

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto del ácido láctico sobre la calidad sanitaria de
Litopenaeus vannamei y *Pleoticus muelleri* a 4°C.

Proyecto de tesis para optar el Título Profesional de Licenciada
en Biología

Claudia Mariví Pazce Zúñiga

Asesor: Dr. Tomás Agurto Sáenz

Lima, Perú

2021

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto del ácido láctico sobre la calidad sanitaria de
Litopenaeus vannamei y *Pleoticus muelleri* a 4°C.

Proyecto de tesis para optar el Título Profesional de Licenciada
en Biología

Claudia Mariví Pazce Zúñiga

Asesor: Dr. Tomás Agurto Sáenz

Lima, Perú

2021

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto del ácido láctico sobre la calidad sanitaria de
Litopenaeus vannamei y *Pleoticus muelleri* a 4°C.

Claudia Mariví Pazce Zúñiga

MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR Y ASESOR.

PRESIDENTE: Dr. Enzo Foy Valencia

SECRETARIO: Blgo. Alcides Guerra Santa Cruz

VOCAL: M.V. Franco Ceino Gordillo

ASESOR: Dr. Tomás Agurto Sáenz

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres por ser el apoyo constante en el desarrollo de mi vida personal y profesional, porque gracias a ellos que impulsan mis objetivos, hoy puedo decir que empiezo mi vida profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Victor Raúl y María Danitza por darme las herramientas para poder superar los obstáculos, a mis hermanos Victor y Danitza por ser mi ejemplo y motivarme con sus consejos, a mi sobrino Leonardo por llenarme de su inocencia y amor infinito.

Al Dr. Tomás Agurto Sáenz, asesor de mi tesis, por el soporte académico en el desarrollo de esta investigación, a Orlando Advíncula por orientarme en el procesamiento de mis datos.

A mis maestros de microbiología: Dr. Tomás Agurto Sáenz, Blgo. Alcides Guerra Santa Cruz y Mg. Félix Ramos Guerrero que, en las aulas y laboratorios, sembraron en mi la intención de profundizar mis conocimientos en la Microbiológica.

Al laboratorio ALS LS PERU SAC, por brindarme el apoyo logístico en la ejecución de la parte experimental de mi trabajo de investigación, al equipo de microbiología, fisicoquímica y fisicosensorial: Jackeline, Deborah, Rocío, Ana, Lidia, Sarita, Jesús, Alexis, Germán y Jair, porque cada uno de ellos contribuyo en mi trabajo de investigación.

A María Martha Lazo de la vega, por el apoyo incondicional y por acompañarme durante todo este camino, sin ti nada de esto hubiera sido posible.

A mis compañeros de vida Aaron Gómez, Dayanne Vilela, Fernando Huamachumo, María Pimentel y Sandra Contreras, por motivarme permanentemente y acompañarme en cada paso dado.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
I. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	16
1.1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	17
1.1.3. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	17
1.1.4. OBJETIVO GENERAL.....	19
1.1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
II. MARCO TEÓRICO.....	20
2.2. <i>Litopenaeus vannamei</i> , Boone 1931 “Langostino Blanco”	20
2.3. <i>Pleoticus muelleri</i> , Bate, 1888 “Langostino argentino”.....	21
2.4. Bacterias patógenas en Crustáceos.....	22
2.4.1. <i>Escherichia coli</i>	23
2.4.2. <i>Salmonella spp.</i>	24
2.4.3. <i>Vibrio cholerae</i>	25
2.4.4. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25
2.5. Melanosis en Crustáceos	26
2.6. Aditivo alimentario	27
2.7. metabisulfito de sodio	28
2.7.1. Método Monier Williams.....	29
2.8. Bacteriocinas alimentarias.....	30
2.8.1. Clasificación	30
2.8.2. Modo de acción.....	31
2.9. Ácido Láctico	32
2.9.1. Modo de acción del Ácido láctico	33
2.10. Aseguramiento de la calidad alimentaria.....	34
III. ANTECEDENTES	35
IV. HIPÓTESIS.....	43

4.1.	HIPOTESIS GENERAL:	43
4.2.	HIPOTESIS ESPECIFICAS:	43
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
5.1.	Lugar de ejecución	43
5.2.	Tipo y diseño de investigación	43
5.2.1.	Tipo de Investigación	43
5.2.2.	Diseño de la investigación	44
5.3.	Variables	44
5.3.1	Variable independiente:	44
5.3.2	Variable dependiente:	44
5.4.	Operacionalización de las variables	45
5.5.	Muestreo	45
5.6.	Procedimiento y análisis de datos	45
5.7.	Aspecto ético	47
VI.	RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	48
6.1.	RESULTADOS	48
6.1.1.	Efecto del ácido láctico sobre el recuento de aerobios mesófilos totales de <i>Pleoticus muelleri</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación.	49
6.1.2.	Efecto del ácido láctico sobre el recuento de <i>Escherichia coli</i> de <i>Pleoticus muelleri</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación.	52
6.1.3.	Efecto del ácido láctico sobre el recuento de aerobios mesófilos totales de <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación	55
6.1.4.	Efecto del ácido láctico sobre el recuento de <i>Escherichia coli</i> de <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación	57
6.1.5.	Acción antimicrobiana in vitro del Ácido láctico sobre cepas bacterianas de <i>Salmonella spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Escherichia coli</i> según la AOAC (2013).	59
6.2.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	61
VII.	DISCUSIÓN	65
VIII.	CONCLUSIONES	68
IX.	RECOMENDACIONES	69
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	70
XI.	ANEXOS	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Clasificación taxonómica de <i>Litopenaeus vannamei</i> , Boone 1931 “Langostino Blanco”	20
Tabla N°2. Clasificación taxonómica de <i>Pleoticus muelleri</i> “Langostino argentino”.....	21
Tabla N°3. Cuadro de clasificación de <i>Salmonella enterica</i> en subespecies.....	24
Tabla N°4. Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas	31
Tabla N°5. Normativas aplicadas para la determinación de microorganismos indicadores de calidad de productos hidrobiológicos.	45
Tabla N°6. Normativas aplicadas para la determinación de microorganismos indicadores de calidad de productos hidrobiológicos.	46
Tabla N°7. Esquema de los tratamientos realizados para evaluar la carga microbiana con diferentes concentraciones de Ácido láctico en <i>Litopenaeus vannamei</i> (Langostino blanco) y <i>Pleoticus muelleri</i> “Langostino argentino”	46
Tabla N°8. Estadísticos descriptivos del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/gr) de <i>Pleoticus muelleri</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación.	49
Tabla N°9. Análisis de varianza (ANOVA) para el efecto del ácido láctico sobre el recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/gr) de <i>Pleoticus muelleri</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación.	50
Tabla N°10. Prueba de Comparación con LSD de Fisher del recuento de Aerobios mesófilos totales (UFC/gr) de <i>Pleoticus muelleri</i> a 4°C, las concentraciones de Ácido láctico y los tiempos de observación	50
Tabla N°11. Estadísticos descriptivos del recuento de <i>Escherichia coli</i> (UFC/gr) de <i>Pleoticus muelleri</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación	52
Tabla N°12. Análisis de varianza (ANOVA) para el efecto del ácido láctico sobre el recuento de <i>Escherichia coli</i> (UFC/gr) de <i>Pleoticus muelleri</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación.	53
Tabla N°13. Prueba de Comparación con LSD de Fisher del recuento de Aerobios mesófilos totales (UFC/gr) de <i>Pleoticus muelleri</i> a 4°C, según las concentraciones de Ácido láctico y los tiempos de observación.....	53
Tabla N°14. Estadísticos descriptivos del recuento de aerobios mesófilos totales en <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación	55
Tabla N°15. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el efecto del ácido láctico sobre el recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/gr) de <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación.	56
Tabla N°16. Prueba de Comparación con LSD de Fisher del recuento de Aerobios mesófilos totales (UFC/gr) de <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4°C, las concentraciones de Ácido láctico y los tiempos de observación.....	56

Tabla N°17. Estadísticos descriptivos del recuento de <i>Escherichia coli</i> (UFC/gr) de <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación.	57
Tabla N°18. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el efecto del ácido láctico sobre el recuento de <i>Escherichia coli</i> (UFC/gr) de <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4°C, según los tiempos de evaluación.	58
Tabla N°19. Prueba de Comparación con LSD de Fisher del recuento de <i>Escherichia coli</i> (UFC/gr) de <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4°C, las concentraciones de Ácido láctico y los tiempos de observación.....	58
Tabla N°20. Niveles de metabisulfito de sodio en <i>Pleoticus muelleri</i> y <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4 °C, antes de la aplicación de los tratamientos.	60
Tabla N°21. Medidas del pH en <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4 °C.	60
Tabla N°22. Medidas del pH en <i>Pleoticus muelleri</i> a 4 °C.	60
.....	78
Tabla N°23. Reporte del análisis sensorial de <i>Litopenaeus vannamei</i>	81
Tabla N°24. Reporte del análisis sensorial de <i>Pleoticus muelleri</i>	82

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

Figura. N°1. Proceso químico del efecto de melanosis	26
Figura. N°2. Equipo de destilación Monnier Williams	29
Figura N°3. Modo de acción de las bacteriocinas: Clase I, II, III, IV	32
Figura N°4. Estructura molecular Ac. Láctico	33
Figura N°5. Proceso experimental de la investigación.....	44
Figura N°6. Preparación de los especímenes y tratamientos para la investigación: A: Selección de langostino; B: Pesado; C: Distribución de los especímenes en cada tratamiento; D: Inmersión de Langostino en ácido láctico.....	47
Figura N°7. Enumeración de microorganismos aerobios mesófilos totales – ISO 4833-1:2013	77
Figura N°8. Recuento de <i>Escherichia coli</i> – ISO 16649-2:2015.....	77
Figura N°9. Detección de <i>Vibrio cholerae</i> – FDA /BAM Online 8th Ed. Rev. 2004	78
Figura N°10. Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> – FDA /BAM Online 8th Ed. Rev. 2004..	78
Figura N°11. Detección de <i>Salmonella spp.</i> – ISO 6579-1:2017	79
Figura N°12. Detección de <i>Staphylococcus aureus</i> – ISO 6888-1:2019.....	79
Figura N°13. Determinación de sulfitos por el método Moner Williams- AOAC Official Method 990.28.....	80

Figura N°14. Recuento de aerobios mesófilos totales de <i>Pleoticus muelleri</i> , con los tratamientos de 0.5, 1, 1.5% y el control. (A: 0 horas; B: 72 horas de exposición)	83
Figura N°15. Recuento de <i>Escherichia coli</i> de <i>Pleoticus muelleri</i> con los tratamientos de 0.5, 1, 1.5% y el control. (A: 0 horas; B: 72 horas de exposición)	83
Figura N°16. Evaluación sensorial de <i>Pleoticus muelleri</i> a las 72 horas de exposición con ácido láctico. (A: CONTROL; B: 0.5%; C: 1%, D: 1.5% de ácido láctico.....	84
Figura N°17. Recuento de aerobios mesófilos totales de <i>Litopenaeus vannamei</i> con los tratamientos de 0.5, 1, 1.5% y el control. (A: 0 horas; B: 72 horas de exposición)	84
Figura N°18. Recuento de <i>Escherichia coli</i> de <i>Litopenaeus vannamei</i> con los tratamientos de 0.5, 1, 1.5% y el control. (A: 0 horas y B: 72 horas de exposición	85
Figura N°19. Evaluación sensorial de <i>Litopenaeus vannamei</i> a las 72 horas de exposición con ácido láctico. (A: CONTROL; B: 0.5%; C: 1% y D: 1.5% de ácido láctico	85
Figura N°20. Acción antimicrobiana in vitro del ácido láctico: CONTROL, 0,5%, 1% y 1.5%. (A: <i>Vibrio cholerae</i> , B: <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , C: <i>Escherichia coli</i> , D: <i>Salmonella spp</i> y E: <i>Staphylococcus aureus</i>	86
Gráfico N°1. Efecto del ácido láctico sobre el recuento bacteriano de Aerobios mesófilos totales en <i>Pleoticus muelleri</i> a 4°C: A) 0%, B) 0.5%, C) 1% y D) 1.5%.....	51
Gráfico N°2. Efecto del ácido láctico sobre el recuento bacteriano de <i>Escherichia coli</i> en <i>Pleoticus muelleri</i> a 4°C: A) 0%, B) 0.5%, C) 1% y D) 1.5%	51
Gráfico N°3. Efecto del ácido láctico sobre el recuento bacteriano de Aerobios mesófilos totales en <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4°C: A) 0%, B) 0.5%, C) 1% y D)	54
Gráfico N°4. Efecto del ácido láctico sobre el recuento bacteriano de <i>Escherichia coli</i> en <i>Litopenaeus vannamei</i> a 4°C: A) 0%, B) 0.5%, C) 1% y D) 1.5%.	54
Gráfico N°5. Acción antimicrobiana in vitro del Ácido láctico sobre cepas bacterianas de <i>Salmonella spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Escherichia coli</i> : A) 0%, B) 0.5%, C) 1% y D) 1.5%.	59

RESUMEN

Los langostinos (*Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri*) son valorados en Perú y en el extranjero por su valor nutricional, pero al ser un producto perecedero requiere de aditivos adicionales, siendo el ácido láctico uno de ellos. Por lo cual, la investigación tiene como objetivo determinar el efecto que posee el ácido láctico sobre la calidad sanitaria de los langostinos, mediante la reducción de la carga bacteriana de Aerobios mesófilos totales (AMT) y *Escherichia coli* (EC), además de la evaluación sensorial de cada individuo. Los especímenes procedentes del departamento de Tumbes fueron enfrentados a 4 concentraciones de Ácido láctico (0, 0.5, 1.0 y 1.5 %) durante 0, 24, 48 y 72 horas de exposición, a una temperatura de 4°C, donde se realizó el recuento de AMT y EC. Los resultados mostraron que el ácido láctico redujo significativamente la carga bacteriana de AMT en *Litopenaeus vannamei* a una concentración de 1.5 % a partir de las 24 horas, sin embargo, no logro su inactivación en 72 horas. El tratamiento de 0.5% logro la inhibición de EC desde las 48 horas de evaluación hacia delante. Para el caso de *Pleoticus muelleri* el ácido láctico al 1.5% logro inhibir el crecimiento de AMT desde las 48 horas, mientras que la carga bacteriana de EC fue inhibida desde las 48 horas a una concentración de 0.5%. En la evaluación sensorial, se obtuvo una mejora en las características organolépticas en ambos individuos, a 72 horas de evaluación y a una concentración de 1.5%. De manera que se confirma el efecto positivo del ácido láctico sobre la calidad sanitaria de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri* a 4°C, mediante la acción antibacteriana que tuvo frente AMT y EC, siendo una alternativa para remplazar los aditivos químicos tales como el metabisulfito de sodio, además que garantiza un alimento de calidad para el consumidor.

PALABRAS CLAVE: Bacteriocinas, Ácido láctico, Actividad antimicrobiana, calidad sanitaria, *Pleoticus muelleri*, *Litopenaeus vannamei*, Aerobios mesófilos totales, *Escherichia coli*

ABSTRACT

Prawns (*Litopenaeus vannamei* and *Pleoticus muelleri*) are valued in Peru and abroad for their nutritional value, but being a perishable product it requires additional additives, lactic acid being one of them. Therefore, the objective of the research is to determine the effect that lactic acid has on the sanitary quality of prawns, by reducing the bacterial load of total mesophilic aerobes (AMT) and *Escherichia coli* (EC), in addition to the evaluation sensory of each individual. The specimens from the department of Tumbes were faced with 4 concentrations of lactic acid (0, 0.5, 1.0 and 1.5%) during 0, 24, 48 and 72 hours of exposure, at a temperature of 4 ° C, where the count was carried out. of AMT and EC. The results show that lactic acid significantly reduced the AMT bacterial load in *Litopenaeus vannamei* at a concentration of 1.5% after 24 hours, however, it did not achieve its inactivation within 72 hours. The 0.5% treatment achieved EC inhibition from 48 hours of evaluation onwards. In the case of *Pleoticus muelleri*, 1.5% lactic acid was able to inhibit the growth of AMT from 48 hours, while the bacterial load of EC was inhibited from 48 hours at a concentration of 0.5%. In the sensory evaluation, an improvement in the organoleptic characteristics was obtained in both individuals, at 72 hours of evaluation and a concentration of 1.5%. Thus, the positive effect of lactic acid on the sanitary quality of *Litopenaeus vannamei* and *Pleoticus muelleri* at 4 ° C is confirmed, through the antibacterial action it had against AMT and EC, being an alternative to replace chemical additives such as metabisulfite of sodium, in addition to ensuring a quality food for the consumer.

KEY WORDS: Bacteriocins, Lactic Acid, Antimicrobial Activity, Sanitary Quality, *Pleoticus muelleri*, *Litopenaeus vannamei*, Aerobios mesófilos totales, *Escherichia coli*

I. INTRODUCCIÓN

El “langostino blanco” *Litopenaeus vannamei* es una especie nativa del Océano Pacífico, se distribuye desde Sonora, México y Sudamérica hasta Tumbes en Perú, vive en fondos arenosos y fangosos de ambientes tropicales, entre 5 y 72 m de profundidad. La producción acuícola del langostino blanco a nivel mundial se ha incrementado desde el año 2006 hasta el 2014 en un 70% en lo que respecta a volumen de producción, siendo la especie con mayor demanda a nivel mundial según la FAO (2016). Así como también, la de mayor comercialización en el Perú por sus propiedades nutritivas y organolépticas, además de su capacidad de supervivencia frente a enfermedades y resistencia a elevadas temperaturas. En el año 2015, se exportó 18,001.540 toneladas (PRODUCE 2016), siendo la región Tumbes la que concentra el 93% de la producción nacional de langostinos y exporta el 59% del total nacional, que en el año 2018 fue valorizado en US\$ 222 millones. Uno de los principales destinos de exportación es: Estados Unidos con 51.5% del total de los envíos (US\$ 111.1 millones), demostrando un incremento con respecto al 2016.

En cuanto a *Pleoticus muelleri* (Langostino argentino) se distribuye en las costas Río de Janeiro, Brasil y de Argentina, es uno de los recursos más importantes del litoral patagónico. Entre 2016 y 2018, el total de las exportaciones argentinas de langostinos alcanzó un promedio 176 mil toneladas, equivalentes a US\$ 1.167 millones al año, como menciona Chavesta (2016). Es importante mencionar que, la materia prima se exporta a países latinos como Perú, Honduras y Guatemala, en donde se procesa para la obtención de un producto terminado el cual tiene como destino final a la Unión Europea, seguido por China que registró en el último año un incremento del 39% en volumen, respecto al 2017 según Chavesta (2016).

El Perú reconoció la importancia de controlar la producción y distribución de alimentos en todas sus etapas, es por ello que existen Autoridades Sanitarias en el país como (DIGESA, SANIPES y SENASA), responsables de la inocuidad de los alimentos y que a su vez conforman la Comisión Multisectorial Permanente de Inocuidad Alimentaria (COMPIAL) sin embargo; la gran mayoría de productores opta por el uso de conservantes y aditivos especialmente de origen sintético, como afirma Quispe (2017) como es el caso

del metabisulfito de sodio, aditivo usado en las etapas de almacenamiento, producción y distribución de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri*, ya que inhibe la formación de 4 tipos de melanosis, pero el uso indiscriminado provoca daños en la salud como: irritaciones en la piel, alergias, entre otras enfermedades. Actualmente, se han incrementado los casos de infección por alimentos contaminados, para *Litopenaeus vannamei* “langostino blanco” y *Pleoticus muelleri* “Langostino argentino” específicamente por aerobios mesófilos y *Escherichia coli*, menciona Barbosa *et al.* (2016), siendo esta una de las más peligrosas, debido a que existen cepas que producen toxinas como: toxina Shiga o verotoxigénicas que provocan cuadros gastrointestinales graves, los síntomas suelen ser diarrea grave, a menudo acompañada de cólicos abdominales, sin y con fiebre moderada, que suelen aparecer dos o tres días después del consumo del alimento contaminado, la recuperación se da en el plazo de una semana. La contaminación es provocada generalmente por la inadecuada manipulación durante el proceso de envasado y/o almacenaje y sobre todo por la ruptura de la cadena de frío.

Una alternativa de conservación es el uso de aditivos de origen natural como: el ácido láctico, una bacteriocina, de amplio uso en la industria por sus características benéficas, el cual ha sido aprobada legalmente para el uso en alimentos por la Food and Drug Administration (FDA) y categorizada como (GRAS) Generalmente Reconocidas como Seguras, tal como expresa Berisnstain, *et al.* (2012). El desarrollo de estos microorganismos ácido-lácticos, y la ausencia de patógenos o alterantes, contribuyen favorablemente en la preservación de los alimentos reduciendo el uso de conservantes químicos, como es el caso del metabisulfito de sodio. Por ende, la presente investigación busca determinar el efecto del ácido láctico sobre la calidad sanitaria de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri* a 4°C, logrando generar una protección adicional, mediante la reducción de los recuentos bacterianos, permitiendo incrementar la vida útil del producto.

1.1. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, *Litopenaeus vannamei* “Langostino blanco” y *Pleoticus muelleri* “Langostino argentino” son productos de exportación, los cuales son comercializados bajo congelación en terminales pesqueros, en muchas ocasiones no existe un control estricto de la cadena de frío, lo cual conlleva a la proliferación de la carga microbiana, como es el caso de *Escherichia coli*, bacteria que posee relevancia en la salud pública mundial, afectando principalmente a niños y adultos mayores que sufren severos cuadros de infección gastrointestinal. Se transmite mediante el consumo de alimentos contaminados, en el caso de productos hidrobiológicos, ya que, en ocasiones, estos son ingeridos crudos. De acuerdo con el Ministerio de la Salud (2016) las enfermedades diarreicas agudas (EDAS) siguen siendo un factor importante de morbilidad en la población, indicando una mayor incidencia de episodios de enfermedades diarreicas agudas en temporada cálida, siendo el departamento de Lima con mayores episodios de esta afección. Otro problema que implica la ruptura de la cadena de frío para *Litopenaeus vannamei* “langostino blanco” y *Pleoticus muelleri* “Langostino argentino”, es la melanosis que consiste en el desarrollo de puntos o manchas negras propio de la oxidación de las quinonas, esto provoca un impacto adverso sobre las propiedades sensoriales y la aceptabilidad del consumidor, por lo que reduce drásticamente la calidad del producto lo que conlleva a grandes pérdidas económicas. Para poder contrarrestar la melanosis existen diversos aditivos alimentarios de origen pesqueros y acuícola incluidos en la lista del Codex alimentarius como agentes sulfitantes y sus derivados, siendo el metabisulfito de sodio el más común, utilizado para la conservación de un amplio grupo de crustáceos debido a que previene 4 tipos de melanosis y evita la pérdida de color y textura, lo cual incrementa la vida útil del producto, pero no es considerado un antimicrobiano.

El Organismo Nacional de Sanidad Pesquera – SANIPES (2016) regula la dosis máxima de S₀₂ (mg/Kg) (150 ppm) en la matriz de crustáceos congelados, el exceso de este aditivo puede provocar múltiples reacciones alérgicas, dermatitis, irritación gastrointestinal, náuseas y vómitos, incluso el contacto directo puede causar irritación de las fosas nasales, garganta e inflamación en los pulmones. Otra desventaja, es el impacto perjudicial sobre el ambiente, ya que se vierte residuos de S₀₂ en los canales de abasto de camaroneras, lo que genera el deterioro de la calidad de agua afectando el crecimiento del fitoplancton, por ende, toda la cadena alimenticia.

Por ello, existe la necesidad de ofrecer alimentos mínimamente procesados y en consecuencia del creciente rechazo por parte de los consumidores hacia el uso de aditivos sintéticos, ha obligado a la industria alimentaria a reconsiderar la aplicación de ácidos orgánicos (bacteriocinas) con propiedades antimicrobianas, como es el caso del ácido láctico, aditivo de amplio uso en la industria alimentaria, lo que nos lleva a formular la siguiente pregunta:

1.1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es el efecto del ácido láctico sobre la calidad sanitaria de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri* a 4°C.

1.1.3. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Litopenaeus vannamei es una de las 3 especies principales de exportación en Perú, posee desde el 2006, más del 93% de los volúmenes de cosechas en la actividad acuícola. El 2016, la cosecha alcanzó las 20,441 toneladas métricas (TM). En cuanto a *Pleoticus muelleri* “Langostino argentino”, es uno de los recursos más destacados de la acuicultura de Argentina. Entre los años 2016 y 2018, el total de exportaciones argentinas al mundo alcanzó un promedio 176 mil toneladas, equivalentes a US\$ 1.167 millones al año. Cabe resaltar que, para el caso de la presentación “head-off”, se exporta en gran medida a países latinos como Perú Honduras y Guatemala, para la obtención de un producto terminado, el cual tendrá como destino final a la Unión Europea, seguido por China. Los langostinos (*Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri*) son considerados alimentos de gran valor nutricional por su alto contenido de proteínas, aportando minerales como magnesio, potasio y hierro, además posee un bajo nivel en grasas, asimismo posee una versatilidad en el consumo, convirtiéndolo en un producto completo. Por lo cual, la demanda del mercado nacional e internacional es cada vez más exigente con respecto al desarrollo de nuevas técnicas para la protección de los alimentos perecibles como es el caso de los productos hidrobiológicos, esto genera nuevos retos en la investigación, que a la vez cumplan, con los estándares de calidad e inocuidad exigidas por las normas actuales.

En la industria alimentaria existen diversos aditivos naturales, uno de ellos el ácido láctico, un metabolito fisiológico (bacteriocina) producido por bacterias ácido lácticas que poseen actividad

antimicrobiana frente al crecimiento de bacterias Gram negativas patógenas como es el caso de *Escherichia coli enteropatógena (EPEC)*, generador de diversos cuadros diarreicos en niños y adultos. Actualmente, el ácido láctico está legalmente aprobado para uso en alimentos por la F.D.A y categorizada como GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras). Cabe mencionar que su efectividad en productos hidrobiológicos y cárnicos se da en bajas concentraciones, además de su fácil aplicación, este no posee ningún efecto adverso en las características organolépticas, generando una mejora en la calidad del producto, permitiendo así el incremento de la vida útil. En cuanto al impacto ambiental, la aplicación del ácido láctico como aditivo en los langostinos, reduciría los vertimientos de sulfitos (aditivo químico actualmente usado), que suelen ser eliminados en los canales camaroneros, lo que afecta en la calidad del agua y los seres vivos que habiten en ese ecosistema.

1.1.4. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto del ácido láctico sobre la calidad sanitaria de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri* a 4°C.

1.1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la acción antibacteriana del ácido láctico a concentraciones de 0%, 0.5%, 1% y 1.5% frente a Aerobios mesófilos y *Escherichia coli* a intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas aislados de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri* a 4°C.
- Evaluar la acción antibacteriana *in vitro* del ácido láctico al 0, 0,5%, 1% y 1.5% que ejerce sobre cepas de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Escherichia coli*.

II. MARCO TEÓRICO

2.2. *Litopenaeus vannamei*, Boone 1931 “Langostino Blanco”

El camarón blanco del pacífico o langostino blanco es un cefalópodo originario de las costas del Océano Pacífico, desde México hasta Tumbes (Perú). Actualmente se produce en los países de China, Tailandia, Indonesia, Brasil, Perú, Colombia y Estados Unidos de América. Habita en aguas con temperaturas superiores a 20°C, se puede encontrar hasta los 72 m de profundidad en aguas marinas como en estuarios, según Rosado (2018). Losxs adultos son marinos y los juveniles estuarinos, tolera amplios rangos de temperatura (óptimo de 25°-30 °C) y salinidad (de 10-50 partes por mil) y puede crecer bien en salinidades muy bajas en rangos de 5 a 45 partes por mil de salinidad, menciona Ríos (2019). Posee el cuerpo alargado, dividido en cefalotórax (rostro, antena, anténulas y periópodos), abdomen (6 segmentos abdominales y pleópodos) y cola (telson y urópodos), de color blanco translúcido con tonos amarillos, con antenas, periópodos (patas delanteras) y urópodos (cola) pigmentados de color rojizo. Rostro moderadamente largo con 7 - 10 dientes dorsales y 2 - 4 dientes ventrales, expresado por el Instituto Nacional de Pesca (2018). Los adultos viven y se reproducen en mar abierto, mientras que la post larva migra a las costas a pasar la etapa juvenil, la etapa adolescente y pre adulta en estuarios, lagunas costeras y manglares. Los machos llegan a la madurez a partir de los 20 g. y las hembras a partir de los 28 g. en una edad de entre 6 y 7 meses, es ahí donde libera entre 100 000 y 250 000 huevos de aproximadamente 0,22 mm de diámetro. La incubación ocurre aproximadamente 16 horas después del desove y la fertilización, según la FAO (2019).

Tabla N°1.

Clasificación taxonómica de *Litopenaeus vannamei*, Boone 1931 “Langostino Blanco”

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfilo	Crustacea
Clase	Malacostraca
Orden	Decapoda
Suborden	Dendrobranchiata
Familia	Penaeidae
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931)

2.3. *Pleoticus muelleri*, Bate, 1888 “Langostino argentino”

El langostino argentino también llamado como: langostino rojo argentino, gambón argentino o langostino austral, es un cefalópodo que habita al Sudeste de América del Sur, en el océano atlántico entre las costas de Santa Cruz, Argentina y Brasil. Es una especie de aguas templado-frías con una profundidad que oscilan entre los 3 y 100m. Las principales características son: el ciclo de vida corto, considerado anual en términos pesqueros, una tasa de crecimiento alta, variable espaciotemporalmente y un gran potencial reproductivo. El langostino presenta dimorfismo sexual y crecimiento diferencial por sexos, las tallas máximas de los machos son menores a de las hembras, estos alcanzan tallas de hasta 45 mm de largo de caparazón o cefalotórax (18 cm de largo total y aproximadamente 50 g de peso total), mientras que las hembras alcanzan tallas de hasta 58 mm de largo de caparazón o cefalotórax (22,5 cm de largo total y aproximadamente 90 g de peso total, según Bertuche *et al.* (1999). *Pleoticus muelleri* es un producto muy valorado en el mercado internacional tanto por sus cualidades organolépticas como por sus características nutricionales, caracterizado como un alimento con un buen nivel proteico, elevado porcentaje de humedad, bajo contenido de grasa y minerales como: fósforo, calcio y hierro, un apreciable contenido de vitaminas como niacina (B3). En cuanto a su nivel calórico este alimento aporta aproximadamente noventa y seis (96) kilocalorías cada cien (100) gramos de carne.

Tabla N°2.

Clasificación taxonómica de Pleoticus muelleri “Langostino argentino”

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfilo	Crustacea
Clase	Malacostraca
Orden	Decapoda
Suborden	Dendrobranchiata
Familia	Solenoceridae
Género	<i>Pleoticus</i>
Especie	<i>Pleoticus muelleri</i> (BATE, 1888)

2.4. Bacterias patógenas en Crustáceos

El número de enfermedades que afectan a los camarones cultivados ha aumentado de manera constante con la expansión e intensificación de los sistemas de cultivo comerciales a gran escala. Entre los agentes causales reconocidos de las enfermedades infecciosas del camarón se encuentran virus, bacterias, rickettsias, hongos y protozoos, según Hettiarachchi *et al.* (2005)

Se realizaron pruebas a langostinos de exportación e importación, en busca de bacterias como *Salmonella*, *Vibrio*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. El 16 % de langostinos cocidos, listo para comer, se encontraron varias bacterias, incluidas *Vibrio* y *E. coli*, estas pueden causar enfermedades como: el colera, diarreas e intoxicación alimentaria, incluso puede llevar a la muerte. En siete muestras de langostino crudo (seis de cultivo y una silvestre), se encontró *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina, esta bacteria puede causar infecciones a menudo difíciles de tratar. Estos hallazgos constituyen una causa de preocupación.

De acuerdo con Miget (1991) las enfermedades asociadas al consumo de productos hidrobiológicos son principalmente atribuidas a productos contaminados por 3 razones siguientes:

- Patógenos presentes en el medio natural como: *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.
- Microorganismos introducidos al ambiente acuático como resultado de desperdicios impropios del ser humano como: *Staphylococcus*, *Salmonella*, y *Vibrio sp.*
- Microorganismos introducidos durante la manipulación del producto, principalmente por parte del personal del barco de cosecha; por procesos en planta, durante la conservación del alimento y por el consumidor (coliformes fecales como *E. Coli*, *Staphylococcus* y *Salmonella*).

2.4.1. *Escherichia coli*

El género *Escherichia* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, cuyas características son: bacilos rectos Gramnegativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, inmóviles o móviles mediante flagelos peritricos, fermentadores de D-glucosa (a menudo con producción de gas), catalasa positivos y oxidasa negativos, expresa Koneman (2008). La infección que provocada por *E.coli* es considerada una zoonosis (enfermedades transmitidas de animales a humanos) de origen alimentaria, es decir que es transmitida a los humanos a través del consumo de los productos alimenticios contaminados. La mayoría de las especies no son peligrosas, pero las cepas productoras de toxina Shiga o verotoxigénicas pueden provocar cuadros gastrointestinales graves. En los adultos los síntomas suelen ser diarrea grave, algunas veces sanguinolentas, acompañada de cólicos abdominales, con y sin fiebre moderada, suelen aparecer dos o tres días después del consumo del alimento contaminado, y la recuperación se da en un plazo de una semana. Las *E.coli* extraintestinales (ExPEC) son consideradas como patógenos oportunistas que generan diversas infecciones siendo las más reconocidas la uropatogénica (UPEC) (causante de cistitis y pielonefritis) y la causadora de meningitis neonatal (NMEC), que puede cruzar la barrera hematoencefálica; Ambas pueden causar septicemia en el ser humano. Existe otro grupo denominado de *E.coli* diarreogénicas (DEC), clasificadas en seis patotipos: *E. coli* productora de toxina shiga (STEC) o también referida como enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteropatogénica (EPEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) y de adherencia difusa (DAEC), de las cuales, las cuatro primeras son las más prevalentes y están asociadas a alimento contaminado y mala calidad de agua, según la FDA (2016).

2.4.2. *Salmonella* spp.

Salmonella es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son móviles gracias a la presencia de flagelos peritricos. Posee la capacidad de multiplicarse a una velocidad muy elevada, ya que puede duplicar su número cada 15 o 20 minutos si la temperatura es elevada (superior a 20° C), expresa Agasan *et al.* (2002)

Actualmente existen cerca de 2700 serovares, con excepción de la serovariedad *Gallinarum-Pollorum*. *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella bongori* (Grupo V) y *Salmonella enterica*, la cual se subdivide en 6 subespecies como se observa en la **Tabla N°3** que se presenta a continuación:

Tabla N°3.

Cuadro de clasificación de Salmonella enterica en subespecies

<i>Salmonella enterica</i>	<i>S. enterica</i> subsp <i>enterica</i> (Subespecies I)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>salamee</i> (Subespecies II)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>arizoanae</i> (Subespecies IIIa)
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (subespecies IIIb)
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (subespecies IV)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>indica</i> (subespecies VI)

Fuente: Agasan *et al* 2002

Salmonella crece a un pH que varía entre 4-9, esta tolerancia al ácido depende del tamaño, factores como la temperatura y sustancias como los nitritos, según Lake *et al.* (2002). Diversos serovares de *Salmonella* se han adaptado al pH de los pollos, favoreciendo de esta manera su colonización, menciona Joeger *et al.* (2009). Es frecuente encontrarlo en alimentos derivados (carne, crustáceos, huevos, leche), por lo que es considerado un indicador de contaminación alimentaria.

2.4.3. *Vibrio cholerae*

V. cholerae es un microorganismo de vida libre y que se adapta a condiciones ambientales, tales como las de los ríos o un estuario, lo que permite la asociación a organismos tales como zoo-fitoplancton, peces, a macro-microalgas y crustáceos. Proviene de la familia Vibrionaceae, clase Gammaproteobacteria, comprende bacilos gramnegativos curvados y motiles, generalmente gracias a la posesión de un flagelo polar; estos microorganismos presentan metabolismo anaerobio-facultativo y fermentador; además, producen las enzimas citocromo oxidasa, catalasa y quitinasa, esta bacteria tiene la capacidad de descarboxilar la ornitina y la lisina, pero es incapaz de hidrolizar la arginina. Crece en medios de cultivo con gran contenido de sal NaCl 3%. La Vibriosis como patología, ha sido la causa de mortalidades elevadas en cultivos de langostinos en países productores a escala global, y afecta tanto durante la larvicultura como en la fase de engorde en un amplio grupo de Crustáceos. Además, que su presencia se consideraría una alerta sanitaria debido a que es una enfermedad devastadora que ha producido siete pandemias en el mundo y que desafortunadamente hizo su manifestación en nuestro país en el verano de 1991.

2.4.4. *Vibrio parahaemolyticus*

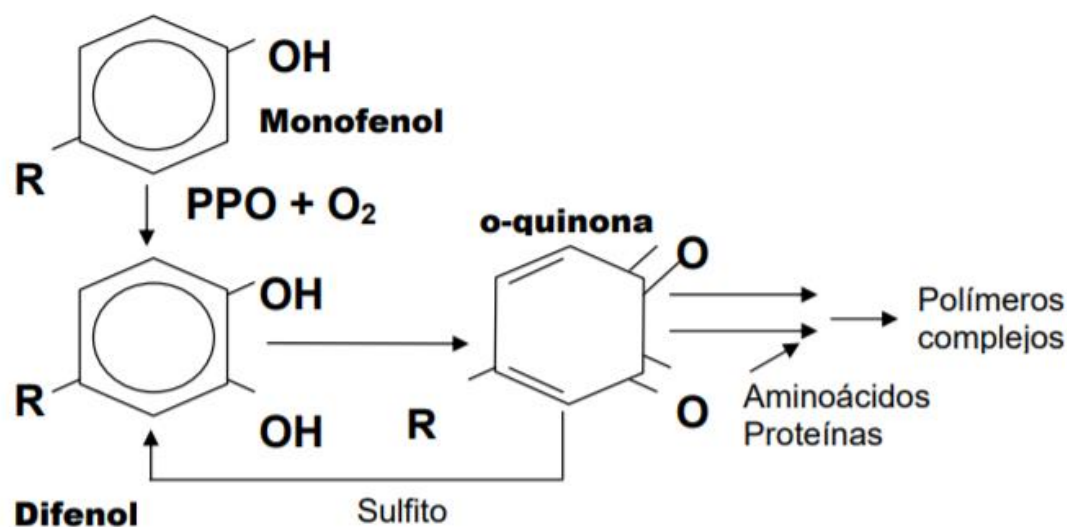
Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, halofílico (8% NaCl), cuyo hábitat son las aguas con alta concentración de sal, capaz de descarboxilar la ornitina y la lisina, pero es incapaz de hidrolizar la arginina. Todas las cepas comparten un antígeno H común, pero, hasta la fecha, se han descrito 12 tipos O (somáticos) y más de 70 antígenos K (capsulares), aunque muchas otras cepas no se pueden tipificar. La mayoría de los aislados clínicos de *V. parahaemolyticus* son diferenciables de las cepas ambientales por su capacidad para producir una hemolisina directa termoestable (TDH), denominada fenómeno de Kanagawa. Se registró en el Perú por primera vez en 1996, entre los factores de virulencia representativos se encuentran las hemolisinas Tdh y Trh menciona Davis *et al.* (2017). Es capaz de mantenerse en suspensión en el agua de mar, por lo que es capaz de concentrarse en moluscos y crustáceos, en los cuales puede alcanzar grandes concentraciones. Es capaz de provocar cuadros de gastroenteritis aguda por ingestión de mariscos y otros alimentos marinos crudos o mal cocidos.

2.5. Melanosis en Crustáceos

La melanosis que presentan los crustáceos es un proceso natural producto de reacciones químicas, enzimáticas y no enzimáticas. Es ocasionada por la formación de melanina, debido a reacciones enzimáticas oxidativas iniciadas por la enzima polifenoloxidasa o PPO, que contiene cobre, e hidroliza monofenoles a difenoles o bien éstos a benzoquinonas, seguidas por una autooxidación y polimerización, según Ogawa *et al.* (1987) como muestra la siguiente figura:

Figura. N°1.

Proceso químico del efecto de melanosis



Fuente: Espino *et al.* (2010)

Para evitar este fenómeno indeseable se utilizan algunos aditivos químicos entre los que se encuentra el metabisulfito de sodio, muy usado a nivel internacional debido a que revierten la formación de las altamente reactivas o-quinonas que conducen químicamente a la aparición de la melanosis. Aunque los productos de la melanosis (melaninas) no son nocivos y no influyen sobre el sabor ni el aroma, los consumidores los rechazan por su apariencia. La melanosis intensa puede causar pérdidas económicas muy importantes, debido al elevado valor que tienen estos mariscos en el mercado, expresa Díaz *et al.* (2003)

2.6. Aditivo alimentario

Un aditivo alimentario es la sustancia que se añade de manera intencional a los alimentos en su proceso de almacenamiento, preparación, transformación, envase y transporte con la función de transformarlos en alimentos más seguros, protegiéndolos de las bacterias y de los cambios medioambientales, previniendo su oxidación, mejorando su apariencia, sabor y consistencia como menciona Velázquez *et al.* (2019). Según el Codex Alimentarius, el concepto de aditivo se refiere a cualquier sustancia que, independientemente de su valor nutricional, se añade intencionadamente a un alimento con fines tecnológicos y en cantidades controladas.

Las principales funciones de los aditivos alimentarios son las siguientes: asegurar la seguridad y la salubridad, aumentar la estabilidad del producto, mantener el valor nutricional del alimento, potenciar la aprobación del consumidor y ayudar en la fabricación, transformación, preparación, transporte y almacenamiento del alimento.

Los motivos por lo cual se utilizan los aditivos alimentarios en la industria alimentaria son básicamente de tipo económico y social. Lo cual permite incrementar la durabilidad de los alimentos, y así poder tener un mayor aprovechamiento de ellos.

La clasificación general de los aditivos alimentarios según Beristain *et al.* (2012) son:

- Sustancias que impiden las alteraciones químicas y biológicas (antioxidantes, antioxidantes y conservantes).
- Sustancias estabilizadoras de las características físicas (emulgentes, espesantes, gelificantes, antiespumantes, antiapelmazantes, humectantes, reguladores de pH).
- Sustancias modificadoras de los caracteres organolépticos (colorantes, potenciadores del sabor, edulcorantes artificiales, aromas).

2.7. metabisulfito de sodio

El metabisulfito de sodio es una sal inorgánica de color blanco a ligeramente amarillo con un olor muy parecido al dióxido de azufre, es soluble en agua, glicerina y etanol (Regulación Comunidad Europea, 2016). Es utilizado en la industria acuícola, para prevenir la melanosis en el camarón, sin embargo, es un compuesto peligroso, ya que, si se inhala puede provocar irritación en los conductos respiratorios, y en el caso de una persona asmática, la reacción puede ser severa, según la FDA (2013).

Según la Regulación Comunidad Europea (2016), afirma que el metabisulfito de sodio es “un aditivo utilizado en la industria de alimentos como agente conservador, con la finalidad de inhibir el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias en los alimentos antes de ser consumidos” (p.15). El metabisulfito de sodio favorece el incremento de la vida útil de algunos productos alimenticios al protegerlos y evitar cambios en su color o textura.

Las propiedades físicas y químicas son las siguientes:

Estado de la Materia:	Sólido cristalino	Solubilidad en Agua:	45% @ 20 ° C NA
Apariencia:	Blanco	Otro Solubilidad:	N/A
Umbral de Olor:	Fuerte olor a SO ₂	Punto de Ebullición:	
Presión de Vapor:		Punto de Congelación:	
Densidad de Vapor (Aire = 1):		Punto de Fusión:	150 °C / 302 ° F
Fórmula Peso:	190.11	Tasa de Evaporación:	Normal.
Densidad:	NA	pH:	4.0 – 4.5 (10% Solución).
Gravedad Especifica(H₂O= 1):	1.5	% Volatilidad:	NA

Fuente: MSDS – Ineos Calabrian

Para evitar el fenómeno melanósico que sufren la mayor parte de los crustáceos de interés comercial, se ha generalizado el uso de metabisulfito de sodio, por su bajo costo y efectividad. No obstante, numerosas publicaciones han demostrado sus efectos adversos en personas sensibles o asmáticas, pudiendo atribuirse reacciones alérgicas como: urticaria, angioedema, edema laríngeo, constricción bronquial, prurito, eczema de contacto, rinitis, shock anafiláctico menciona Brazo (2003).

2.7.1. Método Monier Williams

El método determina los sulfitos libres y las porciones reproducibles de sulfitos ligados, tales como productos carbonílicos adicionados en alimentos, La porción de muestra es calentada en HCl en reflujo para convertir el sulfito a SO_2 . El N_2 introducido por debajo de la superficie de la solución de reflujo arrastra el SO_2 a través del condensados enfriado por el agua y por medio del burbujeador sujetado al condensador, con solución del H_2O_2 al 3 % donde el SO_2 se oxida a H_2SO_4 . El contenido de sulfito está directamente relacionado al H_2SO_4 generado, el cual se determina por titulación con NaOH estandarizado, según la AOAC 99020 (2013).

Equipos:

- Procesador de alimentos
- Balanza analítica
- Chiller
- Termómetro digital.
- Manta de calentamiento

Sistema de destilación Monier –Williams

- A) Conector para aplicar presión
- B) Embudo de separación
- C) Matraz de fondo redondo
- D) Tubo de entrada de gas
- E) Condensador
- F) Brazo conector para burbujeo
- G) Deposito receptor

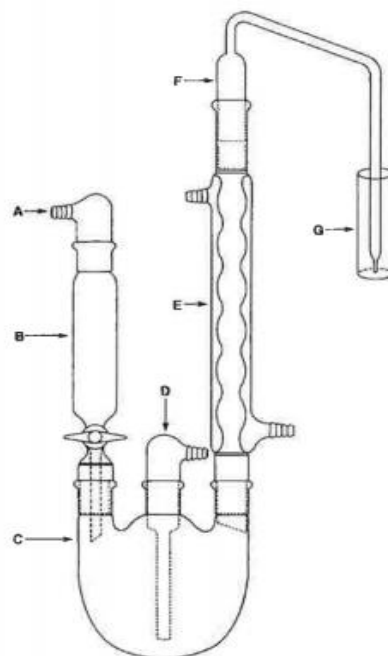


Figura. N°2. Equipo de destilación Monnier Williams

2.8. Bacteriocinas alimentarias

Las bacteriocinas son considerados péptidos con actividad antimicrobiana, segregadas por un gran número de bacterias Gram positivas y Gram negativas; sin embargo, en su gran mayoría son producidas por las bacterias ácido lácticas, se caracterizan por la producción de ácido láctico como resultado metabólico final de la fermentación de carbohidratos según Monroy *et al.* (2009). Son generalmente en forma de cocos o bacilos, la mayoría son anaerobios y oxidasa negativas tienden a sintetizar ATP en la fermentación láctica de los glúcidos, no poseen citocromos y no son formadores de esporas. Una de sus características bioquímicas es que son homofermentativas, donde el producto final de fermentación es el ácido láctico y en heterofermentativas, aquellas que producen además del ácido láctico, etanol, acetato y CO₂. Son utilizados como conservantes naturales en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad por acidificar y por lo tanto preservar alimentos de las esporas, sino también su implicación en la textura, sabor olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados, como expresa Arrazola (2016)

2.8.1. Clasificación

Las bacteriocinas se agrupan en cuatro clases diferenciables. La clase I está integrada por los lantibióticos de amplio espectro, de bajo peso molecular y con modificaciones post-traduccionales, entre los más representativo se encuentran la nisina. La Clase II incluye péptidos termoestables de bajo peso molecular sin modificaciones, cuya principal característica es la actividad antimicrobiana es que actúan contra *Listeria spp.* La Clase III agrupa a péptidos de mayor tamaño, termolábiles como la helveticina, mientras que la Clase IV está conformada por moléculas complejas con fracciones de lípidos y carbohidratos según Agudelo *et al.* (2015). En la Tabla N°4 se presenta la clasificación de las bacteriocinas, con sus principales productores, características y ejemplos.

Tabla N°4.

Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas

CLASE	PRODUCTOR	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLOS
I: Lantibióticos	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus sake</i>	Pequeños péptidos catiónicos de forma espiral o globular	Nisina A y Z Epidermina
II: No Lantibióticos	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus johsonii</i> <i>Lactobacillus planctarum</i> <i>Lactobacillus sake</i> <i>Pediococcus acidilactic</i>	Péptidos termoestables (110°-121°C) con masas moleculares de 10 KDa. Activo contra <i>Listeria</i> .	Pediocina P A Sakacina Divergicina Lactococcina
III: Mayor tamaño, termolábiles	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Presenta una masa molecular mayor a 30 kDa. Producidos por el género <i>Lactobacillus</i>	Helveticina Lactacinas A
IV: Bacteriocinas complejas	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	Son proteínas con lípidos y carbohidratos para ser activos	Circularina A Lactocina 27

Fuente: Agudelo *et al.* (2015)

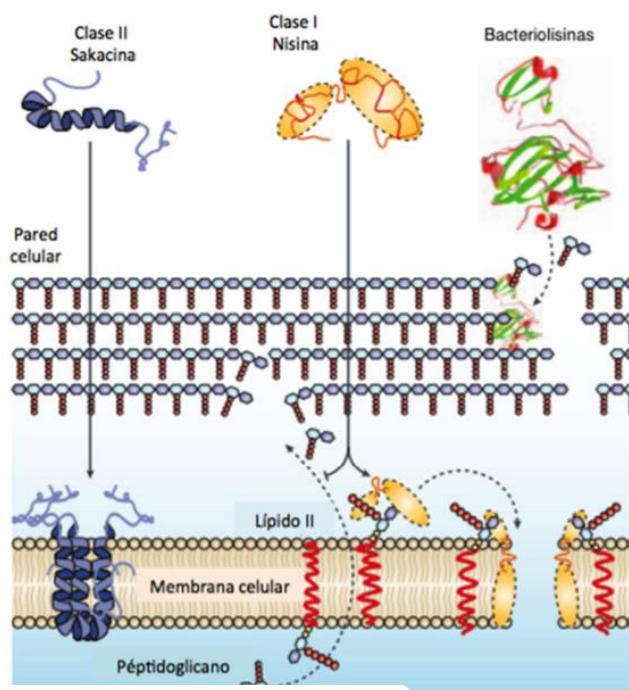
2.8.2. Modo de acción

La mayoría de las bacteriocinas actúan sobre la membrana celular provocando su desestabilización y permeabilizan mediante la formación de canales o poros iónicos, menciona Grande *et al.* (2005), que van a dar salida a compuestos como fosfato, potasio, aminoácidos, ATP, disminuyendo la síntesis de macromoléculas y por consecuencia la muerte celular, según González-Martínez *et al.* (2003). Algunos miembros de la Clase I, como la nisina que ha demostrado tener un modo de acción dual, debido a que se une a la pared celular mediante una atracción electrostática, esto es posible debido a que este péptido posee una carga positiva y la pared celular una carga negativa lo

que permite la unión. Luego la nisina se une al lípido II, que es el transportador principal de las unidades del peptidoglicano desde el citoplasma hasta la pared celular, lo que provoca la formación de un poro transmembranal lo que permite la salida de Aminoácidos y ATP, que conlleva finalmente a la muerte celular. (Fig.2)

Figura N°3.

Modo de acción de las bacteriocinas: Clase I, II, III, IV



Fuente: Cotter *et al.* (2005)

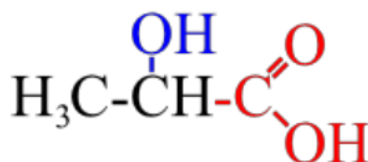
2.9. Ácido Láctico

El ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanoico o ácido hidroxipropiónico), es un compuesto químico líquido, incoloro, soluble en éter, agua y alcohol e insoluble en cloroformo, de punto de fusión bajo en estado puro. Es un ácido carboxílico, con un grupo hidroxilo (dibujado en azul) en el carbono adyacente al grupo carboxilo (dibujado en rojo), lo que lo convierte en un ácido α -hidroxílico (AHA) de fórmula $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$ (Fig.3). En solución puede perder el protón y convertirse en el anión lactato. Posee dos isómeros ópticos: el dextrógiro ácido D-(-)-láctico o d-ácido láctico (en este caso, el ácido (R)-láctico]] y el otro es el levógiro ácido L-(+)-láctico o ℓ -

ácido láctico (en este caso, ácido (S)- láctico), que es el que tiene importancia biológica como afirma Quinteros (2012).

Figura N°4.

Estructura molecular Ac. Láctico



La mayoría de los microorganismos que son productores del metabolito: ácido láctico son en gran medida perteneciente al género *Lactobacillus*, está comprendido por bacterias en forma bacilar de 0,5 – 1,2 x 1,0 – 10,0 μm, comúnmente se asocian en cadenas cortas, son anaerobias facultativas o microaerófilos, catalasa y citocromo negativo, según Foo *et al.* (1993). La temperatura óptima de crecimiento está entre 30 – 40 °C y su hábitat natural es variado, se puede encontrar en el aparato gastrointestinal de mamíferos y aves, incluyen alimentos de origen vegetal y animal.

El ácido láctico es de amplio uso en la industria; debido a sus características benéficas, se utiliza en la industria alimentaria (en bebidas y como conservante), en farmacia, medicina, textilera, en la industria del cuero y para la producción de plásticos biodegradables, tal como menciona Agudelo *et al.* (2015)

2.9.1. Modo de acción del Ácido láctico

Las moléculas de ácido láctico pueden ejercer dos efectos: interfiere con funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, por otro lado, la disociación del ácido láctico provoca el incremento de protones en el interior celular, cuando sucede ello, la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula, lo que genera el detenimiento de la bomba de protones, produciendo la reducción del pH interno, lo que a su vez causa desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad, afirma Milena *et al.* (2009).

2.10. Aseguramiento de la calidad alimentaria

El aseguramiento de la calidad alimentaria se define como el conjunto de requisitos de los sistemas de gestión de la calidad e inocuidad alimentaria para su implementación en la industria, lo que permite ejercer la normatividad de los sistemas de calidad, los cuales son el factor medular en la industria alimentaria.

Este presenta 3 sistemas los cuales son: BPM o GMP en inglés, POES o SSOP's en inglés, y el APPCC o HACCP en inglés.

- a) BPM (Buenas prácticas de manufactura): Son los procedimientos necesarios para lograr alimentos inocuos, saludables y sanos. Estas medidas son necesarias para evitar la contaminación del alimento en las distintas etapas de: almacenamiento, producción y comercialización.
- b) POES (Procedimientos Operativos Estandarizados de Sanitización): El cual describe las tareas de saneamiento, que aseguren la conservación de la higiene, con descripción del procedimiento y asignación de responsables. Estos procedimientos deben aplicarse antes, durante y posteriormente a las operaciones de elaboración.
- c) HACCP (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos): Es un sistema que permite identificar, evaluar y controlar peligros que comprometen la inocuidad de los alimentos. Se basa en 7 principios o pasos del HACCP: Realizar un análisis de los peligros, determinar los puntos críticos de control, establecer límites críticos, establecer un sistema de vigilancia, establecer medidas correctivas, establecer procedimientos de verificación y establecer un sistema de documentación.

Por lo que la calidad implica un conjunto de características de un producto que influyen en su aceptabilidad o desaprobación por parte de los consumidores en tanto que calidad de un alimento es el conjunto de características de este que son exigidas por los consumidores, explícita o implícitamente.

III. ANTECEDENTES

Islam et al. (2011) Mencionan que el quitosano extraído de los desechos del procesamiento de camarones autóctonos puede usarse como un agente antibacteriano eficaz en la industria alimentaria, debido a su gran efectividad contra *Salmonella paratyphi* y *Staphylococcus aureus*, lo cual se midió mediante el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC). Siendo las concentraciones más efectivas las de 288 y 300 ppm para obtener mayor eficiencia en las cepas bacterianas.

Nader, J. (2015) Asegura que la calidad es el conjunto de características de un producto que influyen en su aceptabilidad o desaprobación por parte de los consumidores en tanto que calidad de un alimento es el conjunto de características de este que son requeridas por los consumidores, explícita o implícitamente. Así mismo menciona que el Codex Alimentarius cumple con otras funciones como son: ofrecer una base sólida para el establecimiento de programas de reconocimiento mutuo y programas equivalentes de control de alimentos que faciliten el comercio internacional de los mismos

Moreno (2012) Demostró la reducción de la carga microbiana en la carne de pollo mediante el uso de bactericidas orgánicos para atacar grupos generales de microorganismos utilizando para dicho estudio ácido láctico que afecta principalmente a microorganismos Gram negativos y Nisina que afecta a microorganismos Gram positivos, para lo cual utilizó soluciones de ácido láctico al 1%, 2% y soluciones de Nisina con 300 y 500 ppm, aplicando el método de inmersión con tiempos de 5 y 10 minutos y temperaturas de almacenamiento de 4 y 18 °C, resultando la eliminación de Aerobios en un 99.25% y Coliformes totales en un 99.30%.

Talero (2019) Manifiesta que la aplicación de tres aceites esenciales tales como romero, orégano y eugenol y el ácido láctico en carnes bovinas refrigeradas, posee actividad antimicrobiana. Inicialmente, determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en cada aceite en forma individual y en mezclas con el ácido láctico utilizando cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus y *Salmonella spp.* En donde las muestras con mayores puntajes de aceptabilidad global (más de 6 en la escala hedónica) fueron las tratadas con ácido láctico (0,87% V/V) y la mezcla binaria de láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V). Por lo que sus resultados indican que fue posible extender tres veces más la vida útil de las carnes refrigeradas con la adición de ácido láctico (0,87% V/V) y con la mezcla láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V), en comparación con la muestra sin tratamiento.

Portal (2019) Afirma que el uso de aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis L.*), ajo (*Allium sativum*) y ácido láctico posee acción antibacteriana sobre los aerobios mesófilos totales, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* presentes en la carcasa de cuy para su biopreservación. Determinó que el tratamiento individual con aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” y *Allium sativa* “ajo” no tienen actividad bactericida frente a Mesófilos aerobios totales, *S. aureus*, *E. coli* y Coliformes totales presentes en la carcasa de cuy. Sin embargo, el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” tuvo una actividad bacteriostática frente a *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 1% y frente a *Escherichia coli* en concentraciones de 0.7% y 1%. Sin embargo, el tratamiento combinado de aceites esenciales de romero y ajo con ácido láctico tuvo una actividad bactericida frente Mesófilos aerobios totales, *S. aureus*, *E. coli* y Coliformes totales en concentraciones de 0.7% y 1%.

Arrazola et al. (2016). Afirman que las bacterias ácido lácticas, actúan como medio conservante para embutidos crudos curados, mejorando las características, fisicoquímicas y sensoriales y alargando su vida útil. Ya que demostraron la acción bactericida contra *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus* y aerobios mesófilos, además realizó una prueba sensorial con un panel no entrenado. Mencionan también que el ácido láctico produce un efecto llamado antagonismo láctico que produce la reducción del pH dentro de la pared celular provocando la posterior lisis.

Espino et al. (2010) Aplicaron un método práctico para minimizar los vertimientos al medio ambiente de la solución de metabisulfito de Sodio (MBS) en las camaroneras, la cual consistió en realizar pruebas con distintas soluciones de MBS a diferentes concentraciones y se determinó, por medio de un salinómetro, la variación de las lecturas en dicho instrumento para un rango de disminución de la concentración en 1 %, en donde finalmente elaboraron una tabla con las

dosificaciones para la reactivación de las soluciones teniendo en cuenta la pureza del agente químico empleado, se utilizó a *Litopenaeus vannamei* para realizar el tratamiento químico de este durante la cosecha, a partir de la reactivación de las soluciones usadas.

Loubes et al. (2017) Afirman que la melanosis es un proceso de oscurecimiento en los tejidos externos e internos que afecta notablemente su valor comercial. Para prevenir y evitar este efecto se utiliza metabisulfito de sodio que genera buenos resultados, además de tener un costo adecuado. Por ello aplicaron sustancias reductoras o antioxidantes (antioxidantes fenólicos presentes en extracto acuoso de orégano), e inhibidores de la enzima polifenoloxidasas (4-hexilresorcinol y ficina) para evitar la melanosis en *Pleoticus muelleri*. La acción antimelanósica se logró en los tratamientos con el aditivo 4-hexilresorcinol, considerado GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro), que en dosis reducida (0,0025%) es tan eficaz como el metabisulfito de sodio. Tanto los extractos de orégano como la ficina, han mostrado una efectividad muy inferior al 4-hexilresorcinol.

Mercado (2007) Menciona que para asegurar la inocuidad alimentaria es una pieza clave la prevención y reducción de los riesgos a lo largo de las fases de la producción de alimentos. Para garantizar alimentos inocuos y de calidad es necesario trabajar en tres ámbitos: 1) el diseño de un marco normativo moderno armonizado con la normativa internacional, particularmente el Codex Alimentarius; 2) la prevención de la inocuidad en la cadena de alimentos basada en las Buenas Prácticas tanto de manufactura como de alimentos y 3) el diseño y gestión de un sistema nacional de control de alimentos con instituciones que hagan operativa la legislación, el control, la inspección y la información, educación y comunicación. En este trabajo se presentan tres experiencias desarrolladas en tales ámbitos. La primera muestra tres proyectos desarrollados por la FAO para mejorar capacidades normativas y de gestión del Codex Alimentarius; la segunda, la implementación de la Agencia Chilena para la Inocuidad de los Alimentos; y, la tercera, la experiencia Argentina en el Programa SICOFHOR para el fomento de las Buenas Prácticas en la cadena de hortalizas y frutas.

Hermenejildo *et al.* (2019) Señalaron que los valores obtenidos de metabisulfito de sodio en camarones expedidos en el mercado Caraguay Guayaquil en el mes de enero en modalidad Entero, la muestra número 1 presenta el valor más alto de 36.5 ppm, mientras que la muestra 2 el más bajo de 10.6 ppm. En el mes de febrero en el primer muestreo se obtuvo 26.42 ppm siendo este el valor más bajo, el valor más alto de este mes fue de 30.85 ppm. En el mes de marzo el valor más alto que se obtuvo fue de 28.64 ppm. Por lo que en la presente investigación los valores obtenidos de metabisulfito de sodio se encuentran dentro de los valores aceptados por la Norma Ecuatoriana INEN 456 1980-11 langostinos y camarones congelados (Crustáceos). En el caso del estudio microbiológico los resultados fueron ausencia para los siguientes microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Ríos (2019) Determina que influencia de los tratamientos de ajo y de orégano en las características sensoriales de las conservas de colitas de langostino es aceptada por el consumidor además de proveerle excelentes características químicas y microbiológicas. Para el desarrollo de esta investigación las colitas de langostino fueron sometidas a un tratamiento por inmersión de un minuto con metabisulfito de sodio y agua en una cantidad de 15g/L en una tina de plástico, con la finalidad de evitar la melanosis en el producto final, posterior a ello, la materia prima fue analizada microbiológicamente en donde se halló una pequeña cantidad de microorganismos en las colitas de langostino, sin embargo, la cantidad no sobrepasaba los límites establecidos en la R.M. N°591-2008/MINSA. Luego buscó determinar el método de saborizado con ajo y con orégano más adecuado para la investigación, estudiándose 3 métodos independientes de saborizado por las especias, los cuales fueron: precocción de las colitas por inmersión con las especias, macerado de las colitas en especias y posterior precocción, y por último precocción de las colitas de langostino por inmersión con las especias y posterior macerado con las mismas. Siendo la formulación óptima para el líquido de gobierno, la cual contenía con ajo: 90% de aceite, 7% de ajo y 3% de vinagre; mientras tanto la mejor formulación para el líquido de gobierno con orégano fue: 93% de aceite, 4% de orégano y 3% de vinagre.

Rosado (2018) Determino fenotípicamente la resistencia antimicrobiana de 5 antibióticos usados en acuicultura langostinera, por parte de especies del género *Vibrio*. En donde se colectaron 130 langostinos, procedentes de 17 centros de producción de la región Tumbes, identificando 57 cepas mediante bioquímica presuntiva como *Vibrio spp.* Se realizó dos pruebas bioquímicas para la diferenciación a nivel de especies las cuales fueron: la fermentación de la sacarosa y halotolerancia, obteniéndose: 8 cepas de *Vibrio cholerae*, 3 cepas de *V. mimicus*, 11 cepas de *V. harveyi*, 8 cepas de *V. vulnificus*, 11 cepas de *V. parahaemolyticus* y 16 cepas de *V. alginolyticus*. Se realizo antibiogramas mediante la técnica placa-disco, en donde la Ampicilina fue el antibiótico que más resistencia presentaba (47%), seguido del Cloranfenicol (19%) y Tetraciclina (16%), mientras que Sulfametoxazol + Trimetoprim presentaba alta sensibilidad (95%) pero también resistencia (3%), además de Ciprofloxacino (93% de cepas sensibles) pero sin resistencia. Según el perfil de resistencia, Ampicilina fue el antibiótico que más monoresistencia presentó (16 cepas), y en cuanto a la resistencia múltiple, Ampicilina y Cloranfenicol presentaron 4 cepas con este perfil fenotípico. Finalmente, menciona que hay un bajo riesgo de desarrollo de resistencia antimicrobiana en la acuicultura

Vásquez et al. (2018) Realizaron un análisis microbiológico de productos hidrobiológicos los cuales fueron: pescados y mariscos provenientes de diferentes mercados de la ciudad de Huánuco, hallando prevalencia de *E. coli* y *S. aureus*, estos pueden producir graves enfermedades en los humanos que consumen el pescado y mariscos de manera cruda, y que son expendidos de forma tradicional en estos mercados.

Quispe (2017) Menciona que la aplicación de bacteriocinas como la nisina y ácido láctico mediante tratamientos individuales y combinados puede mejorar la calidad de conservación de *Dosidicus gigas* (calamar gigante) en donde evaluó la acción antimicrobiana del ácido láctico y la nisina en la carga bacteriana de Aerobios Mesófilos Totales y Coliformes Totales en tiempos de 0,24,48 y 72 horas a 3 diferentes concentraciones las cuales fueron: 0.5%, 1% y 1.5% cada una. Donde obtuvo mayor eficacia en la reducción de carga bacteriana de Aerobios Mesófilos Totales y Coliformes Totales, con el tratamiento combinado de nisina más ácido láctico a diferencia de la

aplicación de los tratamientos individuales, lo cual no provocó deterioros en los signos organolépticos y teniendo en cuenta el mantenimiento del pH que fue de 7.

Barboza et al. (2016) Mencionan que las enfermedades transmitidas por alimentos causadas por *Escherichia coli* son una de las enfermedades gastrointestinales más importantes lo que significa un riesgo para la salud pública. La presencia de *E. coli* en aguas o en productos como el camarón indica contaminación fecal, por ello el presente trabajo detectó la presencia de patotipos de *Escherichia coli* (enteropatógenos, enterotoxígenos, enterohemorrágicos y enteroinvasores) en *Farfantepenaeus brasiliensis* y *Litopenaeus schmitti* vendidos en los mercados callejeros de Brasil mediante PCR. Se encontró que la mayoría de las muestras de camarón M (músculo) y del langostino limpio (CS) contenían poblaciones de coliformes termotolerantes menor a 0.3 MPN/g. Sin embargo, sólo una (2.6%) de las 38 muestras de CS compradas en los mercados presentaba una población superior al estándar recomendado por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos, menciona la ICMSF (1986), es decir, 2.1×10^2 MPN/g. Estos hallazgos brindan información útil a las autoridades de salud sanitaria para mejorar la seguridad alimentaria y la salud en la población brasileña.

Ramos et al. (2016). Señalaron que la aplicación del ácido láctico mejora la calidad sanitaria de las conchas de abanico durante su venta en los terminales pesqueros y mercados en Lima (Perú), evaluaron el efecto tiene el ácido láctico (AL) sobre la carga de Aerobios mesófilos (AM), Coliformes totales (CT) y *Staphylococcus sp.*, presentes en las conchas de abanico (CA). Las muestras (CA frescas, desvalvadas y lavadas) fueron obtenidas del terminal pesquero de Villa María del Triunfo en la ciudad de Lima, procedentes de la Bahía de Paracas (Ica). Las cuales fueron enfrentadas a 4 concentraciones de AL (0, 0.5, 1.0 y 1.5 %) durante 0, 24, 48 y 72 horas de exposición a una temperatura de 6 ± 1 °C. Para los recuentos de AM, CT y *Staphylococcus sp.*, utilizaron los métodos AOAC Internacional 990.12, 998.08 y 2003.11 respectivamente. Donde el ácido láctico redujo significativamente los conteos de AM a una concentración de 1.5 % con 72 horas de contacto (reducción promedio: 1.77 log UFC/g), siendo inactivo a partir de la hora 48 (0.5 % de AL) y 72 (1.0 % de AL). La efectividad del AL fue demostrada con los CT a partir de los tratamientos con 1.0 % y 48 horas de contacto, dando resultados negativos (< 1 UFC/g). La carga de *Staphylococcus sp.*, en CA fue controlada a partir de una concentración de 0.5 % de AL

con 48 horas de contacto, siendo muy efectivas a las 24 horas con una concentración de 1.0 y 1.5 % (< 1 UFC/g). Por lo tanto, el ácido láctico es capaz de mejorar la calidad sanitaria de las CA dependiendo de la concentración y el tiempo de contacto en el hielo que se usa para conservar las CA o por aspersión directa sobre las mismas.

Ramos et al. (2015) Realizó un estudio basado en bacteriocinas empleando tratamientos individuales y combinados de nisina y ácido láctico para el aseguramiento de la calidad microbiológica en conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*, L. 1819) donde evaluó la acción antibacteriana de acuerdo al recuento de las unidades formadoras de colonia de *Escherichia coli*, Coliformes totales, Aerobios mesófilos totales y usando para ello placas Petrifilm 3M sometidas a evaluación en tiempos de 0,24,48,72 horas y a diferentes concentraciones cada una de estas menores a 0.5%. Donde obtuvo mayor eficiencia con la combinación del tratamiento de nisina más ácido láctico generando la inhibición de Aerobios mesófilos totales y obteniendo valores permisibles para Coliformes totales, en el caso de la nisina provocó la inhibición bacteriana de *Staphylococcus sp.*

Gracia et al. (2012) Señalaron que una alternativa para el uso de antibióticos comerciales son los extractos de aceites vegetales con actividad antimicrobiana no específica. En el presente estudio, se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) así como la capacidad de inhibición en placa del aceite esencial de orégano *Lippia verlandieri*, con fracción alta en timol (FT) y fracción alta en carvacrol (FC), comparados con antibióticos comerciales, para las bacterias *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Vibrio mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. vulnificus*, aisladas de *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco). También, se determinó la supervivencia de camarones infectados con *Vibrio alginolyticus* tratados con las fracciones FT, FC y Enrofloxacina. Las CMI de la fracción alta en timol (FT) y fracción alta en carvacrol (FC) fueron de 50 a 100 µg/mL, mientras que el antibiótico comercial presentó una CMI de 10 a 50 µg/mL. La bacteria *Vibrio alginolyticus* presentó el más alto ($p \geq 0.05$) grado de sensibilidad (50 a 56 mm de halo de inhibición) con FC y Enrofloxacina. Por otro lado, la supervivencia de camarón fue de 70, 50 y 50% con la aplicación de FC, FT y Enrofloxacina, respectivamente. Ambas fracciones del extracto de aceite esencial de orégano tienen la capacidad de controlar el crecimiento *in vitro* de bacterias patógenas en camarón. Concluyeron que la

fracción alta en carvacrol de aceite esencial de orégano es una alternativa favorable o un complemento a los antibióticos comerciales para el control de *Vibrio spp.*, patógenos en camarones.

Quinteros (2012). Estableció una técnica de depuración que mejora la calidad microbiológica de la concha negra, de manera que cumpla con la norma internacional de calidad microbiológica para estos bivalvos, además de que no afecte sus características organolépticas, ello se pudo obtener mediante el uso del ácido láctico utilizado como bactericida para el sistema estacionario. Se realizó la determinación del tiempo ideal de exposición de la concha negra con el ácido láctico, el cual fue de 24 horas, debido a que en horas posteriores se observa un aumento significativo del pH, lo cual no es favorable para la eliminación de enterobacterias. Obteniendo diferencias significativas entre las conchas sometidas a la acción del agua con ácido láctico y las de control; dándonos como conclusión que el agua desinfectada con ácido láctico es más eficaz para la depuración de las bacterias.

Sotomayor et. al (2003). Determinaron el efecto inhibitor *in vitro* de mezclas de cepas probióticas sobre el crecimiento de *Vibrios* patógenos que fueron aislados del hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*, de larvas y de juveniles, entre los cuales encontramos a las siguientes especies: *Vibrio sp.*, *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *Bacillus sp.* La técnica utilizada para la preparación de cepas probióticas consistió en sembrarlas cada una de forma individual, considerando su fase exponencial en LB (Lennox L. Broth Base) 2% NaCl para obtener una concentración base de 10^5 UFC/ml de cada cepa. El efecto inhibitor consistió en sembrar 1 ml de cada mezcla con 1 ml del patógeno correspondiente en tubos con 10 ml de Caldo LB 2% NaCl, manteniéndolas por 5 horas y media a 28 °C en constante movimiento. Se presentó porcentajes de inhibición significativamente mayores ($p < 0.05$) entre las mezclas que lograron inhibir a la cepa de *Vibrio sp* y *Bacillus sp.*, para el caso de *V. vulnificus*, todas las mezclas probióticas lograron inhibirla en porcentajes mayores al 50%. Por ello, se concluye que las cepas probióticas tienen potencial aplicación para inhibir diversos *Vibrios* patógenos en los sistemas acuícolas.

IV. HIPÓTESIS

4.1. HIPOTESIS GENERAL:

- El Ácido láctico tiene un efecto significativamente favorable sobre la calidad sanitaria de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri* a 4°C.

4.2. HIPOTESIS ESPECIFICAS:

- El ácido láctico a concentraciones de 0,5%, 1% y 1.5% a intervalos de 0, 24, 48, 72 horas y a 4 °C ejerce una acción antibacteriana frente a Aerobios mesófilos y *Escherichia coli*.
- El ácido láctico a concentraciones de 0,5%, 1% y 1.5% ejerce una acción antimicrobiana *in vitro* sobre cepas de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* y *Escherichia coli*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar de ejecución

La parte experimental se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la empresa ALS LS PERU SAC, Calle Russell 193 Urb. La Calera de la Merced Surquillo, Lima, Perú.

5.2. Tipo y diseño de investigación

5.2.1. Tipo de Investigación

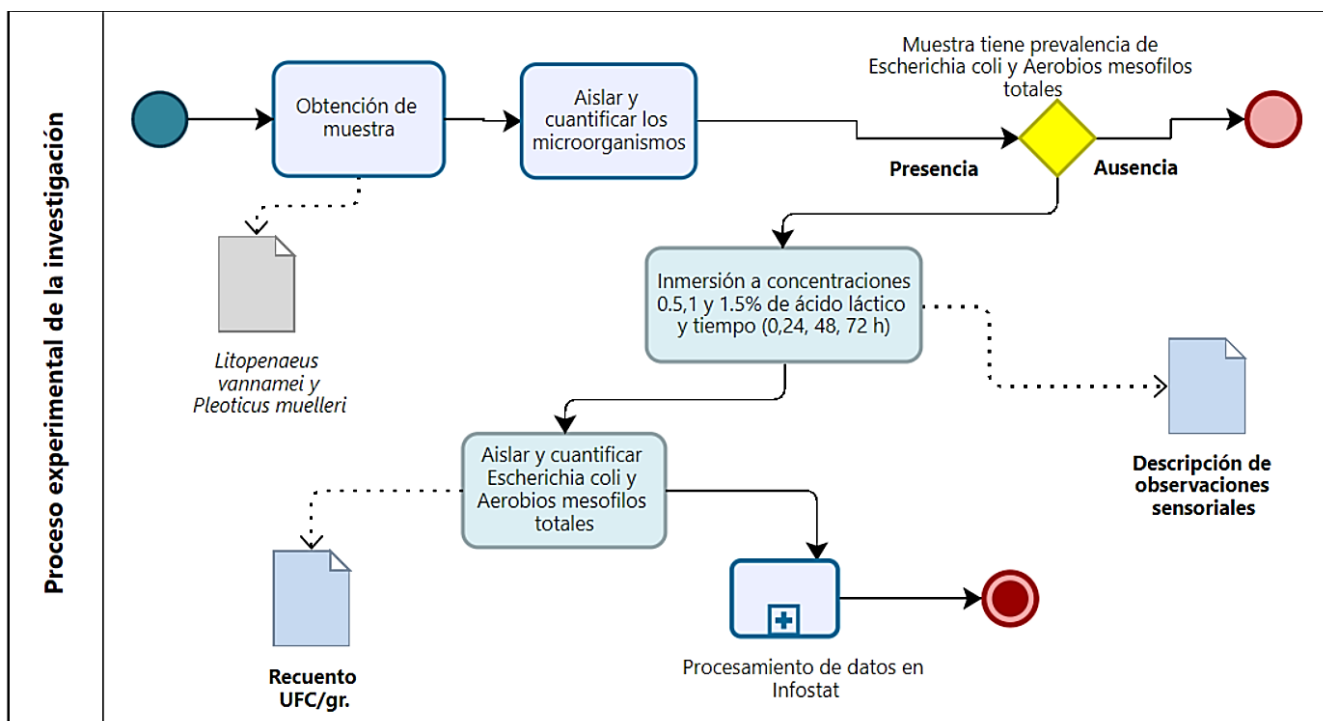
- Investigación aplicada.

5.2.2. Diseño de la investigación

- Diseño experimental

Figura N°5.

Proceso experimental de la investigación



5.3. Variables

5.3.1 Variable independiente: Concentración de ácido láctico (4 niveles), tiempo (4 niveles) y temperatura (4°C)

5.3.2 Variable dependiente: Recuento de Aerobios mesófilos totales, detección de *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Escherichia coli*.

5.4. Operacionalización de las variables

VARIABLES	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	ESCALA DE MEDICION
Concentración de Ácido láctico	Cuantitativo	Porcentaje (%)	Ordinal
Tiempo	Cuantitativo	Horas (H)	Ordinal
Aerobios mesófilos	Cuantitativo	UFC/gr.	Razón
<i>Escherichia coli</i>	Cuantitativo	UFC/gr.	Razón

5.5. Muestreo

Se utilizó únicamente la proteína (sin cascara) de *Litopenaeus vannamei* “Langostino blanco” y *Pleoticus muelleri* “Langostino argentino”, que contó con un peso de 10 kg, los cuales provienen del departamento de Tumbes.

5.6. Procedimiento y análisis de datos

El desarrollo de la tesis consistió en tres etapas las cuales fueron:

ETAPA I: Se utilizaron 300 gr. de cada espécimen de *Litopenaeus vannamei* “Langostino blanco” y *Pleoticus muelleri* “Langostino argentino” (Fig.3-A, B), se determinó la prevalencia de indicadores microbiológicos, fisicoquímicos y sensorial de calidad según R.M. N°591-2008/MINSA. Para las cuales se aplicarán las siguientes metodologías:

Tabla N°5.

Normativas aplicadas para la determinación de microorganismos indicadores de calidad de productos hidrobiológicos.

Recuento de <i>Aerobios mesófilos</i>	ISO 4833-1:2013 (Diag.2)
Enumeración de <i>Escherichia coli</i>	ISO 16649-2:2015 (Diag.3)
Enumeración de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	FDA/BAM Online 8th Rev-2004 (Diag.4)
Detección de <i>Vibrio cholerae</i>	FDA/BAM Online 8th Rev-2004 (Diag.5)
Detección de <i>Salmonella spp.</i>	ISO 6579-1;2017 (Diag.6)
Enumeración de <i>Staphylococcus aureus</i>	ISO 6888-1:2019 (Diag.7)

Tabla N°6.

Normativas aplicadas para la determinación de microorganismos indicadores de calidad de productos hidrobiológicos.

Análisis sensorial de productos hidrobiológicos	ISO 4121:2003
Determinación de sulfitos- Método William Monier	AOAC Official Method 990.28 (Diag.8)

ETAPA II: Se preparó las 4 concentraciones (0, 0.5%, 1 % y 1.5%) de Ácido láctico y se realizó un enfrentamiento antimicrobiano *in vitro* basado en la AOAC Official Method 960.09. para cada una de las cepas: *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* y *Escherichia coli*.

ETAPA III: Se aplico cada uno de los tratamientos por el método de inmersión, se midió el pH en cada uno de los tiempos de evaluación: 0, 24. 48 y 72 horas, se realizaron 3 repeticiones para cada tratamiento, de los cuales se aisló y cuantifico Aerobios mesófilos y *Escherichia coli*. siguiendo con la metodología mencionada previamente. **(Cuadro N°6 y Fig.3-C, D)**

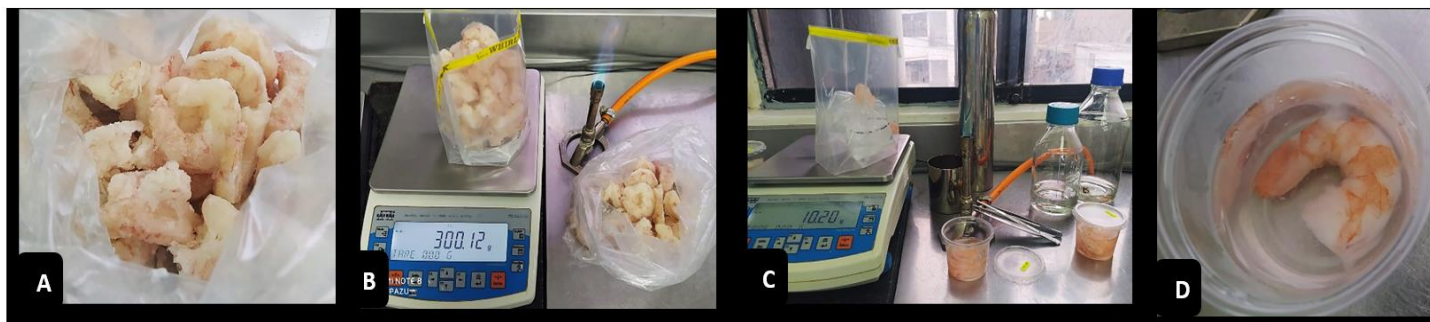
Tabla N°7.

Esquema de los tratamientos realizados para evaluar la carga microbiana con diferentes concentraciones de Ácido láctico en *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri*.

Tiempo (horas)	Concentraciones de Ácido Láctico			Control 0%
	Conc. 0.5%	Conc 1%	Conc 1.5%	
0 – 24- 48- 72	3 unidades de langostinos de 10 gr cada uno. Recuento de Aerobios mesófilos UFC/gr. y Recuento de <i>Escherichia coli</i> UFC/gr.	3 unidades de langostinos de 10 gr cada uno. Recuento de Aerobios mesófilos UFC/gr. y Recuento de <i>Escherichia coli</i> UFC/gr.	3 unidades de langostinos de 10 gr cada uno. Recuento de Aerobios mesófilos UFC/gr. y Recuento de <i>Escherichia coli</i> UFC/gr.	3 unidades de langostinos de 10 gr cada uno. Recuento de Aerobios mesófilos UFC/gr. y Recuento de <i>Escherichia coli</i> UFC/gr.

Figura N°6.

Preparación de los especímenes y tratamientos para la investigación: A: Selección de langostino; B: Pesado; C: Distribución de los especímenes en cada tratamiento; D: Inmersión de Langostino en ácido láctico

**5.7. Aspecto ético**

Se cumplen con los criterios éticos en la utilización de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri*.

VI. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

6.1. RESULTADOS

Se analizaron un total de 192 especímenes de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri* equitativamente, de los cuales se aisló y cuantifico aerobios mesófilos totales y *Escherichia coli*, ambos conservados a una temperatura constante de 4°C, los cuales fueron inmersos a distintas concentraciones de ácido láctico (0%, 0.5%, 1% y 1.5%) en 4 tiempos de exposición: 0, 24, 48 y 72 horas.

En los resultados obtenidos se observó que las 2 variables: concentración (%) y tiempo (h.), tuvieron un alto grado de dispersión, por ende, se aplicó la transformación estadística Log (UFC +1). En todos los casos se analizaron los supuestos estadísticos en donde los errores poseen una distribución normal y existe homogeneidad de varianzas.

Se realizo el recuento de aerobios mesófilos totales y *Escherichia coli* (UFC/gr) luego de la aplicación de los tratamientos mencionados, obteniendo los resultados que a continuación se presentan:

Tabla N°8.

Estadísticos descriptivos del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/gr) de Pleoticus muelleri a 4°C, según los tiempos de evaluación.

Tiempo	Tratamiento	Media	Media Log (UFC/g+1)	Desv. estándar Log (UFC/g+1)	N
0	Ácido láctico al 0%	4.9E+03	3.689	0.145	3
	Ácido láctico al 0.5%	2.2E+03	3.352	0.159	3
	Ácido láctico al 1%	2.0E+03	3.309	0.028	3
	Ácido láctico al 1.5%	1.1E+03	3.049	0.024	3
	Total	2.6E+03	3.35	0.089	12
24	Ácido láctico al 0%	2.0E+04	4.31	0.126	3
	Ácido láctico al 0.5%	1.0E+03	2.999	0.142	3
	Ácido láctico al 1%	1.9E+02	2.269	0.218	3
	Ácido láctico al 1.5%	1.3E+02	2.098	0.174	3
	Total	5.4E+03	2.919	0.165	12
48	Ácido láctico al 0%	1.4E+05	5.145	0.138	3
	Ácido láctico al 0.5%	2.7E+02	2.437	0.275	3
	Ácido láctico al 1%	2.2E+01	1.347	0.875	3
	Ácido láctico al 1.5%	1.0E+00	0	0	3
	Total	3.5E+04	2.232	0.322	12
72	Ácido láctico al 0%	3.1E+05	5.484	1.389	3
	Ácido láctico al 0.5%	2.5E+03	3.39	0.065	3
	Ácido láctico al 1%	3.4E+01	1.536	0.234	3
	Ácido láctico al 1.5%	1.0E+00	0	0	3
	Total	7.7E+04	2.603	0.422	12
Total	Ácido láctico al 0%	1.2E+05	18.629	1.797	12
	Ácido láctico al 0.5%	1.5E+03	12.179	0.641	12
	Ácido láctico al 1%	5.7E+02	8.461	1.354	12
	Ácido láctico al 1.5%	3.1E+02	5.147	0.198	12
	Total	3.0E+04	44.415	0.998	48

Nota: 6.1.1. Esta tabla muestra el efecto del ácido láctico sobre el recuento de aerobios mesófilos totales de Pleoticus muelleri a 4°C, según los tiempos de evaluación.

Tabla N°9.

Análisis de varianza (ANOVA) para el efecto del ácido láctico sobre el recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/gr) de Pleoticus muelleri a 4°C, según los tiempos de evaluación.

Origen	Suma de cuadrados Tipo III	gl	Cuadrados medios	F-valor	p-valor
Tiempos (h)	9.91	3	7.17	24.15	<0.0001
Concentración (%)	71.32	3	3.30	173.88	<0.0001
Tiempos (h) *Concentración (%)	26.28	9	23.77	21.36	<0.0001
Error	4.38	32	2.92		
Total	111.88	47	0.14		

R al cuadrado =0.96

Tabla N°10.

Prueba de Comparación con LSD de Fisher del recuento de Aerobios mesófilos totales (UFC/gr) de Pleoticus muelleri a 4°C, las concentraciones de Ácido láctico y los tiempos de observación

Tiempo(h)	Concentración	Medias	E.E.	
48	0	5.12	0.21	A
72	0	5.03	0.21	A
24	0	4.3	0.21	B
0	0	3.67	0.21	B C
72	0.5	3.39	0.21	C D
0	0.5	3.33	0.21	C D
0	1	3.31	0.21	C D
0	1.5	3.05	0.21	D
24	0.5	2.98	0.21	D E
48	0.5	2.39	0.21	E F
24	1	2.23	0.21	F
24	1.5	2.07	0.21	F G
72	1	1.49	0.21	G H
48	1	1.01	0.21	H
48	1.5	0	0.21	I
72	1.5	0	0.21	I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Gráfico N°1.

Efecto del ácido láctico sobre el recuento bacteriano de Aerobios mesófilos totales en *Pleoticus muelleri* a 4°C: A) 0%, B) 0.5%, C) 1% y D) 1.5%.

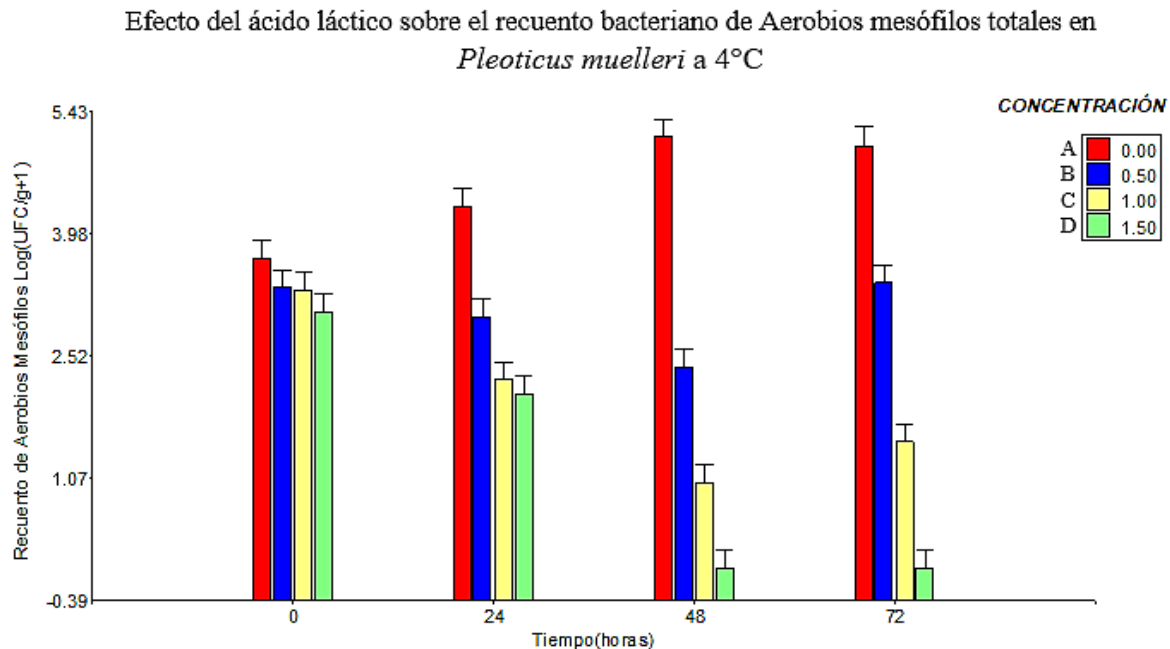


Gráfico N°2.

Efecto del ácido láctico sobre el recuento bacteriano de *Escherichia coli* en *Pleoticus muelleri* a 4°C: A) 0%, B) 0.5%, C) 1% y D) 1.5%

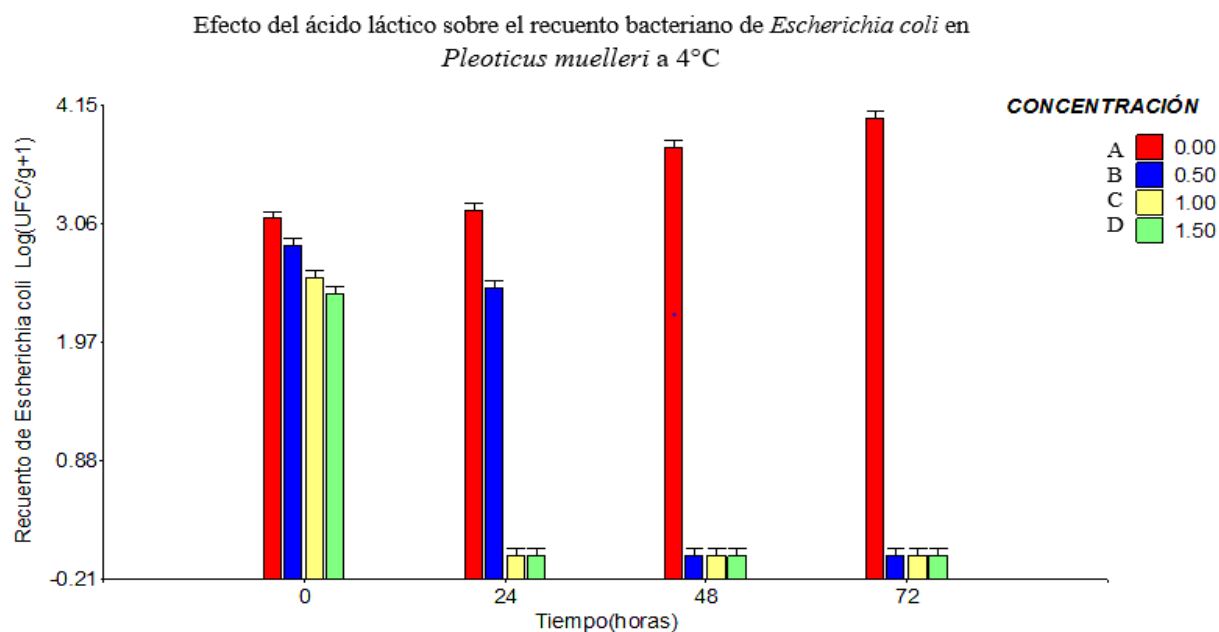


Tabla N°11.

Estadísticos descriptivos del recuento de Escherichia coli (UFC/gr) de Pleoticus muelleri a 4°C, según los tiempos de evaluación.

Tiempo	Tratamiento	Media	Media Log (UFC/g+1)	Desv. estándar Log (UFC/g+1)	N
0	Ácido láctico al 0%	1.4E+03	3.111	0.216	3
	Ácido láctico al 0.5%	7.5E+02	2.859	0.143	3
	Ácido láctico al 1%	3.8E+02	2.569	0.101	3
	Ácido láctico al 1.5%	2.6E+02	2.417	0.083	3
	Total	7.0E+02	2.739	0.136	12
24	Ácido láctico al 0%	1.6E+03	3.189	0.201	3
	Ácido láctico al 0.5%	3.3E+02	2.476	0.246	3
	Ácido láctico al 1%	1.0E+00	0.000	0.000	3
	Ácido láctico al 1.5%	1.0E+00	0.000	0.000	3
	Total	4.9E+02	1.416	0.112	12
48	Ácido láctico al 0%	6.0E+03	3.772	0.095	3
	Ácido láctico al 0.5%	1.0E+00	0.000	0.000	3
	Ácido láctico al 1%	1.0E+00	0.000	0.000	3
	Ácido láctico al 1.5%	1.0E+00	0.000	0.000	3
	Total	1.5E+03	0.943	0.024	12
72	Ácido láctico al 0%	1.1E+04	4.035	0.000	3
	Ácido láctico al 0.5%	1.0E+00	0.000	0.000	3
	Ácido láctico al 1%	1.0E+00	0.000	0.000	3
	Ácido láctico al 1.5%	1.0E+00	0.000	0.000	3
	Total	2.7E+03	1.009	0.000	12
Total	Ácido láctico al 0%	5.0E+03	14.107	0.512	12
	Ácido láctico al 0.5%	2.7E+02	5.335	0.388	12
	Ácido láctico al 1%	9.5E+01	2.569	0.101	12
	Ácido láctico al 1.5%	6.7E+01	2.417	0.083	12
	Total	1.4E+03	24.428	0.271	48

Nota: 6.1.2. Esta tabla muestra el efecto del ácido láctico sobre el recuento de Escherichia coli de Pleoticus muelleri a 4°C, según los tiempos de evaluación.

Tabla N°12.

Análisis de varianza (ANOVA) para el efecto del ácido láctico sobre el recuento de Escherichia coli (UFC/gr) de Pleoticus muelleri a 4°C, según los tiempos de evaluación.

Origen	Suma de cuadrados Tipo III	gl	Cuadrados medios	F-valor	p-valor
Tiempos (h)	25.09	3	7.96	678.59	<0.0001
Concentración (%)	68.04	3	8.36	1840.10	<0.0001
Tiempos (h) *Concentración (%)	26.28	9	22.68	236.94	<0.0001
Error	0.39	32	2.92		
Total	119.82	47	0.01		

R al cuadrado =1.00

Tabla N°13.

Prueba de Comparación con LSD de Fisher del recuento de Aerobios mesófilos totales (UFC/gr) de Pleoticus muelleri a 4°C, según las concentraciones de Ácido láctico y los tiempos de observación.

Tiempo (h)	Concentración	Medias	E.E.	
72	0	4.04	0.06	A
48	0	3.77	0.06	B
24	0	3.19	0.06	C
0	0	3.11	0.06	C
0	0.5	2.86	0.06	D
0	1	2.57	0.06	E
24	0.5	2.48	0.06	E
0	1.5	2.42	0.06	E
48	1.5	0	0.06	F
72	1	0	0.06	F
24	1.5	0	0.06	F
72	1.5	0	0.06	F
48	0.5	0	0.06	F
72	0.5	0	0.06	F
24	1	0	0.06	F
48	1	0	0.06	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Gráfico N°3.

Efecto del ácido láctico sobre el recuento bacteriano de Aerobios mesófilos totales en *Litopenaeus vannamei* a 4°C: A) 0%, B) 0.5%, C) 1% y D)

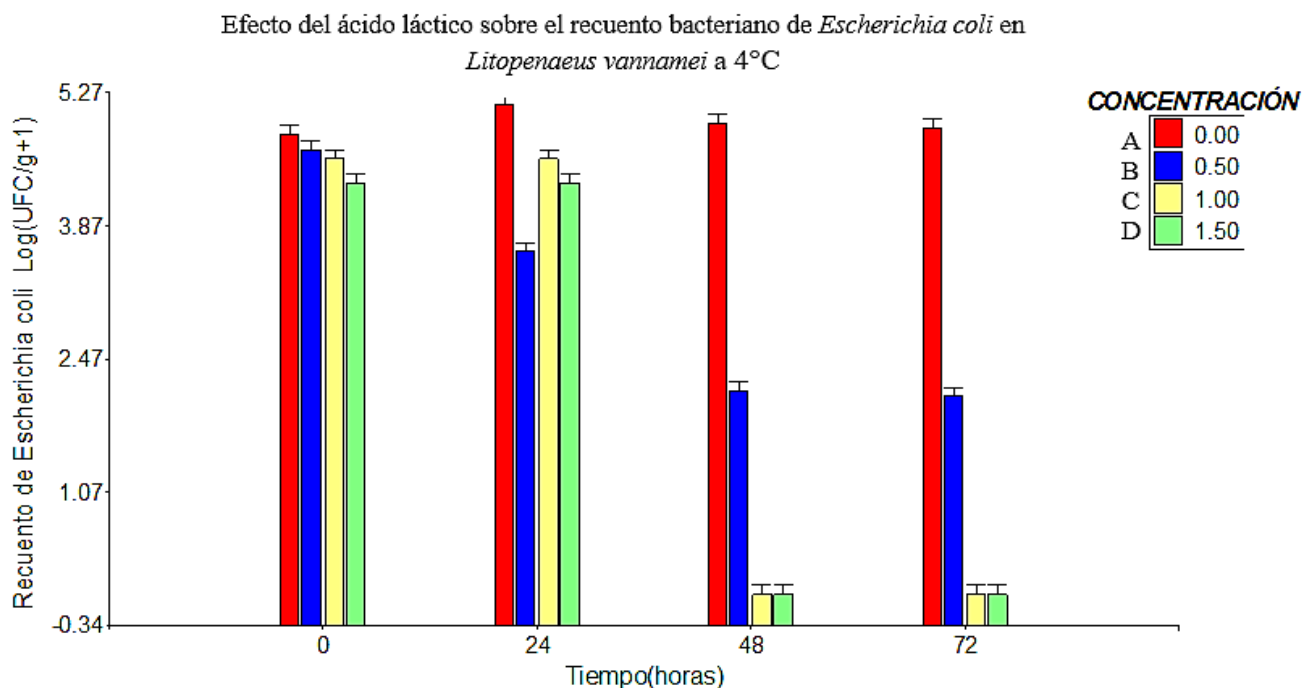


Gráfico N°4.

Efecto del ácido láctico sobre el recuento bacteriano de *Escherichia coli* en *Litopenaeus vannamei* a 4°C: A) 0%, B) 0.5%, C) 1% y D) 1.5%.

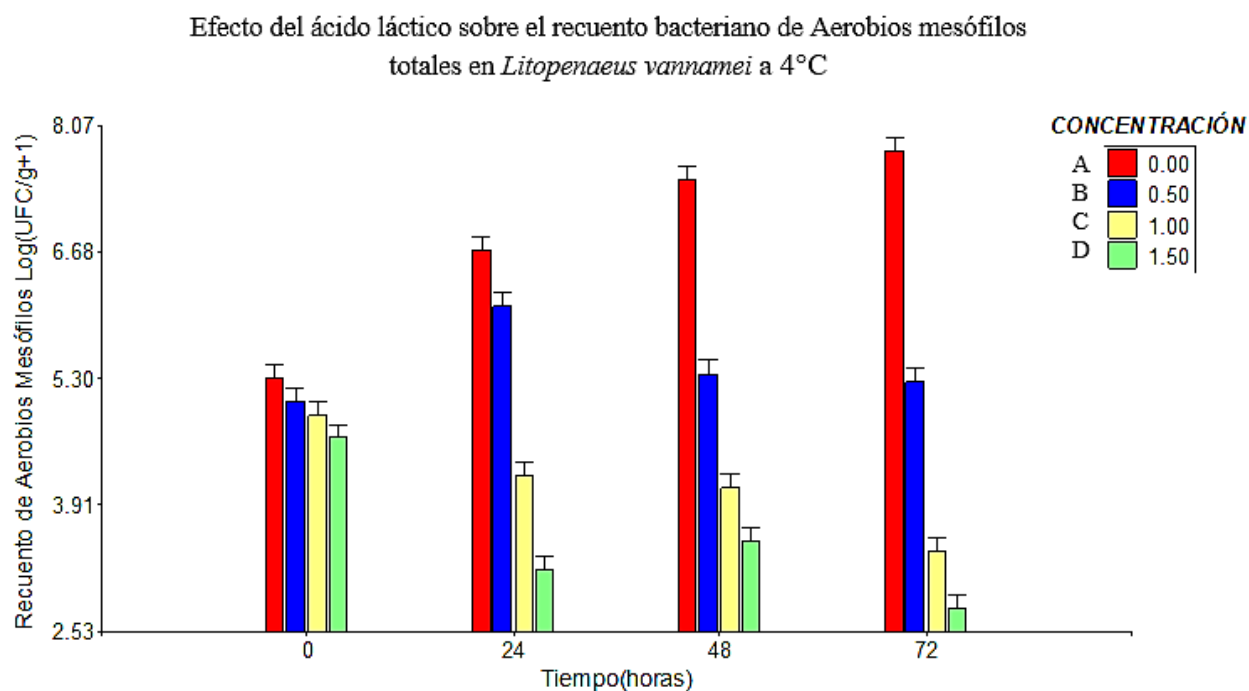


Tabla N°14.

Estadísticos descriptivos del recuento de aerobios mesófilos totales en Litopenaeus vannamei a 4°C, según los tiempos de evaluación

Tiempo	Tratamiento	Media	Media Log (UFC/g+1)	Desv. estándar Log (UFC/g+1)	N
0	Ácido láctico al 0%	2.0E+05	5.304	0.0147	3
	Ácido láctico al 0.5%	1.2E+05	5.043	0.2719	3
	Ácido láctico al 1%	7.9E+04	4.896	0.0163	3
	Ácido láctico al 1.5%	4.6E+04	4.648	0.1587	3
	Total	1.1E+05	4.973	0.1154	12
24	Ácido láctico al 0%	6.9E+06	6.703	0.4101	3
	Ácido láctico al 0.5%	1.5E+06	6.084	0.3898	3
	Ácido láctico al 1%	1.7E+04	4.234	0.1070	3
	Ácido láctico al 1.5%	1.7E+03	3.202	0.1601	3
	Total	2.1E+06	5.056	0.2668	12
48	Ácido láctico al 0%	2.9E+07	7.467	0.0109	3
	Ácido láctico al 0.5%	2.2E+05	5.347	0.0360	3
	Ácido láctico al 1%	1.3E+04	4.103	0.0796	3
	Ácido láctico al 1.5%	4.9E+03	3.519	0.4671	3
	Total	7.4E+06	5.109	0.1484	12
72	Ácido láctico al 0%	6.3E+07	7.783	0.1597	3
	Ácido láctico al 0.5%	1.8E+05	5.266	0.0227	3
	Ácido láctico al 1%	4.0E+03	3.404	0.4975	3
	Ácido láctico al 1.5%	6.5E+02	2.781	0.2100	3
	Total	1.6E+07	4.809	0.2225	12
Total	Ácido láctico al 0%	2.5E+07	27.257	0.595	12
	Ácido láctico al 0.5%	5.1E+05	21.741	0.720	12
	Ácido láctico al 1%	2.8E+04	16.638	0.700	12
	Ácido láctico al 1.5%	1.3E+04	14.150	0.996	12
	Total	6.4E+06	79.786	0.753	48

Nota: 6.1.3. Esta tabla muestra el efecto del ácido láctico sobre el recuento de aerobios mesófilos totales de Litopenaeus vannamei a 4°C, según los tiempos de evaluación.

Tabla N°15.

Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el efecto del ácido láctico sobre el recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/gr) de Litopenaeus vannamei a 4°C, según los tiempos de evaluación.

Origen	Suma de cuadrados Tipo III	gl	Cuadrados medios	F-valor	p-valor
Tiempos (h)	0.62	3	6.52	3.30	<0.0001
Concentración (%)	75.91	3	0.21	404.70	<0.0001
Tiempos (h) *Concentración (%)	21.31	9	25.30	37.86	<0.0001
Error	2.0	32	2.37		
Total	99.84	47	0.06		

R al cuadrado =0.98

Tabla N°16.

Prueba de Comparación con LSD de Fisher del recuento de Aerobios mesófilos totales (UFC/gr) de Litopenaeus vannamei a 4°C, las concentraciones de Ácido láctico y los tiempos de observación

Tiempo. h	Concentración	Medias	E.E.	
72	0	7.78	0.14	A
48	0	7.47	0.14	A
24	0	6.7	0.14	B
24	0.5	6.08	0.14	C
48	0.5	5.35	0.14	D
0	0	5.3	0.14	D E
72	0.5	5.27	0.14	D E
0	0.5	5.04	0.14	D E F
0	1	4.9	0.14	E F
0	1.5	4.65	0.14	F G
24	1	4.23	0.14	G H
48	1	4.1	0.14	H
48	1.5	3.52	0.14	I
72	1	3.4	0.14	I
24	1.5	3.2	0.14	I
72	1.5	2.78	0.14	J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla N°17.

Estadísticos descriptivos del recuento de Escherichia coli (UFC/gr) de Litopenaeus vannamei a 4°C, según los tiempos de evaluación.

Tiempo	Tratamiento	Media	Media Log (UFC/g+1)	Desv. estándar Log (UFC/g+1)	N
0	Ácido láctico al 0%	7.2E+04	4.84	0.140	3
	Ácido láctico al 0.5%	4.7E+04	4.67	0.027	3
	Ácido láctico al 1%	3.9E+04	4.58	0.113	3
	Ácido láctico al 1.5%	2.1E+04	4.32	0.017	3
	Total	4.4E+04	4.60	0.074	12
24	Ácido láctico al 0%	1.5E+05	5.15	0.016	3
	Ácido láctico al 0.5%	5.1E+03	3.60	0.113	3
	Ácido láctico al 1%	3.9E+04	4.58	0.168	3
	Ácido láctico al 1.5%	2.1E+04	4.32	0.081	3
	Total	5.3E+04	4.41	0.094	12
48	Ácido láctico al 0%	9.3E+04	4.96	0.455	3
	Ácido láctico al 0.5%	1.4E+02	2.13	0.427	3
	Ácido láctico al 1%	1.0E+00	0.00	0.155	3
	Ácido láctico al 1.5%	1.0E+00	0.00	1.024	3
	Total	2.3E+04	1.77	0.515	12
72	Ácido láctico al 0%	9.0E+04	4.90	0.365	3
	Ácido láctico al 0.5%	1.5E+02	2.08	0.637	3
	Ácido láctico al 1%	1.0E+00	0.00	0.361	3
	Ácido láctico al 1.5%	1.0E+00	0.00	0.113	3
	Total	2.3E+04	1.74	0.369	12
Total	Ácido láctico al 0%	1.0E+05	19.845	0.975	12
	Ácido láctico al 0.5%	1.3E+04	12.478	1.204	12
	Ácido láctico al 1%	1.9E+04	9.159	0.797	12
	Ácido láctico al 1.5%	1.0E+04	8.633	1.235	12
	Total	3.6E+04	50.115	1.053	48

Nota: 6.1.4. Esta tabla muestra el efecto del ácido láctico sobre el recuento de Escherichia coli de Litopenaeus vannamei a 4°C, según los tiempos de evaluación.

Tabla N°18.

Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el efecto del ácido láctico sobre el recuento de Escherichia coli (UFC/gr) de Litopenaeus vannamei a 4°C, según los tiempos de evaluación

Origen	Suma de cuadrados Tipo III	gl	Cuadrados medios	F-valor	p-valor
Tiempos (h)	90.81	3	12.87	1092.68	<0.0001
Concentración (%)	60.05	3	30.27	722.56	<0.0001
Tiempos (h) *Concentración (%)	42.23	9	20.02	169.36	<0.0001
Error	0.89	32	4.69		
Total	193.97	47	0.03		

R al cuadrado =1.00

Tabla N°19.

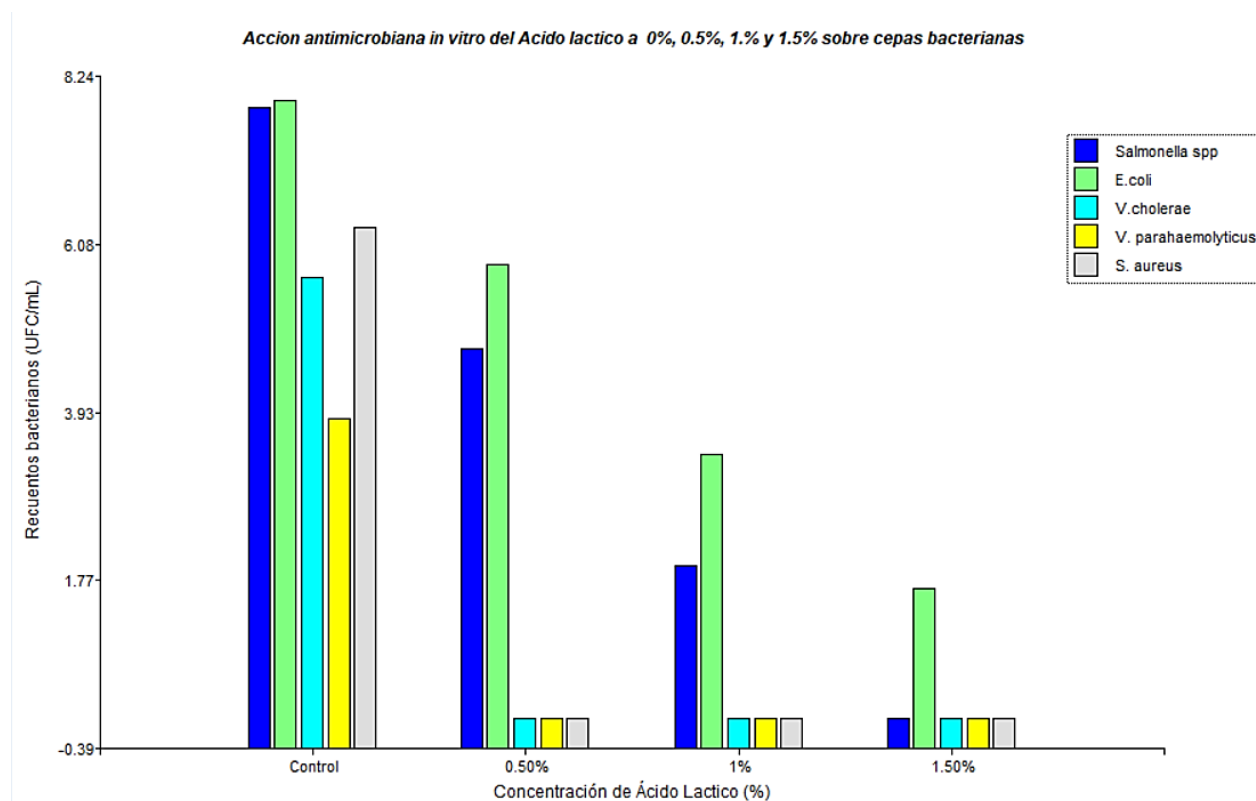
Prueba de Comparación con LSD de Fisher del recuento de Escherichia coli (UFC/gr) de Litopenaeus vannamei a 4°C, las concentraciones de Ácido láctico y los tiempos de observación

Tiempo. h	Concentración	Medias	E.E.	
24	0	5.15	0.1	A
48	0	4.96	0.1	A B
72	0	4.9	0.1	A B C
0	0	4.84	0.1	B C D
0	0.5	4.67	0.1	C D
24	1	4.58	0.1	D E
0	1	4.58	0.1	D E
24	1.5	4.32	0.1	E
0	1.5	4.32	0.1	E
24	0.5	3.6	0.1	F
48	0.5	2.13	0.1	G
72	0.5	2.08	0.1	G
72	1.5	0	0.1	H
48	1.5	0	0.1	H
72	1	0	0.1	H
48	1	0	0.1	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.0$)

Gráfico N°5.

Acción antimicrobiana in vitro del Ácido láctico sobre cepas bacterianas de Salmonella spp., Staphylococcus aureus, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus y Escherichia coli: A) 0%, B) 0.5%, C) 1% y D) 1.5%.



Nota: 6.6.5 El grafico muestra la acción antimicrobiana in vitro del Ácido láctico sobre cepas bacterianas de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Escherichia coli*: A) 0%, B) 0.5%, C) 1% y D) 1.5%.

Tabla N°20.

Niveles de metabisulfito de sodio en Pleoticus muelleri y Litopenaeus vannamei a 4 °C, antes de la aplicación de los tratamientos.

<i>Muestra</i>	<i>metabisulfito de sodio (ppm)</i>
<i>Litopenaeus vannamei</i>	10 ppm
<i>Pleoticus muelleri</i>	20 ppm

Tabla N°21.

Medidas del pH en Litopenaeus vannamei a 4 °C.

Tiempo/ Concentración	Ácido láctico			
	0%	0.5%	1%	1.5%
0 horas	6.5	6	5.7	5
24 horas	7	5.8	5.4	4.8
28 horas	7.2	5.8	5.3	4.7
72 horas	7	5.5	5	4.5
PROMEDIO	6.9	5.8	5.4	4.8

Tabla N°22. *Medidas del pH en Pleoticus muelleri a 4 °C.*

Tiempo/ Concentración	Ácido láctico			
	0%	0.5%	1%	1.5%
0 horas	7	6.4	6	5.3
24 horas	7	6	5.5	5
28 horas	7.2	5.8	5.3	4.8
72 horas	7	5.5	5	4.5
PROMEDIO	7	6	5.5	5

6.1. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la **Tabla N°8**, se puede verificar que, el recuento bacteriano de Aerobios mesófilos totales en *Pleoticus muelleri*, a las 24 horas de evaluación fue de: 1.0E+03 UFC/gr, 1.9E+ 02 UFC/gr y 1.3E+02 UFC/gr para las diferentes concentraciones de ácido láctico: 0.5%,1% y 1.5% respectivamente, en comparación al tratamiento control que expresa un recuento de 2.0E+04 UFC/gr, observando una reducción significativa de 2Log. Se encontró también recuentos de 3.4E+01 UFC/gr y <10 UFC/gr en las concentraciones de 1% y 1.5% de ácido láctico respectivamente, siendo el recuento de la muestra control: 1.2E+05 UFC/gr a las 72 horas, se confirma una reducción considerable de la carga microbiana (**Fig.14**). Así mismo la **Tabla N°9**, demuestra que existe una interacción de variables ($p<0.05$) ($F=23.77$), en función al tiempo de evaluación y a las concentraciones de ácido láctico sobre el recuento bacteriano de Aerobios Mesófilos Totales UFC/gr de *Pleoticus muelleri*

Para el caso de la **Tabla N°10**, se observa la diferencia de medias desde las 24 horas en la concentración 0.5% (E) de ácido láctico, la cual conlleva a una comparación de medias teniendo en cuenta las concentraciones en función al tiempo y en comparación con el control, cabe resaltar que no se obtienen diferencias significativas de medias en cuando a la concentración 1% y 1.5% a las 48h y 72 h (I y H).

De igual manera en el **Gráfico N°1**, se evidencia el crecimiento exponencial del control (A) a través del tiempo de evaluación y una reducción significativa, en el caso de las concentraciones de 1% y 1.5% (C y D) de ácido láctico, en cuanto a la concentración de 0.5% se observa una reducción significativa a las 48 horas (B) la cual no se mantiene constante a través del tiempo.

En la **Tabla N°11**, se observa que el recuento bacteriano de *Escherichia coli* en *Pleoticus muelleri*, a las 24 horas de evaluación fue de: 3.3E+ 02 UFC/gr para 0.5% de ácido láctico, sin embargo en las concentraciones de 1% y 1.5% el resultado fue <10 UFC/gr, en comparación con el tratamiento control que expresa un recuento de 1.6E+03 UFC/gr, observando una reducción significativa desde la concentración de 0.5% y una reducción absoluta desde 24 horas para las concentraciones 1% a 1.5%, manteniéndose de la misma forma para los 2 tiempos posteriores (48 h y 72 h)(**Fig.15**). Y en la **Tabla N°12** existe una interacción de variables ($p<0.05$) ($F=236.94$), en función al tiempo

de evaluación y a las concentraciones de ácido láctico sobre el recuento bacteriano de *Escherichia coli* UFC/gr de *Pleoticus muelleri*.

En el caso de la **Tabla N°13** se puede constatar la diferencia de medias en el control que varía en función al tiempo (A, B, C), ello debido al aumento de la carga microbiana, mientras que desde la concentración 0.5% de ácido láctico (D) a las 0 horas de evaluación se puede verificar una distinción que conlleva a la obtención de medias iguales (E y F) debido a la reducción absoluta de la carga microbiana lograda con las concentraciones de 1% y 1.5% desde las 24 horas de evaluación hacia adelante.

Lo cual, se confirma en el **Gráfico N°2**, en donde se demuestra el crecimiento del control (A) con respecto al tiempo y una reducción absoluta a las 24 horas, con las concentraciones de 1% y 1.5% (C y D) de ácido láctico que se mantiene a través del tiempo, en cuanto a la concentración de 0.5% (B) se evidencia una reducción significativa a las 24 horas, mientras que desde las 48 h y 72 h la reducción es absoluta.

En la **Tabla N°14**, se puede verificar que el recuento bacteriano de aerobios mesófilos en *Litopenaeus vannamei*, a las 48 horas de evaluación fue de $2.2E+05$ UFC/gr para la concentración 0.5% de ácido láctico, mientras que para la concentración 1% y 1.5% se obtuvo recuentos de $1.3E+04$ UFC/gr y $4.9E+03$ UFC/g, por lo que se observa una reducción de 1 Log para cada una de las concentraciones, en función al control que tuvo un recuento de $2.9E+07$ UFC/gr. Cabe mencionar que a las 72 horas de evaluación la concentración de 1.5% de ácido láctico obtuvo un recuento de $6.5E+02$ UFC/gr a comparación del control que obtuvo $6.3E+07$ UFC/gr, esto muestra una reducción considerable (4Log) de la carga bacteriana de aerobios mesófilos totales (**Fig.17**). Así mismo la **Tabla N°15**, demuestra que existe una diferencia estadística significativa y una interacción de variables ($p < 0.05$) ($F = 37.86$), en función al tiempo de evaluación y a las concentraciones de ácido láctico sobre el recuento bacteriano de aerobios mesófilos UFC/gr de *Litopenaeus vannamei*.

En la **Tabla N°16** se puede observar la primera diferenciación de las medias en la concentración de 1.5% a 0 horas de evaluación (G), mientras que en 24 horas de evaluación existe una diferencia de medias desde la concentración de 0.5% (C), en el tiempo de 48 horas, sin embargo, no se observa una diferencia de medias (H) en las concentraciones de 1 y 1.5%, mientras que con la concentración 1.5% (J) a las 72 h se observó una diferencia de medias con respecto a otras

concentraciones, esto debido a que hubo una reducción considerable de la carga bacteriana de aerobios mesófilos totales en *Litopenaeus vannamei*.

Del mismo modo, en el **Gráfico N°3**, se confirma el crecimiento del control (A) con respecto al tiempo y una reducción significativa en el caso a las concentraciones de 1% y 1.5%, sin embargo, para el caso de la concentración 1.5% de ácido láctico (D), se obtuvo mayor eficiencia a las 72 horas con respecto al control, en cuanto a la concentración de 0.5% (B) no se registra una variación significativa en cuanto a la reducción de la carga bacteriana a las 48 horas y 72 horas.

Como se puede observar en la **Tabla N°17**, el recuento bacteriano de *Escherichia coli* en *Litopenaeus vannamei*, a las 48 horas de evaluación fue de $1.4E+02$ UFC/gr para concentración 0.5% de ácido láctico, mientras que, para la concentración 1% y 1.5% se obtuvo recuentos <10 UFC/gr lo que indica una reducción absoluta de la carga microbiana en función al control que obtuvo un recuento de $9.3E+04$ UFC/gr (**Fig.18**). En la **Tabla N°18**, se observa que existe una diferencia estadística significativa y una interacción de variables ($p<0.05$) ($F=169.36$), en función al tiempo de evaluación y a las concentraciones de ácido láctico sobre el recuento bacteriano de *Escherichia coli* UFC/gr de *Litopenaeus vannamei*.

Se puede observar la primera diferenciación de las medias en la concentración de 0.5% (F) a las 24 horas de evaluación mientras que, la concentración 1% y 1.5% (H) no poseen medias significativamente diferentes ya que, en los tiempos de evaluación 48 h y 72 h se obtiene una reducción absoluta en la carga microbiana en función al control (**Tabla N°19**).

Del mismo modo, en el **Gráfico N°4**, se evidencia un crecimiento continuo del control (A) con respecto al tiempo y una reducción significativa en el caso a las concentraciones de 1% y 1.5%, sin embargo, para el caso de la concentración 0.5% de ácido láctico (B), se obtuvo mayor eficiencia a las 48 horas con respecto al control, pero no se observa una reducción significativa a las 48 horas y 72 horas.

El **Gráfico N°5**, demuestra la obtención de una eficiencia antimicrobiana *in vitro* del Ácido láctico contra cepas de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Escherichia coli*, lo que se manifiesta desde la concentración 0.5% para las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*, la cual se mantiene en las siguientes concentraciones (1% y 1.5%) (**Fig.20-E, A y B**) para el caso de las cepas de

Salmonella spp y *Escherichia coli*, se observa una reducción significativa en la concentración de 1.5% de ácido láctico (**Fig.20-D y C**). Cabe mencionar que no se encontró prevalencia de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*, en *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri*.

Los niveles de metabisulfito de sodio fueron de 10 ppm para *Litopenaeus vannamei* y 20 ppm para *Pleoticus muelleri*, en ambos casos no excedió el límite permisible (<150 ppm) mencionado por la Resolución Ministerial N°591-2008-MINSA (**Tabla N°20**), en cuanto al pH para *Litopenaeus vannamei* este fue reduciéndose según cada concentración obteniendo los promedios de 6.9, 5.8, 5.4 y 4.8 para las concentraciones de 0%, 0.5%, 1% y 1.5% respectivamente, hubo una ligera variación según el tiempo de exposición, logrando la acidificación del medio (**Tabla N°21**). En el caso de *Pleoticus muelleri* mostro una ligera variación con respecto al control llegando a acidificar ligeramente el pH del medio, obteniendo los promedios de 7, 6, 5.5, y 5 para las concentraciones de 0%, 0.5%, 1% y 1.5% respectivamente, se observó variaciones de 0.2 a 0.3 en relación al tiempo de exposición. (**Tabla N°22**).

Al inicio de la investigación, el análisis sensorial para *Pleoticus muelleri* tuvo un puntaje de 7 en la escala de evaluación, para los atributos de: aspecto, color, textura, olor y sabor (**Tabla N°23**); a partir de las 48 horas, la muestra control empezó a tener modificaciones, categorizándola como: producto con un grado tolerable de frescura, ligeros daños y ligeros signos de descomposición, obteniendo el puntaje de 6, mientras que en los individuos tratados con ácido láctico a 0.5%, 1% y 1.5%, no se observaron modificaciones desfavorables en las características organolépticas de la matriz, en comparación al control, sin embargo a las 72 horas de evaluación en la concentración de 1.5% evidencia una mejora considerablemente en el aspecto, textura, sabor y olor. (**Fig.16**).

Para el caso de *Litopenaeus vannamei* al inicio de la investigación todos los especímenes fueron categorizados como: producto con un grado aceptable de frescura, obteniendo puntajes entre 7 y 8 en los diferentes atributos de la evaluación sensorial correspondiente (**Tabla N°24**), no obstante a las 48 horas de evaluación la muestra control empezó a mostrar modificaciones desfavorables en cuanto a textura, aspecto, color, olor y sabor por lo que se le categorizo como: producto con un grado tolerable de frescura, ligeros daños y ligeros signos de descomposición, obteniendo puntajes entre 5 y 6, resultados muy similares en la concentración de 0.5% de ácido láctico. A las 72 horas de evaluación la muestra control mostro una descomposición considerable categorizándola como:

producto con bajo grado de frescura, producto rechazable, con visibles signos de descomposición y daños, siendo puntuado con 4 en la categoría de aspecto, a diferencia de las concentraciones de 1% y 1.5% que lograron conservar las características propias del langostino obteniendo puntajes entre 7 y 8 en todos los atributos de la evaluación sensorial (**Fig. 19**).

VII. DISCUSIÓN

La aplicación de bacteriocinas como el ácido láctico, provocó una reducción en la carga bacteriana (Aerobios mesófilos totales y *Escherichia coli*) de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri*, así mismo Quispe (2017), Moreno, P (2012), Ramos (2015), Ramos *et al.* (2016) y Portal (2019), afirman la eficacia del ácido láctico sobre los microorganismos que contaminan matrices como: *Dosidicus gigas*, *Gallus gallus*, *Argopecten purpuratus* y *Cavia porcellus*.

Por lo cual, la concentración del ácido láctico es un factor que interviene en la acción antimicrobiana, en la parte experimental del trabajo de investigación, las concentraciones: 1% y 1.5% provocaron la reducción de la carga bacteriana de Aerobios mesófilos totales y una inhibición total contra *Escherichia coli* en *Pleoticus muelleri*, mientras que la concentración de 0.5% de ácido láctico para *Escherichia coli* en *Litopenaeus vannamei*, no tuvo una eficiencia significativa con relación al control y en cuanto a los Aerobios mesófilos totales, hubo un ligero incremento muy cercano al control, sin embargo, los valores finales fueron menores que el control, así como se menciona en Ramos (2015) la concentración de 1.5% de ácido láctico logro una reducción significativa de Aerobios mesófilos totales y una inhibición en el recuento de Coliformes totales, mientras que a partir de la concentración de 0.5% hubo una reducción en el recuento *Staphylococcus sp.* en *Argopecten purpuratus* (concha de abanico), lo que concuerda con Ramos *et al.* (2016) que obtuvo una reducción en el recuento de Coliformes Totales ($p < 0,05$) con los tratamiento de 0.5%, 1% y 1.5% de ácido láctico, para el caso de *Escherichia coli* resulto < 1 UFC/mL (ausente) a partir de la concentración 0.5% hacia delante. Quispe (2017) afirma que existe una reducción de la carga bacteriana de Aerobios Mesófilos totales y Coliformes Totales con 0.8% de Ácido láctico en *Dosidicus gigas* (calamar gigante), así mismo Portal (2019) evidenció que el ácido láctico al 1% presenta actividad antibacteriana frente a aerobios mesófilos, *S. aureus* y *E.*

coli, sin embargo, a la misma concentración solo presenta acción bacteriostática frente a Coliformes totales.

Moreno (2012) comprobó que el ácido láctico al 1% provoca una acción positiva en la vida útil de la carne de pollo, mediante la reducción de *E. coli*, permitiendo retardar su crecimiento durante un periodo de 7 días, lo que concuerda con el presente trabajo de investigación en donde el ácido láctico al 1% logro una reducción significativa sobre *Escherichia coli*, cabe destacar que la concentración más eficiente fue de 1.5%, a pesar de ser una concentración mayor, no provoco efectos desfavorables, ni modificaciones organolépticas en la matriz de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri*, sin embargo para Moreno (2012) el ácido láctico al 2%, provoco la modificación de las características físicas del producto, por lo que la determinación de la concentración de ácido láctico a utilizar es fundamental ya que, este no debe modificar las características físicas y organolépticas del producto.

Existen diversos métodos para la aplicación del ácido láctico, uno de ellos es por inmersión, usado en el presente trabajo, así como Ramos *et al.* (2016) y Ramos (2015) con *Argopecten purpuratus* (concha de abanico) y Moreno (2012) con la carne de pollo, no obstante, otro método es la aspersión, aplicación utilizada por Quispe (2017) con *Dosidicus gigas* (calamar gigante), obteniendo con ambos métodos una eficiencia significativa en la reducción de la carga microbiana de cada una de las matrices mencionadas.

El tiempo de exposición es un factor que influye en la cantidad del efecto antibacteriano que posee el ácido láctico, considerando que la variable de temperatura (4°C) fue constante para la investigación, los resultados obtenidos a las 24 horas de exposición no mostraron una reducción microbiana significativa con la concentración de 0.5% de ácido láctico en *Litopenaeus vannamei* para Aerobios mesófilos totales y *Escherichia coli*, siendo confirmado por Ramos (2015) que afirma que el recuento de Coliformes totales en conchas de abanico no fue reducido significativamente en la concentración de 0.5% en un tiempo de exposición de 72 horas, pero el valor final fue menor en relación con la muestra control, seguido que no se inactivó la carga microbiana a las 24 horas de tratamiento, ello considerando únicamente con el tratamiento con ácido láctico. Otro lado, el tiempo de exposición de 48 y 72 horas, logró una reducción en función al control, similar comportamiento en el caso de *Pleoticus muelleri* para Aerobios mesófilos totales, sin embargo, para *Escherichia coli* se logró una inhibición total en las 48 horas y 72 horas

de exposición, igual que Ramos *et al.* (2016) quien afirma que, en 72 horas de exposición a una concentración de 1.5% de ácido láctico se reduce significativamente los conteos de Aerobios mesófilos totales, además logro la inactivación (< 10 UFC/g) de Coliformes Totales a las 48 horas exposición, en donde las concentraciones estaban entre 1.0 – 1.5 %.

Todos estos autores mencionados han demostrado la efectividad del ácido láctico en la mejora de la calidad sanitaria de los productos hidrobiológicos más comercializados en Perú, considerando que es una matriz que tiende a degradarse más rápido por lo tanto es más susceptible a contaminaciones cruzadas, el uso de ácido láctico es una alternativa que puede reemplazar los conservantes químicos como el metabisulfito de sodio.

Por otro lado, la metodología utilizada para el aislamiento y cuantificación de bacterias propias de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri*, fue realizada en el marco de la Resolución Ministerial N°591-2008-MINSA, que nos brinda las unidades para la expresión de resultados, en la presente investigación se utilizaron normas ISO y FDA/BAM, siendo el APS (Agua Peptonada Salina) el diluyente principal, a diferencia de Ramos *et al.* (2016) que, para el aislamiento y cuantificación de aerobios mesófilos, coliformes totales y *Staphylococcus sp.* usó métodos de la AOAC International, empleando placas Petrifilm® y agua peptonada al 0.1 % como solución diluyente. La misma metodología aplicada por Quispe (2017) en *Dosidicus gigas* (calamar gigante), la cual menciona que el uso de Petrifilm® reduce el rango de error en el experimento, dato que confirma Moreno, P (2012) y Ramos (2015), por lo tanto, en la presente investigación se aplicó la incertidumbre propia de cada método, para cumplir con el aseguramiento de la calidad que nos exige dicha normativa, lo que permite la obtención de datos correctos y errores estándares normales.

VIII. CONCLUSIONES

- El ácido láctico es capaz de mejorar la calidad sanitaria de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri* a 4°C dependiendo de la concentración y del tiempo al que se someta, siendo una alternativa para el reemplazo del uso de aditivos químicos tales como el metabisulfito de sodio.
- Se comprobó que el tratamiento de 1.5% de Ácido láctico aplicado en *Pleoticus muelleri* a 4°C logro la inhibición (<10 UFC/gr.) de Aerobios mesófilos totales a partir de las 48 horas, en cuanto a *Escherichia coli* el tratamiento de 0.5% logro la inhibición (<10 UFC/gr.) desde las 48 horas de evaluación. Cabe mencionar que la concentración de 1.5% mejoró las características organolépticas de *Pleoticus muelleri* a las 72 horas de exposición.
- Se confirmo que el tratamiento de 1.5% de Ácido láctico aplicado en *Litopenaeus vannamei* a 4°C reduce la carga bacteriana de Aerobios mesófilos totales a partir de las 24 horas (reducción promedio: 3.5 log UFC/g), ello con relación al control, que empezó a incrementar su carga de forma exponencial desde las 24 horas de exposición hacia adelante. En el caso de *Escherichia coli* el tratamiento de 1% (<10 UFC/gr.) logro la inhibición desde 48 horas de evaluación, sin embargo, el tratamiento de 0.5%, no tuvo eficiencia bacteriana significativa contra Aerobios mesófilos totales y *Escherichia coli*. Es importante resaltar que la concentración de 1.5% mejoró las características organolépticas, obteniendo puntajes de 7 y 8, dentro de la evaluación sensorial.
- Se demostró que desde la concentración de 0.5% de Ácido láctico se obtuvo una eficiencia antibacteriana *in vitro* del 99.99% frente a las cepas de *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Escherichia coli*.

IX. RECOMENDACIONES

- Realizar un historial de la carga bacteriana de *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri*, para poder determinar el comportamiento microbiano de los individuos.
- Realizar controles microbiológicos de cada una de las soluciones y medios de cultivo empleados en el desarrollo de la investigación.
- Seleccionar individuos *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri* del mismo tamaño y peso.
- Cerciorarse de que los individuos *Litopenaeus vannamei* y *Pleoticus muelleri*, no hayan sido sometidos a ningún proceso de sanitización, ya que podría influenciar en la carga bacteriana.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agasan, A., Kornblum, J., Williams G, Pratt Ch, Fleckenstein P, Wong, M. Ramon A. (2002) Profile of *Salmonella enterica* subsp. Enterica (Subspecies I) serotype 4,5, 12: Strains causing food-borne infections in New York City. J Clin Microbiol; 40: 1924-1929
- Agudelo, N., Torres, M., Álvarez, C., & Vélez, L. (2015). Bacteriocinas Producidas Por Bacterias Ácido-Lácticas y su aplicación en la Industria De Alimentos. Alimentos Hoy, 23(36), 63–72.
- Alimentarios, A. (1984). Aditivos Alimentarios. Volumen XIV.
- Álvarez, M. (2009). Evaluación de tres metodologías de tratamiento con metabisulfito de sodio en camarones enteros para prevenir melanosis. Honduras: Editores Honduras S.A.
- AOAC, (1984). “Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists”. 12th Ed. Washington. USA.
- Arrazola, G., Alvis, A., & Pérez, A. (2016). Bacterias ácido-lácticas como aditivo protector de microorganismos no deseables en carnes curadas. Vitae, 23, S165–S169
- Barbosa, J., Ribeiro, F., Lavezzo, F., Barbosa, M. C., Rossi, M., & Do Amaral, A. (2016). Detection of pathogenic *Escherichia coli* and microbiological quality of chilled shrimp sold in street markets. Letters in Applied Microbiology, 62(5), 372–378.
- Beristain, C., Palou, E. & López, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. Temas selectos de ingeniería de alimentos, 6(2), 64-78.
- Bertuche, C., Fischbach, A., Fernández, M. & Piñero, R. (2000). Langostino (*Pleoticus muelleri*. Síntesis del estado de las pesquerías marítimas argentinas y de la Cuenca del Plata. Años 1997-1998, con una actualización de 1999. Publicaciones Especiales, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata.

- Bertuche, D., Fischbach, A. Roux, M. & Piñero, R. (2000). Langostino (*Pleoticus muelleri*). Síntesis del estado de las Pesquerías Marítimas Argentinas y de la Cuenca del Plata. Años 1997-1998, con la actualización de 1999. INIDEP, Mar del Plata
- Brazo, V. (2003). Manual de Alergia Clínica. Ed. Masson S.A., Barcelona.
- Canizalez, A., Gonzales, E., Vidal E., Flores, H. & León, N. (2013). Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern. México. *International Journal of Food Microbiology*. 164(1):36-45
- Carrillo, O., Vega-Villasante, F., Nolasco, H., & Gallardo, N. (2000). Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento de camarón. *Avances en Nutrición Acuícola*.
- Chavesta, C., & Ramírez, O. (2016). UNIVERSPlan de Negocio para Determinar la Viabilidad de un Centro de Cultivo de Langostinos en Estanques Continentales en la Provincia de Paita
Plan de Negocio para Determinar la Viabilidad de un Centro de Cultivo de Langostinos en Estanques Continentales.
- Díaz, M., Martínez, T., Montero, M. Gómez, J. Zamorano, R. & Martínez Á. (2003). Estudios de los agentes conservantes e inhibidores de la melanosis en crustáceos, Ed. Junta de Andalucía Consejería de Agricultura y Pesca, Andalucía.
- Espino, R., Flores, E., & Pérez, M. (2010). Minimización de los vertimientos de solución de metabisulfito de Sodio en las camaroneras. 5–9.
- Espino, R., Flores, E., & Pérez, M. (2010). Minimización de los vertimientos de solución de metabisulfito de Sodio en las camaroneras. 5–9.
- FAO (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- FAO (2019). Programa de información de especies acuáticas (*Penaeus vannamei*) (Boone, 1931)".

- FAO (2020) Aquaculture topics and activities. Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO -Roma.
- FAO. (2019). FAO Aquaculture Network. FAO Aquaculture Newsletter, 60, 72.
- Food and Drug Administration. (2013). Codex general standard for food additives- Sodium metabisulfite Revision:2013
- GESTION. (2018). ComexPerú: Exportaciones de langostinos peruanos alcanzan récord. Pag.1-3
- González, E., Gómez, M. & Jiménez, Z., Bacteriocinas de probióticos. Revista Salud Pública y Nutrición, 4(2), 2003.
- González-Martínez, B.E.; Gómez-Treviño, M.; Jiménez-Salas, Z., Bacteriocinas de probióticos. Revista Salud Pública y Nutrición, 4(2), 2003.
- Grande, M., Lucas, R., Abriouel, H., Ben-Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez, M., Valdivia, E.& Gálvez, A. (2005). Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. International Journal of Food Microbiology, 104: 289-297.
- Hermenejildo, M., & Pérez, E. (2017). Evaluación de la calidad microbiológica y los niveles de metabisulfito de sodio en camarones expedidos en el Mercado Caraguay Guayaquil-Ecuador (Doctoral dissertation, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas).
- Hettiarachchi, G., & Hettiarachchi, C. (2005). Isolation of the bacterium, *Vibrio harveyi* from cultured shrimp, *Penaeus monodon* and production of vaccines against the bacterium. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 33(4), 257–263.
- Ibarra-Menéndez, A. & Ibarra-Menéndez, R. (2012). Recuperación del metabisulfito sódico en las cosechas del camarón y su efecto nocivo al agua en el medio ambiente costero. Desarrollo Local Sostenible, 5(14).
- InfoAgro. (2019). Langostinos y camarones de Argentina a Brasil. Agroruralnoticia.
- Instituto Nacional de Pesca (2018) Camarón blanco del pacífico. Gobierno de México.

- Islam, M., Masum, M., & Mahub, R. (1970). In vitro antibacterial activity of shrimp chitosan against *Salmonella paratyphi* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of the Bangladesh Chemical Society*, 24(2), 185–190.
- Joeger, R., Sartori, C. & Kniel, K. (2009) Comparison of Genetic and Physiological Properties of *Salmonella enterica* Isolates from Chickens Reveals One Major Difference Between Serovar Kentucky and Other Serovars: Response to Acid. *Foodborne pathogens and disease*; 6: 503-512.
- Koneman, W., & Allen, S. (2008). *Diagnostico microbiológico /Microbiological diagnosis: Texto y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. médica panamerican
- Lake, R., Hudson A. & Cressey, P. (2002). Risk profile of *Salmonella* (non typhoid) in poultry (Whole and Pieces).
- Loubes, S. Vidales & C. Almada (2017) Evaluación sensorial de crustáceos tratados con inhibidores de la melanosis
- Mercado, Carmen E. (2007). Los ámbitos normativos, la gestión de la calidad y la inocuidad alimentaria: una visión integral. *Agroalimentaria*, 12(24), 119-131.
- Miget, R. (1991). *Microbiology of crustacean processing: shrimp, crawfish, and prawns. Microbiology of marine food products*. Springer, Boston, MA: 65-87.
- Milena, M., Suárez, H. Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido-lácticas en la conservación de la carne.
- Mondragón, G., Escalante, P., Osuna, J., Ibarra, V., Morlett, J., Aguilar, C., & Rodríguez, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64–70.
- Monroy, M., Castro, T., Fernández F. & Mayorga, L. (2009). Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos*, 73: 63-72.

- Moreno, C. (2012) Efecto combinado de La Nisina y Ácido Láctico en la vida útil de carne de pollo. Tesis de Licenciatura en ingeniería de alimentos – facultad de ciencia e ingeniería en alimentos -UTA. Ecuador. 1-30.
- Nader, J. (2015). La calidad. aplicación de sus principios a los alimentos. su visualización por distintos sectores. el enfoque del Codex Alimentarius. FAO, 1–6.
- Norzagaray, M., Espinosa, L, Apún, J. & Muñoz, P. (2011) Análisis numérico para la determinación de efectos geográficos en dos variedades de tilapias *Oreochromis niloticus* (*Stirling* y *Chitralada*). *Revistaaquatic.com*
- Ogawa et. al. (1987). Inhibition of Shrimp Melanosis by 4-Hexylresorcinol. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1, (1). The Haworth Press BDN. (1995). Melanosis en Crustáceos. *Food Tech*. Ref. 951. Boletín informativo/Marzo.
- Portal (2019). Actividad antimicrobiana mediante tratamiento combinado de aceite esencial de “romero” (*Rosmarinus officinalis L.*), “ajo” (*Allium sativum*) y ácido láctico para la bioconservación de carne de cuy (*Cavia porcellus*).
- PRODUCE. (2016). Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2013. Dirección de Estudios y Derechos Pesqueros y Acuícola. 193.
- Quinteros, D. (2012). Escuela Superior Politécnica Del Litoral: Diseño de un Sistema de Depuración para Concha Prieta usando Ácido Láctico
- Quispe, C. (2017). Conservación de calamar gigante (*Dosidicus gigas* Orbigny 1835) por tratamiento combinado de nisina y ácido láctico a 6oc -Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en. Tesis Para Título Profesional De Licenciada En Biología, 1, 67.
- Ramos, J. (2015). Tratamientos combinados de nisina y ácido láctico para el aseguramiento de la calidad microbiológica de conchas de abanico (*Argopecten purpuratus L.* 1819). Tesis. Universidad Ricardo Palma. Perú

- Ramos, J., Silva, M., Ramos, F., & Agurto, T. (2016). Efecto de la nisina sobre la calidad sanitaria de conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*) extraídas de la bahía de Paracas, Perú. 23, 120–122.
- Regulación Comunidad Europea. (2016). metabisulfito de sodio. Madrid: UE. Revista Departamento de Salud y Servicios de New Jersey. metabisulfito de sodio. New Jersey Department, 6.
- Ríos, M. (2019). Características sensoriales de las conservas de colitas de langostino (*Litopenaeus vannamei*) Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa Tesis.
- Rosado, A. (2018). Resistencia Antimicrobiana de bacterias del género *Vibrio* en Langostino Blanco (*Litopenaeus vannamei*) en centros de cultivo de la Región Tumbes.
- Sae-leaw, T., & Benjakul, S. (2019). Prevention of melanosis in crustaceans by plant polyphenols: A review. Trends in Food Science and Technology, 85(December 2018).
- Sotomayor, M., & Balcázar del Piñal, J. (2003). Inhibición de *Vibrios* patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. AquaTIC: Revista Electrónica de Acuicultura, 19, 9–15
- Taboada, J. C. (2019). Incidencias de tallas por cosecha en *Litopenaeus vannamei* (bonne 1931) “langostino blanco” procesado en la empresa marinasol – Tumbes. 114.
- Talero, M. (2019). Utilización de aceites esenciales en combinación con ácido láctico para extender la vida útil de carnes bovinas- Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos. 1–155.
- Vásquez, J., Tasayco, R., Chuquiyauri, M., & Apac, S. (2018). Evaluación microbiológica de pescados y mariscos expendidos en mercados de la ciudad de Huánuco. Investigación Valdizana, 12(2), 75–82.
- Velázquez, G., Collado, R., Cruz, A., Velasco, A. & Rosales, J. (2019). Reacciones de hipersensibilidad a aditivos alimentarios. Revista alergia México, 66(3), 329-339

XI. ANEXOS

A. Ficha técnica del Ácido láctico



HENAN JINDAN LACTIC ACID TECHNOLOGY CO., LTD
19C, Lianmeng International Business Tower,
No. 125 Huanghe Road, Zhengzhou, Henan, China
Tel: +86 371-60136136 Fax: +86 371-60136138
E-mail: jindanla@jindanlactic.com Website: www.jindanlactic.com

Lactic Acid 88% Excellent, Color < 50APHA

Revised Date: 15-01-2014

Product code	JD-LA88-02
Chemical name	L-(+)-Lactic Acid, (S)-2-hydroxy- propanoic acid
CAS Number	79-33-4 ; 50-21-5 (general CAS number)
EEC food additive number	E270
Description	The lactic acid, produced by fermentation, is slight yellowish to colorless, syrupy and hygroscopic liquid with slightly acid odor. The product is GRAS.
Molecular formula	C ₃ H ₅ O ₃
Molecular weight	90.08
Stereochemical purity(L-isomer)	Min 97%
Content	Min 88%
Color, fresh	Max 50APHA
Sulphate	Max 10ppm
Chloride	Max 10ppm
Sulphated ash	Max 0.05%
Iron	Max 10ppm
Total heavy metals	Max 10ppm
Lead	Max 0.5ppm
Arsenic	Max 1ppm
Mercury	Max 1ppm
Cyanide	Max 1ppm
Limit of Citric, Oxalic, Phosphoric and Tartaric Acid	Passes test
Reducing sugars	Passes test

Remarks:

- 1.) 1ppm = 1mg/kg = 0.0001%
- 2.) Sulphated ash = Residue on ignition

Packaging:

- 1.) 800 x 25kg polydrums = 20mts in one 20'FCL and palletized, totally 20 pallets, 10 pallets of 1200kg each, the other 10 pallets of 800kg each.
- 2.) 80 x 250kg polydrums = 20mts in one 20'FCL and palletized, totally 20 pallets of 1000kg each.

Factory Add: No. 08 Jindan Avenue, Dancheng, Henan, China
Tel: +86 394-3195398 Fax: +86 394-3195766



HENAN JINDAN LACTIC ACID TECHNOLOGY CO., LTD
19C, Lianmeng International Business Tower,
No. 125 Huanghe Road, Zhengzhou, Henan, China
Tel: +86 371-60136136 Fax: +86 371-60136138
E-mail: jindanla@jindanlactic.com Website: www.jindanlactic.com

- 3.) 20 x 1200kg IBC = 24mts in one 20'FCL.
- 4.) 23mt flexitank in one 20'FCL.
- 5.) 25mt ISO tanks (The supply and delivery of ISO tanks is not stable.)

Storage Condition:

Keep well closed in its original packing in a cool & dry place.
Shelf life: 2 years.

Applications:

- 1.) brewery (beer, cider, sake...), confectionery (highly-bioled candy...), bakery (sour dough, rye bread, wheat bread...), pickles (olives, gherkins, pearl onions...), meat products (sausage, collagen casing), dairy products (cottage cheese, cheese cake, yogurt, ice cream...), margarine, butter, dips and dressings, sauces (ketchups, mayonnaise...), blending food ingredients...
- 2.) plant/house/hospital cleaning products or detergents (descaler, soap-scum remover, anti-bacterial agent), leather(tannery), cigarette(tobacco), olar wafer(to remove bonding adhesive), textiles, coatings ...
- 3.) animal feed (drinking water, premixtures...), seaweed growing ...
- 4.) personal care products (face creams, lotions, shampoo, hair dyes, soaps...)
- 5.) pharmaceutical ingredient (dermatological treatment...)

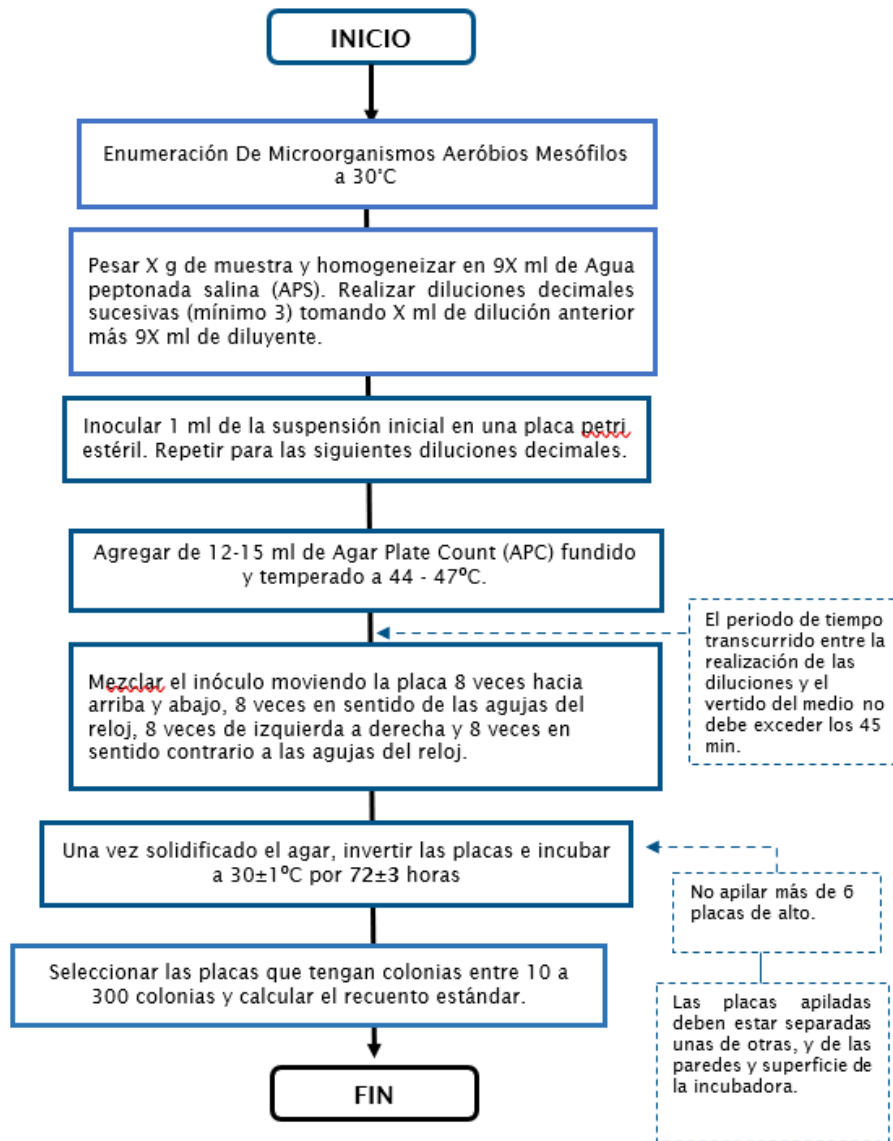
Warranty:

This information herein is offered as a guide and is believed to be accurate and reliable as of the date of the printing.

If you have any special requirements which are not listed in our specification, please confirm before your ordering.

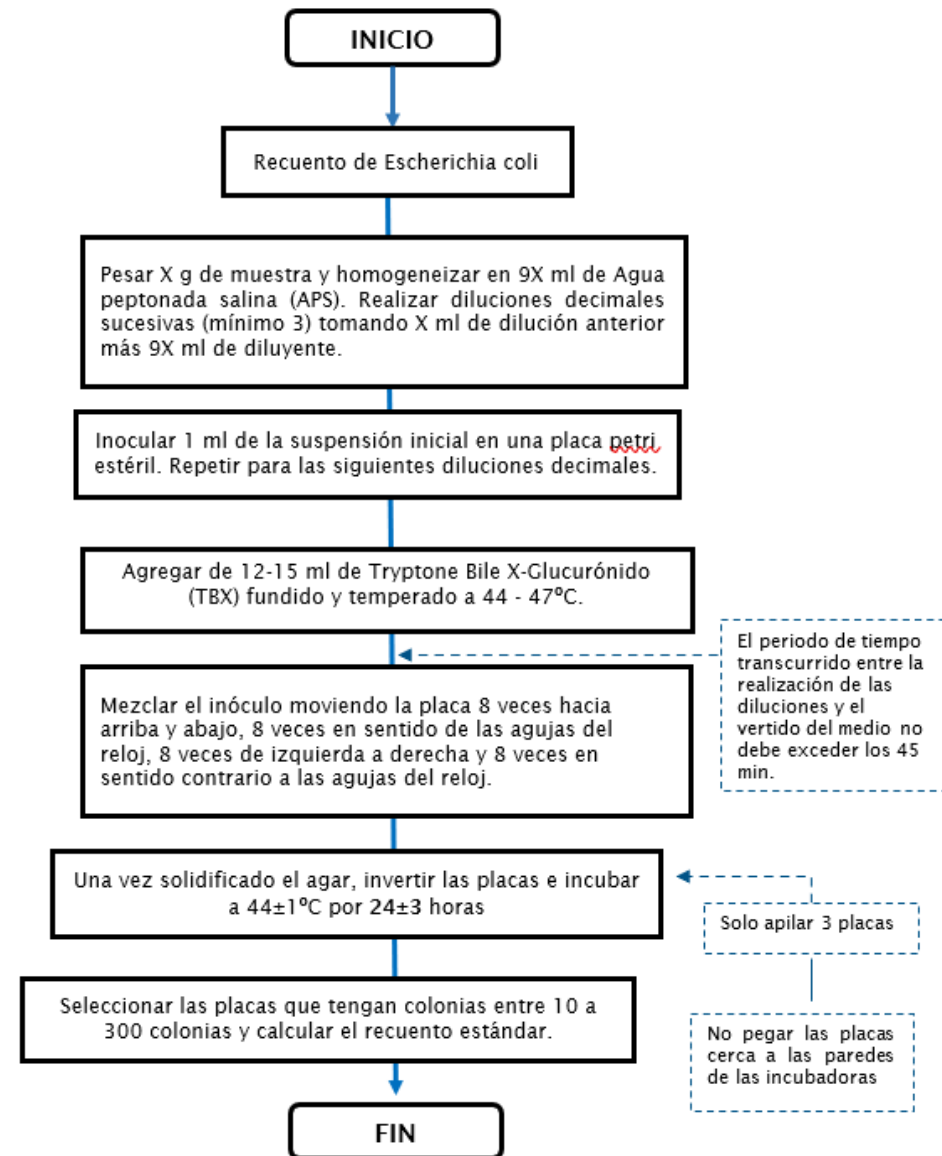
Factory Add: No. 08 Jindan Avenue, Dancheng, Henan, China
Tel: +86 394-3195398 Fax: +86 394-3195766

Figura N°7. Enumeración de microorganismos aerobios mesófilos totales – ISO 4833-1:2013



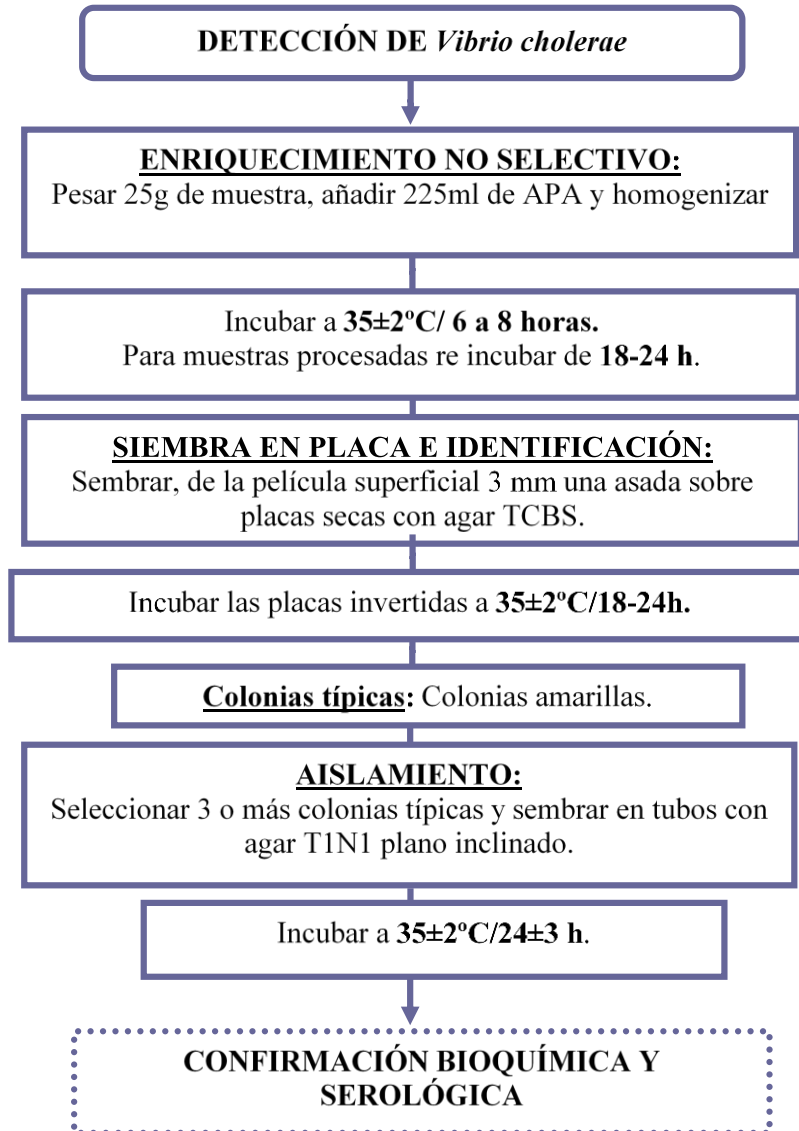
Fuente: ALS LS PERU

Figura N°8. Recuento de *Escherichia coli* – ISO 16649-2:2015



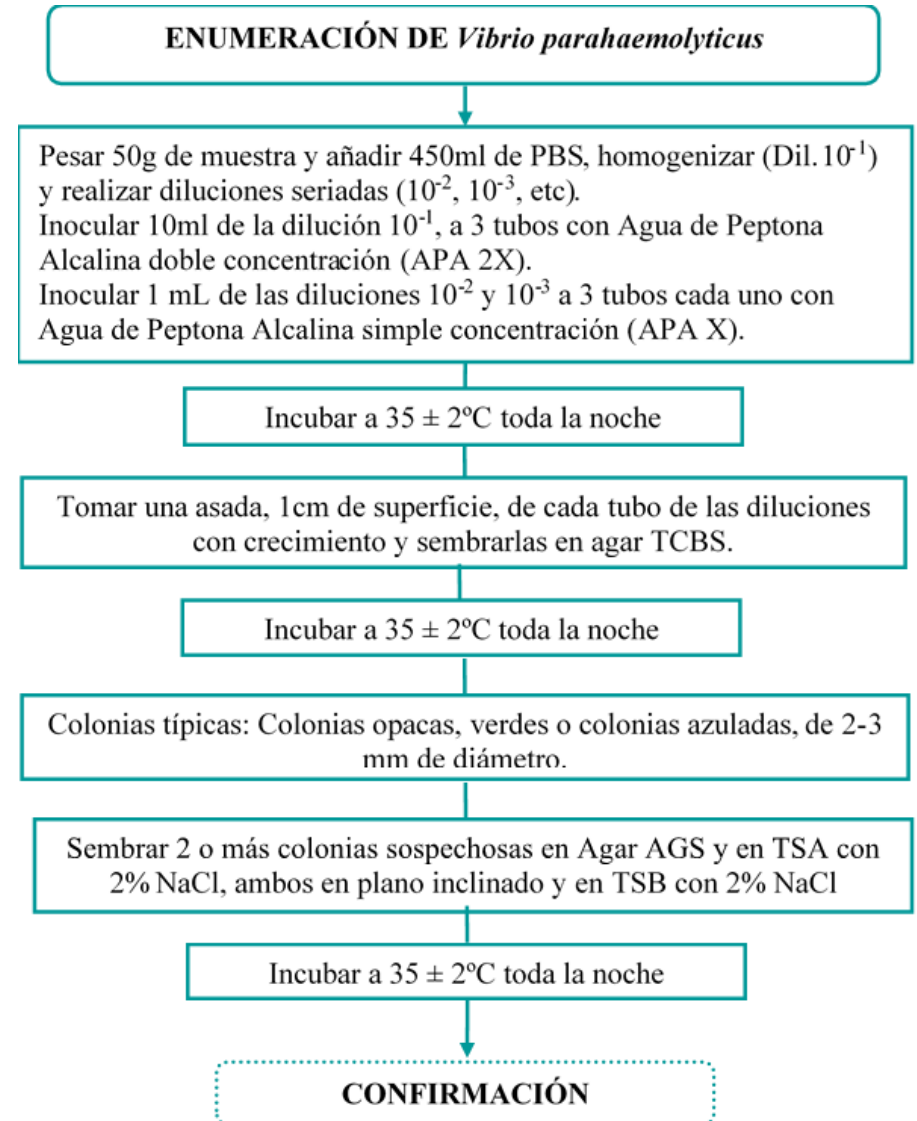
Fuente: ALS LS PERU

Figura N°9. Detección de *Vibrio cholerae* – FDA /BAM Online 8th Ed. Rev. 2004



Fuente: ALS LS PERU

Figura N°10. Detección de *Vibrio parahaemolyticus*– FDA /BAM Online 8th Ed. Rev. 2004



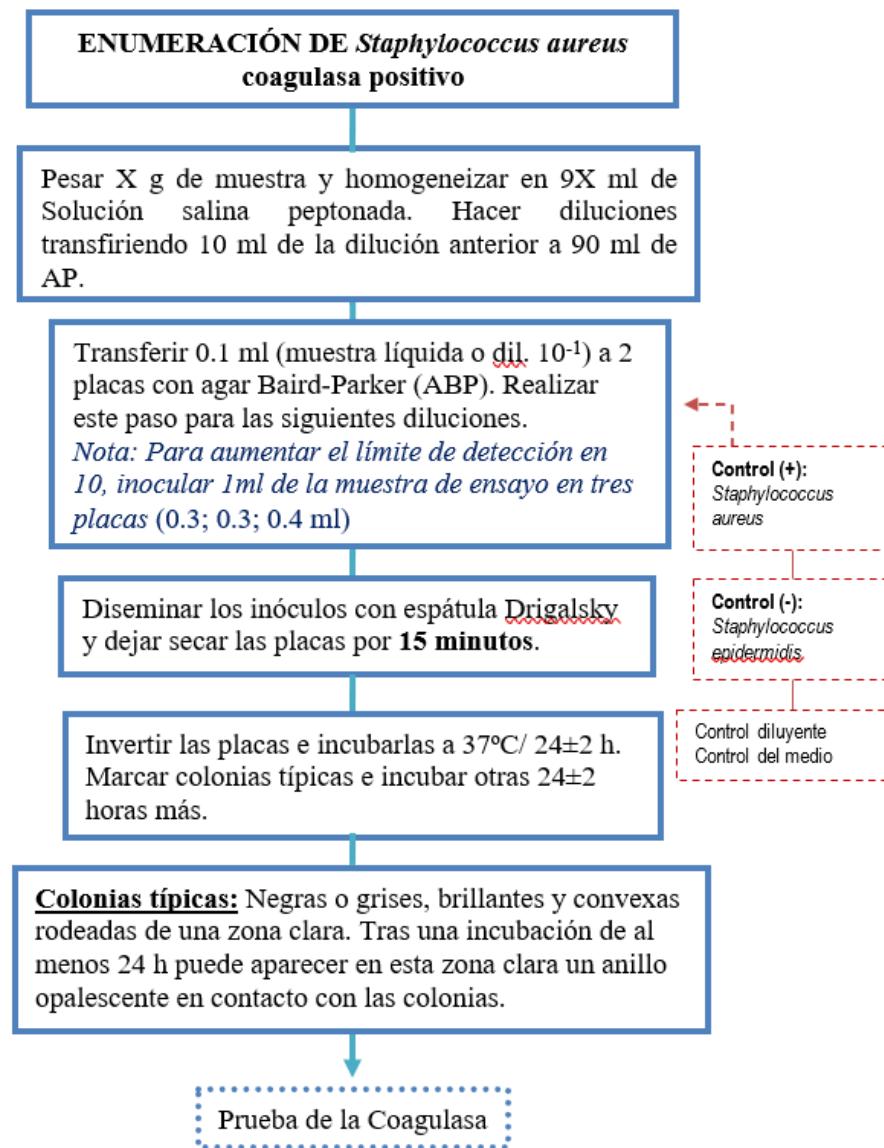
Fuente: ALS LS PERU

Figura N°11. *Detección de Salmonella spp. – ISO 6579-1:2017*



Fuente: ALS LS PERU

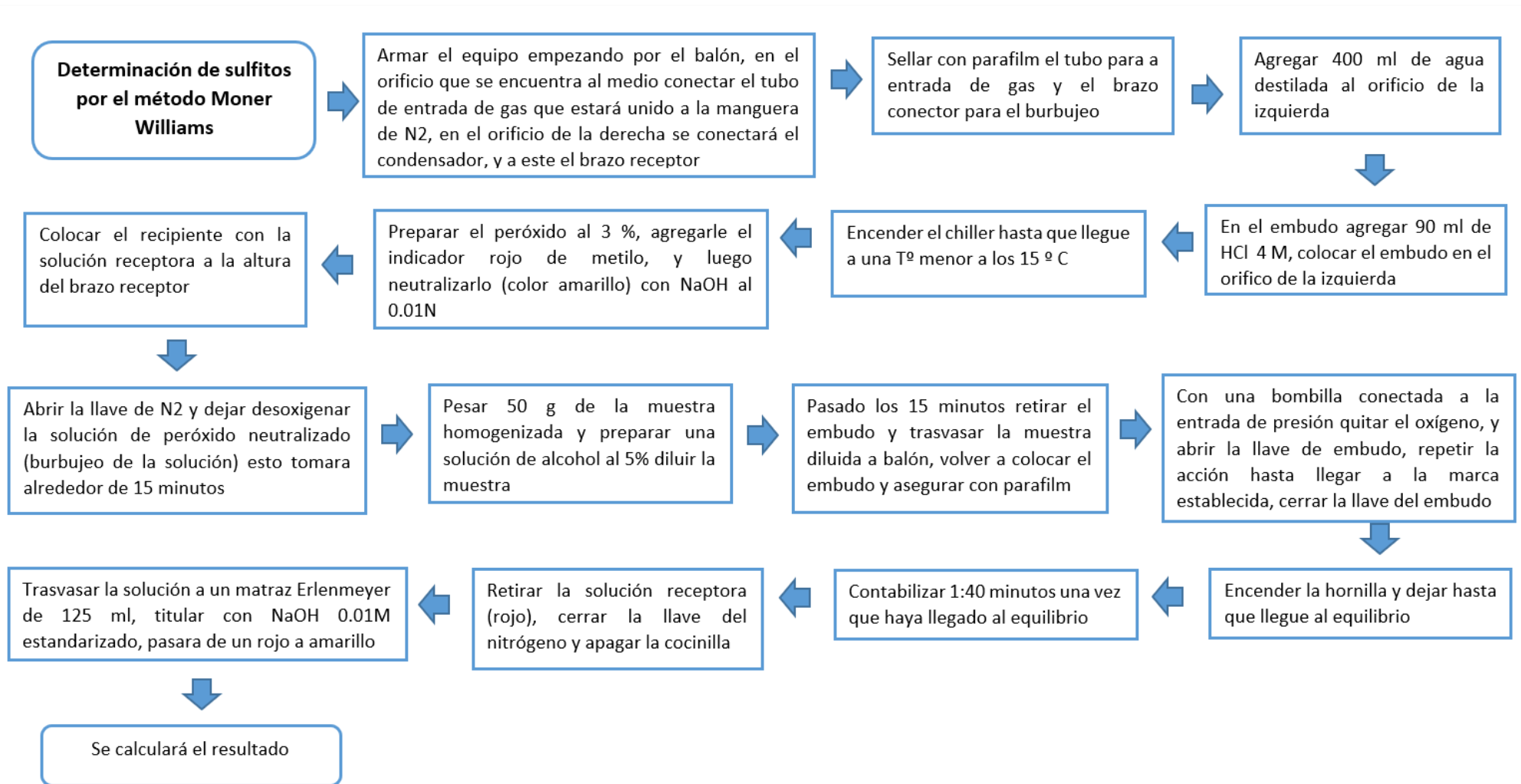
Figura N°12. *Detección de Staphylococcus aureus – ISO 6888-1:2019*



Fuente: ALS LS PERU

Figura N°13.

Determinación de sulfitos por el método Moner Williams- AOAC Official Method 990.28



Fuente: Elaboración propia

Figura N°14.

Recuento de aerobios mesófilos totales de Pleoticus muelleri, con los tratamientos de 0.5, 1, 1.5% y el control. (A: 0 horas; B: 72 horas de exposición)

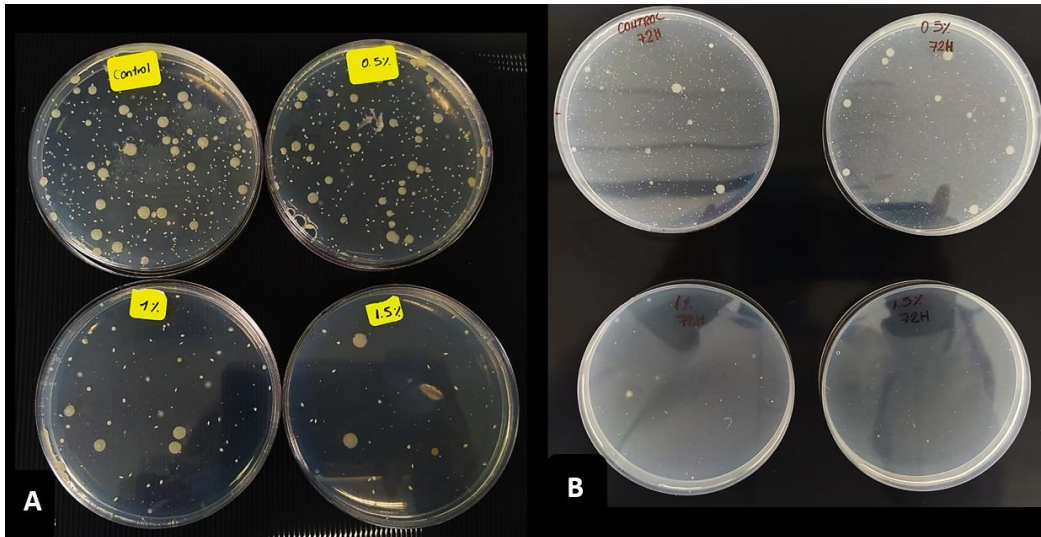


Figura N°15.

Recuento de Escherichia coli de Pleoticus muelleri con los tratamientos de 0.5, 1, 1.5% y el control. (A: 0 horas; B: 72 horas de exposición).

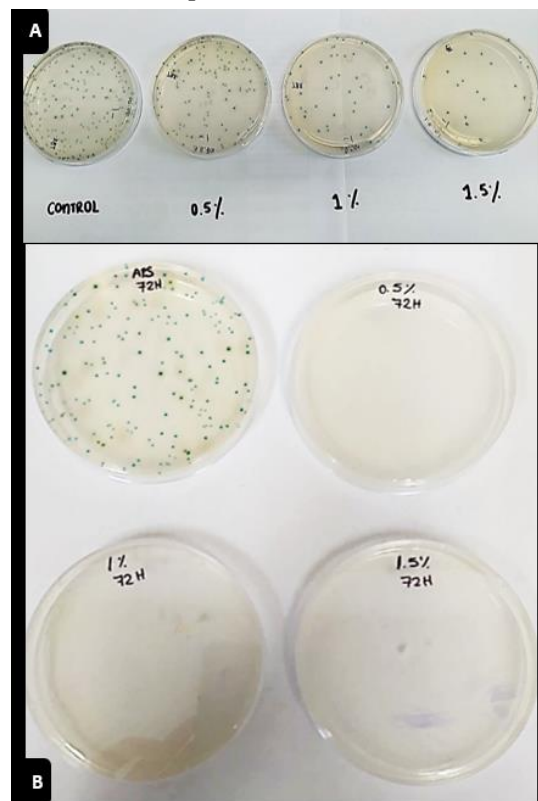
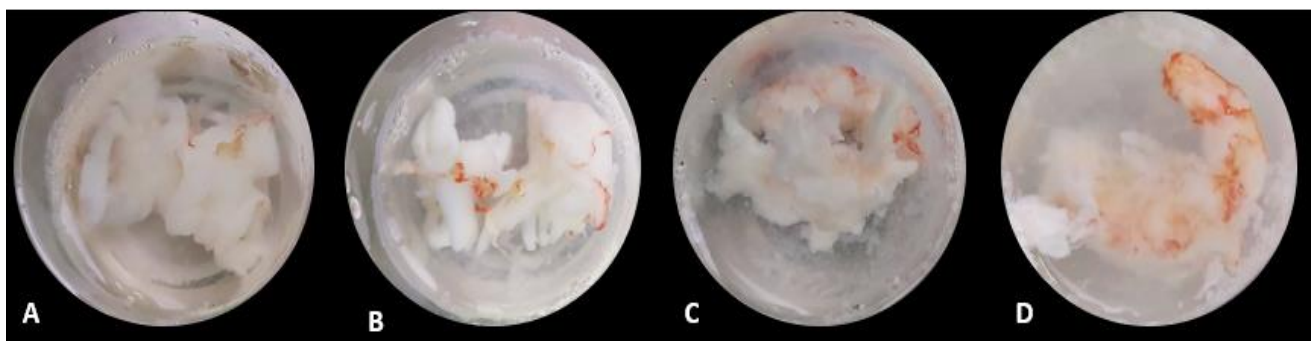


Figura N°16.

Evaluación sensorial de Pleoticus muelleri a las 72 horas de exposición con ácido láctico. (A: CONTROL; B: 0.5%; C: 1%, D: 1.5% de ácido láctico).

**Figura N°17.**

Recuento de aerobios mesófilos totales de Litopenaeus vannamei con los tratamientos de 0.5, 1, 1.5% y el control. (A: 0 horas; B: 72 horas de exposición).

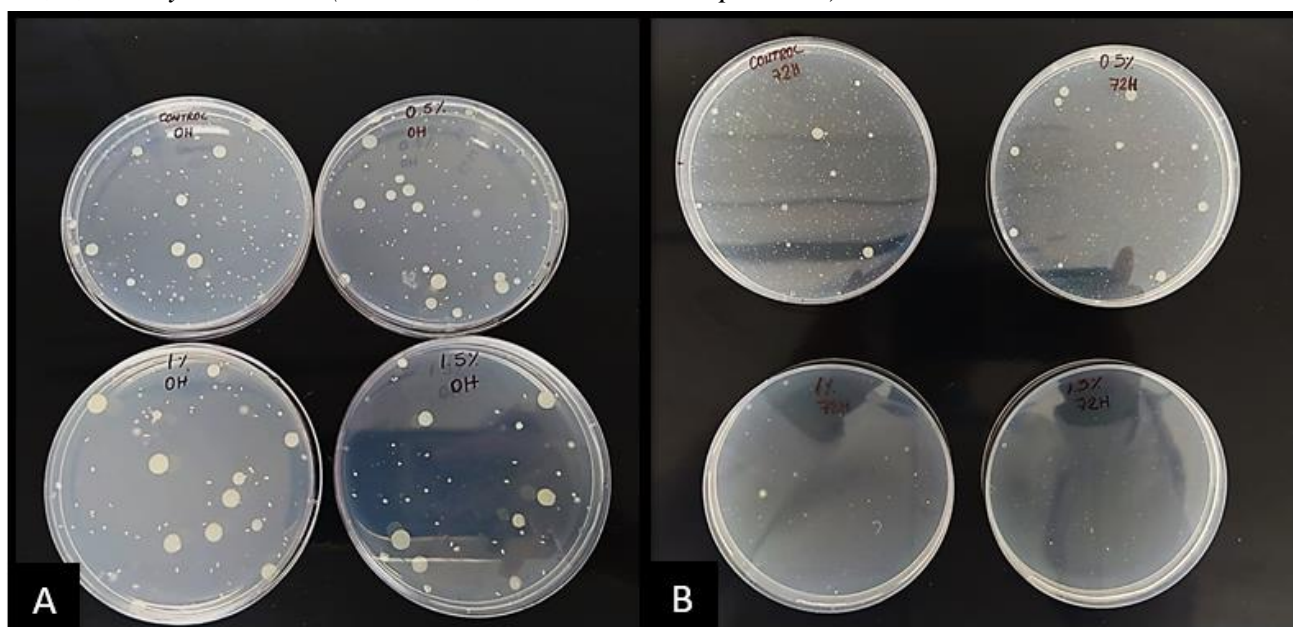
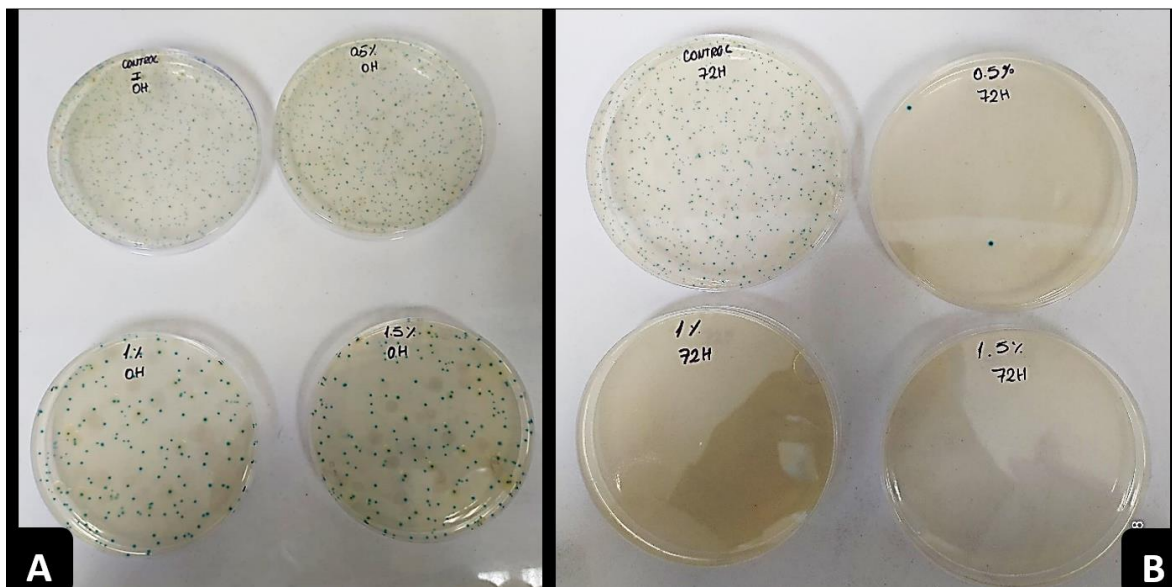


Figura N°18.

Recuento de Escherichia coli de Litopenaeus vannamei con los tratamientos de 0.5, 1, 1.5% y el control. (A: 0 horas y B: 72 horas de exposición)

**Figura N°19.**

Evaluación sensorial de Litopenaeus vannamei a las 72 horas de exposición con ácido láctico. (A: CONTROL; B: 0.5%; C: 1% y D: 1.5% de ácido láctico).

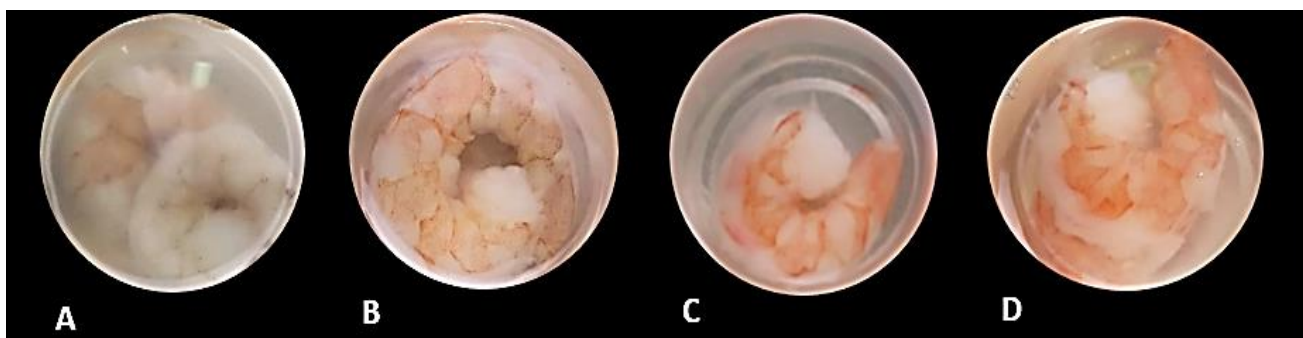


Figura N°20.

Acción antimicrobiana in vitro del ácido láctico: CONTROL, 0,5%, 1% y 1.5%. (A: *Vibrio cholerae*, B: *Vibrio parahaemolyticus*, C: *Escherichia coli*, D: *Salmonella spp* y E: *Staphylococcus aureus*.)

