMENTOS DEL CLOROPLASTO:

### a. FUNDAMENTO:

La separación de los pigmentos fotosintetizantes se pueden hacer de dos formas:

- Por la distribución de los pigmentos frente a solventes inmiscibles. Esto naturalmente esa en función del coeficiente de partición de cada pigmento, o sea del grado en que una sustancia o grupo de sustancias que es fraccionada por dos solventes inmiscibles.
- Un método elegante de separar los pigmentos fotosintetizantes es por cromatografía de papel.

### b. PROCEDIMIENTO:

- i. Obtenga 100g de materia vegetal triturada.
- ii. Vierta unos 80 ml del extracto de acetona en un embudo de separación y añada 50ml de éter de petróleo y cuidadosamente agite por unos minutos. Repose y note la separación de dos capas. La capa superior contiene los pigmentos disueltos en el éter de petróleo, la capa inferior es una mezcla de acetona y agua los cuales son intersolubles se trabaja a temperatura ambiente ( 20°C).
- iii. Descarte la capa inferior abriendo la llave del embudo separador y retenga solo la porción superior. Lave esta porción con tratamientos sucesivos de agua destilada descantado en cada operación la porción inferior. Luego añada 40ml de metanol al 90% (cuidado es toxico) mezcle cuidadosamente nuevamente se forma dos capas. La porción superior es el éter y retiene a la clorofila a y el caroteno. En la porción inferior esta la clorofila b y la xantofila disueltos en el metanol.

- iv. Transfiera la porción inferior sobre otro embudo de separación, sin dejar caer líquido de la porción superior del embudo inicial. Se tiene ahora dos embudos de separación, uno (A) el original conteniendo clorofila a y caroteno disueltos en éter de petróleo y otro (B) que contienen la clorofila b y la xantofila disueltos en metanol.
- v. Ahora vierta el embudo A unos 20ml de KOH al 20% en metanol recientemente preparado. Tape bien sacuda y deje en reposo. Note la separación de dos capas. Vierta 20ml de agua, mezcle de nuevo y deje en reposo. Las dos capas que se forman contienen respectivamente, la superior caroteno y la inferior clorofila a. Si desea identificar al caroteno con el reactivo Carr-Price.
- vi. Con el embudo B proceda como sigue, vierta 40ml de éter etílico. Cuidadosamente lave con agua destilada dos o tres veces descartando la porción inferior que contiene metanol y agua. La clorofila b y la xantofila ahora están contenidos en un extracto de éter. Tape bien sacuda y deje en reposo 10 a 15 minutos. Añada 20ml de agua y deje en reposo hasta que se separen dos capas; la superior contiene xantofila y la inferior clorofila b. Así se tiene separados los cuatro pigmentos principales de los cloroplastos.

### 3. METODO PARA DETERMINACION DE CLOROFILA B

#### c. FUNDAMENTO:

- La concentración de clorofila b en una suspensión de cloroplastos o de algas intactas se puede determinar midiendo la densidad óptica en extracto de metanol, etanol u otros.
- A 5ml del extracto de acetona centrifugar y decantar, la acetona sobre nadante. Extraiga el sedimento dos veces más con 5ml de metanol combine los extractos y diluya hasta un volumen final de 20ml con metanol.
- Aplicar cálculos de Warburg y Machinney.

#### ▪ Absorbancia:

Cuando un haz de luz incide sobre un cuerpo traslúcido, una parte de esta luz es absorbida por el cuerpo, y el haz de luz restante atraviesa dicho cuerpo. A mayor cantidad de luz absorbida, mayor será la absorbancia del cuerpo, y menor cantidad de luz será transmitida por dicho cuerpo. Como se ve, la absorbancia y la transmitancia son dos aspectos del mismo fenómeno. La absorbancia, a una determinada longitud de onda  $\lambda$ .

La medida de la absorbancia de una solución es usada con mucha frecuencia en laboratorio clínico, para determinar la concentración de analitos tales como colesterol, glucosa, creatinina y triglicéridos en sangre. Cada uno de estos analitos se hace reaccionar químicamente con determinados compuestos, a fin de obtener una solución coloreada. A mayor intensidad de color, mayor será la absorbancia de la solución en una determinada longitud de onda. La absorbancia es entonces directamente proporcional a la concentración del analito en sangre.

Para medir esta absorbancia, se hace incidir un haz de luz con determinada intensidad y longitud de onda, sobre la solución, y se mide la luz transmitida al otro lado de la cubeta que contiene dicha solución. Estas técnicas están comprendidas en el área de la espectrofotometría.

▪ **Método de Warburg:**

○ La densidad óptica del extracto de metanol y etanol se determina a 578nm en una cubeta de 1cm

○ Cálculos:

$$\frac{\text{Densidad optica a } 578\text{nm}}{740} = \text{mg de clorofila /ml}$$

▪ **Método de Machinney:**

○ La densidad óptica del metanol y etanol se determina a 665 nm (DO 665) y a 650 nm (DO 650), que es la absorción máxima para la clorofila a y clorofila b.

○ Cálculos:

$$\frac{0.0338 \times DO \ 650 - 0.0125 \times DO \ 665}{1} = \text{mg de clorofila b / (ml de extracto)}$$

$$\frac{0.0165 \times DO \ 665 - 0.0083 \times DO \ 650}{1} = \text{mg de clorofila a / (ml de extracto)}$$

**4. METODO: DIFUSION EN DISCOS**

**MEDIO DE CULTIVO: AGAR MUELLER HINTON**

○ **COMPOSICION:** infusión de carne y peptona de caseína bajo contenido de inhibidores, adecuada (Ca++ y Mg++) pH osmoralidad.

○ Volumen:

○ Placas de 150mm, 60-70ml de AMH

○ Placas de 100mm, 25-30ml de AMH

○ Espesor : 4mm

○ Se pesa 5g de agar Mueller Hinton, se le adiciona 150ml de agua destilada, cubrir con papel de aluminio.

○ Dejar el matraz en la cocina hasta que hierva.

○ Autoclavar el matraz y eliminar cualquier tipo de contaminación que existiera, 40min a 121°C con un vacío de 1.5kg/cm<sup>3</sup>.

○ Transcurrido el tiempo dejar enfriar el matraz por 20min.

○ Agregar a cada placa 20ml de agar preparado.

**PROCEDIMIENTO:**

• **Aislamiento de colonias: preparación de microorganismos**

○ Encender mechero

○ Seleccionar 3 a 5 colonias bien aisladas (en fase logarítmica) y tocar la parte superior de cada una con el asa, poner boca abajo la placa.

- Preparar una suspensión en 5ml de solución fisiológica o en caldo peptonado en un tubo de ensayo, cubrir con algodón el tubo
- Turbidez equivalente al tubo 0.5 de Mc Farland
- **Inoculo**
- El microorganismo E. Coli y salmonella spp. debe ser puro y hallarse en la fase logarítmica con una turbidez equivalente al tubo 0.5 de Mc Farland (Esta suspensión contendrá aproximadamente  $150 \times 10^6$  UFC/ml)
- Sumergir un hisopo estéril en la suspensión preparada en el aislamiento y presionar el hisopo contra las paredes del tubo.
- Se aplica en la placa Petri cuyo contenido es el agar Mueller Hinton, se siembra con hisopo en 3 direcciones e hisopar la circunferencia de la placa.
- Dejar que absorba el exceso de humedad superficial antes de aplicar los discos por 3 a 5 min.
- Rotular placa y poner fecha, dibujar las cuatro secciones donde se colocaran los discos.
- Esterilizar pinza sumergiéndola en alcohol y pasar por llama de mechero.
- Con ayuda de las pinzas sumergir cada disco en la concentración de extracto 0.2%, 0.15% y 0.1% de extracto de bioactivo en agua destilada.
- Colocar y presionar cada disco sobre la superficie del agar.
- Luego de colocar el primer disco es necesario esterilizar las pinzas nuevamente con alcohol y en el mechero.
- Incubar dentro de los 15min posteriores a que los discos fueron aplicados.
- Incubar las placas invertidas en estufa de cultivo a  $35^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 18h.
- Medir los halos con calibre o regla (mm)
- La interpretación de los resultados del antibiograma (S, I, R) se realiza en función de los valores establecidos por diferentes comités.

## 5. METODO DE RECuento Y SIEMBRA EN SUPERFICIE PARA E.COLI Y SALMONELLA SPP.

Este tipo de recuento se define como un procedimiento en el cual cada célula viable puede formar una colonia en placa con agar específico para el microorganismo, donde un cierto volumen de cultivo diluido que no suele ser superior a 0.1ml se extiende sobre la superficie de una placa con medio solio utilizando un asa estéril o escobillón de vidrio. La plaza se incuba en un ambiente predeterminado, hasta que aparecen las colonias y se cuenta su número.

### PROCEDIMIENTO:

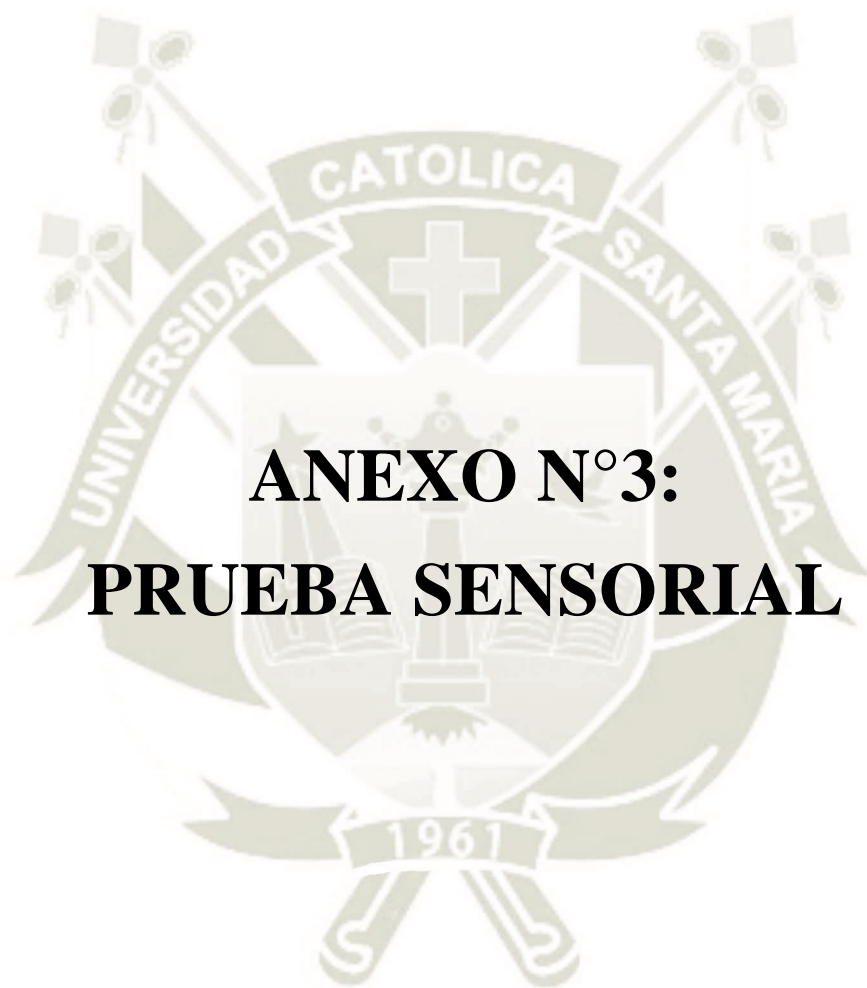
- Se divide en 2 partes:

#### 1. Enriquecimiento no selectivo en medio liquido:

- (1) pesar 10gr de muestra (carne expuesta a extracto) y agregar a 90ml SSP (solución salina peptonada), homogenizar la mezcla en una licuadora.

## 2. Enriquecimiento Selectivo en medio solido.- siembra por Superficie

- Se prepara el medio nutritivo según la norma técnica del agar EMB para E. coli y Salmonella Shiguella para salmonella spp. las cantidades en gramos serán llevadas a dilución con la concentración que indica la etiqueta del envase del Agar en polvo.
- Se traslada la dilución a un matraz y se procede a elevar la temperatura hasta 90°C por 1min.
- El Agar EMB se somete a esterilización con apoyo del autoclave a 121°C por 45min
- Nota: El agar Salmonella-Shiguella no se somete a esterilización.
- Se deja enfriar los matraces, se tendrán 4 placas, con Agar EMB (color rojo claro) específico para recuento de E.coli y 4 placas con agar Salmonella-Shiguella (color amarillo ligeramente anaranjado) para recuento de Salmonella spp.
- Se procederá a extraer 0.1ml de la solución de anterior (1) y por siembra en extensión con una espátula driglasky se incuba, por 18-48 horas a 37°C.
- **Recuento:**
  - Transcurrido el tiempo necesario se analizan las placas y observa las colonias formadas, con el apoyo del contador de colonias.
  - Demostrar la cantidad de enterobacteriaceae en nuestra muestra con las unidades de UFC/gr de muestra
  - Resultados:
    - PRESENCIA:
      - salmonella positivo, coloración de colonias rosadas hasta negras con bordes claros.
      - E. Coli. Positivo, coloración verde metálico propia de la producción de ácido láctico.
    - AUSENCIA
      - Coloraciones fuera de los parámetros.



# **ANEXO N°3: PRUEBA SENSORIAL**

✓ **PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO A PANELISTAS SEMI-ENTRENADOS:**  
(Flores Vera, 2015)

- **Juez Semi-entrenado:** Son conocidos como panelistas de Laboratorio, o personas con un entrenamiento teórico similar al de los jueces entrenados que realizan pruebas sensoriales y que poseen suficiente habilidad, pero que intervienen en pruebas sencillas que no requieren de una definición muy precisa de términos.
- **Formación de un panel semientrenado:** Se debe considerar las siguientes etapas, reclutamiento, selección y entrenamiento básico en el caso de panelistas semientrenados, para desarrollar cada uno de los procesos se consideró la Norma ISO 85:2012, la cual considera los siguientes puntos:
- **Reclutamiento y selección:** Se agrupo panelistas que ya hayan llevado el curso de control de calidad en la UCSM, por ser un curso que establece análisis sensorial, el número que se requirió para el desarrollo de la investigación fue de 10 panelistas por cada análisis. Para el reclutamiento se tomó en cuenta, el grado de interés y motivación que presentaba el panelista para ejecutar la prueba, la actitud hacia los alimentos, buena salud, disponibilidad para recibir las instrucciones.
- **Entrenamiento:** Se les proporciono a los jueces instrucciones de escalas y puntuaciones con el objetivo de que los jueces sean capaces de detectar y reconocer característicos en las muestras.
- **Validación del Panel:** Se controló periódicamente la eficacia y comportamiento de los jueces a través de la observación y análisis de resultados, para comprobar si los jueces pueden obtener resultados apropiados y reproducibles, asi analizar la capacidad del panel para detectar, identificar y medir un atributo.



✓ **CARTILLA DE ACEPTABILIDAD:**

Cód.
------

**CARTILLA DE ACEPTABILIDAD GENERAL**

Nombres.....Edad.....

Apellido paterno.....Sexo.....

Apellido Materno.....Fecha y Hora.....

**INSTRUCCIONES**

Se presenta una muestra de lomo frito usted debe elegir una de las alternativas que se le muestran a continuación, de acuerdo a las características que está evaluando.

**El producto:**

OLOR	COLOR	SABOR	TEXTURA

**OLOR**

CRITERIO	PUNTUACIÓN
Muy agradable	5
Agradable	4
Aceptable	3
Regular	2
Desagradable	1

**COLOR**

CRITERIO	PUNTUACIÓN
Muy bueno	5
Bueno	4
Aceptable	3
Regular	2
Malo	1

**SABOR**

CRITERIO	PUNTUACIÓN
Muy agradable	5
Agradable	4
Aceptable	3
Regular	2
Desagradable	1

**TEXTURA**

CRITERIO	PUNTUACIÓN
Muy buena	5
Bueno	4
Aceptable	3
Regular	2
Malo	1

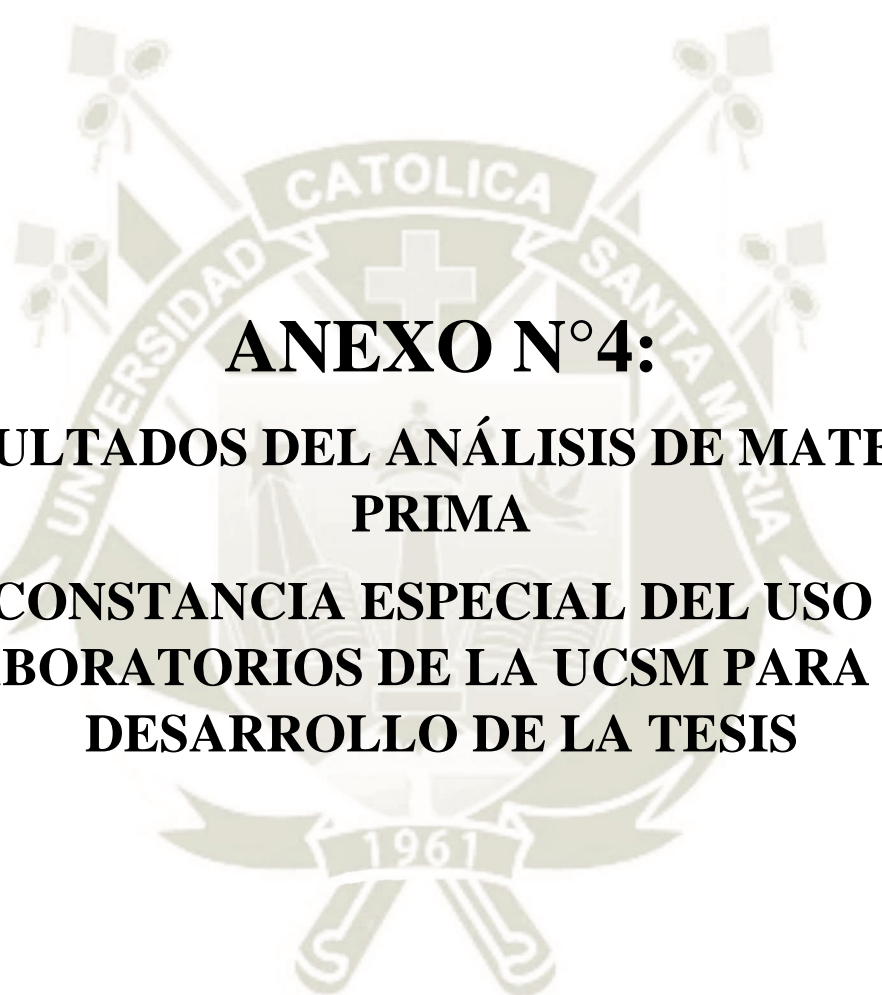
Si usted eligió me agrada o desagrada mucho, diga ¿por qué?

.....

**Observaciones**

.....

Gracias por su colaboración.



**ANEXO N°4:**  
**RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MATERIA  
PRIMA**  
**Y CONSTANCIA ESPECIAL DEL USO DE  
LABORATORIOS DE LA UCSM PARA EL  
DESARROLLO DE LA TESIS**



AREQUIPA - PERÚ

*Universidad Católica de Santa María*

☎ (51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ [ucsm@ucsm.edu.pe](mailto:ucsm@ucsm.edu.pe) 🌐 <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado:1350

## CONSTANCIA ESPECIAL N°007-Coord.Lab-2019

LA QUE SUSCRIBE COORDINADORA DE LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA, DEJA CONSTANCIA QUE LA SEÑORITA:

### **OBANDO GOMEZ SOFIA DEL MAR**

**INSTITUCIÓN:** UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA - AREQUIPA.

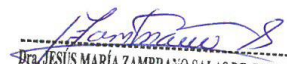
HA DESARROLLADO EL PROYECTO DE TESIS, TITULADO:

**“EFECTO BACTERICIDA Y CONSERVANTE DEL EXTRACTO DE ALGA (ULVA SPP) APLICADO EN CARNE DE VACUNO”**

**PERIODO** : del 10 de abril al 23 de mayo del 2019.

SE EXPIDE LA PRESENTE CONSTANCIA A SOLICITUD EXPRESA, Y PARA LOS FINES QUE CONVenga.

Arequipa, 2019,05.24.

  
Dra. JESÚS MARÍA ZAMBRANO SALAS DE CALLE  
COORDINADORA DE LABORATORIOS  
Y GABINETES  
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

JMZS/ClyG  
rtr



**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166  
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350  
AREQUIPA - PERU



**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA22D19.003932**

<b>Nombre del Cliente</b>	: Sofía del Mar Obando Gómez
<b>Dirección del Cliente</b>	: Calle 27 de Noviembre 308 La Libertad Cerro Colorado
<b>RUC</b>	: No corresponde
<b>Condición del Muestreado</b>	: Por el cliente
<b>Descripción</b>	: Alga <i>Ulva spp.</i>
<b>Tamaño de muestra</b>	: 250 mL
<b>Fecha de Recepción</b>	: 22/04/2019
<b>Fecha de Inicio del Ensayo</b>	: 22/04/2019
<b>Fecha de Emisión de Informe</b>	: 26/04/2019
<b>Página</b>	: 1 de 1

**I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:**

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE PROTEINAS (%) Método Kjeldahl, A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984.	2,37
DETERMINACION DE HUMEDAD (%) Official Methods of Analysis. 1990. Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Vol. II. Method 925.45D. USA. p. 1010 - 1011.	88,69
DETERMINACIÓN DE GRASA (%) Adaptado del Método gravimétrico NTP 209.263.2001	3,49
DETERMINACIÓN DE CENIZA (%) Método gravimétrico adaptado de NTP 209.265.2001	3,05
DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA (%) Adaptado de NTP 205.003.1980	0,93
DETERMINACION DE HIDRATOS DE CARBONO (%) Alimentos Cocidos De Reconstitución Instantánea, Por cálculo	1,47
CONTENIDO CALORICO (KCAL %) Por cálculo	46,77
DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TOTAL EN PRODUCTOS DE FRUTAS (%) AOAC Official Method 942.15. Acidity (Titratable) of Fruit Products. Official method of Analysis of AOAC International, ed. 18, 2005, Cap. 37, p.10	< 0,01

**OBSERVACIONES:**

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez.  
CQFDA 00824  
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC





**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166  
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apdo. 1350  
AREQUIPA - PERÚ



**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA09D19.003909**

<b>Nombre del Cliente</b>	: Sofia del Mar Obando Gómez
<b>Dirección del Cliente</b>	: Cal. 27 de Noviembre 308 Cerro Colorado La Libertad
<b>RUC</b>	: No corresponde
<b>Condición del Muestreado</b>	: Por el cliente
<b>Descripción</b>	: Alga <i>Ulva spp</i>
<b>Tamaño de muestra</b>	: 100 g
<b>Fecha de Recepción</b>	: 09/04/2019
<b>Fecha de Inicio del Ensayo</b>	: 09/04/2019
<b>Fecha de Emisión de Informe</b>	: 16/04/2019
<b>Página</b>	: 1 de 1

**I. ANALISIS MICROBIOLÓGICO:**

ANÁLISIS	RESULTADO
NUMERACION DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFILOS VIABLES (UFC/g) ICMSF Vol I Ed.II Met 1 pag 120-124(Trad. 1978) Reimp 2000, Ed Acribia)	< 10
NUMERACION DE <i>E. coli</i> ( NMP/g) ICMSF Vol I Ed.II Met 1 pag 132-134(Trad. 1978) Reimp 2000, Ed Acribia)	< 3

**OBSERVACIONES:**

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

.....  
**Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez**  
CQFDA 00624  
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC





**ANEXO N°5:  
RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL  
PRODUCTO FINAL**



**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1186  
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Actdo. 1350  
AREQUIPA - PERU



**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA22D19.003931**

<b>Nombre del Cliente</b>	: Sofia del Mar Obando Gómez
<b>Dirección del Cliente</b>	: Calle 27 de Noviembre 308 La Libertad Cerro Colorado
<b>RUC</b>	: No corresponde
<b>Condición del Muestreado</b>	: Por el cliente
<b>Descripción</b>	: Extracto bioactivo de alga <i>Ulva spp.</i>
<b>Tamaño de muestra</b>	: 250 mL
<b>Fecha de Recepción</b>	: 22/04/2019
<b>Fecha de Inicio del Ensayo</b>	: 22/04/2019
<b>Fecha de Emisión de Informe</b>	: 26/04/2019
<b>Página</b>	: 1 de 1

**I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:**

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE PROTEINAS (%) Método Kjeldahl, A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984.	3,25
DETERMINACION DE HUMEDAD (%) Official Methods of Analysis. 1990. Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Vol. II. Method 925.45D. USA. p. 1010 - 1011.	93,20
DETERMINACIÓN DE GRASA (%) Adaptado del Método gravimétrico NTP 209.263.2001	0,15
DETERMINACIÓN DE CENIZA (%) Método gravimétrico adaptado de NTP 209.265.2001	0,90
DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA (%) Adaptado de NTP 205.003.1980	1,27
DETERMINACION DE HIDRATOS DE CARBONO (%) Alimentos Cocidos De Reconstitución Instantánea, Por cálculo	1,23
CONTENIDO CALORICO (KCAL %) Por cálculo	19,27
DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TOTAL EN PRODUCTOS DE FRUTAS (%) AOAC Official Method 942.15. Acidity (Titratable) of Fruit Products. Official method of Analysis of AOAC International, ed. 18, 2005, Cap. 37, p.10	< 0,01

**II. ANALISIS MICROBIOLÓGICO:**

ANÁLISIS	RESULTADO
NUMERACION DE <i>E. coli</i> ( NMP/g) ICMSF Vol I Ed.II Met 1 pag 132-134(Trad. 1978) Reimp 2000, Ed Acribia)	< 3
NUMERACION DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFILOS VIABLES (UFC/g) ICMSF Vol I Ed.II Met 1 pag 120-124(Trad. 1978) Reimp 2000, Ed Acribia)	< 10

**OBSERVACIONES:**

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez  
CQFDA 00624  
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC





**ANEXO N°6:  
CÁLCULOS DESARROLLADOS**

- **CALCULOS DESARROLLADOS PARA EL CONTENIDO DE CLOROFILA B:**
  - **MATERIA PRIMA: ULVA SPP.**

Absorbancia a 650nm	0.822
Absorbancia a 665nm	1.091

- **Calculo:**

$$0.0338 \times DO_{650} - 0.0125 \times DO_{665} = mg \text{ de clorofila } b/ml$$

**Donde:**

DO: Absorbancia resultante

$$0.0338 \times 0.822 - 0.0125 \times 1.091 = 0.0141mg \text{ de clorofila } b/ml$$

- **PRODUCTO FINAL: EXTRACTO DE ALGA ULVA SPP.**

Absorbancia a 650nm	0.073
Absorbancia a 665nm	0.101

- **Calculo:**

$$0.0338 \times DO_{650} - 0.0125 \times DO_{665} = mg \text{ de clorofila } b/ml$$

**Donde:**

DO: Absorbancia resultante

$$0.0338 \times 0.073 - 0.0125 \times 0.101 = 0.0012mg \text{ de clorofila } b/ml$$

- **CALCULOS PARA CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE ALGA ULVA SPP.**

0.2% extracto bioactivo	Absorbancia a 650nm	0.128
	Absorbancia a 665nm	0.169
0.15% extracto bioactivo	Absorbancia a 650nm	0.073
	Absorbancia a 665nm	0.101
0.1% extracto bioactivo	Absorbancia a 650nm	0.057
	Absorbancia a 665nm	0.098

0.05% extracto bioactivo	Absorbancia a 650nm	0.029
	Absorbancia a 665nm	0.045

▪ **Calculo:**

$$0.0338 \times DO_{650} - 0.0125 \times DO_{665} = \text{mg de clorofila b/ml}$$

**Donde:**

DO: Absorbancia resultante

**0.2% de extracto bioactivo:**

$$0.0338 \times 0.128 - 0.0125 \times 0.169 = 0.0022 \text{mg de clorofila b/ml}$$

**0.15% de extracto bioactivo:**

$$0.0338 \times 0.073 - 0.0125 \times 0.101 = 0.0012 \text{mg de clorofila b/ml}$$

**0.1% de extracto bioactivo:**

$$0.0338 \times 0.057 - 0.0125 \times 0.098 = 0.0007 \text{mg de clorofila b/ml}$$

**0.05% de extracto bioactivo:**

$$0.0338 \times 0.029 - 0.0125 \times 0.045 = 0.0004 \text{mg de clorofila b/ml}$$

• **CALCULOS DE INTERPOLACIÓN PARA DETERMINAR Ft AL 1% UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO N°3:**

○ **OBTENER Ft (1%) PARA GL ERROR = 72**

GL TRATAMIENTO	2
GL TRATAMIENTO	4
GL TRATAMIENTO	9

○ **CALCULOS:**

▪ **PARA GL TRATAMIENTO = 2**

A=	70	B=	4.92
C=	80	D=	4.88
E=	72	X=	4.912

$$X = B + \left( \frac{(E - A) * (D - B)}{c - A} \right)$$

$$X = 4.92 + \left( \frac{(72 - 70) * (4.88 - 4.92)}{80 - 70} \right)$$

$$X = 4.912$$

▪ **PARA GL TRATAMIENTO = 4**

A=	70	B=	3.6
C=	80	D=	3.56
E=	72	X=	<b>3.592</b>

$$X = B + \left( \frac{(E - A) * (D - B)}{c - A} \right)$$

$$X = 3.6 + \left( \frac{(72 - 70) * (3.56 - 3.6)}{80 - 70} \right)$$

$$X = 3.592$$

▪ **PARA GL TRATAMIENTO = 9**

A=	70	B=	2.67
C=	80	D=	2.64
E=	72	X=	<b>2.664</b>

$$X = B + \left( \frac{(E - A) * (D - B)}{c - A} \right)$$












$$X = 2.67 + \left( \frac{(72 - 70) * (2.64 - 2.67)}{80 - 70} \right)$$

$$X = 2.664$$



**ANEXO N°7:  
PRODUCTOS SIMILARES**

**LISTAS DE EMPRESAS PRODUCTORAS DE BACTERICIDAS**

#	LOGO	EMPRESA	DIRECCION
1		SURFACTAN	Malvinas Argentinas Nro. 4589 Col. Victoria, Buenos Aires - Argentina
2		DIQUIMTEX	Adalberto Tejada No. 29 Col. Los Olivos Tlahuac, México C.P. 13210. México.
3		MAQUIMEX	Avenida Paseo de la Reforma # 379 Piso 3 Col. Cuauhtémoc, México C.P. 6500. México.
		Oleoespecies	Vicente Guerrero 1251-B Col. El Mante, ZAPOPAN, Jalisco C.P. 45235. México.
4		PDV	Prolongación Protón 48 Col. Parque Industrial Naucalpan, Naucalpan de Juárez, México
5		DIAFRA	Calle Central 13B Col. Fracc. Industrial Alce Blanco, Naucalpan, Edo. de Méx. C.P. 53560. México.
6		CCI.	Avila Camacho 118 P. 6 - Of. 602 Col. Lomas de Chapultepec, Miguel Hidalgo, Ciudad de México C.P. 11000. México.
7		Biotecnia	Calle B No. 2105 Int. A Col. El Tigre, Zapopan, Jalisco C.P. 45134. México.
8		Representaciones y Distribuciones REDI:	Avenida reforma 1-50 zona 9 nivel 10 Guatemala, Guatemala C.P. 01009. Guatemala.
9		OREGANO SINTESIS S.A.	Paseo de las Palmas 735 - Piso 9 Col. Lomas de Chapultepec, Miguel Hidalgo, Distrito Federal C.P. 11000. México.
10		CEETA	Carr. Irapuato-Cueramaro 10 Col. Villas de Irapuato, Irapuato, Guanajuato C.P. 36670. México.



**ANEXO N°8:  
ETIQUETA DEL PRODUCTO**



Cód. 0001

**Modo de Empleo:**

Agregar 40ml de producto en 100g de corte de lomo veteadado, el tiempo de inmersión no debe exceder 1 min, escurrir, y empaquetar corte de carne

**Información Nutricional**

100g de Extracto de Alga Ulva spp. contiene:

	%	Almacenamiento: Conservar en refrigeración, 4°C y protegido de la luz
Calorías (Kcal)	19.27	
Grasa Total (%)	0.15	
Carbohidratos(%)	1.23	
Proteína (%)	3.25	
Fibra (%)	1.27	
Minerales (%)	0.90	
Humedad (%)	93.2	

INFORMACIÓN: El extracto presenta funciones bactericidas y conservantes en carne de lomo veteadado, gracias al contenido de clorofila b (0.0012mg/ml)

INGREDIENTES DEL EXTRACTO: Extracto de Alga Ulva spp. y agua destilada.



nto:





# ANEXO N°9: FOTOS

- **FOTOS DEL ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA**

**ALGA ULVA SPP.  
HABITAD: PLAYA HERMOSA  
MARCONA - ICA - PERÚ**



**ALGA ULVA SPP.  
HABITAD: PLAYA LOS PINGÜINOS  
MARCONA - ICA - PERÚ**



**ALGA ULVA SPP.  
MOMENTO DE ACOPIO**



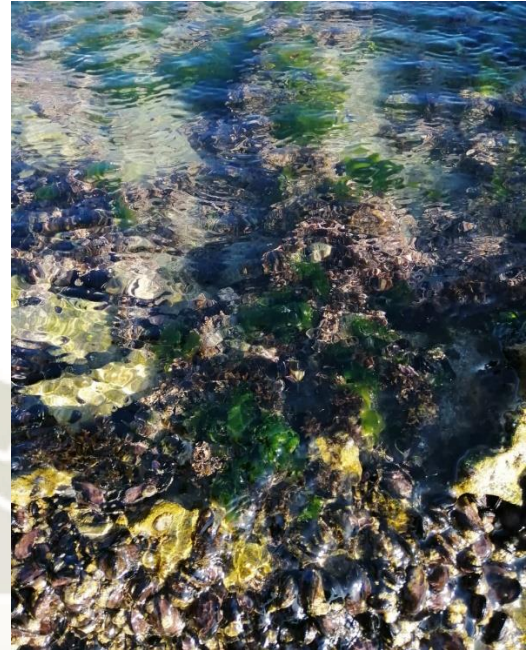
**ALGA ULVA SPP.  
HABITAD: PLAYA LOS PINGÜINOS  
ECOSISTEMA**



**ALGA ULVA SPP.  
HABITAD Y EPIBIONTES**



**ALGA ULVA SPP.  
UBICACIÓN A SEMI OLEAJE**



**SELECCIÓN DEL ALGA ULVA SPP.**



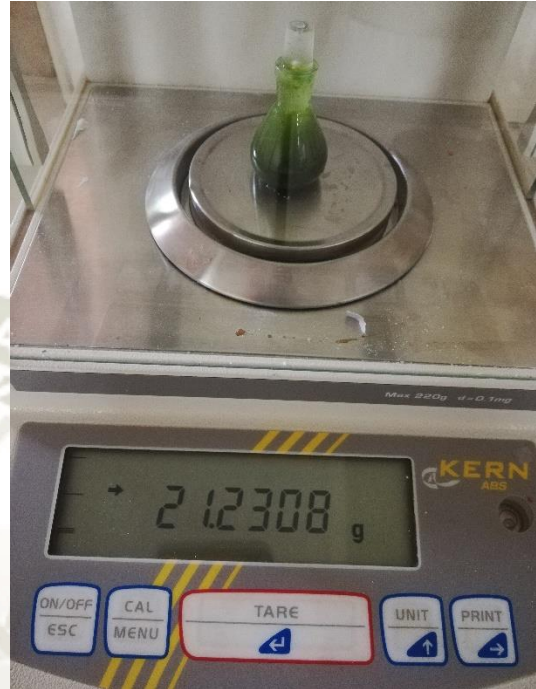
**ANÁLISIS DEL ALGA ULVA SPP.**



**ALGA ULVA SPP.  
TRITURADO**



**ALGA SPP.  
ANÁLISIS DE DENSIDAD**



**ALGA ULVA SPP.  
ANÁLISIS DE PH**



**ALGA ULVA SPP.  
ANÁLISIS DE °BRIX**



- **FOTOS DEL EXPERIMENTO N°1: EXTRACCIÓN DE BIOACTIVO DEL ALGA ULVA SPP.**

**ETAPA DE EXTRACCIÓN DEL ALGA ULVA SPP.**



**DETERMINACIÓN DE  
ABSORVANCIA**



**ANÁLISIS DE EXTRACCIÓN**



**OBSERVACIÓN DE CUBETAS  
CON EXTRACTO PARA  
DETERMINACIÓN DE  
ABSORVANCIA**



**REPRESENTACIÓN DE LA EXTRACCIÓN A  
25°C**



**REPRESENTACIÓN DE LA EXTRACCIÓN A  
4°C**



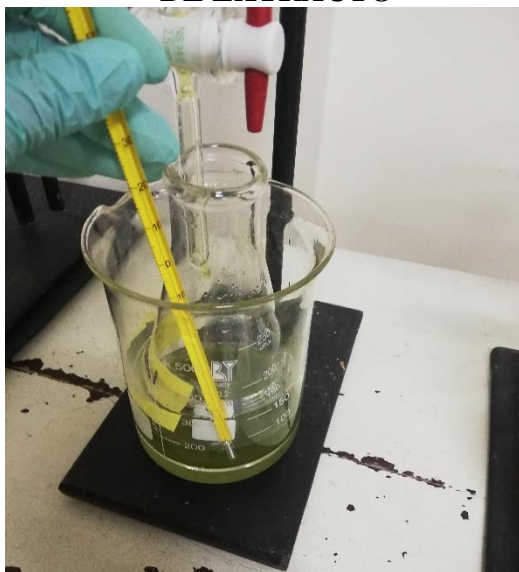
**LIMPIEZA DE CUBETAS**



**REPRESENTACIÓN DEL  
INTERIOR DEL  
ESPECTROFOTOMETRO ANTES  
DE REALIZAR LA MEDICIÓN**



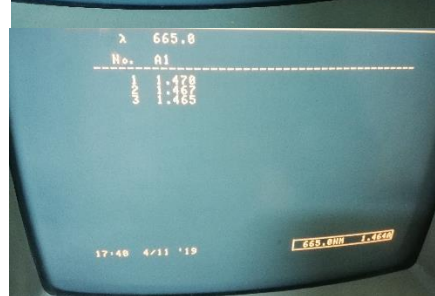
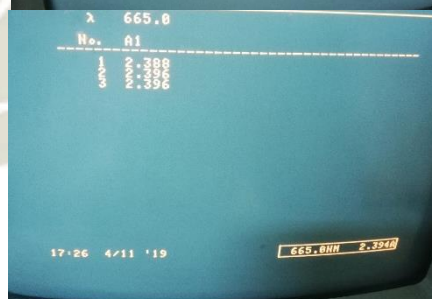
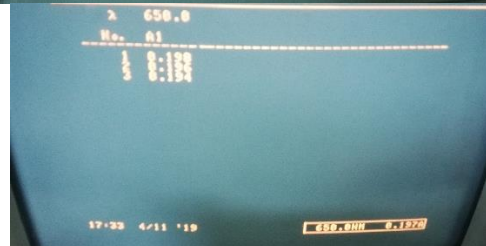
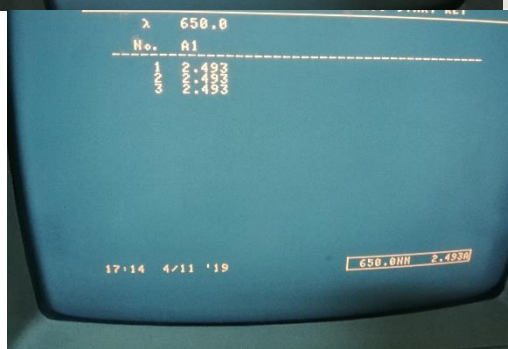
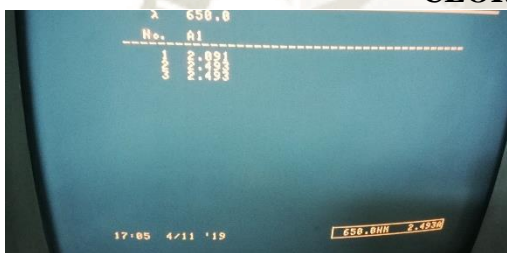
### ACONDICIONAMIENTO DE TEMPERATURA DE EXTRACTO



### MATERIA RESULTANTE LUEGO DE LA EXTRACCIÓN



### VALORES DE ABSORVANCIA PARA DETERMINAR EL CONTENIDO DE CLOROFILA B



**DESTILACIÓN EN EL ROTAVAPOR –  
EXTRACTO DE ETANOL**



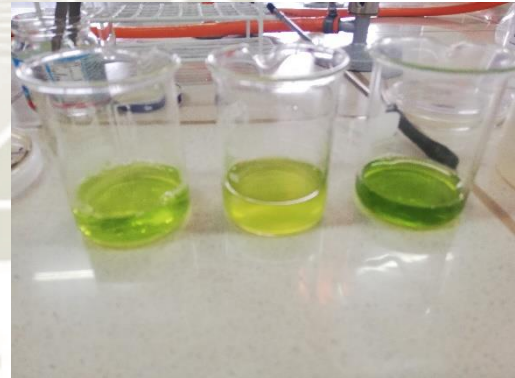
**DESTILACIÓN EN EL  
ROTAVAPOR – EXTRACTO DE  
METANOL**



**DESTILACION FINAL POR ROTAVAPOR**



**EXTRACTOS OBTENIDOS  
LUEGO DE LA EXTRACCION  
ETANOL – AGUA - METANOL**



- FOTOS DEL EXPERIMENTO N°2: SENSIBILIDAD BACTERICIDA DEL BIOACTIVO**

**ESCALA DE MC FARLAND CON  
INOCULO DE E. COLI**



**SIEMBRA EN AGAR MUELLER HINTON**



**ESCALA DE MC FARLAND CON  
INÓCULO DE SALMONELLA SPP.**



**POSICIONAMIENTO DE DISCOS EN  
AGAR MUELLER HINTON**



### PREPARACIÓN DE AGAR MUELLER HINTON



### PROCESO DE AUTOCLAVADO DE AGAR MUELLER HINTON



### AGAR MUELLER HINTON



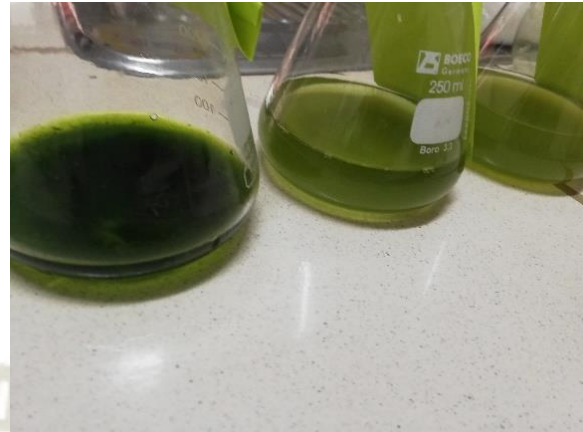
### TAMAÑO DE DISCO UTILIZADO



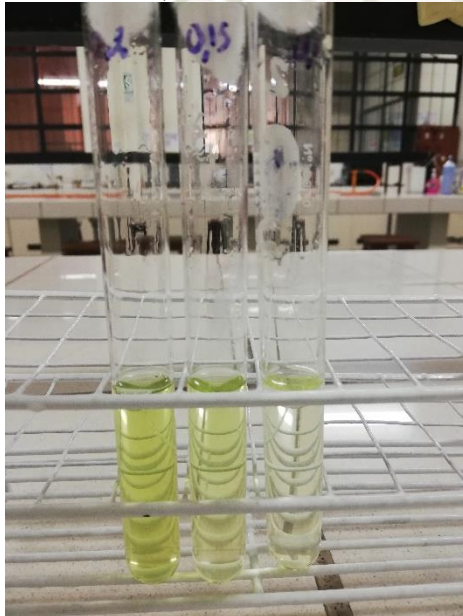
### TRATAMIENTO A AGAR MUELLER HINTON



### EXTRACTOS PARA DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD



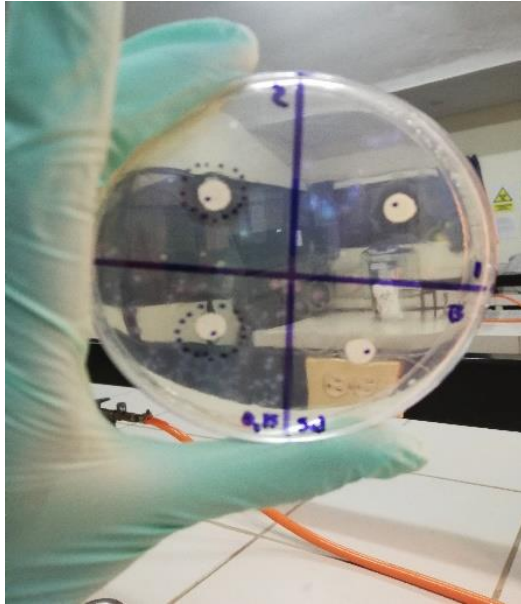
### CONCENTRACIONES DE EXTRACTOS 02%, 0.15% Y 0.1%



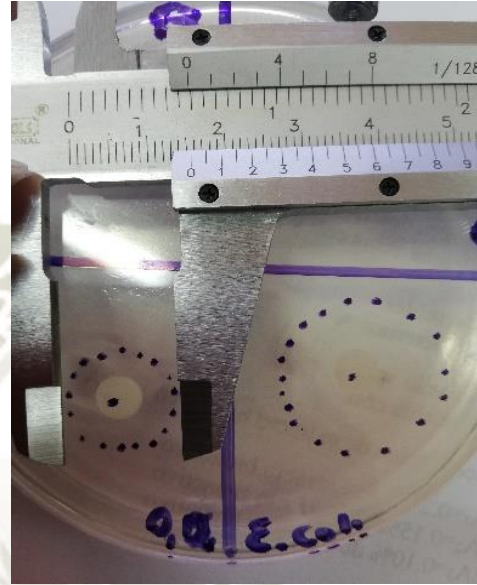
### TAMAÑO DE HALO PARA E. COLI



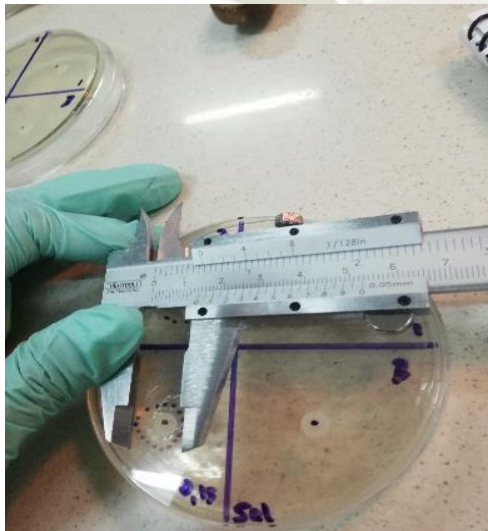
### TAMAÑO DE HALO PARA SALMONELLA SPP.



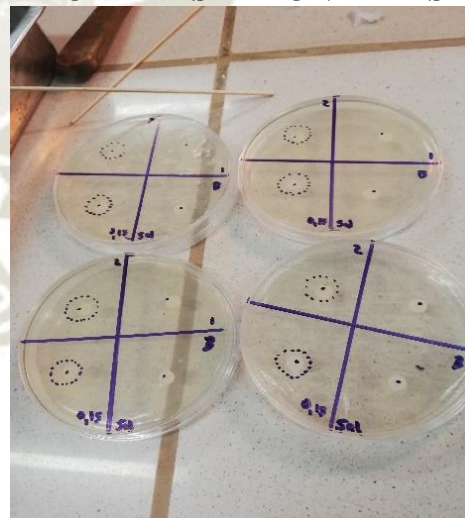
### DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE HALO PARA E.COLI



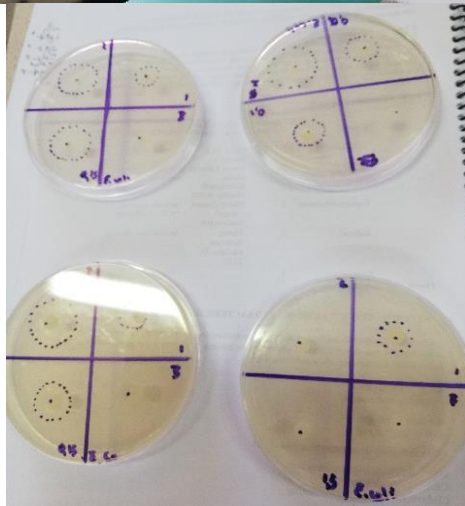
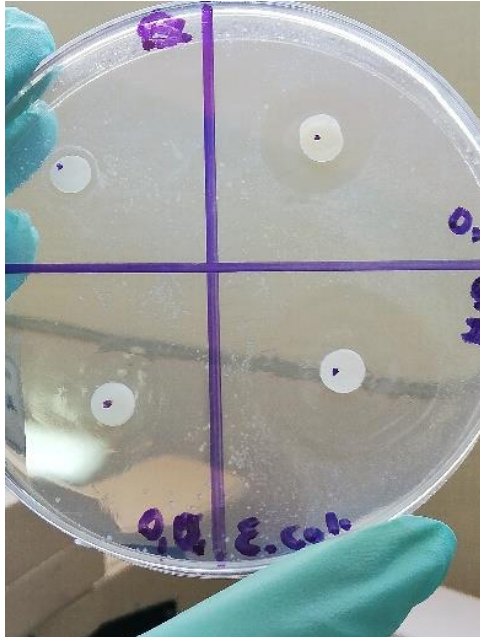
### EMPLEO DEL VERNIER PARA DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL HALO



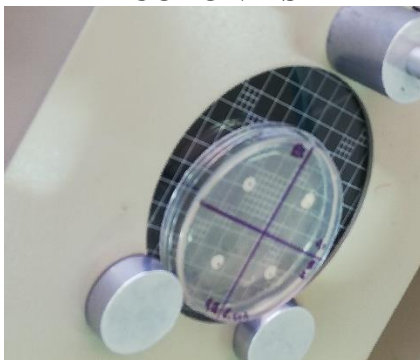
### REPETICIONES PARA DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE HALO PARA SALMONELLA SPP.



**REPETICIONES PARA  
DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE  
HALO PARA E.COLI**



**EMPLEO DEL CONTADOR DE  
COLONIAS**



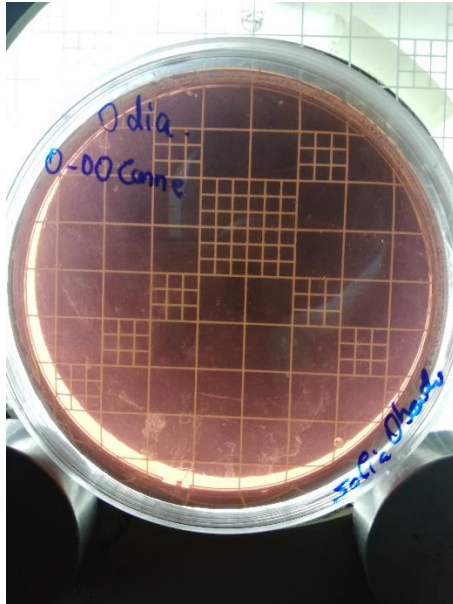
**PROCESO DE INCUBACIÓN DE PLACAS  
PARA DETERMINACIÓN DE LA  
SENSIBILIDAD**



**EMPLEO DEL PARAFILM PARA  
SELLAR LAS PLACAS**



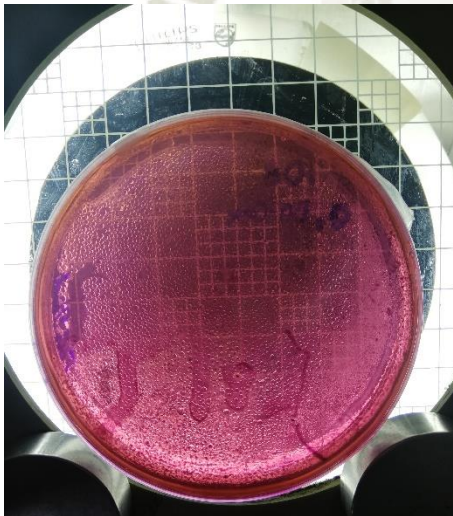
**RECUENTO DE E.COLI - DIA 0 EN  
CARNE SIN EXTRACTO**



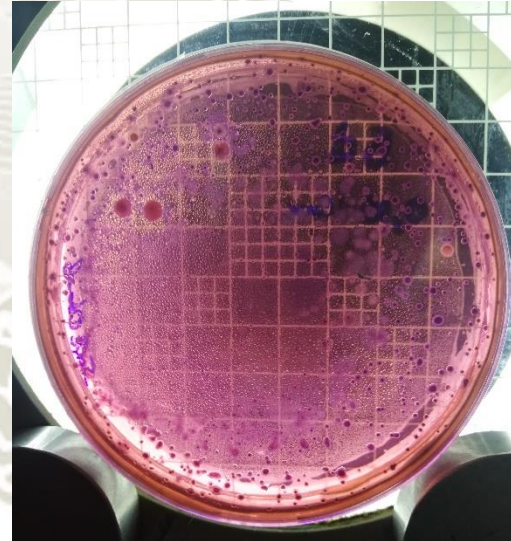
**ANÁLISIS DE RECUENTO DE E.COLI Y  
SALMONELLA SPP. EN CARNE SIN  
EXTRACTO**



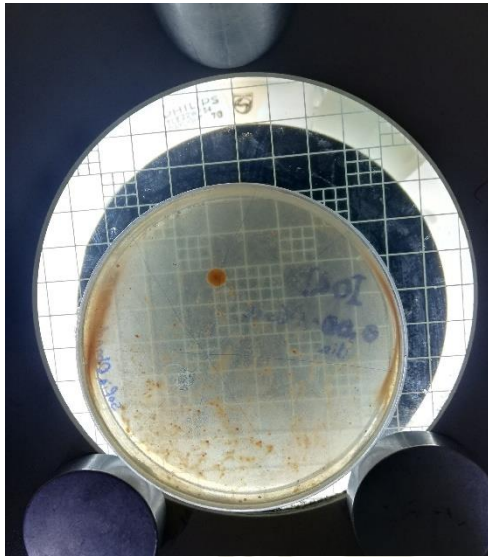
**RECUENTO DE E.COLI - DIA 1 EN  
CARNE SIN EXTRACTO**



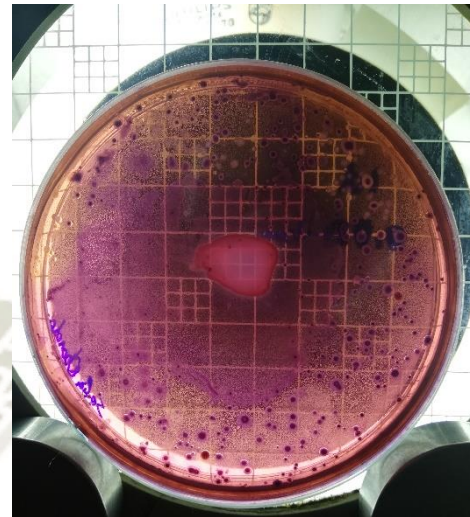
**RECUENTO DE E.COLI - DIA 5 EN  
CARNE SIN EXTRACTO**



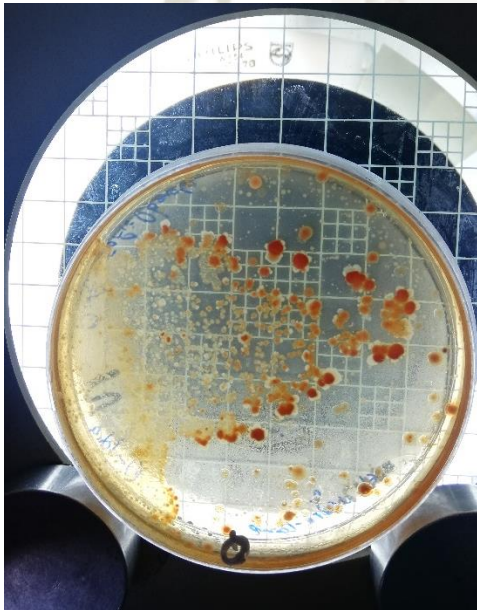
**RECUENTO DE SALMONELLA SPP -  
DIA 0 EN CARNE SIN EXTRACTO**



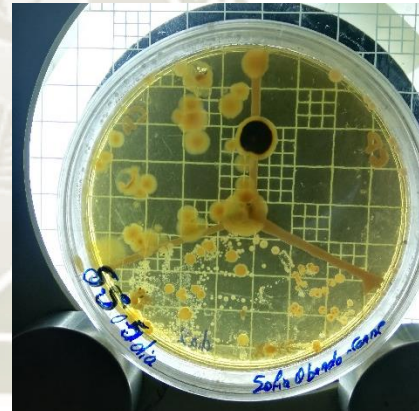
**RECUENTO DE E.COLI - DIA 10 EN  
CARNE SIN EXTRACTO**



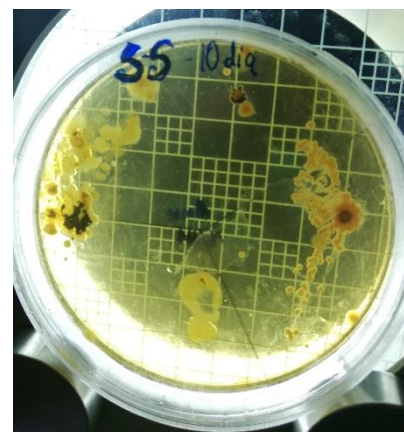
**RECUENTO DE SALMONELLA SPP -  
DIA 1 EN CARNE SIN EXTRACTO**



**RECUENTO DE SALMONELLA SPP - DIA  
5 EN CARNE SIN EXTRACTO**



**RECUENTO DE SALMONELLA SPP - DIA  
10 EN CARNE SIN EXTRACTO**

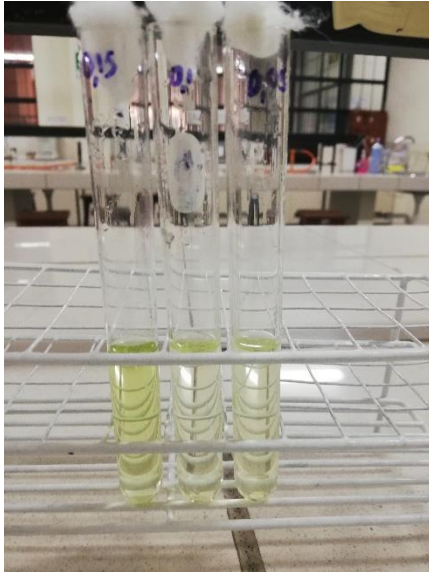


- **FOTOS DEL EXPERIMENTO N°3: EFECTO BACTERICIDA EN CARNE DE VACUNO**

**FUNDO MATUARE - CAMANA**



**DILUCIONES DE EXTRACTOS PARA  
DETERMINACIÓN DE EFECTO –  
0.15%, 0.1% Y 0.05%**



**AGAR S-S – PESADO**



**AGAR EMB - PESADO**



**CORTES DE LOMO VETEADO EN  
INMERSIÓN CON EXTRACTO**



**PREPARACIÓN DEL AGAR EMB**



### PREPARACIÓN DEL AGAR S-S



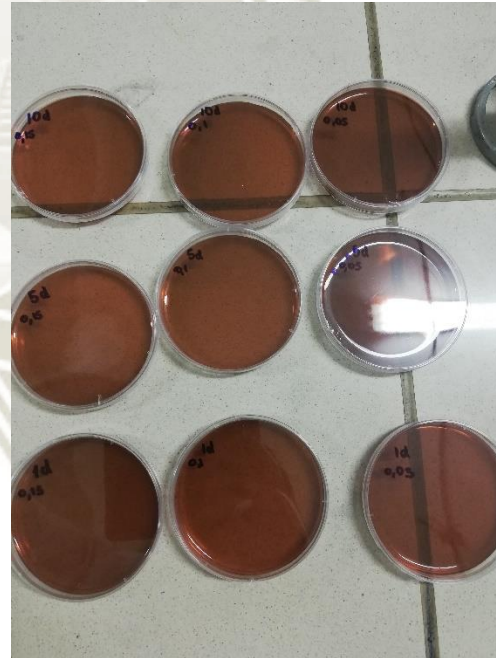
### SIEMBRA EN SUPERFICIE DE SALMONELLA



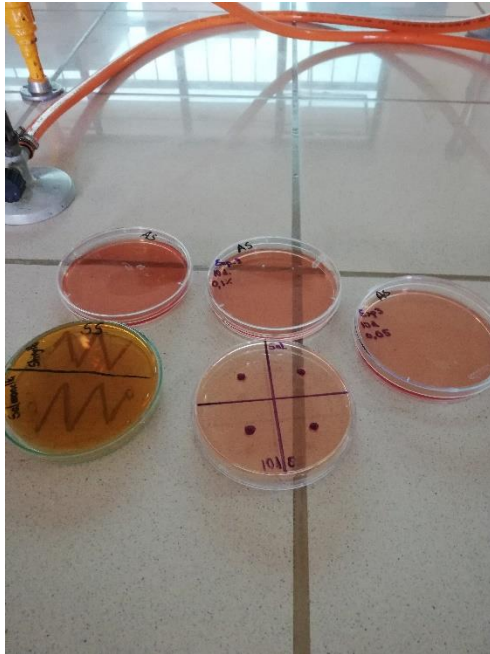
### LLENADO DE PLACAS PETRI CON AGAR EMB PARA SIEMBRA DE E.COLI



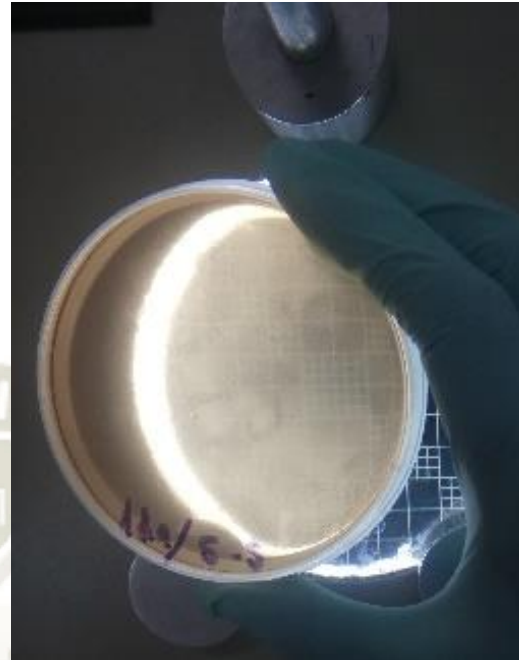
### RESULTADOS DE RECUENTO DE E.COLI EN AGAR EMB - AUSENCIA



**RESULTADOS DE RECUENTO DE  
SALMONELLA SPP. EN AGAR S-S**



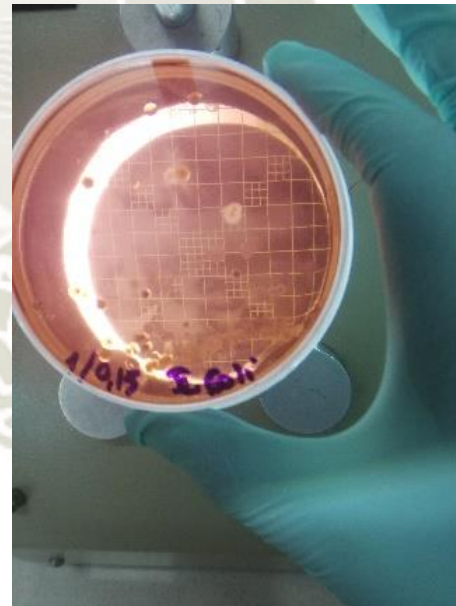
**AUSENCIA EN RECUENTO DE  
SALMONELLA SPP.**



**ANALISIS DE RECUENTO DE  
SALMONELLA SPP.**



**AUSENCIA EN RECUENTO DE E.COLI**



**SIEMBRA EN AGAR EMB PARA  
RECUENTO DE E.COLI**



**SIEMBRA EN AGAR SALMONELLA  
SHIGELLA**



**CORTES DE LOMO PARA ANÁLISIS**



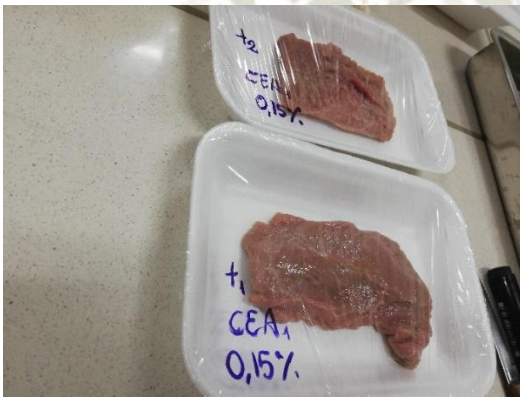
**PESO POR CORTE DE LOMO**



**ENVASADO EN LDPE**



**CORTES DE LOMO LUEGO DE LA  
INMERSIÓN EN EXTRACTO  
1 Y 5 DIAS DE REFRIGERACIÓN**



**PANELISTAS**

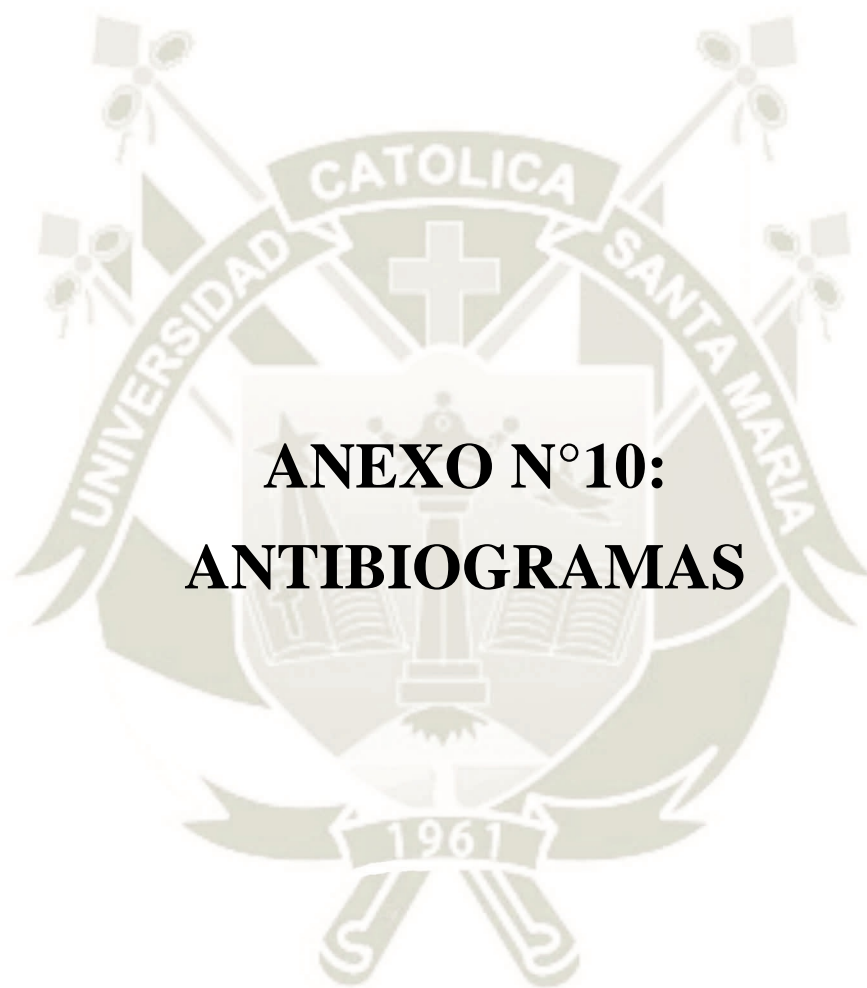


**PRODUCTO FINAL – EXTRACTO DE  
ALGA ULVA SPP.**



**PRODUCTO FINAL**





**ANEXO N°10:  
ANTIBIOGRAMAS**

## SECCION 8

### ANTIBIOGRAMA PARA ENTEROBACTERIACEAE

- **MEDIO DE CULTIVO**

- Agar Mueller Hinton

- **INOCULO**

Método de crecimiento o suspensión directa de la colonia. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de mc. Farland.

- **INCUBACIÓN**

35°C

- **LECTURA**

15 – 18h

- **INTERPRETACION DE LOS DIAMETROS CRITICOS**

#### Antibióticos y diámetros críticos

Antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro en mm		
		R	I	S
<b>PENICILINAS</b>				
Ampicilina	10ug	13	14-16	17
<b>CEFALOSPORINAS</b>				
Cefalotina	30ug	14	15-17	18
Cefuroxima axetil	30ug	14	15-22	23
Cefuroxima sodium	30ug	14	15-17	18
Cefoxitina	30ug	14	15-17	18
Cefotaxima	30ug	14	15-22	23
Ceftriaxona	30ug	13	15-20	21
Ceftazidima	30ug	14	15-17	18
Cefixima	30ug	15	15-18	19
Cefpirome	30ug	14	15-17	18
Cefepime	30ug	14	15-17	18
<b>B LACTAMICO / INHIBIDOR DE BATALACTAMASA</b>				
Ampicilina /Sulbactam	10/10ug	11	12-14	15
Amoxicilina /Acido Clavulanico	20/10ug	13	14-17	18
Cefaperazona /sulbactam +	75ug/ 30ug	15	16-20	21
<b>MONOBACTAMS</b>				
Aztreonam	30ug	15	16-21	22
<b>CARBAPENEMS</b>				
Imipenem	10ug	13	14-15	16
Meropenem	10ug	13	14-15	16
<b>AMINOGLUCOSIDOS</b>				
Gentamicina	10ug	12	13-14	15
Amikacina	30ug	14	15-16	17
<b>QUINOLONAS</b>				
Ácido nalidixico	30ug	13	14-18	19

Norfloxacin	10ug	12	13-16	17
Ciprofloxacina	5ug	15	16-20	21
Ofloxacina	5ug	12	13-15	16
<b>TETRACICLINA</b>				
Tetraciclina	30ug	14	15-18	19
<b>OTROS</b>				
Cloramfenicol	30ug	12	13-17	18
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1.25/23.75ug	10	11-15	16

Diámetros críticos adaptados del CFA – SFM, 2000 – 2001.

Adaptado a partir de los diámetros críticos de la Cefoperazona según el NCCLS 2001

