



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*) COMO POTENCIAL BIOCONSERVADOR EN LA CARNE DE TRUCHA.”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR**

**VERÓNICA GABRIELA REA VARELA**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2011**

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo está dedicado a Dios y a mi madre espiritual la Virgen del Carmen quiénes me han dado las fuerzas necesarias para culminar una etapa más de mi vida.*

*A mis Padres por ser las personas que me han apoyado incondicionalmente durante todo este tiempo y siendo a la vez un ejemplo a seguir para nosotros. A mi hermano Oscar por sus consejos quién me brindó en toda mi carrera y cuando yo más necesitaba de él. A Carlos y Mónica también dedico este trabajo porque ellos con sus palabras de aliento me han sabido brindar su cariño y comprensión.*

*A mi querida sobrina en especial va dedicado el esfuerzo que estoy haciendo porque ella es la razón de que yo culmine mi sueño y al mismo tiempo empiece otro.*

## **AGRADECIMIENTO**

*Mi gratitud al Personal Docente de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en especial a la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias y a todos aquellos que intervinieron en la formación durante mi carrera.*

*Un profundo agradecimiento a las Dras. Jeaneth Gallegos y Olga Lucero quienes con su experiencia y amplios conocimientos, me asesoraron para alcanzar el éxito en la culminación de esta investigación, los mismos que serán aprovechados durante el resto de mi formación profesional.*

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>CIM</b>	Concentración inhibitoria mínima
<b>CMB</b>	Concentración mínima bactericida
<b>UFC/mL</b>	Unidades formadoras de colonias por mililitro
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Horas
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µL</b>	Microlitro
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro cuadrado
<b>INEN</b>	Instituto Nacional de Normativa Ecuatoriana
<b>R<sub>1</sub></b>	Primera Repetición
<b>R<sub>2</sub></b>	Segunda Repetición
<b>R<sub>3</sub></b>	Tercera Repetición
<b>%</b>	Porcentaje
<b>t</b>	Tiempo
<b>n</b>	Número de colonias
<b>f</b>	Factor de dilución
<b>c</b>	Concentración
<b>NBVT</b>	Nitrógeno Básico Volátil Total
<b>N</b>	Normalidad
<b>ETA</b>	Enfermedades transmitidas por alimentos
<b>T<sub>Amb</sub></b>	Temperatura ambiente
<b>T<sub>Rfig</sub></b>	Temperatura de refrigeración
<b>T<sub>Cong</sub></b>	Temperatura de congelación

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

1. MARCOTEÓRICO .....	1
1.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	1
1.1.1 GENERALIDADES .....	1
1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	2
1.3 METODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	3
1.3.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR .....	3
1.3.2 MÉTODO DE MICRO DILUCIÓN EN CALDO .....	3
1.4 COMINO ( <i>Cuminum cyminum</i> ).....	4
1.4.1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA .....	4
1.4.2 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA DE COMINO .....	4
1.4.3 CARACTERÍSTICAS DEL COMINO.....	5
1.4.4 APLICACIONES MEDICINALES DEL COMINO .....	5
1.4.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SEMILLA DE COMINO .....	6
1.5 ACEITE ESENCIAL DE COMINO ( <i>Cuminum cyminum</i> ).....	6
1.5.1 USO TERAPÉUTICO DEL ACEITE DE COMINO .....	7
1.5.2 TOXICIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO .....	8
1.5.3 EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO ...	8
1.6 CONSERVANTES NATURALES .....	8
1.7 ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS.....	9
1.7.1 GENERALIDADES .....	9
1.7.1.1 Localización de los aceites esenciales en plantas .....	11
1.7.1.2 Función de los aceites esenciales en plantas .....	11
1.7.1.3 Clasificación de los aceites esenciales.....	11
1.7.2 CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	12
1.7.2.1 Toxicidad de los aceites esenciales .....	12
1.7.3 TRUCHA ARCO IRIS .....	13
1.7.3.1 Introducción.....	13
1.7.3.2 Situación de la Trucha Arco Iris ( <i>Onchorynchus mykiss</i> ) .....	14
1.7.3.3 Acuicultura: Producción .....	15
1.7.3.3.1 Situación mundial .....	15
1.7.4 APORTES NUTRITIVOS DEL PESCADO .....	17
1.7.4.1 Generalidades. ....	17
1.7.4.2 Composición nutritiva del pescado .....	18
1.7.5 MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO ....	-

1.7.5.1	Métodos Sensoriales .....	20
1.7.5.2	Métodos Físicos.....	21
1.7.5.3	Métodos Químicos.....	21
1.7.5.3.1	Compuestos nitrogenados de carácter básico .....	21
1.7.6	CAUSAS DE LA ALTERACIÓN DE LOS ALIMENTOS .....	22
1.7.6.1	Alteraciones del pescado .....	23
1.7.6.2	Factores que influyen en el tipo y velocidad de la alteración.....	24
1.7.6.3	Signos de Alteración del pescado .....	24
1.7.6.4	Bacterias que alteran el pescado .....	25
1.7.6.4.1	Bacterias causantes de enfermedades alimentarias .....	26
1.7.7	<i>Escherichia coli</i> .....	27
1.7.7.1	Clasificación .....	27
1.7.7.2	Morfología de <i>Escherichia coli</i> .....	27
1.7.7.3	Infecciones en humanos por <i>Escherichia coli</i> .....	27
1.7.7.4	Bacterias <i>Proteolíticas</i> .....	28
1.7.7.5	<i>Pseudomonas spp</i> .....	29
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	31
2.1	LUGAR DE INVESTIGACIÓN .....	31
2.2	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	31
2.2.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
2.2.2	MATERIALES DE LABORATORIO.....	31
2.2.3	EQUIPOS .....	32
2.2.4	REACTIVOS.....	33
2.2.4.1	Medios de cultivo .....	34
2.2.4.2	Cepas utilizadas .....	34
2.3	MÉTODOS.....	35
2.3.1	FASE EXPERIMENTAL.....	35
2.3.1.1	Caracterización físico- químico del pescado .....	35
2.3.1.2	Determinación de las características sensoriales .....	35
2.3.1.3	Ensayos microbiológicos en la trucha arco iris ( <i>Onchorynchus mykiss</i> ).....	39
2.3.1.4	Aislamiento, identificación y conservación de las cepas empleadas en el estudio.....	39
2.3.1.5	Actividad antibacteriana del aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) sobre las bacterias aisladas causantes de la degradación de la carne de trucha.....	44
2.4	SCREENING DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	44
2.4.1	MÉTODO DE DIFUSIÓN DE DISCO.....	44
2.4.2.1	Método macrodilución: .....	44
2.4.3	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA .....	46
2.4.4	Tiempo de muerte.....	47
2.4.5	EFFECTO INHIBITORIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE DE COMINO ( <i>Cuminum cyminum</i> ) ESTUDIO "in situ" .....	49
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
3.1	RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL Y QUÍMICA DE LA CARNE DE TRUCHA.....	51
3.2	ANÁLISIS PARA DETERMINAR EL NITRÓGENO BÁSICO VOLÁTIL TOTAL.....	56

3.3	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA CARNE DE TRUCHA ARCO IRIS TRATADA CON ACEITE ESENCIAL DE COMINO ( <i>Cuminum cyminum</i> ).....	56
4	CONCLUSIONES.....	75
5	RECOMENDACIONES .....	76
6	RESUMEN .....	77
7	BIBLIOGRAFÍA .....	78
8	ANEXOS .....	88

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Pesca de captura marina y continental: Los 10 Principales países productores en 2006.....	15
CUADRO No. 2	Cálculo del índice de calidad del pescado.....	36



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Caracterización para identificar <i>Escherichia coli</i> .....	41
TABLA No. 2	Cambios en los atributos sensoriales de filetes de Trucha en ambiente, refrigeración y congelación.....	51
TABLA No. 3	Clasificación de pescados en cuatro categorías.....	52
TABLA No. 4	Determinación de Nitrógeno básico volátil total (NBVT).....	54
TABLA No. 5	Screening de actividad antimicrobiana del aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>Escherichia coli</i> .....	56
TABLA No. 6	Determinación de la concentración inhibitoria mínima.....	58
TABLA No. 7	Concentración mínima bactericida de aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>E. coli</i> .....	60
TABLA No. 8	Determinación de la turbidez en tubos a diferentes tiempos.....	63
TABLA No. 9	Resultados del tiempo de muerte de Aceite de Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>E. coli</i> , a una concentración de 0.5 MIC en mg/mL.....	65
TABLA No. 10	Resultados del tiempo de muerte de Aceite de Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>E. coli</i> , a una concentración de 1 MIC en mg/mL.....	66
TABLA No. 11	Resultados del tiempo de muerte de Aceite de Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>E. coli</i> , a una concentración de 2 MIC en mg/mL.....	68
TABLA No. 12	Resultados del tiempo de muerte de Aceite de Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>E. coli</i> , a una concentración de 4 MIC en mg/mL.....	69
TABLA No. 13	Tratamiento utilizados “ <i>in vivo</i> ” para la determinación de la actividad antimicrobiana del Aceite de Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>Pseudomonas</i> spp.....	70
TABLA No. 14	Tratamiento utilizados “ <i>in vivo</i> ” para la determinación de la actividad antimicrobiana del Aceite de Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>Proteolíticos</i> .....	71
TABLA No. 15	Tratamiento utilizados “ <i>in vivo</i> ” para la determinación de la actividad antimicrobiana del Aceite de Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>E. coli</i> .....	72

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Screening de Actividad antimicrobiana del Aceite de Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>Escherichia coli</i> .....	57
GRÁFICO No.2	<i>Escherichia coli</i> expuesto a Aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) 0.5 MIC (15.6 mg/mL).....	66
GRÁFICO No.3	<i>Escherichia coli</i> expuesto a Aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) 1 MIC (31.25 mg/mL).....	67
GRÁFICO No.4	<i>Escherichia coli</i> expuesto a Aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) 2 MIC (62.5mg/mL).....	68
GRÁFICO No.5	<i>Escherichia coli</i> expuesto a Aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) 4 MIC (125 mg/mL).....	70
GRÁFICO No.6	Actividad Antimicrobiana del Aceite esencial de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>Pseudomonas</i> spp en la carne de trucha.....	71
GRÁFICO No.7	Actividad Antimicrobiana del Aceite esencial de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>Proteolíticos</i> en la carne de trucha.....	72
GRÁFICO No.8	Actividad Antimicrobiana del Aceite esencial de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) frente a <i>Escherichia coli</i> en la carne de trucha.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Aldehído Cumínico.....	6
--------------	------------------------	---

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Planta de Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ).....	5
FOTOGRAFÍA No. 2	Semilla de Comino.....	5
FOTOGRAFÍA No. 3	Aceite de comino .....	7
FOTOGRAFÍA No. 4	Trucha Arco iris ( <i>Onchorynchus mykiss</i> ).....	13
FOTOGRAFÍA No. 5	Bacteria <i>Escherichia coli</i> .....	28
FOTOGRAFÍA No. 6	Bacteria <i>Proteolíticas</i> .....	29
FOTOGRAFÍA No. 7	Bacteria <i>Pseudomonas</i> spp.....	30
FOTOGRAFÍA No. 8	Identificación de <i>Escherichia coli</i> por caldo EMUG.....	39
FOTOGRAFÍA No. 9	Pruebas Bioquímicas.....	40
FOTOGRAFÍA No. 10	Siembra en Agar VRB para identificación de <i>Escherichia coli</i> .....	40
FOTOGRAFÍA No. 11	Recuento de <i>Proteolíticos</i> : Siembra en Agar leche.....	42
FOTOGRAFÍA No. 12	Aislamiento de <i>Pseudomonas</i> spp en Agar Cetrimida.....	42
FOTOGRAFÍA No. 13	Conformación del banco de cepas.....	43

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Determinación de NVBT en la carne de trucha arco iris.....	88
ANEXO No. 2	Actividad Antimicrobiana “ <i>in vitro</i> ” del Aceite de Comino sobre las bacterias aisladas causantes de la degradación de la carne de Trucha.....	88
ANEXO No. 3	Ensayo “ <i>in situ</i> ” de Aceite de Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ), con tres tipos de bacterias <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteolíticos</i> y <i>Pseudomonas spp.</i> .....	91

## INTRODUCCIÓN

Los bioconservadores son una parte esencial en los productos alimenticios ya que extienden la vida de anaquel del producto, controlan las propiedades organolépticas de los alimentos y garantizan la salud del consumidor inhibiendo el crecimiento y/o aniquilando a microorganismos indeseables (52).

Para García, la actividad antimicrobiana de hierbas y especias, es atribuida tanto a compuestos fenólicos presentes en sus extractos, como a compuestos alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavinas presentes en las esencias. Por su parte Nychas indica que los compuestos fenólicos presentes en sustancias antimicrobianas naturales, pueden desnaturalizar enzimas o bien interferir en aminoácidos, ambas acciones vinculadas con la germinación microbiana (43).

De otro lado, en relación a la conservación de alimentos, actualmente la industria enfrenta una creciente exigencia, por parte del consumidor, para la producción de alimentos de calidad, mínimamente procesados, inocuos y con mayor vida útil, por lo que se hace cada vez más necesaria la sustitución de productos sintéticos por productos naturales menos tóxicos y con menor impacto contra el ambiente, siendo los aceites esenciales y especias una alternativa de importantes alcances en este tema, pues, los estudios *in vitro* e *in situ* reportados en frutas, hortalizas, productos cárnicos y lácteos indican que se requieren muy bajas concentraciones de aceites esenciales para lograr un efecto bioconservador.

Entre estos productos naturales se destaca el aceite de comino (*Cuminum cyminum*), que se ha descrito como agente efectivo por su actividad antimicrobiana y antioxidante que se atribuye a la presencia de compuestos activos tales como: aldehído cumínico (25-35%), terpenos (pineno, terpineol); flavonoides: derivados del luteolol y apigenol que podrían controlar a agentes de deterioro y a patógenos en la carne de trucha (45).

Por tanto, el presente estudio estuvo encaminado a evaluar la actividad antimicrobiana “*in vitro*” del aceite de comino (*Cuminum cyminum*), y su potencial uso como bioconservador de la carne de trucha con el fin de aportar en la búsqueda de aditivos naturales que contribuyan a mejorar la conservación y la inocuidad de este alimento muy susceptible al deterioro. Además la industria alimentaria será otro sector beneficiado al disponer de información sobre un aditivo natural que satisfaga la demanda de producción de alimentos más frescos, más naturales, mejor conservados y con garantía de calidad (49).

Para la determinación “*in vitro*” se utilizó un Screening de actividad antimicrobiana mediante difusión de discos, los cuales dieron eficacia utilizando concentraciones de 10.000, 5.000, 2.500 y 1.250  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , la CIM se utilizó en concentraciones de 1.000 hasta 0.998 mg/mL, determinando que las potencias de 1.000 hasta 15.6 mg/mL da la eficacia, debido que las otras concentraciones son muy bajas, la CIMB fue de 31.25 mg/mL, el tiempo de muerte específico de las bacterias fue de 4 horas en adelante, con una reducción del 100%. El estudio “*in situ*” del efecto inhibitorio del aceite de comino, se utilizó a una concentración de 312.5 mg/mL, dando efectividad para la bacteria *Pseudomonas spp* las cuales fueron almacenadas a 0, 12, 24 y 48 horas de refrigeración (4°C) este fue el tratamiento más efectivo para reducir la pérdida de la calidad del pescado, en cambio para *Escherichia coli* y especies *proteolíticas* son inactivas.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCOTEÓRICO

#### 1.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

##### 1.1.1 GENERALIDADES

En general un antimicrobiano es un agente que irrumpe una función microbiana presentando a la vez una toxicidad selectiva. Estos agentes (antibióticos) son producidos por microorganismos, tienen diferentes espectros de inhibición, muchos son efectivos solo contra una variedad limitada de patógenos mientras otros son de amplio espectro, es decir atacan diferentes clases de patógenos (41).

Algunos agentes se pueden usar contra más de un grupo. Entre los antimicrobianos. Los agentes estáticos inhiben el crecimiento microbiano de modo reversible, o sea si el agente es removido, los microorganismos recuperarán de nuevo su crecimiento, en cambio los agentes cidas destruyen al microorganismo diana, su actividad depende de la concentración y el agente puede ser solamente estático a bajos niveles. El efecto de un agente también varía con la especie diana, un agente puede ser cida para unas especies y estático para otras (41).

Plantas con usos medicinales y culinarios han demostrado tener actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, las cuales han sido evaluadas mediante estudios “*in vitro*” e “*in vivo*”. Las pruebas de actividad antibacteriana se han clasificado en métodos de difusión, de dilución y autobiográficos. Parece que hasta el momento no existen pruebas estandarizadas para evaluar la actividad antibacteriana de potenciales preservativos contra microorganismos relacionados con los alimentos por lo que algunas pruebas propuestas por la NCCLS (Instituto para la Normalización de Laboratorios Clínicos) para el ensayo de



antibióticos se han modificado para aplicarlas en compuesto naturales como los aceites esenciales (6).

Investigadores han adaptado métodos experimentales para representar lo mejor posible futuras aplicaciones, sin embargo el ensayo puede ser afectado por múltiples factores tales como: el método para extraer el material de la planta, el volumen de inóculo, la fase de crecimiento, el medio de cultivo, el pH, el emulsificante, el tiempo y la temperatura de incubación (27).

Alguna idea de la efectividad de estos agentes puede ser obtenida a partir de la concentración inhibitoria mínima, (CIM), la concentración mínima bactericida (CMB) y el tiempo de muerte. La concentración inhibitoria mínima mide el desempeño antibacteriano del agente, a través de la más baja concentración de una droga que previene el crecimiento de un patógeno particular. La concentración mínima bactericida es la concentración más baja que mata al patógeno. Para determinar la rapidez de un efecto bactericida o la duración de un efecto bacteriostático se aplica el ensayo de tiempo de muerte (27).

## **1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Hoy en día existe una demanda significativa de los consumidores por los alimentos que son mínimamente procesados y libres de conservantes químicos de síntesis con la percepción de ser "natural " como resultado, la industria alimentaria se enfrenta a grandes desafíos para producir alimentos naturales antimicrobianos y antioxidantes para reducir el uso de conservantes químicos sintéticos y siguen produciendo alimentos seguros que son también considerados como saludables (37).

Los antimicrobianos se usan en los alimentos por dos razones principales: (1) para controlar los procesos naturales de deterioro (conservación de alimentos), y (2) para prevenir y controlar el crecimiento de microorganismos, incluidos los microorganismos patógenos, los antimicrobianos naturales son derivados de origen animal, vegetal y de origen microbiano. Existe un potencial considerable para la utilización de antimicrobianos naturales en los alimentos, especialmente en frutas y hortalizas frescas. Sin embargo, los métodos y

mecanismos de acción, así como los efectos toxicológicos y sensoriales de los antimicrobianos naturales, no se conocen con exactitud (27).

### **1.3 METODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES**

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha aprobado este método como una norma para el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínico. El método de difusión del disco es el método técnico más utilizado para determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y extractos (37).

#### **1.3.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR**

La actividad antimicrobiana es generalmente evaluada por este método para los estudios preliminares. Un disco de papel empapado con la igualdad de oportunidades se coloca en la superficie inoculada de una placa de Agar y la zona de inhibición microbiana se mide. Diferentes parámetros en esta prueba podría afectar el resultado, tales como el volumen de igualdad de oportunidades en los discos de papel, el grosor de la capa de Agar y el disolvente. Por ejemplo, algunos de los disolventes reportados son el etanol, metanol, Tween-20, Tween-80, la acetona en combinación con Tween-80, glicol de polietileno, el glicol de propileno, n-hexano y dimetilsulfóxido, lo que podría dar lugar a dificultades al comparar los diferentes estudios (Brandi et al, 2006; Burt et al, 2007.). Los datos más precisos sobre el extracto de evaluación a los antimicrobianos se han obtenido con este método (Kil et al., 2009) (37).

#### **1.3.2 MÉTODO DE MICRO DILUCIÓN EN CALDO**

El método de microdilución en caldo se utilizó para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las partes aéreas de aceite fresco *Plectranthus cylindraceus* contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. De acuerdo con David son y Naidu, este método mostró renta media-baja (% v / v) de diferentes aceites esenciales extraídos de laurel, clavo, menta y tomillo contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, en

comparación con el Agar-dilución ensayo. Este método fue utilizado por Radusiene et al. para evaluar la actividad antimicrobiana de *Acoruscalamus* contra 17 especies de bacterias, levaduras y hongos (37).

#### **1.4 COMINO (*Cuminum cyminum*)**

##### **1.4.1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Apiales

Familia: Apiaceae

Género: *Cuminum*

Especie: *Cuminum cyminum*

##### **Nombre binomial**

*Cuminum cyminum* (54)

##### **1.4.2 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA DE COMINO**

Es una planta herbácea anual perteneciente a la familia *apiaceae* (antes llamadas umbelíferas). Alcanza una altura de 30 cm, tiene hojas lanceoladas, las flores son pequeñas, blancas o rosas. Las llamadas semillas son, en realidad, los frutos que constituyen la especia. De forma ovoidea o fusiforme alargada, con cerca de medio centímetro de largo, pardo amarillo y cubiertos de una fina de pelusa (Fotografías No 1 y No. 2).

De sabor fuerte y aromático, un poco amargo pero agradable, las semillas se pueden adquirir enteras o picadas. Estos son utilizados para la aplicación de ciertos productos como las carnes, el curry (11) (12) (13).



**FOTOGRAFÍA No1: Planta de Comino en floración**



**FOTOGRAFÍA No2: Semillas de Comino**

### **1.4.3 CARACTERÍSTICAS DEL COMINO**

El fruto es alargado, más o menos achatado en sus extremos, mide aproximadamente de 5 a 7 milímetros de largo por 1,5 de espesor. Es en su fruto donde se encuentran los principios activos.

El comino corresponde a una planta herbácea anual, por lo tanto todo su ciclo de desarrollo lo completa en el transcurso de un año.

Las semillas del comino habitualmente son de color marrón, aunque existen casos en que son amarillas o negras (48).

### **1.4.4 APLICACIONES MEDICINALES DEL COMINO**

Al comino se lo ha usado popularmente como: diurético, aperitivo, eupéptico, carminativo, espasmolítico, estrogénico, galactógeno, antihelmíntico, ligeramente hipoglucemiante y sedante. Indicado para inapetencia, meteorismo, dispepsias hiposecretoras, espasmos gastrointestinales, diarreas, diabetes, hipomenorrea, dismenorrea. Su aceite esencial provoca relajación, usado como contraindicado con hiperestrogenismo (12) (13).

El fruto concentra la mayor parte los principios activos de la planta, entre ellos el cuminal, que es un tónico estomacal y aperitivo. La infusión de comino, es estimulante

del peristaltismo intestinal y se recomendado para eliminar los molestos gases intestinales (56).

#### 1.4.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SEMILLA DE COMINO

El comino posee dentro de su composición, aceites esenciales. Estos se encuentran constituidos principalmente por monoterpenos, como el aldehído cumínico (Figura No.1) y el terpineol. Además, está conformada por taninos, los cuales resultan ser unos excelentes antioxidantes (51).

El comino presenta también entre sus componentes resinas, sustancias albuminosas y flavonoides. Estos últimos poseen muchas propiedades medicinales, tales como, anticancerígenas, antioxidantes, antimicrobianas, hipocolesterolemiantes, entre otras.

Por otra parte, el comino posee una gran cantidad de hidratos de carbono, como así también altas cantidades de proteínas y fibras (51).

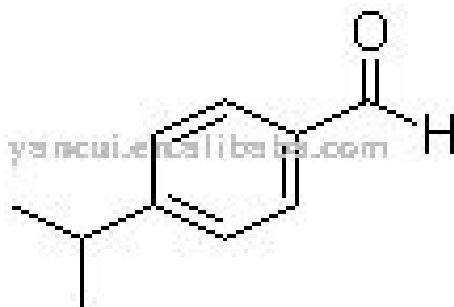


FIGURA NO 1: ALDEHÍDO CUMÍNICO

#### 1.5 ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*)

El comino pertenece a la familia de las umbelíferas a la que pertenecen otras conocidas especias como el anís, hinojo, eneldo, coriandro, etc. Su aceite esencial se extrae mediante la destilación de las semillas (fotografía No. 3). En un principio es incoloro pero amarilla con el tiempo, tiene un aroma parecido al del anís, aunque ligeramente amargo (46).

El olor y sabor del comino provienen principalmente del aceite esencial (2.5-4% en base seca), el cual contiene comino aldehído (p-isopropil-benzaldehído, 25 a 35%) como

principal constituyente. Además, se han encontrado  $\alpha$ - y  $\beta$ -pireno (21%), dipentano, p-cimeno y  $\beta$ -felandreno (2).

En los frutos tostados del comino, un gran número de piracinas han sido identificadas como componentes del sabor. Además de las piracinas y varios derivados de alquilo (particularmente 2,5 y 2,6-dimetil piracina), 2-alcoxi-3-alkilpiracinas parecen ser los compuestos clave (2-etoxi-3-isopropil piracina, 2-metoxi-3-sec-butil piracina, 2-metoxi-3-metil piracina) y el compuesto de sulfuro, 2-metiltio-3-isopropil piracina. El tejido de las frutas contiene un aceite con resina, mucílago y goma, malatos y materia albuminosa, y en la corteza de la semilla existen muchos taninos. El contenido de ceniza es alrededor del 8% (48).



FOTOGRAFÍA No3: ACEITE DE COMINO

### 1.5.1 USO TERAPÉUTICO DEL ACEITE DE COMINO

El aceite esencial de comino se obtiene por destilación al vapor de las semillas maduras. Combina bien con los aceites de romero, lavanda, gálbano, cardamomo

Se han identificados los siguientes usos terapéuticos

- **Circulación y riñón:** mala circulación, acumulación de líquidos o toxinas.
- **Aparato digestivo:** dispepsia, flatulencia, indigestión, cólicos, espasmos.

- **Sistema nervioso:** agotamiento nervioso, migrañas, dolor de cabeza, debilidad (36).

### **1.5.2 TOXICIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO**

Este tipo de aceite de comino no se debe ingerir en las mujeres embarazadas ni en los lactantes o en niños menores de 6 años de edad. También se indica que produce reacciones adversas con aparición de ampollas o dermatitis en personas alérgicas o personas con enfermedad inflamatoria a la piel. El uso del aceite esencial de comino se vuelve tóxico en concentraciones altas, esto se atribuye a sus propiedades estupefacientes que ocasionaran convulsiones (36).

### **1.5.3 EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO**

Los aceites esenciales de especias como pimienta, laurel, cilantro, comino, corteza de cassia, regaliz han demostrado tener actividad bacteriostática con inhibición de patógenos y de micro-organismos alterantes (37).

## **1.6 CONSERVANTES NATURALES**

Las especias y aceites esenciales desde la antigüedad ya eran utilizados para embalsamar cadáveres y evitar la putrefacción, por la presencia de fenoles, flavonoides, que retrasan la autoxidación de las grasas (14) (20).

Actualmente, el creciente interés de los consumidores por la seguridad y calidad de los alimentos que ingieren, las nuevas tendencias revelan una clara preferencia de la industria alimentaria hacia los conservantes naturales, como es el caso de antioxidantes procedentes de extractos de plantas. Así, el mercado de los antioxidantes sintéticos está en declive mientras que los antioxidantes naturales ganan importancia debido a la aceptación de los consumidores y a los requerimientos legales para acceder al mercado (59).

Ciertas especias inhiben el crecimiento de microorganismos. En general son más efectivos frente a organismos gram-positivos que frente a bacterias gram- negativas.

En estos productos se han determinado: gran poder conservante (canela, clavo de olor, mostaza). Inhibición débil de una gran variedad de microorganismos *Micrococcus pyogénes*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Penecilum notatum* (20).

Los aceites esenciales de los cítricos (naranja, limón) son inhibidores del desarrollo de *Aspergillus flavus*, eliminando la producción de aflatoxina. Los extractos de ajo y cebolla inhiben el desarrollo de levaduras y son también antibacterianos. Los cereales, rábanos, plátano, berza contienen también sustancias antimicrobianas (8) (60).

Las sustancias antimicrobianas de numerosas especias son los principios de los aceites esenciales, que son mezclas de diferentes productos volátiles, con frecuencia afines, entre los que se encuentran los hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, esterres fenólicos y ácidos (60).

Los marinados también son otra forma de conservar alimentos, están compuestos por líquidos y elementos aromatizantes que tienen por objeto eliminar los fuertes sabores que pudieran tener los distintos tipos de carne. Además de aromatizarlas se consigue ablandarlas y prolongar su conservación al formar en la preparación una película externa que aísla los microorganismos (50).

## **1.7 ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS**

### **1.7.1 GENERALIDADES**

Los aceites esenciales son mezclas complejas y aromáticas que se obtienen de material de las plantas, se encuentran en las hojas, flores, frutos, maderas, cortezas, raíces y secreciones. Tiene usos en medicina, cosmética, alimentos, bactericida y antisépticos (9) (18).



La obtención de los aceites no ha variado la descripción, desde la forma más antigua hasta la forma más moderna; que es mediante prensas de tornillo, la presión de la materia prima o por procesos mecánicos de destilación simple. Los procedimientos actuales usan solventes orgánicos u operaciones de refinado. Generalmente la extracción de los aceites en semillas deben ser prensadas porque son ricas en proteínas y estas sufren una cocción de 90<sup>0</sup>C que libera el aceite al romper las estructuras celulares y coagulares de las proteínas (5).

En los aceites esenciales los compuestos más frecuentes derivan biogénicamente del ácido mevalónico, se les cataloga como monoterpenoides (C<sub>10</sub>) y (C<sub>15</sub>). Las propiedades físico-químicas de los aceites son muy diversas, puesto que esto engloba sustancias heterogéneas, de las esencias de las plantas. El rendimiento de las esencias obtenidas de una planta varía de unas cuantas milésimas por ciento del peso vegetal del 1-3%. La composición de una esencia cambia también de acuerdo a la época de la recolección o del lugar geográfico o cambios genéticos que se produzcan (9).

Últimamente hay gran interés en el estudio de la eficacia de los aceites esenciales de las plantas aplicadas en alimentos, por la capacidad de estos productos para inhibir el crecimiento bacteriano de ciertos microorganismos como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En este sentido se ha ensayado la actividad de combinación con ciertos tipos de aceites esenciales de comino, orégano, tomillo, perejil, ajo, etc. Y se han utilizado como potentes antibacterianos en ciertos alimentos (32).

Los aceites son inhibidores de las bacterias gram-positivas y gram-negativas, y es su composición estructural la que determina la actividad antibacteriana por ejemplo compuestos con grupos fenólicos son efectivos para microorganismos antagonistas (34).

### **1.7.1.1 Localización de los aceites esenciales en plantas**

Los aceites esenciales pueden encontrarse en toda la anatomía o en la especie (58). Estos compuestos se presentan como líquidos aceitosos aromáticos y volátiles de las flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces (37).

### **1.7.1.2 Función de los aceites esenciales en plantas**

Los aceites esenciales se utilizan como aromatizantes (alimentos); perfumería (fragancias); en productos farmacéuticos (por sus propiedades funcionales), también se emplean como selladores dentales, antisépticos, por ser antibacterianos, antifúngicos y antivirales (27).

### **1.7.1.3 Clasificación de los aceites esenciales**

#### **Por su consistencia**

**Esencias fluidas:** Son líquidos volátiles a temperatura ambiente.

**Bálsamos:** Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos: el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc (44).

**Oleorresinas:** Tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (44).

#### **Clasificación por su origen**

**Aceites Naturales:** Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Estos aceites esenciales son los llamados Aceites esenciales de aromaterapia (44).

En Aromaterapia o la Aromacología sólo se deben de utilizar aceites esenciales naturales, puros y completos, que no hayan sufrido ningún tipo de agregado natural o sintético y que no hayan sufrido ningún proceso de rectificación etc. El concepto básico de la

Aromaterapia es que el aceite esencial no debe tener ninguna transformación para mantener las características químicas que tiene el vegetal (44).

**Aceites Artificiales:** Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes (44).

**Aceites Sintéticos:** Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química (44).

## **1.7.2 CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES**

La calidad se ha convertido en algo cada vez más importante para toda actividad productiva; la competencia de los mercados, y la globalización de la economía hacen imperativo que los productos sean de alta calidad y los costos se controlen en cada etapa del proceso (27).

Concretamente y desde el punto de vista productivo, la calidad de los aceites esenciales implica la valoración de las necesidades del cliente desde el estudio del mercado y su traducción en un diseño y en producto que satisfaga las necesidades en cuanto a funcionalidad, precio, vida y servicio de agentes naturales que han centrado recientemente en la ampliación de la vida útil de los alimentos, para reducir o eliminar las bacterias patógenas, y aumentar la calidad global de sus productos (27).

### **1.7.2.1 Toxicidad de los aceites esenciales**

Si bien su publicación alimentaria y terapéutica es cada vez más amplia, no hay que omitir que existen aceites cuyo uso inadecuado puede resultar tóxico para el organismo. Al igual que sucede con la Actividad antimicrobiana, la toxicidad de los aceites esenciales los puede variar en función de su quimiotipo. Ingeridos por vía oral en dosis muy altas los aceites esenciales como el de Eucalipto, clavo, canela y nuez moscada, pueden ocasionar cuadros

de depresión en el SNC. Se han descrito así mismo, efectos narcóticos y de estupefacientes para el comino, cilantro y tomillo (24).

### 1.7.3 TRUCHA ARCO IRIS

#### 1.7.3.1 Introducción

La pesca ha sido desde tiempos milenarios una de las principales actividades de recolección de alimentos y de materias primas, realizada conscientemente por los humanos e instintivamente por los animales, siendo los mares, lagos, ríos, la fuente fundamental de su obtención. A partir de la Segunda Guerra Mundial, la acuicultura comienza a ser tema prioritario para organismos internacionales como la F.A.O. (Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación) En términos generales, la piscicultura se incluye dentro del concepto genérico de acuicultura, definida como la reproducción y crecimiento de animales y plantas acuáticos (3).

Las técnicas acuícolas para diferentes especies se han venido desarrollando en los últimos veinte años, tales como: camarón, tilapia, cangrejo, bagre trucha, mejillón almeja, ostra y aún ciertas algas. De esta manera es muy claro, que los productos animales acuáticos cultivados por el hombre, están adquiriendo un rol importante en la industria de alimentos, en la medida en que aumenta la presión sobre la pesca natural (22).



**FOTOGRAFÍA NO. 4: TRUCHA ARCO IRIS (*Onchorynchus mykiss*). ESPECIE DE AGUA DULCE QUE VIVE EN TEMPERATURAS COMPRENDIDAS ENTRE 0°C Y 25°C. SIN EMBRAGO TENEMOS QUE DECIR QUE LA TEMPERATURA MÁS ADECUADA PARA REALIZAR SUS FUNCIONES ÓPTIMAS, ES DE 15°C, EN PRESENCIA DE AGUAS MUY CORRIENTES Y OXIGENADAS.**

### **1.7.3.2 Situación de la Trucha Arco Iris (*Onchorynchus mykiss*)**

Esta especie fue originaria del Pacífico de Norteamérica en el transcurso de los años, algunos permanecen hasta un año en los ríos natales, mientras que los otros se dirigen a los mares. Otras especies viven hasta 3 años en los lagos de agua dulce que están en los arroyos (21).

La trucha arco iris (Fotografía No. 4), así como todos los peces, no tienen capacidad propia para regular su temperatura corporal, pues esta depende totalmente del medio acuático en el que viva. Las condiciones naturales que tiene para vivir están comprendidas entre 0°C y 25°C, la temperatura más adecuada para esta especie es de 15°C (4) (3).

Las truchas toleran mal las poluciones acuáticas y son muy sensibles a las contaminaciones orgánicas, así como a numerosos productos en forma accidental, que se encuentran ocasionalmente en las aguas (3).

La calidad de agua que se utiliza para el cultivo de truchas tiene que tener un conjunto de propiedades físicas, químicas y biológicas, tales como: temperatura, ph, oxígeno, turbidez, etc. Estas pueden estar sometidas a variaciones bruscas por varios factores externos fundamentalmente por los cambios atmosféricos y climáticos. Las propiedades químicas son mucho más estables y sus variaciones son mínimas en caso excepcionales de una contaminación produce efectos irreversibles. Las propiedades biológicas están condicionadas a la ausencia o presencia de agentes patógenos (3) (21).

Su importancia reside fundamentalmente en sus cualidades naturales, que permiten su explotación industrial. Con respecto a otras especies de salmónidos, la trucha arco iris muestra una gran docilidad a la cautividad, tolerancia y adaptación social, con un comportamiento menos agresivo que la trucha común (62).

### 1.7.3.3 Acuicultura: Producción

#### 1.7.3.3.1 Situación mundial

La especie de truchas tiene hoy en día una gran importancia en el mundo de la piscicultura, está ampliamente diseminada por la cría intensiva en todos los continentes, totalizándose en 1988 una producción mundial de 220.400 toneladas, dando un resultado positivo de la especie (3).

En el mundo existen cerca de 20 especies de peces que son cultivados intensamente, otras 60 especies son cultivadas extensivamente o solamente a nivel experimental.

La producción acuícola mundial se ha orientado al cultivo de camarón, tilapia, trucha y cachama.

**CUADRO No 1: PESCA DE CAPTURA MARINA Y CONTINENTAL: LOS 10 PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES EN 2006**

<b>País</b>	<b>Millones de Toneladas*</b>
<b>China</b>	17,1
<b>Perú</b>	7
<b>Estados Unidos de América</b>	4,9
<b>Indonesia</b>	4,8
<b>Japón</b>	4,2
<b>Chile</b>	4,2
<b>India</b>	3,9
<b>Federación de Rusia</b>	3,3
<b>Tailandia</b>	2,8
<b>Filipinas</b>	2,3
<b>TOTAL</b>	54,5

Fuente: El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008, © FAO Dirección de Estadística 2009.

En el año 2005 la exportación total de truchas fue de dos millones 490 mil dólares, siendo el mayor exportador Canadá con 989 mil millones de dólares seguido por Noruega con 585 mil millones, Alemania con 422 mil millones, Estados Unidos con 204 mil millones y el resto con 288 mil millones.

En los siguientes años la producción de trucha incrementó la producción, teniendo como principales destinos a Canadá y Estados Unidos que, de manera conjunta, concentraron el 70 por ciento del total de los envíos.

La exportación total de ese producto sumó en el año 2007 tres millones 614 mil dólares, 30% más que en similar período del año 2006 cuando la cifra ascendió a dos millones 788 mil dólares. En el año 2007 se compraron truchas peruanas, el mayor comprador es Canadá con un millón 255 mil dólares (34.7 por ciento), mientras que Estados Unidos ocupó el segundo lugar al importarlo por un millón 248 mil dólares (34.5 por ciento), le siguió Noruega con 485,170 dólares, concentrando el 13 % del total y Alemania que registró una participación de siete por ciento. También se encuentran Suecia, España, Egipto, Francia, Bélgica, Reino Unido, México y Santa Lucía. El comercio internacional de trucha alcanzó aproximadamente US\$ 500 millones anuales en el 2009, pero la participación de Perú en este mercado es de apenas 0.8% de total que se comercializa. Los principales mercados de exportación continúan siendo Estados Unidos, Canadá, Noruega y Alemania.

Como podemos darnos cuenta en estos últimos años ha aumentado la exportación de trucha hacia los Estados Unidos, motivos por el cual hemos decidido exportar hacia ese lugar sumando al Tratado de Libre Comercio que se tiene con ese país.

En Ecuador la truchicultura ha tenido un crecimiento lento en el país. Aunque el cultivo se inició hace 20 años y la comercialización interna y externa cobró fuerza a partir de 1996, el desarrollo de esta actividad todavía es incipiente. Se estima que el país cuenta actualmente con una producción de 50 toneladas mensuales, cuando solo los pedidos externos superan las 100 toneladas.

Aún así, las empresas dedicadas al cultivo de truchas hacen esfuerzos por crecer y expandirse, sobre todo, en el mercado internacional. Excompiscis, por ejemplo, es una empresa familiar que se inició en la actividad hace 18 años. Enrique Maldonado, gerente general de la empresa, recuerda que cuando arrancó el negocio su producción era de 500 kilos mensuales. Ahora, luego de un largo proceso de experimentación y tecnificación, la producción asciende a 15 toneladas mensuales que provienen 5 toneladas del criadero de

Verde cocha (al noroccidente de Pichincha) y 10 toneladas de las piscinas de Cosanga (en Napo).

De este total, 6 toneladas se exportan a los EEUU y 9 toneladas se quedan en el mercado nacional. Para la venta externa el producto se entrega fresco (entero o fileteado) mientras que al interior del país se comercializa ahumado o congelado.

Hasta hace 10 años, la trucha todavía era un alimento poco conocido, no obstante, a partir de 2000 se experimentó el crecimiento de la demanda y consecuentemente aumentaron los proyectos de cultivo de truchas, aunque, según explica el director del Centro de Investigaciones Acuícolas Papallacta (Ceniac), Jaime Idrovo, "los criaderos nacen sin sustentos técnicos, por lo que fracasan al poco tiempo".

Maldonado asegura que la truchicultura demanda de personal capacitado, alimentación adecuada, manejo técnico y sobre todo "ajustarse a la exigencias del cliente externo".

Bajo esas características, Acuicultura ha logrado mantenerse durante 20 años. En asociación con una decena de truchicultoras de la zona (Ambato) exporta 40 toneladas mensuales para el Canadá y Alemania. "Potencial y mercado hay, lo que hace falta son inversiones, líneas de crédito, y políticas de Estado", dice Ernesto Castillo, gerente general de Acuicultura (57).

#### **1.7.4 APORTES NUTRITIVOS DEL PESCADO**

##### **1.7.4.1 Generalidades.**

El pescado y otros alimentos marinos engloban diferentes tipos alimenticios. Los cuales viene produciéndose en los mares, ríos y lagos, hace siglos siendo una fuente nutritiva para el consumidor (7).

Los pescados frescos pierden su calidad original, a causa de los procesos enzimáticos y el crecimiento de microorganismos, por este motivo, la mayor parte de los pescados y los mariscos que se consumen requieren de cierto grado de procesamiento y ser congelados



antes de llegar al consumidor. La sensibilidad del pescado y los mariscos es causado por su alto contenido de humedad, su pH neutro (en el cual los microorganismos encuentran las mejores condiciones para el crecimiento) y la presencia de enzimas que rápidamente deterioran el sabor y el aroma. La descomposición de las proteínas a causa de los microorganismos, provocan olores desagradables, la oxidación de la grasa no saturada con alto contenido graso (7).

#### **1.7.4.2 Composición nutritiva del pescado**

- Parte comestible del pescado: 50%.
- Contenido proteico: 18%.
- Contenido en grasa: 3%.
- Calorías (Cada 100g): 94Kcal (7).

#### **1.7.4.3 Valor nutritivo del pescado**

El pescado posee una serie de vitaminas, proteínas y de elementos minerales que facilitan las funciones en el metabolismo. Y está constituido como una aportación de gran calidad en la dieta del consumo humano (6).

Entre los aminoácidos que abundan es la lisina (muy necesaria para los niños en crecimiento) y el triptófano (imprescindible para la formación de la sangre). Ambos aminoácidos escasean en la proteína de los cereales y de otros alimentos vegetales, por lo que la presencia del pescado en la dieta complementa y mejora su calidad de proteínas (6).

Los lípidos y grasas del pescado constan, entre otros compuestos, de ácidos grasos, algunos de los cuales protegen al consumidor frente a la formación de depósitos grasos en las arterias. El pescado contiene además otros lípidos que rebajan el colesterol y se asocian a una serie de efectos beneficiosos relacionados con la prevención de las enfermedades cardiovasculares (6).

El pescado contiene grandes cantidades de vitamina A y D, y también posee vitamina E (que ejerce un efecto protector antioxidante). En general, también es una buena fuente nutritiva de vitaminas del grupo B, es muy rico en sodio y en potasio y algo menos en

calcio. Por su contenido en minerales el consumo de pescado es recomendable para niños en crecimiento y para mujeres embarazadas (6).

#### **1.7.4.4 Consumo mundial de pescado**

Un informe de la FAO da cuenta de que el consumo de pescado creció a 17, 2 kilos per cápita al año en 2009, una cantidad sin precedentes, y la tendencia es que siga aumentando.

El pescado representa casi la quinta parte de la cantidad promedio de proteínas que comen más mil 500 millones de personas en el mundo.

El valor alimenticio del pescado es tal que sólo una porción de 150 gramos proporciona entre 50 y 60 por ciento de las proteínas que una persona necesita al día, además de ser también una fuente de vitaminas y minerales (55).

#### **1.7.4.5 Conservación del pescado**

La aplicación de procedimientos adecuados de manipulación permitirá que el producto sea mantenido de la mejor forma, conservando sus características nutricionales y organolépticas (7).

Las cámaras frías son una de las principales formas de aplicación de la conservación a bajas temperaturas, en ellas los alimentos deben conservarse según los requerimientos específicos de cada uno de ellos en cuanto a temperatura, humedad, tiempo y compatibilidad organoléptica (53).

El pescado es el más susceptible a la autólisis, oxidación e hidrólisis y a la alteración microbiana. Los conservadores son aquellos que permiten alargar la vida útil del pescado y eliminar los microorganismos causantes del deterioro (23).

Hoy en día en el mundo existe una mayor demanda de alimentos de mejor calidad y estos resultan de la integración exitosa de los más avanzados métodos de la tecnología de

producción de alimentos con los métodos de la tecnología de almacenamiento y distribución (46).

- Empleo del calor
- Eviscerado
- Empleo de bajas temperaturas
- Refrigeración
- Congelación empleo de radiaciones
- Conservación por desecación
- Empleo de conservadores
- Antioxidantes (7) (23) (46).

### **1.7.5 MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO**

Un método de determinación de la frescura o de la calidad de un pescado, debe ser rápido, fiable, coincidente con la apreciación sensorial y, preferiblemente, aplicable a todos los alimentos marinos. Debido a la gran variedad de especies y de modificaciones bioquímicas existentes, esto es difícil de lograr. En este sentido, se han propuesto numerosos métodos de evaluación de la frescura y calidad del pescado: sensoriales, físicos, químicos y microbiológicos (42).

#### **1.7.5.1 Métodos Sensoriales**

Los métodos organolépticos o sensoriales utilizan los órganos de los sentidos para evaluar características del pescado como su aspecto, textura, olor, color, sabor valorando los cambios organolépticos desarrollados progresivamente en el pescado hasta su deterioro. Son los más utilizados en las inspecciones diarias de lonjas, puertos y mercados y en ellos se apoyan los consumidores y los inspectores de los alimentos para determinar la frescura, calidad e idoneidad de los diferentes lotes de pescado (42).

Los métodos sensoriales no requieren de equipos ni materiales especiales, son rápidos y permiten la valoración simultánea de más de un parámetro en diferentes muestras de pescado (42).

### **1.7.5.2 Métodos Físicos**

Los métodos físicos son generalmente no destructivos, sencillos y de fácil aplicación, por lo que resultan muy útiles en la analítica de rutina y pueden utilizarse fuera del laboratorio. Sin embargo, la información que ofrecen es a menudo limitada y se suelen utilizar únicamente como complemento de otro tipo de técnica de (42).

### **1.7.5.3 Métodos Químicos**

Los métodos químicos aportan generalmente, resultados objetivos, fiables y seguros. La mayoría de los métodos químicos utilizados en la evaluación de la calidad del pescado implican el análisis de una sola sustancia o de diferentes sustancias que pertenecen a la misma familia. Por ello, se considera mejor determinar más de uno de estos parámetros. Sin embargo, presentan la ventaja respecto a otro tipo de métodos, de poder ser utilizados tanto para la evaluación de la frescura del pescado sin procesar, como de la frescura del pescado utilizado como materia prima para la obtención de derivados en los que los tratamientos tecnológicos aplicados frecuentemente modifican el sabor, olor y color (42).

#### **1.7.5.3.1 Compuestos nitrogenados de carácter básico**

##### **Nitrógeno básico volátil total (NBVT)**

Tanto la actividad bacteriana, como las modificaciones bioquímicas fruto de la actividad autolítica del pescado dan lugar a una serie de compuestos nitrogenados básicos como el amoníaco, la trimetilamina (expresado como nitrógeno de trimetilamina, N-TMA), la dimetilamina (expresado como nitrógeno de dimetilamina, N-DMA) y la monometilamina, conocidas en su conjunto como Nitrógeno Básico Volátil Total (N-BVT), a los que se les considera representativos de la alteración del pescado. La determinación de N-BVT

presenta una elevada correlación con el grado organoléptico de aceptación del pescado y se aplica en ensayos de rutina debido a que puede ser un método relativamente sencillo de aplicar y barato (42).

El componente mayoritario de la fracción del N-BVT es el N-TMA, compuesto originado por la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA) y al que se considera el responsable del característico “olor desagradable” del pescado. Cuando el desarrollo o la actividad bacteriana están impedidos, como es el caso de temperaturas de congelación, a partir del precursor OTMA se puede formar N-DMA y formaldehído en cantidades equimoleculares por acción de enzimas del propio pescado. Así, el N-TMA está relacionado con el almacenamiento del pescado en refrigeración, mientras que el N-DMA con el pescado mantenido en congelación (42).

#### **Niveles de N-BVT en pescado y su interés como índice higiénico - sanitario**

Se han sugerido diversas cifras de N-BVT relacionadas con la calidad del pescado. Así Billon y col. clasificaron el pescado estableciendo tres categorías:

- **Clase I**, N-BVT < 30 mg/100 g
- **Clase II**, 30 mg/100 g < N-BVT < 40 mg/100 g
- **Clase III**, N-BVT > 40 mg/100 g. Un pescado que presentase estas cantidades, no sería apto para el consumo humano (42).

#### **1.7.6 CAUSAS DE LA ALTERACIÓN DE LOS ALIMENTOS**

Un alimento alterado por contaminación microbiana (crecimiento y actividad de comunidades con actividades enzimáticas) presenta cambios en las características sensoriales, textura, color, olor, sabor, lo cual hace al producto rechazable para el consumo, afectando su comercialización.

El pescado por su origen, cae en la categoría de alimentos alterables, siendo muy sensible a la acción degradadora de organismos con capacidad proteolítica y lipolítica, en efecto, la microbiota de alteración podría estar constituida por:

- El mal tratamiento higiénico del pescado, porque debe empezar con la preparación del personal que trabaja cumpliendo las normas sanitarias.
- La limpieza y desinfección de las instalaciones incluyendo artes de la pesca equipos y utensilios; es decir de la aplicación de la cadena de frío.
- Utilización de envases y embalajes en buen estado higiénico (6) (3).

### **1.7.6.1 Alteraciones del pescado**

El pescado y los demás productos alimenticios procedentes del mar pueden alterarse, igual que la carne, por autólisis, oxidación y actividad bacteriana. La mayor causa del deterioro es la acción de las enzimas que estos poseen, ocasionando el desarrollo bacteriano. Otra causa muy común también es el enrriamiento oxidativo de las grasa de los animales (23).

Los microorganismos que llegan a las carnes son procedentes del exterior, y por el tubo digestivo, durante el sacrificio, la preparación y el almacenamiento. La aparición de malos olores y sustancias viscosas en las carnes indica un incremento en las poblaciones microbianas originando su deterioro. El recuento de viables alcanza entre 50 y  $100 \times 10^6$  UFC/g, dado que sólo un número limitado de microorganismos realmente invade el músculo y el crecimiento microbiano se lleva a cabo principalmente en la superficie, el deterioro es probablemente una consecuencia de la difusión de enzimas bacterianas hacia el interior del músculo y de la difusión externa de nutrientes (9).

Los alimentos marinos están implicados en los brotes de toxiinfección alimentaria; los peces en general y los moluscos, en el momento de la captura están libres de contaminación por *Salmonelas* y *Estafilococos* causantes de ETA (23).

### 1.7.6.2 Factores que influyen en el tipo y velocidad de la alteración

El tipo y la velocidad de alteración del pescado varían con una serie de factores:

1. **Tipo De Pescado:** Las diversas clases de pescados son susceptibles a las alteraciones, los peces planos se alteran con más facilidad que los redondos. Los peces grasos se estropean rápidamente por la instauración de su grasa, lo que hace que sean susceptibles a la oxidación.
2. **Condiciones de captura:** Se producen la alteración debido a la falta de oxígeno, manipulación, descenso del pH.
3. **Contaminación bacteriana:** Las bacterias del pescado pueden proceder del barro, agua, operarios, que lo manipulan, películas viscosas que los recubren o del contenido intestinal.
4. **Temperatura:** El método de conservación más utilizado es la refrigeración, que evita o retrasa el crecimiento bacteriano.
5. **Empleo de un antibiótico:** En forma de baño o en el hielo (23).

La alteración es el, resultado de una serie compleja de cambios que ocurren en el tejido muerto a consecuencia de sus propias enzimas de las bacterias y de reacciones químicas. Las características conocidas del pescado son alteradas por los siguientes efectos resultantes de un conjunto de cambios (3).

### 1.7.6.3 Signos de Alteración del pescado

Reay y Shewan describen una serie de modificaciones fácilmente identificables que el pescado va sufriendo a medida que se alteran hasta convertirse en un producto pútrido. Su característica es de color de aspecto brillante, pálido y adquiere color paró como amarillo de aspecto sucio. La capa viscosa de la superficie aumenta, especialmente en las aletas y agallas. Los ojos van hundiéndose y arrugándose de modo gradual, la pupila se enturbia y la córnea se hace opaca. Las agallas y los músculos se ablandan y en consecuencia se oxidan por la hemoglobina (23).

Es decir que los signos de la alteración se pueden detectar por el mal olor que se percibe al examinar las agallas. Si el pescado no es eviscerado inmediatamente, las bacterias intestinales atraviesan la pared intestinal y llegan a los tejidos internos de la cavidad intestinal. Se cree que este proceso se debe a las enzimas proteolíticas del intestino (17).

#### **1.7.6.4 Bacterias que alteran el pescado**

Las bacterias que provocan la alteración del pescado se encuentran en su superficie y en su intestino. Estos gérmenes varían con las temperaturas a las que se haya conservado el producto; a las temperaturas de refrigeración predominan las especies de *Pseudomonas*, a las que siguen en importancia algunos miembros de los géneros *Achromobacter* y *Flavobacterium*. En las temperaturas elevadas se encuentran bacterias como *Micrococcus* y *Bacillus*, se han citado casos en los que interviene otros géneros como: *Escherichia*, *Proteus*, *Sarcina*, *Serratia* y *Clostridium*. La mayoría de estas crecen solo a temperaturas ordinarias de la atmósfera y probablemente se desarrollan a temperatura de refrigeración (23).

Las bacterias alterantes crecen casi exclusivamente en la superficie del pescado, de aquí que la alteración se desarrolle lentamente cuando la proporción superficie/volumen es baja y rápidamente cuando es alta. Por lo tanto, la tasa de alteración aumenta al pasar de pescado entero a pescado eviscerado, de filetes a piezas menores y finalmente a pescado triturado (61).

Una excepción puede constituirlo el pescado capturado en condiciones de alimentación intensiva, debido a que en estas circunstancias la intensa actividad enzimática digiere muy pronto después de la muerte la pared intestinal, permitiendo que las bacterias allí localizadas penetren en la carne que rodea la cavidad abdominal (61).



#### **1.7.6.4.1 Bacterias causantes de enfermedades alimentarias**

Las enfermedades producidas por los alimentos (ETA) es el síndrome originado por la ingestión de los alimentos y/o agua contaminada, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afectan a la salud del consumidor a nivel individual (6).

También se producen por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental o intencional desde su producción hasta su consumo (6) (15).

Las infecciones alimentarias se deben al consumo de alimentos contaminados con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos que en la luz intestinal pueden multiplicarse y producir toxinas (6) (15).

Existen al menos 12 grupos reconocidos de bacterias y un grupo variado, cuyos miembros se describen de tiempo en tiempo como agentes de intoxicación alimenticia dentro de estos tenemos:

- *Salmonella especies*
- *Staphylococcus aureus*
- *Clostridium perfringens*
- *Clostridium botulinum*
- *Escherichia coli*
- *Shigella spp*
- *Yersinia enterolítica*
- *Vibrio parahaemolyticus*
- *Aeromona shydrophila*
- *Bacillus cereus* (esporulados aerobios)
- *Campylobacter jejuni*
- *Listeria monocytogenes* (16)

### **1.7.7 *Escherichia coli***

#### **1.7.7.1 Clasificación**

**Familia:** Enterobacteriaceae

**Especie:** *Escherichia*

**Gènero:** *coli*

#### **1.7.7.2 Morfología de *Escherichia coli***

*Escherichia coli* (Fotografía No 5) son bacilos de 1 a 3  $\mu\text{m}$  por 0.5 $\mu\text{m}$ , sus formas varía desde cocos a pequeños bastoncillos, que se presentan solos, en pares, en cortas cadenas agrupados en general móviles por los flagelos peritricos aunque existen variantes móviles no flagelados. No forman esporas y son gam negativos (40).

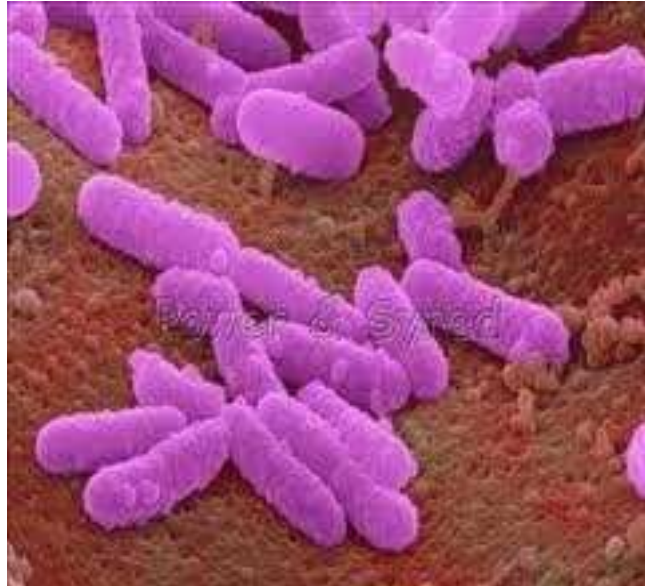
En cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente y en los cultivos viejos se presentan con formas de un tamaño mayor. Son aeróbicos y anaeróbicos facultativos, produce dos tipos de fibras que rigen su capacidad patógena.

*E. coli* produce un tipo de encima denominada bacteriocina que regula la flora normal según el principio de la antibiosis (40).

#### **1.7.7.3 Infecciones en humanos por *Escherichia coli***

La mayoría de los gérmenes *E. coli* están presentes en el tracto gastrointestinal son inofensivos a menos que se desplacen a otras regiones del cuerpo tales como el tracto urinario o las meninges donde provocan daño. *E.coli* es una bacteria Gram negativa, facultativa, la cual puede crecer a temperaturas tan bajas como las de refrigeración (1 a 5°C). Los factores implicados en esta infección se encuentran la deficiente cocción delos alimentos, la falta de normas de higiene, por parte de los manipuladores y del mismo consumidor, la demora en la refrigeración de los alimentos, una vez han sido preparados y las contaminaciones cruzadas.

Los productos de origen cárnico implicados son la carne de hamburguesa y productos a base de salmón, y en general todo producto que sea manipulado bajo escasas normas higiénicas (10) (16).

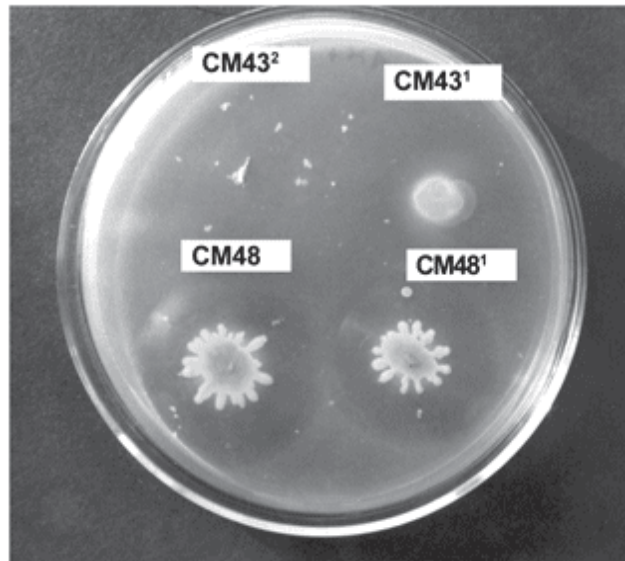


FOTOGRAFÍA No5: *Escherichia coli*. AUMENTO DE 20.000X DEL MICROSCOPIO DE BARRIDO ELECTRÓNICO

#### 1.7.7.4 Bacterias *Proteolíticas*

Las Bacterias *Proteolíticas* (Fotografía No 6) constituyen un grupo heterogéneo de bacterias fuertemente proteolíticas que forman proteinasas (enzimas que digieren las proteínas) extracelulares, así llamadas porque se difunden fuera de las células. Todas las bacterias poseen proteinasas intracelulares, pero sólo unas cuantas las tienen en forma que puedan ser difundidas extracelularmente. Las Bacterias proteolíticas pueden dividirse en aerobias o facultativas, que pueden ser esporógenas o no y anaerobias productoras de esporas. *Bacillus cereus* es un germen aerobio esporulado proteolítico; *Pseudomonas fluorescens*, es aerobio o facultativo y no produce esporas y *Clostridium sporogenes* anaerobio y esporulado. Muchas especies de *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Proteusson* proteolíticas. Ciertas bacterias llamadas ácido proteolíticas determinan a la vez una fermentación ácida y una proteólisis. Como ejemplos pueden citarse *Streptococcus faecalis*, *Liquefaciens* y *Micrococcus caseolyticus*. Algunas bacterias son putrefactivas, es

decir, descomponen las proteínas anaeróbicamente, produciendo compuestos malolientes tales como ácido sulfúrico, mercaptanos, aminas, indol, y ácidos grasos. La mayor parte de las especies proteolíticas de *Clostridium* son putrefactivas, lo mismo que algunas especies de *Proteus*, *Pseudomonas* y otros géneros que no producen esporas (28).



FOTOGRAFÍA No 6: BACTERIAS *Proteolíticas*. COLONIAS DE BACTERIAS AISLADAS EN AGAR LECHE; MOSTRANDO EL HALO DE INHIBICIÓN DE LA CASEÍNA.

#### 1.7.7.5 *Pseudomonas* spp

La *Pseudomonas* spp (Fotografía No 7) es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos, aeróbicos estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Ciertos miembros del género son *psicrófilos*, mientras que otros sintetizan sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso con gran valor taxonómico (28).

Los miembros de este género generalmente son móviles gracias a uno o más flagelos polares que poseen, son catalasa positivos y no forman esporas. Algunas especies sintetizan una cápsula de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biopelículas y protege de la fagocitosis, de los anticuerpos o del complemento aumentando así su patogenicidad (28).

Otras características que tienden a ser asociadas con las especies de *Pseudomonas* con algunas excepciones incluye la secreción de pioverdina (fluorescein), un sideróforo fluorescente de color amarillo verdoso bajo condiciones limitadas de hierro. Algunas especies pueden producir otros sideróforos, tales como la piocianina por la *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* (28).



**FOTOGRAFÍA N.º7: *Pseudomonas* spp. BACILOS GRAM NEGATIVOS, OBSERVADOS AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO CON RESOLUCIÓN DE 10nm Y AUMENTO DE 20.000X**

## **CAPÍTULO II**

### **2 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN**

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Aplicada y Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### **2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

##### **2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

La Trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*) muestra utilizada para la investigación fue tomada en la Hostería “La Pampa”, ubicada en Chambo, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, fue seleccionada de acuerdo a su grado de frescura, ausencia de enfermedades, sin lesiones físicas ni mecánicas, sana y limpia; se almacenó en gavetas de 60 x 40cm y trasladadas en fundas ziploc a los Laboratorios de Alimentos y Microbiología para realizar los correspondientes análisis de frescura.

##### **2.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO**

- Balones aforados
- Pipetas
- Erlenmeyers
- Pinza
- Pipetas automáticas
- Varilla de vidrio
- Píquetas

- Probeta graduada
- Vaso de precipitación
- Bureta
- Matraz
- Soportes Universales
- Pinzas para soportes
- Dean Start
- Balón para destilación
- Refrigerante
- Mangueras
- Gradilla
- Picnómetro
- Papel filtro N<sub>o</sub> 3
- Cajas petris
- Papel aluminio
- Tubos tapa rosca
- Frascos de vidrio
- Pera
- Masque
- Pretriflim
- Algodón
- Gasa
- Viales

### **2.2.3 EQUIPOS**

- Estufa
- Mufla
- Balanza analítica
- Autoclave

- Espectrofotómetro
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de UV
- Refrigeradora
- Molino
- Cámara fotográfica (Sony)
- Computador
- Equipo de micro destilación
- Cuchillos
- Tijera
- Asa de platino
- Baño maría
- Refractómetro

#### **2.2.4 REACTIVOS**

- Sulfúrico Ácido (J. T. Baker 9681-05)
- Sodio Hidróxido (MERK 1.064998.1000)
- Agua destilada
- Desinfectante
- Alcohol
- Rojo de metilo (MERK 6076)
- Cloruro de Bario (DANGER B- 34)
- Amoníaco (CONSEP )
- Suero fisiológico al 80%
- Aceite de comino a diferentes concentraciones como 10.000, 5.000, 2.500 y 1.250
- Glicerol (Mallinckrodt 5092)
- Tween 80 al 10% (MERK 8.2350)
- Estreptomicina
- Sulfato de sodio



#### **2.2.4.1 Medios de cultivo**

- Agar VRB para Enterobacterias (DIFCO 211695)
- Agar PCA (DIFCO 247940)
- Caldo EMUG para *Escherichia coli* ( DIFCO 222200)
- Agar TSA (BBL 211043)
- Caldo lactosa bilis brillante al 2% (DIFCO 274000)
- Agar Cetrimida para *Pseudomona* ( MERCK 1.25284)
- Agar leche para *proteolíticos*
- Caldo TSB (Bacto 211825)
- Caldo leche para proteolíticos
- Agar Müller Hinton (DIFCO 225250)
- Caldo Müller Hinton (DIFCO 275730)
- Agar – Agar (Sharlau 07- 004)
- Tryptone (Acumedia 7351A)

#### **2.2.4.2 Cepas utilizadas**

- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas* spp
- *Proteolíticas*

## 2.3 MÉTODOS.

### 2.3.1 FASE EXPERIMENTAL

#### 2.3.1.1 Caracterización físico- químico del pescado

#### 2.3.1.2 Determinación de las características sensoriales

- **Preparación de la muestra**

Tras la limpieza del pescado (descamado, eviscerado) se cortó en pedazos de 5 x 5 y se colocó en papel aluminio para ser codificada y colocada en cada una de las temperaturas correspondientes como: ambiente, refrigeración y congelación.

Para la Evaluación de las características sensoriales de la Trucha indicamos que a temperatura de 21 °C (ambiente) de 0 días de almacenada no hubo ningún contratiempo, en cambio a 4 °C (refrigeración) de 0 días, la evaluación sensorial de la trucha se realizó después de 4 horas pero en el mismo día, y a 0 °C (congelación) de 0 días de igual manera la evaluación sensorial se realizó a 6 horas después de haber puesto a congelar, pero tomando en cuenta que se ejecutó en el mismo día para no alterar el control.

- **Evaluación Sensorial**

La Evaluación sensorial de la trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*) se realizó atribuyendo valores de apreciación al aspecto, textura y olor, percibidos a través de los sentidos, de acuerdo al Cuadro No 3.

**Aspecto:** Tabla para la evaluación de la calidad del pescado fresco Larrañaga C. et all (Cuadro No. 3)

**Textura:** Tabla para la evaluación de la calidad del pescado fresco Larrañaga C. et all (Cuadro No. 3)

**Olor:** Tabla para la evaluación de la calidad del pescado fresco Larrañaga C. et all. (Cuadro No. 3)

**CUADRO No 2: CÁLCULO DEL ÍNDICE DE CALIDAD DEL PESCADO**

	Valores de Apreciación			
	3	2	1	0
<b>Aspecto</b>				
<b>Piel</b>	Pigmentación brillante, con mucus acuoso transparente.	Pigmentación viva, pero sin brillo; mucus ligeramente turbio	Pigmentación en decoloración; mucus lechosos	Pigmentación apagada; mucus opaco
<b>Ojos</b>	Convexo; cornea transparente; pupila negro brillante	Convexo o subconvexo; cornea ligeramente opaca; pupila negra apagada	Plano, cornea opaca; pupila opaca	Cóncava en el centro; cornea lechosa, pupila gris.
<b>Branquias</b>	Rojizo brillante y sin mucosidad	Menos coloreada, y con ligeras trazas de mucus claro.	Decolorado y con mucus opaco	Mucus opaco
<b>Carne (corte a nivel del abdomen)</b>	Azulada, translúcida, brillante; sin cambio de coloración natural.	Aterciopelada, cérea de color ligero	Ligeramente opaca	Opaca
<b>Color a lo largo de la espina dorsal</b>	Sin coloración	Ligeramente rosa	Rosa	Rojo
<b>Órganos</b>	Rojo brillante	Rojo mate	Rojo pálido	Rojo pardo
	<b>Estado</b>			
<b>Carne</b>	Firme y elástica, superficie lisa	Con elasticidad disminuida	Ligeramente blanda superficie cérea.	Blanda; las escamas se desprenden fácilmente; superficie granulosa.
<b>Espina dorsal</b>	Se rompe en lugar de desprenderse	Adherente	Poco adherente	No adherente
<b>Peritóneo</b>	Totalmente adherido a la carne	Adherente	Poco adherente	No adherente
	<b>Olor</b>			
<b>Branquias, piel y cavidad abdominal</b>	A algas marinas	Ni a algas marinas ni desagradable.	Ligeramente agrio	Agrio

- **Determinaciones Químicas en la carne de trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*).**

Mediante la determinación del Nitrógeno básico volátil total se llegó a conocer el tiempo que permanece fresco la carne bajo condiciones de temperatura ambiente, refrigeración y congelación.

### **NBVT:NTE INEN 182**

Bases volátiles totales: Es la cantidad de nitrógeno básico contenido en la muestra de conservas de pescados y determinado mediante el procedimiento anotado en la presente norma (19).

- **Parte experimental**

1. Desmenuzador mecánico molino
2. Balón de destilación de 250 mL
3. Matraz errlenmeyer
4. Condensador

- **Reactivos**

1. Acido sulfúrico ( J. T. Baker 9681-05)
2. Hidróxido de sodio, solución valorada a 0.1N
3. Óxido de magnesio, reactivo para análisis
4. Rojo de metilo, solución alcohólica
5. Agua destilada

- **Procedimiento**

Se pesó 1 gramo de la muestra, y se transfirió cuantitativamente al balón de destilación, se agregó sobre la muestra 60 mL de agua destilada y 0.02g de óxido de magnesio.

Se conectó inmediatamente el balón al condensador y se destila por 25 minutos. El extremo de salida del condensador debe estar sumergido en 10mL de la solución valorada de ácido sulfúrico al 0.1N contenido en el erlenmeyer, a la cual se agregó unas gotas del indicador rojo de metilo.

Una vez terminada la destilación, se procedió a titular el exceso de ácido contenido en el matrás con solución de hidróxido de sodio 0.1N. También se realizó un ensayo en blanco con todos los reactivos, siguiendo el mismo procedimiento, pero sin la muestra de pescado (19). (Ver Anexo No 1)

### **Cálculos**

El contenido de nitrógeno básico volátil en la muestra, expresado en mg de Nitrógeno por 100gramos de la muestra.

$$N.B.V. = 14 \frac{N_1(V_1 - V_3) + (V_4 - V_2)}{m} * 100$$

Siendo:

**N.B.T.**= Contenido de nitrógeno básico volátil expresado en miligramo de nitrógeno por 100g

**N<sub>1</sub>**= Normalidad de la solución de ácido sulfúrico

**V<sub>1</sub>**= Volumen de la solución de ácido sulfúrico, en mL empleado para recoger el destilado de la muestra

**N<sub>2</sub>**= Normalidad de la solución de hidróxido de sodio

**V<sub>2</sub>**= Volumen de la solución de hidróxido de sodio, en cm<sup>3</sup> empleado en la titulación

**V<sub>3</sub>**= Volumen de la solución de ácido sulfúrico, en cm<sup>3</sup> empleado para recoger el destilado del ensayo en blanco

**m**= Masa de la muestra, en gramos.

### 2.3.1.3 Ensayos microbiológicos en la trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*).

### 2.3.1.4 Aislamiento, identificación y conservación de las cepas empleadas en el estudio

Las cepas utilizadas en el estudio se aislaron a partir de carne fresca de trucha arco iris recolectada en tomada en la Hostería “La Pampa”, ubicada en Chambo, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo. Los microorganismos se identificaron por las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas en medios selectivos y por las respuestas positivas a pruebas metabólicas específicas.

- **Aislamiento y detección de *Escherichia coli* en carne de trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*).**

Se pesó 10 g de carne de trucha y se diluyó 10 veces en agua de peptona al 0.1%, se tomó 10 mL de esta dilución y se inoculó en caldo EC con MUG en doble concentración, se incubó a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 24 horas, se estriaron en placas de agar Mac Conkey y las colonias típicas aisladas se realizaron las pruebas de Eijkman (fermentación de lactosa en caldo lactosa bilis 2%, verde brillante), indol, ureasa, movilidad, citrato y klinger.



FOTOGRAFÍA No 8: IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* POR CALDO EMUG



FOTOGRAFIA NO 9: PRUEBAS BIOQUÍMICAS



FOTOGRAFIA No 10: SIEMBRA EN AGAR VRB PARA IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*

**TABLA No 1: CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS *Escherichia coli***

	KLIGLER								
	Glucosa	Gas/Glucosa	Lactosa	SH <sub>2</sub>	Citrato	Indol	Manitol	Movilidad	Urea
<b><i>Escherichia coli</i></b>	+	+	+	-	-	+	+	V <sup>+</sup>	-

Fuente: BoquetJiménez Ernesto, Manual de técnicas de Microbiología Clínica  
(1)

- **Recuento de proteolíticos**

0.1mL de cada una de las diluciones del homogeneizado, se inocularon y extendieron en placas de Agar Leche, se incubaron a  $30 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 3 días.

Para la preparación del Agar Leche: Se pesó 10 g de leche en polvo; 0.5 g de extracto de levadura; 0.5 g de sulfato de amonio; 0.5 g de cloruro de calcio; 0.1 g de fosfato monobásico de potasio; 0.1 de fosfato dibásico de potasio; 15 g de Agar – Agar todo esto es para un litro de agua destilada.

Las colonias desarrolladas en Agar Leche mostraron un halo de aclaramiento a su alrededor, se caracterizan como típicas bacterias *proteolíticas*.

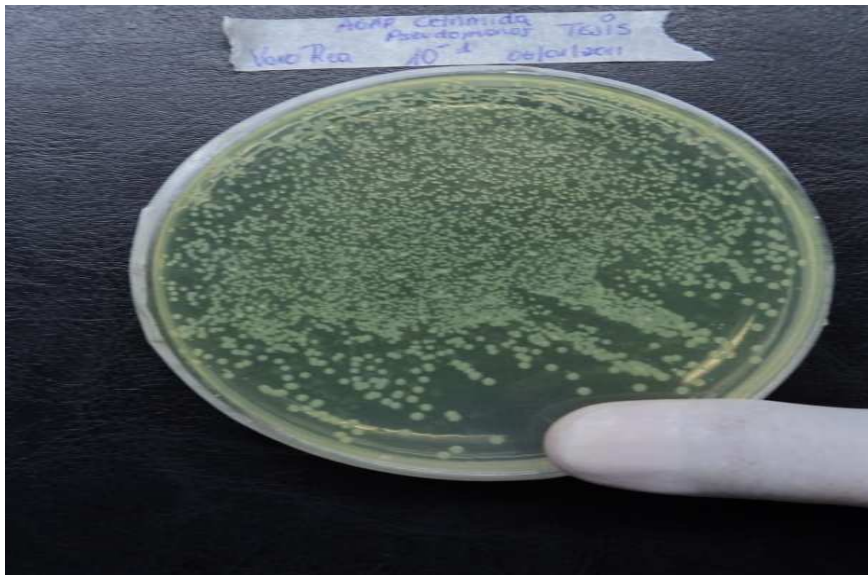




FOTOGRAFÍA No 11: SIEMBRA EN AGAR LECHE

- **Aislamiento de *Pseudomonas* spp**

De las diluciones del homogeneizado de carne de trucha se inocularon en placas de Agar Cetrinida (MERCK 1.05284), se incubaron a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 24 horas.



FOTOGRAFÍA No 12: SIEMBRA EN AGAR CETRIMIDA

- **Conformación del banco de cepas**

Las cepas de interés se conservaron en tubos inclinados con Agar soya Trypticasa que se almacenaron a 4°C, durante el estudio se mantuvieron su viabilidad y pureza. En cada caso se observaron morfologías características coincidiendo con lo reportado por Boteo y Aranzazu.



FOTOGRAFÍA No 13: BANCO DE CEPAS CONSERVADAS EN AGAR TSA

- **Obtención del aceite de comino**

Por el método apropiado para realizar la destilación fue por arrastre de vapor, lo que se obtuvieron 4mL de aceite de comino a partir de 400 g. de semillas.

Los primeros ensayos fueron negativos para la actividad antimicrobiana, siendo necesario la concentración del aceite para lo cual se utilizó el método de destilación simple y para obtener la concentración pura del mismo se añadió sulfato de sodio hidratado, lo que permitió la separación aceite de la solución acuosa.

### **2.3.1.5 Actividad antibacteriana del aceite de comino (*Cuminum cyminum*) sobre las bacterias aisladas causantes de la degradación de la carne de trucha**

## **2.4 SCREENING DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

### **2.4.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN DE DISCO.**

Una suspensión microbiana de  $10^8$  células/mL se diseminó en placas de Agar Müller Hinton, discos de papel de 6 mm de diámetro se impregnaron con 20  $\mu$ L de aceite de comino en tres concentraciones (10000, 5.000, 2.500, 1.250 ppm) y/u otras por determinarse con aceite puro, Tween 80 al 10% y se colocaron en las placas de Agar inoculadas, las placas deberán permanecer a 4°C por 2 h antes de ser incubadas a  $37 \pm 2^\circ$  C por 24 horas.

El diámetro de la zona de inhibición se medirá en mm. La prueba se hará por duplicado y se repetirá en tres ensayos independientes, como control positivo se usará Streptomycin B (10  $\mu$ g/mL) (35). (Ver Anexos No 2)

### **2.4.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA**

#### **2.4.2.1 Método macrodilución:**

Se usarán 13 tubos de 13x100 mm para este ensayo. Doce tubos contendrán diluciones del antimicrobiano en series 1:2 en una escala apropiada de concentraciones (como: 1.000 mg/mL a 0.998 mg/mL cuando los tubos sean inoculados), se usarán controles de crecimiento y de esterilidad.

- **Preparación de la serie de tubos**

Los tubos del 1 al 11 contendrán diluciones del aceite antimicrobiano, el tubo 12 será el control de crecimiento (caldo MH + microorganismos sin antimicrobiano), el tubo 13 será el control de esterilidad (solo caldo MH).

Se dispensará 1 mL de caldo MH en los tubos 2 al 13 y 1.8 mL en el tubo 1 al que se adicionará 200 µL de la solución del antimicrobiano conteniendo 1.000 mg/mL, se mezclará con vortex. Usando una nueva pipeta se transferirá 1 mL del tubo 1 al tubo 2, repitiendo de tubo en tubo hasta el tubo 11, se descartará 1 mL de tubo 11.

- **Preparación del inóculo**

Se transferirán de 3 a 5 colonias (de similar morfología y purificadas a partir de los medios selectivos) a 5 mL de caldo Müller Hinton para obtener una suspensión equivalente al estándar de turbidez 0.5 McFarland, se transferirán 0.1 mL de la suspensión estandarizada a 5 mL de caldo MH, se mezclará en vortex por 15 a 20 segundos, se incubará a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  hasta turbidez visible pero no densa (determinar experimentalmente el tiempo de incubación).

Se ajustará la turbidez de la suspensión con NaCl al 0.85% hasta alcanzar la turbidez del estándar 0.5 MacFarland (aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

Se adicionará 0.3 mL de la suspensión estandarizada a 9.7 mL de caldo MH (dilución 1:32) para obtener recuentos de 4 a  $5 \times 10^6$  UFC/mL. El inóculo se usará en los 15 minutos siguientes de la preparación.

- **Inoculación e incubación**

Los tubos seriados conteniendo el aceite antimicrobiano se inocularon con 100 uL de la suspensión microbiana conteniendo  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Se mezclará 6 a 10 veces, se toman 100 uL para obtener una concentración final del microorganismo  $5 \times 10^5$  UFC/mL. De esta solución estandarizada pasamos a un tubo con 9mL de caldo MH y hacemos diluciones sucesivamente a otros 3 tubos más con 9mL de caldo MH tomando 1mL y en otro tubo estéril tomamos 200 µL de solución más 800 µL de caldo MH, se inoculará 100 µL en una placa de agar se debería contar aproximadamente 100 UFC.

Los tubos seriados 1:2 se incubarán a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  por 20 horas, se mezclarán manualmente, se incubarán 4 horas adicionales.

- **Lectura de la CMI**

Se examinará el tubo 12 (control de crecimiento), se evaluará de la siguiente manera:

- $\pm$ a 1+: muy ligera niebla en el tubo; 2+ ligera niebla; 3+ a 4+, turbidez densa o crecimiento globular fino o precipitado denso con niebla en el sobrenadante.
- Se examinará el tubo 13 (solo caldo). Observar si hay crecimiento cuestionable
- Se examinará la placa para verificar el inóculo: se contarán las colonias que han crecido, se multiplicará este número por el recíproco de la alícuota sembrada y por el factor de dilución ( $5 \times 10^2$ ). El resultado debería estar entre 75 a 150 UFC, si no están en este rango se repetirá todo el ensayo de CIM.
- Se examinarán los tubos del 1 al 11 buscando evidencia de crecimiento y se compararán con los tubos controles.
- Se determinará la CIM (concentración más baja del antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del microorganismo (35). (Ver Tabla No 6)

#### 2.4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

- **Preparación e incubación de cultivos**

A partir de los tubos seriados 1:2 con antimicrobiano se tomarán los tubos que no muestren crecimiento visible, de estos se tomarán inóculos de 10  $\mu$ L y de 100  $\mu$ L y se colocarán en placas de agar MH, se secarán al aire por 15 a 20 minutos, se diseminarán en toda la superficie de la placa, las placas se incubarán a  $35 \pm 2^\circ$  C. Las placas se leerán a las 24 horas para *Escherichia coli*.

- **Lectura de la CIM**

Se tomará en cuenta la densidad microbiana (UFC) del inóculo inicial para el ensayo de CIM, el punto final de la CMB será la concentración del antimicrobiano para que el inóculo inicial se reduzca en un 99.9%.

La CMB se define como la concentración más baja demostrando destrucción de la población en 99.9% o más (35). (Ver Tabla No 7)

#### **2.4.4 Tiempo de muerte**

Este ensayo se utilizará para determinar la actividad antimicrobiana del aceite de comino dependiendo de la concentración y dependiendo del tiempo.

Un inóculo estandarizado se adicionará al caldo conteniendo varias concentraciones del antimicrobiano y a un caldo control de crecimiento (sin antimicrobiano), Se anotarán los viables al tiempo inicial de inoculación y a varios tiempos los resultados se graficarán versus tiempo. Generalmente a las 24 horas hay una reducción de 3 log 10 UFC/mL en los recuentos al comparar la solución antimicrobiana con el control de crecimiento, lo que indica una respuesta bactericida adecuada. La cinética en horas puede ser determinada y comparada para los organismos en estudio (35)

Para aplicar este ensayo se deberán conocer la CIM preferiblemente por el método de macrodilución, a partir de este valor se determinarán otras concentraciones del antimicrobiano, generalmente 2 veces la CIM y 4 veces la CIM, se determinará la tasa de crecimiento del microorganismo a 0, 4, 8, 24 horas luego de la inoculación (35).

- **Concentraciones a ensayar:**

CIM (mg/mL), 2 x CIM, 4 x CIM en tubos con 900uLde caldo MH

**Tiempos:** 0, 4, 8, 24, 48 horas

**Diluciones a sembrar:**  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$

**Concentración del antimicrobiano:** A partir de la solución stock de 1000 mg/mL, luego se realizaron otras diluciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6 mg/mL. Sabiendo que la CIM es 31.25mg/mL, se emplearon también: 0.5 MIC, 1MIC, 2MIC y 4MIC.

Se tomarán de 3 a 5 colonias se transferirán a 5 mL de caldo MH para obtener una suspensión de turbidez igual al estándar 0.5 MF, 0.1 mL de esta suspensión se pasará a 5

mL de CMH se agitará con vortex de 15 a 20 segundos, se incubará a  $35 \pm 2$  °C hasta turbidez visible, debería corresponder a la mitad de la fase logarítmica, se monitoreará el crecimiento en el caldo por 4 a 6 horas, tomando alícuotas del caldo cada 30 minutos y enumerando las UFC, se determinará el tiempo necesario para la incubación.

Se ajustará la suspensión con NaCl al 0.85% para alcanzar la turbidez del estándar 1 MF ( $3 \times 10^8$  UFC/mL), se diluirá esta suspensión mezclando 1 mL de la suspensión con 4 mL de caldo y se obtendrá aproximadamente  $6 \times 10^7$  UFC/mL

- **Inoculación e incubación**

Se adicionará 0.1 mL del inóculo conteniendo  $6 \times 10^7$  UFC/mL a cada tubo con 10 mL de CMH, excepto al control de esterilidad, la concentración final del microorganismo en cada tubo será  $6 \times 10^5$  UFC/mL, se tomará 0.1 mL del tubo y se sembrará en placas de AMH para recuento de viables, se incubará a  $35 \pm 2$  °C, al siguiente tiempo: 4 horas se repetirá el ensayo, se mezclarán con vortex, se removerá 0.1 mL de alícuota (dentro de 5 a 10 minutos), se incubará y se repetirá en los demás tiempos.

- **Lectura de resultados**

A las 24 horas se inspeccionarán visualmente los tubos y se anotará la CMI para el ensayo de tiempo de muerte, también se harán recuentos para todos los tubos incluyendo el control.

Se determinará la densidad del inóculo inicial al tiempo cero para confirmar que la densidad microbiana fue la apropiada: aproximadamente  $6 \times 10^5$  UFC/mL.

Se harán los recuentos y convertirán las UFC/mL a log 10. Se graficará las UFC/mL (y) versus tiempo (x).

Se determinará cual concentración resultará en una baja en 3 log 10 respecto al control de crecimiento.

Se determinará el tiempo requerido para obtener esta disminución.

Se reportarán: CIMs y el tiempo cuando ocurrió la actividad bactericida (35). (Ver Tablas No 9, 10, 11,12)

#### 2.4.5 EFECTO INHIBITORIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*) ESTUDIO "in situ"

- **Preparación del inóculo**

Se tomarán de 3 a 5 colonias se transferirán a 5 mL de caldo MH para obtener una suspensión de turbidez igual al estándar 0.5 MF, 0.1 mL de esta suspensión se pasará a 5 mL de CMH se agitará con vortex de 15 a 20 segundos, se incubará a  $35 \pm 2$  °C hasta turbidez visible, debería corresponder a la mitad de la fase logarítmica, se monitoreará el crecimiento en el caldo por 3 horas, conteniendo una carga microbiana de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, de ahí se toma una alícuota de 0.3mL de la suspensión ajustada en 9.7mL de caldo para obtener una concentración de  $1.5 \times 10^6$  UFC/mL, después se verterá 100µL de la suspensión en 9mL caldo, enseguida se pasará 100µL de la solución anterior a otro tubo con 9.9mL de caldo y de ahí a otro tubo con 9.9mL de caldo MH para obtener la concentración aproximada de  $1.5 \times 10^3$  UFC/mL. (Ver Anexo No 3)

- **Procedimiento del ensayo**

Para el efecto inhibidor del aceite de comino (*Cuminum cyminum*) se realizó un ensayo con una concentración de 312.5mg/mL.

Para esta prueba primeramente se cortó la trucha en pedazos de 5x5, se la hizo hervir por dos minutos, se le retiró la piel de la trucha y se colocó en fundas ziploc pequeñas, después se inoculó 100µL del Caldo MH a una concentración aproximada de bacterias a  $10^3$  UFC/mL, masajeando por un lapso de 1.5min en cada uno de los pedazos, luego se añadió el aceite de comino a una concentración de 312.5mg/mL en cada una de las fundas ziploc, añadiendo 100 µL del aceite y se masajea de igual forma por 1.5min.

Para el blanco se realizó el mismo procedimiento, pero la excepción de esto fue no aplicar el aceite de comino.



Se hará el muestreo de cada una de las fundas ziploc, tanto para las que poseen el aceite de comino con la concentración de 312.5mg/mL y para los blancos correspondientes con cada bacteria como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp y *Proteolíticos*; se incubarán todas las fundas ziploc en la refrigeradora a una temperatura de 4 a 7 °C, luego se tomará la muestra y se harán recuentos de viables a las 0, 12, 24 y 48 horas usando un medio de cultivo de PCA e incubarlo a  $35^{\circ}\pm 2^{\circ}$  C por 24 horas (35).(Ver Tablas13,14, 15)

## CAPÍTULO III

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos que se reportaron fueron obtenidos sobre la base de la metodología indicada.

#### 3.1 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL Y QUÍMICA DE LA CARNE DE TRUCHA

Se realizó la evaluación sensorial a tres grupos de muestras de Trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*), determinándose: Aspecto, textura y olor, a temperaturas: 21°C (ambiente), 4°C (refrigeración) y 0°C (congelación) y a 0, 5 y 15 días de almacenamiento, los resultados constan en la Tabla No. 2

**TABLA No 2: CAMBIOS EN LOS ATRIBUTOS SENSORIALES DE FILETES DE TRUCHA EN AMBIENTE, REFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN.**

Atributos sensoriales	Tratamiento	Período de Almacenamiento (días)		
		0	5	15
Textura	Control (21°C)	3	2	0
	Refrigeración(4°C)	3	1	0
	Congelación (0°C)	3	3	3
Olor	Control (21°C)	3	2	0
	Refrigeración(4°C)	3	2	0
	Congelación (0°C)	3	3	3
Aspecto	Control (21°C)	3	1	0
	Refrigeración(4°C)	3	1	0
	Congelación (0°C)	3	3	3
Promedio	Control (21°C)	3	1.6	0
	Refrigeración (4°C)	3	1.6	0
	Congelación (0°C)	3	3	3

La Unión Europea clasifica los pescados en cuatro categorías, atendiendo al índice de frescura (19). (Ver Tabla No 3)

El índice de frescura del pescado se obtiene de la media aritmética de una serie de valoraciones hechas sobre las características del pescado expuestos en la parte experimental (19). (Ver Cuadro No 3).

**TABLA No 3 CLASIFICACIÓN DE PESCADOS EN CUATRO CATEGORÍAS**

<b>No de CATEGORIA</b>	<b>CATEGORIA</b>	<b>INDICE DE FRESCURA</b>
<b>1</b>	Extra	Igual o superior a 2.7
<b>2</b>	Calidad A	Superior a 2 e inferior a 2.7
<b>3</b>	Calidad B	Superior a 1 e inferior a 2
<b>4</b>	Calidad C	Inferior a 1

(Fuente: Larrañaga call Juan, Carbello Fernandez Julio, Rodriguez Torres Maria del Mar pp: 339),

Las muestras de trucha fueron consideradas como aceptables para consumo humano cuando la calificación alcanzó 3, valor correspondiente a la trucha fresca en la que no se apreció ningún tipo de alteración.

La textura, el olor, color, aspecto, es decir la aceptabilidad de las muestras control a temperatura ambiente fueron inaceptables (calificación 1.6) el día 5, a temperatura ambiente y en refrigeración; se observó el pescado en proceso de descomposición, mientras que en 15 días alcanzó la putrefacción total, siendo inaceptable para el consumo humano.

De acuerdo a Rodríguez (Rodríguez, J., 2005) el pescado se conserva a una temperatura de 4°C, pero la vida comercial termina alrededor de los 2 días mantenido al aire sin protección, sin embargo al envasar en atmósferas modificadas que sustituyen el aire por otras mezclas de gases, el período comercial puede prolongarse considerablemente (47).

De otro lado, los resultados de la evaluación sensorial parecen estar correlacionados a los valores del análisis químico y microbiológico. Así, de acuerdo a Shewan, enterobacterias y

coli formes podrían multiplicarse con el paso del tiempo, ocasionado el deterioro del pescado (42)

Debido a la alta oxidación de los lípidos y crecimiento microbiano las muestras control de filete de trucha demostraron contaminación apareciendo mal olor, limo y decoloración tras 5 días de almacenamiento a temperatura ambiente y en refrigeración, teniendo una (calificación de 1.6).

En cambio, la temperatura de 0°C preservó este alimento, observándose sus características sensoriales inalteradas a los 0, 5 y 15 días de almacenamiento, alcanzando una (calificación de 3).

La temperatura de conservación de los alimentos debe ser la adecuada para evitar la proliferación de los microorganismos contaminantes implicados en el deterioro o enfermedades transmitidas por alimentos, en este sentido las temperaturas de refrigeración y congelación controlan la microbiota de la trucha debido a que inactivan a mesófilos y psicrófilos implicados en la alteración. (42)

Además, el aceite de comino usado como biopreservativo en el filete de trucha no debería introducir ningún tipo de efecto en sus atributos sensoriales, lo cual fue verificado en este estudio.

### **3.2 ANÁLISIS PARA DETERMINAR EL NITRÓGENO BÁSICO VOLÁTIL TOTAL**

La determinación de bases volátiles fue una de las primeras pruebas químicas aplicadas a la evaluación del pescado y durante mucho tiempo se ha considerado representativa del grado de alteración de los productos del mar (39).

Con el término general de nitrógeno básico volátil total (N-BVT) se incluye la medición de N-TMA (producida por el deterioro bacteriano), dimetilamina (producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento en congelación), amoníaco (producido por

desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos) y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con el deterioro de los productos pesqueros. Su determinación expresa cuantitativamente el contenido de bases volátiles de bajo peso molecular (39).

Los valores de NBVT cuando es  $< 30\text{mg}/100\text{g}$  significa que pertenece a la clase I, cuando existe es  $<30\text{mg}/100\text{g}$  y  $<40\text{mg}/100\text{g}$  de NBVT es clase II. Por último cuando el NBVT es  $>40\text{MG}/100\text{g}$  pertenece a la clase III, indicando que el pescado con estos valores no sería apto para el consumo humano (39).

**TABLA N.º 4: DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO BASICO VOLÁTIL TOTAL (NBVT)**

TRATAMIENT	TIEMPO (DIAS)	TEMPERATURAS °C	DETERMINACION DE NBVT mg /100g	RESULTADO
T <sub>1Amb</sub>	0	21	No hubo viraje	0
T <sub>2Ref</sub>	5	4	Se tituló con 1.9mL de NaOH	168mg/100g
T <sub>3Cong</sub>	5	0	No presento viraje	0
T <sub>1 Amb</sub>	15	21	Se tituló con 1.2mL de NaOH	176.99mg/100g
T <sub>2Ref</sub>	15	4	Se tituló con 0.3mL de NaOH	195.51mg/100g
T <sub>3Cong</sub>	15	0	No hubo viraje	0
<b>BLANCO</b>	-	-		

Los valores del nitrógeno básico volátil total para los tratamientos durante el almacenamiento a 4°C y 0°C se presentan en la Tabla No 4

Debido a que el nitrógeno básico volátil total es producido principalmente por descomposición bacteriana, los valores más altos ocurren a los 15 días de almacenamiento de la trucha a temperatura ambiente y en refrigeración, evidenciando la actividad de la microbiota de contaminación. La franca descomposición se inició ya a los 5 días, por ello normalmente, el pescado se mantiene en refrigeración hasta 2 días.

La conservación de la trucha en frío se debe a que, pese a la presencia de grupos que puedan crecer a bajas temperaturas su abundancia disminuye durante el almacenamiento con hielo, posiblemente porque las tasas de crecimiento pueden ser inferiores a las de otros contaminantes como por ejemplo psicrotrofos Gram-negativos (29).

Es así como a la temperatura de 0°C y entre 5 y 15 días de almacenamiento no hay producción de nitrógeno básico volátil total, a la vez las características sensoriales se mantienen y los riesgos microbianos son mínimos, pues las bacterias se encuentran latentes y no hay alteración enzimática, por esta razón la congelación es un método de conservación adecuado que incrementa la vida útil del pescado, promoviendo además ventajas comerciales, económicas e incluso nutricionales al facilitar el acceso de este producto a gran parte de la población.

En general, el pescado es un alimento extremadamente perecible, su deterioro resulta de actividades enzimáticas y microbianas lo cual lleva a pérdida de calidad y contaminación (25). El análisis de metabolitos de contaminación como el nitrógeno básico volátil total puede ser significativamente más rápido que los exámenes microbiológicos como índice de calidad, estos a la vez dan más información sobre la frescura de esta carne (33).

Sería de esperar que el aceite de comino reduzca la formación de Nitrógeno básico volátil total en las condiciones del presente ensayo al reducir el número de población bacteriana en la carne de trucha o disminuir su capacidad para la desaminación oxidativa de compuestos nitrogenados proteicos y /o no proteicos (31).

### 3.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA CARNE DE TRUCHA ARCO IRIS TRATADA CON ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*)

Tabla No 5: SCREENING DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*) FRENTE A *Escherichia coli* \*

Concentraciones mg/mL	Diámetro del halo de Inhibición en (mm)						Desviación estándar
10.000	12	12	12	12	12	12	0,00
5.000	10	10	12	12	11	12	0,98
2.500	8	10	8	9	8	8	0,84
1.250	2	2	2	2	2	2	0,00
Ap	14	14	14	14	13	14	0,41
TW 80 al 10%	0	0	0	0	0	0	0,00
Streptomicina 10µg/µl	12	12	11	12	12	12	0,41

\*Cepa aislada de Trucha arco iris

El mayor efecto inhibitorio correspondió al aceite de comino sin diluir con un halo de 14 mm superando al patrón de Streptomicina que formó un halo de 12 mm. Las concentraciones de 10.000 a 1250 mg/mL también mostraron actividad frente a *E. coli* (Ver Tabla No 5)

La actividad antimicrobiana podría darse por componentes fenólicos con acción principal sobre la membrana bacteriana (38), siendo las bacterias gram positivas más sensibles que las gram negativas (27).

En la actividad antimicrobiana, de compuestos naturales es posible que el componente principal esté modulado por otras moléculas que se encuentran en menor proporción, y es probable que varios componentes jueguen un rol en los atributos de los productos naturales tales como la fragancia, densidad, textura, color y sobre todo la penetración celular de aceites esenciales; las atracciones lipofílicas o hidrofílicas y fijación en las paredes celulares y membranas y la distribución celular. Esta característica es muy importante porque la distribución del aceite en la célula determina los diferentes tipos de reacciones producidas dependiendo de su compartimentalización en la célula. En este sentido da más información el estudio de un aceite completo antes en lugar de sus componentes

individuales (Bakkali, F. et al, 2008), en este estudio el producto ensayado fue el aceite extraído de la semilla de comino (26).

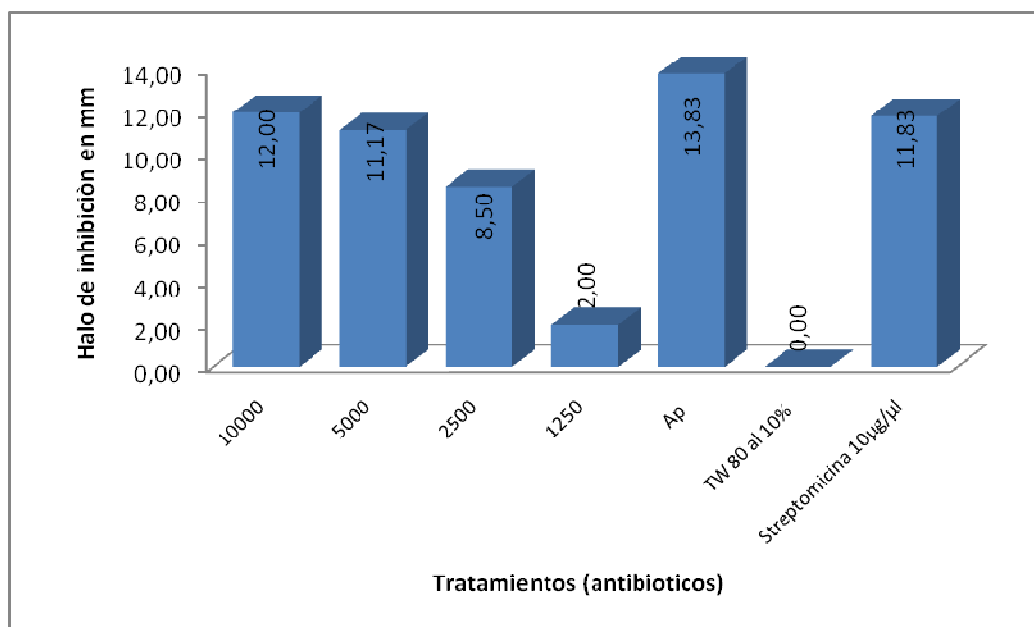


GRAFICO No1: SCREENING DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*) FRENTE A *Escherichia coli* \*



**TABLA No 6: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA**

		<b>CLASIFICACIÓN DE LA TURBIDEZ</b>		
<b>Num. Tubos</b>	<b>Aceite de comino (<i>Cuminum cyminum</i>)</b>	<b>Primera Repetición</b>	<b>Segunda Repetición</b>	<b>Tercera Repetición</b>
	<b>Concentración mg/mL</b>			
<b>1</b>	<b>1000</b>	(+++)	(+++)	(+++)
<b>2</b>	<b>500</b>	(+++)	(+++)	(+++)
<b>3</b>	<b>250</b>	(+++)	(+++)	(+++)
<b>4</b>	<b>125</b>	(+++)	(+++)	(+++)
<b>5</b>	<b>62.5</b>	(++)	(++)	(++)
<b>6</b>	<b>31.25</b>	(++)	(++)	(++)
<b>7</b>	<b>15.6</b>	(++)	(++)	(++)
<b>8</b>	<b>7.8</b>	(+)	(++)	(++)
<b>9</b>	<b>3.9</b>	(+++)	(+++)	(+++)
<b>10</b>	<b>1.95</b>	(+++)	(+++)	(+++)
<b>11</b>	<b>0.998</b>	(+++)	(+++)	(+++)
<b>12</b>	<b>MH+ mo</b>	(+++)	(+++)	(+++)
<b>13</b>	<b>CMH</b>	<b>Claro</b>	<b>Claro</b>	<b>Claro</b>

\*± a 1+: Muy ligera niebla en el tubo

\*2+ ligera niebla

\*3+ a 4+: Turbidez densa o crecimiento globular fino o precipitado denso con niebla en el sobrenadante.

\*CMH: Control

En la tabla No 6 de la determinación de la concentración inhibitoria mínima se clasifica la turbidez en tubos con distintas concentraciones de aceite de comino, para este ensayo se utilizaron trece tubos con caldo Müller Hinton incluidos un caldo inoculado con *Escherichia coli* a ( $4 \times 5 \times 10^6$  UFC/mL ) y otro caldo sin bacterias que serán los controles para nuestro ensayo, las concentraciones de aceite de 1.000, 500, 250 y 125 mg/mL para las tres repeticiones se determina la clasificación de la turbidez con tres cruces lo que visible que tiene una turbidez densa o crecimiento globular fino o una niebla en el sobrenadante, pero no se puede dar una respuesta debido a que la presencia de aceite en estas concentraciones son altas y en contacto con el Tween 80 al 10% al hacer la mezcla se vuelve lechoso y no permite distinguir la presencia o ausencia de los microorganismos en el tubo.

Para las concentraciones de 62.5, 31.25, 15.6, mg/mL se los clasifica la turbidez con dos cruces, que quiere decir que presenta una niebla ligera en el tubo, de igual manera que lo anterior expuesto no se puede determinar si existe o no la presencia de las bacterias, solo la comprobación de esto se lo hace en siembra de Agar Müller Hinton incubados a 35C° por 24 horas.
























































En las últimas concentraciones de 7.8, 3.9, 1.95 y 0.998 mg/mL por triplicado se puede visualizar sin ningún problema la presencia de una niebla bien densa tipificada con tres cruces, para la verificación de microorganismos se realizó la siembra correspondiente. En estas concentraciones existe los microorganismos debido a que las concentraciones realizadas de aceite esencial de comino son muy bajas lo que hace que pierda la eficacia de la actividad antimicrobiana del aceite. (Ver Anexos No 3)

Este ensayo es muy importante debido a que por medio de esto podemos identificar cual va hacer la concentración inhibitoria mínima bactericida utilizada para los siguientes ensayos.


**TABLA No 7: CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA DEL ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*) FRENTE A *Escherichia coli* \***

**METODO DE MACRODILUCIÓN**

Inseng, H.D 1995 Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol I Guide to Regulatory Requirements. ASM press. Washington, D.C. USA pp. 5.16.1 a 5.20.20

Aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) en mg/mL	CONCENTRACIONES											Inoculación: 4 a 5x10 <sup>6</sup> UFC/mL	
	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	1.95	0.998	CONTROLES	
												(MH + mo) Control positivo	CMH Control negativo
													
													
													
													
													

\*Cepa aislada de Trucha arco iris

\*  : ≥30 x 10<sup>2</sup>UFC/mL

\*  : No hay crecimiento

El ensayo de macrodilución en tubos para determinar la concentración inhibitoria mínima CIM está diseñado para indicar cuál es la concentración más baja del agente antimicrobiano capaz de inhibir completamente la multiplicación del inóculo bacteriano (acción estática), lo que se evidencia por la claridad del caldo (37).

En el presente estudio no fue posible la lectura directa de la CIM por cuanto el aceite de comino usado como antimicrobiano ocasionó el desarrollo de turbidez en mayor o menor grado en todos los tubos de la prueba. (Ver Tabla No 6)

Sin embargo, el ensayo permitió determinar la concentración mínima bactericida CMB del aceite de comino mediante subcultivo de inóculo de los tubos en placas de agar Müller Hinton, usando el rango de concentraciones de 1.000 a 0.998 mg/mL con los respectivos controles positivo y negativo (Ver Tabla No 7)

Los resultados de este ensayo mostraron que el aceite de comino fue efectivo en las concentraciones de 1.000 a 31.25-15.6 mg/mL para eliminar *E. coli*, quizás por la presencia de aldehído cumínico, componente principal del comino. En contraste, en las concentraciones sucesivas de orden 2 (7.8 a 0.998 mg/mL) se recuperaron más de  $30 \times 10^2$  UFC /mL de *E. coli*, lo que indica que el aceite fue muy diluido y no ejerció control sobre la población bacteriana.

En la metodología de estudio para la CMB es importante tener presente que el inóculo bacteriano a ensayar debe encontrarse en fase logarítmica de crecimiento ya que muchos antimicrobianos ejercen efecto bactericida solo en la fase exponencial de crecimiento.

Estas pruebas determinaron que el aceite de comino en concentración de 31.25 mg/mL sería bactericida para *E. coli*.

Los estudios de actividad antimicrobiana de productos naturales, no se han estandarizado como en el caso de estudios clínicos, por tanto sus resultados son difíciles de comparar, tomando en cuenta que emplean metodologías de análisis que incluyen diferentes solventes y concentraciones de las cepas microbianas (Hammer, Carson etc) (37).

Para el ensayo del tiempo de muerte, se emplearon las concentraciones mínimas bactericidas en lugar de concentraciones inhibitorias mínimas que en la práctica no se determinaron por la interferencia de turbidez de las disoluciones de aceite en las lecturas de los tubos (Ver Tabla 8).

**TABLA No 8: DETERMINACIÓN DE LA TURBIDEZ EN TUBOS A DIFERENTES TIEMPOS**

Tiempo	Lectura de tubos controles: CMH + 10uL de bacterias $6 \times 10^5$ UFC				Lectura de tubos inoculados con: CMH + Aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> ) + 10uL de bacterias $6 \times 10^5$ UFC			
	0.5MIC (15.6mg/mL)	1MIC (31.25mg/mL)	2MIC (62.5mg/mg/mL)	4MIC (125mg/mL)	0.5MIC (15.6mg/mL)	1MIC (31.25mg/mL)	2MIC (62.5mg/mL)	4MIC (125mg/mL)
t <sub>0</sub>	No hubo turbidez	No hubo turbidez	No hubo turbidez	No hubo turbidez	(+)	(+)	(+++)	(+++)
t <sub>4</sub>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)
t <sub>24</sub>	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	(+++)

\*± a 1+: Muy ligera niebla en el tubo

\*2+ Ligera niebla

\*3+ a 4+: Turbidez densa o crecimiento globular fino o precipitado denso con niebla en el sobrenadante.

El tiempo de muerte es otro método para evaluar la capacidad de un agente antimicrobiano y para examinar la tasa y cuál es la concentración del agente.

En este estudio el tiempo de muerte determinó la actividad bactericida del aceite de comino contra *E. coli* dependiendo de la concentración: 0.5, 1, 2, y 4 CIM y del tiempo de actuación 0, 4, 8 ó 24 horas.

Los resultados de las tablas (9, 10, 11 y 12) indican que mientras el cultivo control a 0 horas de la inoculación de *E. coli* va aumentando en población con el tiempo de incubación, los otros cultivos tratados con las distintas concentraciones del aceite de comino experimentaron una reducción del 100% de la carga microbiana, con un decrecimiento variable de 2-4 log<sub>10</sub>-UFC/mL.

Generalmente, una disminución de 3 unidades logarítmicas en el recuento de viables revela una adecuada respuesta bactericida del material de ensayo y los organismos son típicamente muertos cuando hay una reducción aproximada de 1 log<sub>10</sub>-UFC/mL, a una CIM a 2 y 4 veces la CIM pueden decrecer 2 y 3 unidades logarítmicas en la primera hora de incubación (35). Nuestros resultados guardan coherencia con lo anteriormente mencionado por tanto el aceite de comino muestra actividad bactericida contra *E. coli*. La concentración más baja ensayada de 15.6 mg/mL fue tan efectiva como la solución de 4 CIM y tendrían un tiempo de actuación mínimo de 4 horas.

**TABLA No 9: RESULTADOS DEL TIEMPO DE MUERTE DE *Escherichia coli* FRENTE A UNA CONCENTRACIÓN DE 0.5 MIC (15.6 en mg/mL) ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*)**

<i>Escherichia coli</i>		Aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> )			
Tiempo en (Horas)	<i>E. coli</i> crecimiento microbiano UFC/mL	Log de viables	0.5CIM (15.6mg/mL)	Actual* Log UFC	% de Reducción
0	12x10 <sup>3</sup>	4	0	0	100%
4	67x10 <sup>5</sup>	7	0	0	100%
8	25x10 <sup>7</sup>	8	0	0	100%
24	25x10 <sup>8</sup>	9	0	0	100%

CIM: Concentración inhibitoria mínima  
UFC: Unidades formadoras de colonia

En los ensayos “*in vitro*” realizados para el tiempo de muerte de la bacteria *Escherichia coli* se puede determinar que para este estudio se hizo a cuatro tiempos 0, 4, 8 y 24 horas de incubación a 35 C° por 24 horas, y diferentes concentraciones de aceite como 0.5, 1, 2 y 4 MIC en mg/mL aumentado 100 veces la concentración, es decir que al tiempo cero de inoculación con 24 horas de incubación el crecimiento en el control fue de 4 logaritmos de viables, en cambio a cuatro horas de incubación presenta 7 logaritmos de viables , a ocho horas presenta 8 logaritmos de viables y a veinte y cuatro horas de incubación existe 9 logaritmos de viables, puesto que en la concentración de 0.5 MIC actual de aceite de comino mas la bacteria *Escherichia coli* se redujo a cero unidades formadoras de colonias, se atribuye un porcentaje de efectividad antibacteriana de aceite de comino de manera “*in vitro*” del 100%.

Como se puede observar en el Gráfico No 1 la actividad antibacteriana del aceite de comino es una tendencia recta esto se debe a que produce eficacia “*in vitro*” frente a *E. coli*, así el ensayo de forma “*in vitro*”, indicando que a medida que va pasando las horas de incubación de la bacteria produce el aceite produciendo la muerte de las mismas.



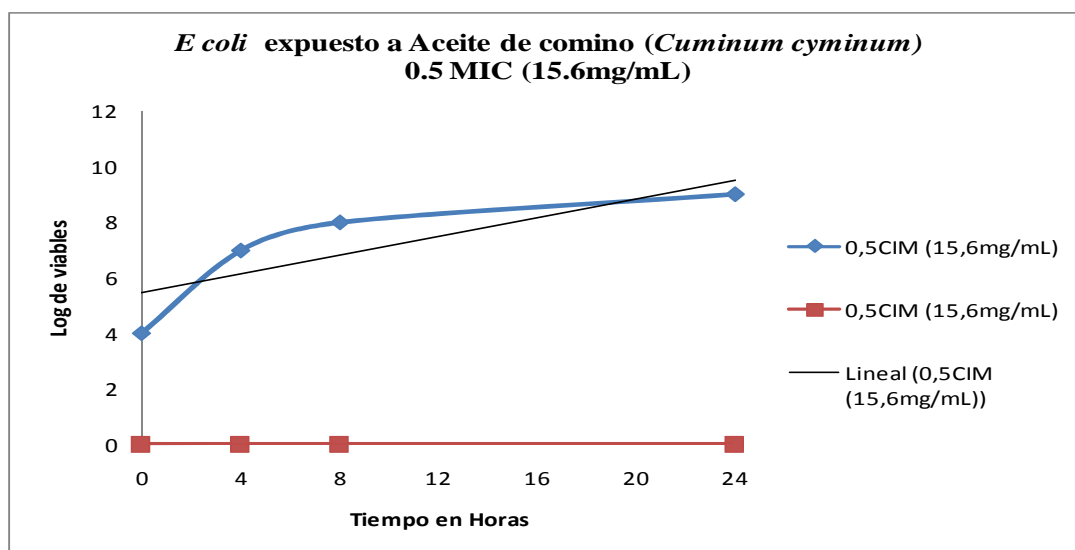


GRAFICO No. 2: *Escherichia coli* EXPUESTO A ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*) 0.5MIC

TABLA No 10: RESULTADOS DEL TIEMPO DE MUERTE DE *Escherichia coli* FRENTE A UNA CONCENTRACIÓN DE 1MIC (31.25mg/mL) ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*).

<i>Escherichia coli</i>		Aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> )			
Tiempo en (Horas)	<i>E. coli</i> crecimiento microbiano UFC/mL	Log de viables	1CIM (31.25mg/mL)	Actual* Log UFC	% de Reducción
0	87x10 <sup>2</sup>	4	0	0	100%
4	98x10 <sup>5</sup>	7	0	0	100%
8	30x10 <sup>3</sup>	5	0	0	100%
24	20x10 <sup>8</sup>	9	0	0	100%

CIM: Concentración inhibitoria mínima  
UFC: Unidades formadoras de colonia

En el ensayo de *E. coli* frente a 1 MIC de aceite de comino al tiempo cero de inoculación con 24 horas de incubación el crecimiento en el control fue de 4 logaritmos de viables, en cambio a cuatro horas de incubación presentó 7 logaritmos de viables, a ocho horas presenta 5 logaritmos de viables y a veinte y cuatro horas de incubación existe 9 logaritmos de viables, puesto que en la concentración de 1 MIC actual de aceite de comino mas la bacteria *Escherichia coli* se redujo a cero unidades formadoras de colonias, dando un

porcentaje de efectividad antibacteriana de aceite de comino de manera “*in vitro*” del 100%.

En el grafico No 3 la tendencia que presenta la actividad del aceite de comino frente a la bacteria es una recta, se debe a que medida que va pasando las horas las bacterias van desapareciendo, debido a que el aceite de comino tiene componentes químicos lo que produce la muerte a las bacterias. En relación a la otra tendencia decimos que, a medida que va pasando las horas van creciendo más las bacterias esto es porque no existe el antibacteriano el cual inhibe el crecimiento.

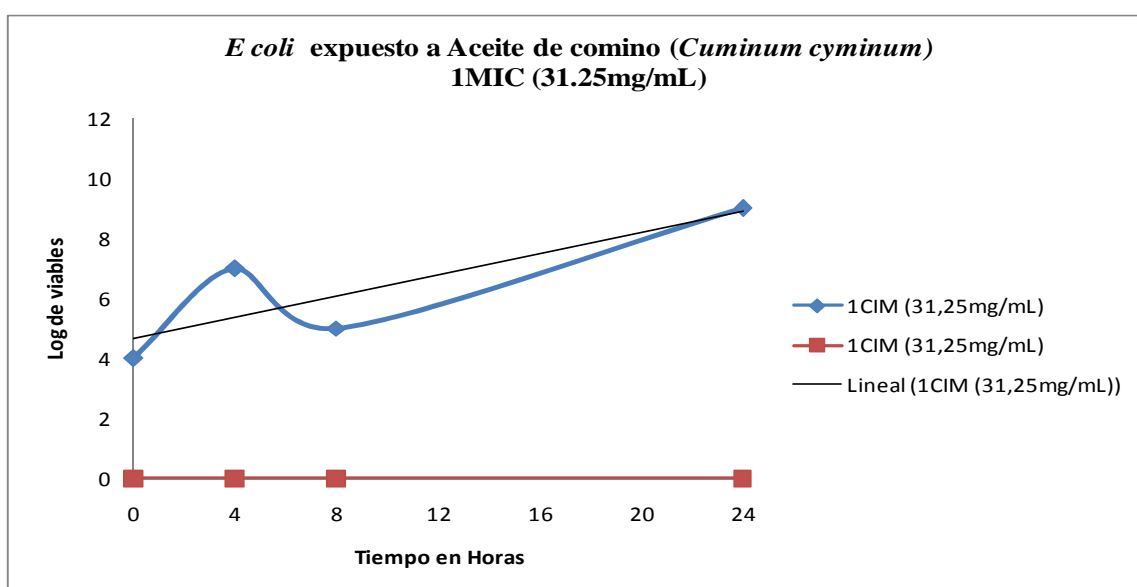


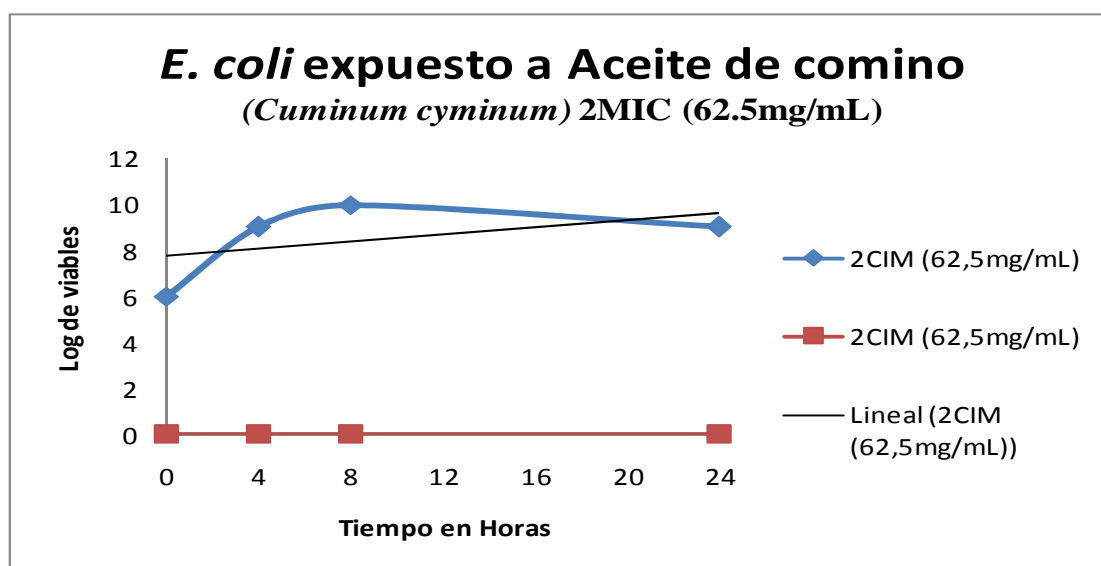
GRAFICO No 3: *Escherichia coli* EXPUESTO A ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*) 1MIC

**TABLA No 11: RESULTADOS DEL TIEMPO DE MUERTE DE *Escherichia coli* FRENTE A UNA CONCENTRACIÓN De 2MIC (62.5mg/mL) ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*).**

Aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> )					
<i>Escherichia coli</i>			2CIM (62.5mg/mL)	Actual* Log UFC	% de Reducción
Tiempo en (Horas)	<i>E. coli</i> crecimiento microbiano UFC/mL	Log de los viables			
0	$12 \times 10^5$	6	0	0	100%
4	$12 \times 10^8$	9	0	0	100%
8	$40 \times 10^8$	10	0	0	100%
24	$21 \times 10^8$	9	0	0	100%

CIM: Concentración inhibitoria mínima  
UFC: Unidades formadoras de colonia

En esta tabla diremos que al tiempo cero existe 6 logaritmos de viables, a cuatro horas hay 9 logaritmos, a ocho horas 10 logaritmos y a veinte y cuatro existen 9 logaritmos de viables estos corresponden al blanco, mientras que en el ensayo de la concentración de aceite a 2MIC en todos los tiempos se reduce a cero los logaritmos de unidades formadoras de colonias, presentando un porcentaje de reducción del 100% en forma “*in vitro*” para el ensayo.



**GRAFICO No 4: *Escherichia coli* EXPUESTO A ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*) 2MIC**

**TABLA No 12: RESULTADOS DEL TIEMPO DE MUERTE DE *ESCHERICHIA COLI* FRENTE A UNA CONCENTRACIÓN DE 4MIC (125mg/mL) ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*).**

Aceite de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> )					
<i>Escherichia coli</i>		4CIM (125mg/mL)	Actual* Log UFC	% de Reducción	
Tiempo en (Horas)	<i>E. coli</i> crecimiento microbiano UFC/mL	Log de viables			
0	110x10 <sup>5</sup>	7	0	0	100%
4	12x10 <sup>8</sup>	9	0	0	100%
8	30x10 <sup>3</sup>	5	0	0	100%
24	97x10 <sup>7</sup>	9	0	0	100%

CIM: Concentración inhibitoria mínima  
UFC: Unidades formadoras de colonia

En esta última tabla del tiempo de muerte de la bacteria *Escherichia coli* de ensayo “*in vitro*” se indica que en el tiempo cero de inoculación con 24 horas de incubación existe 7 logaritmos de viables, a las cuatro horas hay 9 logaritmos de viables, a las ocho horas presenta 5 logaritmos de viables y a las veinte y cuatro 9 logaritmos de viables, las cuales son para el blanco que representa solamente la bacteria sin la presencia del antibacteriano que es el aceite de comino, para el ensayo de la concentración 4MIC de aceite esencial de comino en cada tiempo determinado existe una reducción total de cero logarítmico de unidades formadoras de colonias, indicando el 100% de efectividad del aceite frente a los microorganismos.

Es por esta razón que los extractos de hierbas, aceites esenciales y especias son utilizados por la industria alimentaria como agentes naturales para extender la vida útil de los alimentos. Una variedad de antimicrobianos en plantas y en base de especias se utiliza para reducir o eliminar las bacterias patógenas, y el aumento de la calidad general de los productos alimenticios.

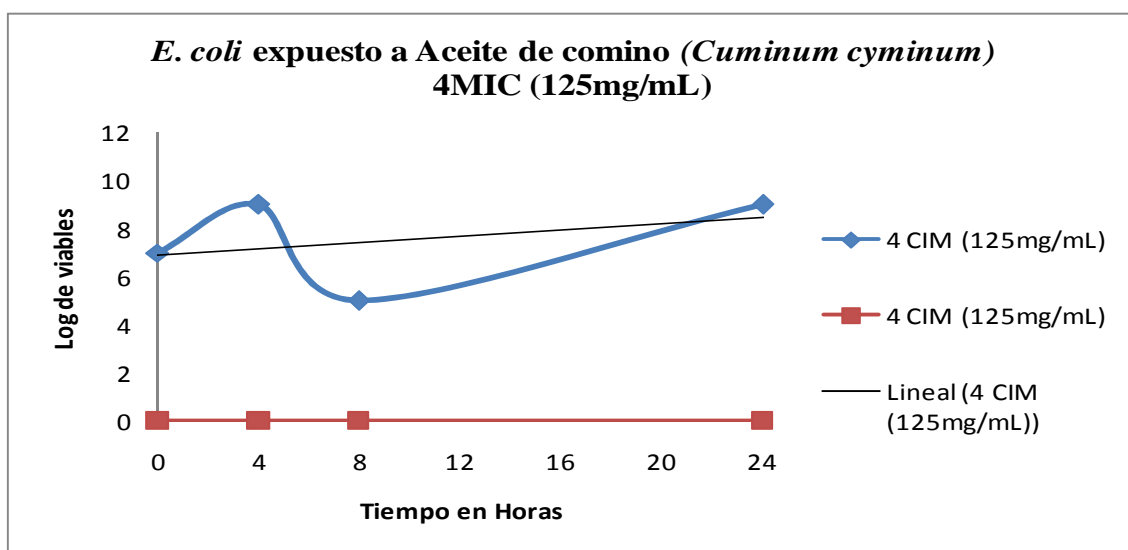
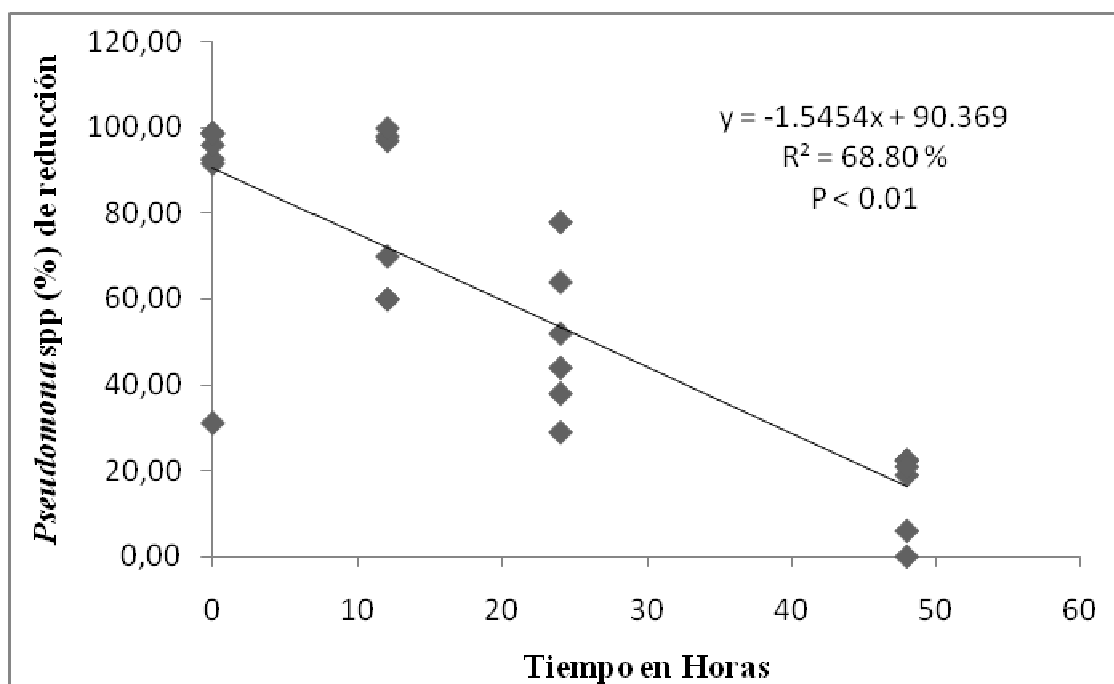


GRAFICO No 5: *Escherichia coli* EXPUESTO A ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*) 4MIC

TABLA No 13: TRATAMIENTOS UTILIZADOS “*IN VIVO*” PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*) FRENTE A *Pseudomonas* spp

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	23	26246,86				
Trata	3	18766,82	6255,61	16,73	3,10	4,94
Error	20	7477,03	373,85			
CV%			33,39			
Media			57,91			

El análisis de varianza indica que el F calculado (16.73) es > que F tabular con un nivel de confianza del 99% por tanto rechazamos la hipótesis y afirmamos que la reducción de bacterias explica fácilmente la variabilidad en el tiempo de contacto de la carne de trucha con el aceite de comino.



**GRAFICO No 6: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*) FRENTE A *Pseudomonas* spp EN LA CARNE DE TRUCHA**

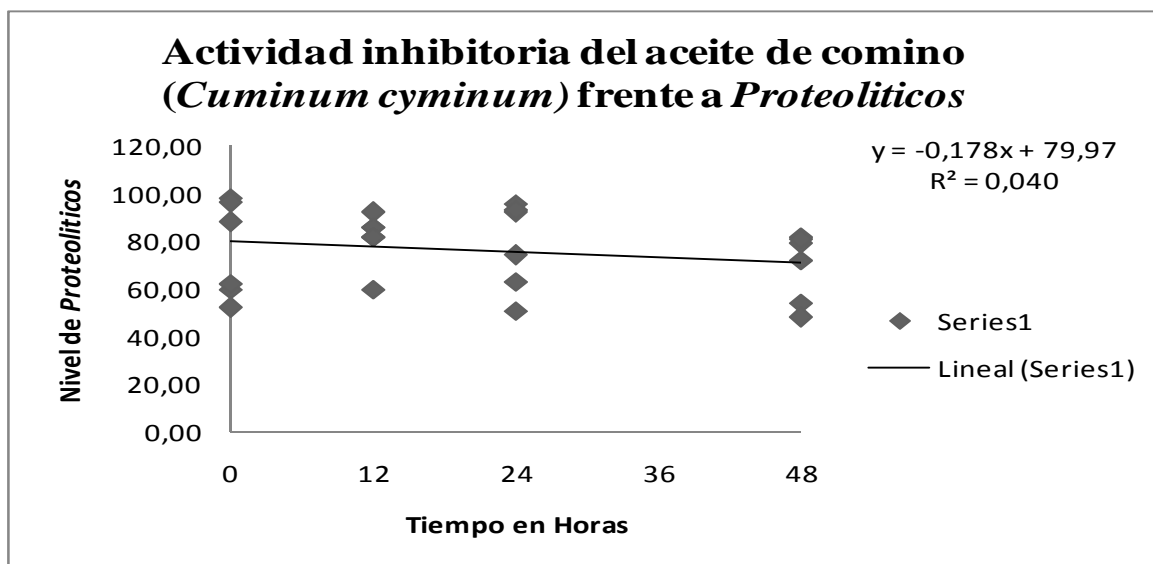
La trucha contaminada en el laboratorio con *Pseudomonas* spp y tratado con el aceite de comino, diez veces su CIM (31.25mg/mL) mostró una reducción poblacional del 1.55% en cada cm<sup>2</sup> y por cada hora de tratamiento con el aceite, la interrelación entre el nivel de bacterias y el tiempo de tratamiento es superior a la media, esto es 68.8%.

**TABLA No 14: TRATAMIENTOS UTILIZADOS “IN VIVO” PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*) FRENTE A *Proteolíticos*.**

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05.	0.01
Total	23	5954,72				
Trat	3	466,22	155,41	0,57	3,10	4,94
Error	20	5488,50	274,42			
CV%			21,72			
Media			76,22			

El análisis de varianza indica que el F calculado 0.57 con un nivel de significancia ( $p < 0.01$ ) es menor que F tabular, por tanto se acepta la hipótesis nula y afirmamos que la

reducción de bacterias no explica la variabilidad en el tratamiento de la carne de trucha con el aceite de comino.



**GRAFICA NO 7: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*) FRENTE A *Proteolíticas* EN LA CARNE DE TRUCHA**

Observamos en la Gráfica No 7 la presencia de bacterias *Proteolíticas* inoculadas con aceite de comino a una concentración de 312.5 mg/mL no está relacionada significativamente ( $P < 0.01$ ) con el tiempo de tratamiento lo que indica que la regresión no el lineal. No existe una reducción de las bacterias *Proteolíticas* en la trucha arco iris inoculada con el aceite de comino.

**TABLA No 15: TRATAMIENTOS UTILIZADOS "IN VIVO" PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*) FRENTE A *Escherichia coli*.**

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05.	0.01
Total	23	1337,17				
Trata	3	129,41	43,14	0,71	3,10	4,94
Error	20	1207,76	60,39			
CV%			8,33			
Media			93,30			

El análisis de varianza arroja un F calculado de 0.71 que es menor a la del F tabular con el 95% y 99% de confianza, esto implica que la reducción de la microbiota no explica la variabilidad en el tratamiento con el aceite de comino.

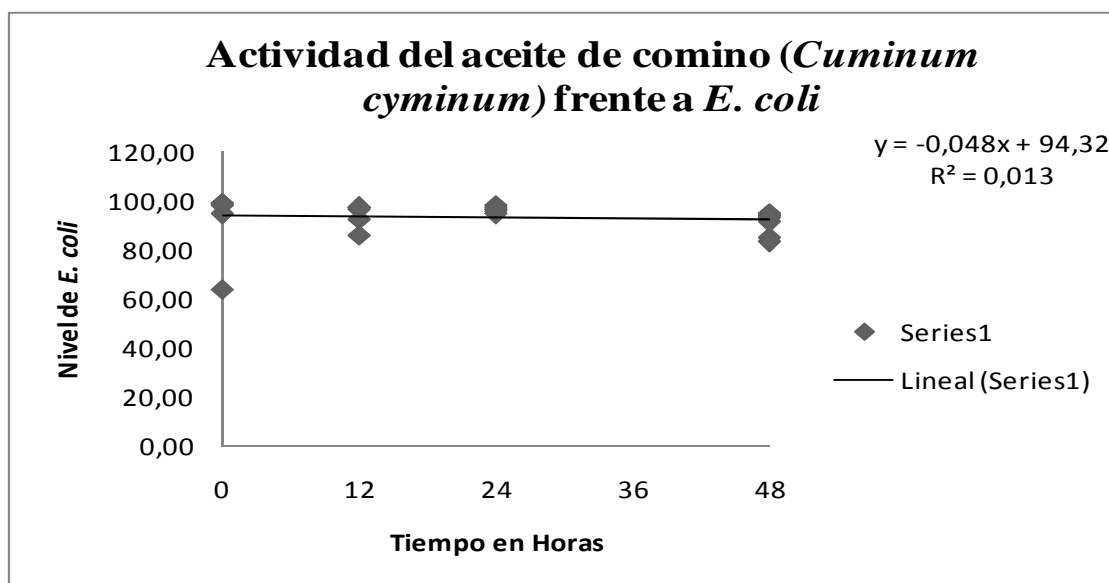


GRAFICO No 8: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*) FRENTE A *Escherichia coli* EN LA CARNE DE TRUCHA

En la Tabla No 15 el coeficiente de variación es de 8.33%, indicando que mientras más bajo posible sea el coeficiente más confiable se hacen los resultados de la actividad del aceite esencial de comino frente a la bacteria propuesta.

En la Gráfica No 8 la actividad para el tratamiento de la bacteria *Escherichia coli* si es confiable. Por tanto se afirma con un 99% de confianza que en la carne de trucha refrigerada a 4 C° y tratada con aceite de comino a una concentración de 312.5 mg/mL a los 0, 12, 24 y 48 horas no experimentan reducción del crecimiento. En el tratamiento “*in vitro*” el aceite de comino inhibía el crecimiento incluso a temperatura ambiente.

Según lo descrito por Shelef, deduce que el aceite de comino inhibe de forma “*in vitro*” las bacterias pero de manera “*in vivo*” se establece que las bacterias se mantienen, debido que el proceso de refrigeración retarda el crecimiento propio de las mismas (37).



Este estudio confirma que el aceite de comino posee actividad antibacteriana “*in vitro*” frente a *Escherichia coli*, en contraste, en el estudio “*in vivo*” no se evidenció reducción de esta población, sin embargo previene el crecimiento, “*in vivo*” el aceite de comino fue activo solo contra *Pseudomonas* spp, permitiendo el crecimiento de otras especies *proteolíticas*, algunos estudios sugieren que extractos naturales pueden ser útiles como bioconservadores en la Industria Alimentaria.

La eficacia de este tipo de extractos se atribuye a que los compuestos solubles penetran más frecuentemente en la matriz alimentaria que los solventes, las oleorresinas de extracción y hasta los aceites esenciales. (37)

El aceite de comino usado en la carne de trucha en la concentración apropiada podría al igual que otras especias extender la vida útil de este alimento (30).

## CAPÍTULO IV

### 4 CONCLUSIONES

1. El comportamiento del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) en el estudio de actividad antimicrobiana “*in vitro*” frente a *E. coli* indica la posibilidad de usar este producto para controlar el potencial patógeno en pescado de agua dulce como la trucha, pues el ensayo de Screening demostró actividad en las concentraciones de 10.000 a 1.250 mg/mL determinándose a la vez una CMB de 31.25 mg/mL.

El estudio “*in situ*” no evidenció reducción de *E. coli* al tratarlo con 10 veces la CMB del aceite de comino, desconociéndose el efecto de la aplicación de concentración superior.

2. Las bacterias *proteolíticas* inoculadas en la carne de trucha no fueron controladas en su crecimiento por los principios antimicrobianos del aceite de comino.
3. *Pseudomonas spp* en el estudio “*in situ*” sufre reducción en su nivel poblacional lo que asocia a la potencialidad de uso del aceite de comino como bioconservador en la industria alimenticia o en uso culinario.

## CAPÍTULO V

### 5. RECOMENDACIONES

1. Ensayar nuevas formas de extracción y purificación de aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) para optimizar la concentración de compuestos activos o metabolitos responsables de su actividad antibacteriana.
2. Investigar antibacterianos de origen vegetal, en especias para evitar el consumo masivo de conservantes artificiales que provocarían daños con el paso del tiempo al consumidor.
3. Ejecutar pruebas con el aceite esencial de Comino a distintas concentraciones y en diferentes bacterias, causantes de enfermedades transmitidas por alimentos.
4. Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de Comino en las diferentes etapas del proceso tecnológico de la carne de trucha para determinar el mayor poder conservante del aceite.
5. Se recomienda estudiar el uso del aceite de Comino, sus ventajas y desventajas económicas para la comercialización dentro de Ecuador como conservante natural de carnes.

## CAPÍTULO VI

### 6. RESUMEN

El objetivo de la investigación fue “Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) como potencial bioconservador en la carne de trucha”.

Pruebas que se realizaron en la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Facultad de Ciencias.

Los métodos utilizados en el ensayo fueron inductivo-deductivos y científico-experimentales; utilizando como materia prima aceite de comino a diferentes concentraciones.

Los microorganismos de ensayo fueron *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp y especies de *proteolíticas*; se aplicaron pruebas de Screening, CMB “*in vivo*” y tiempo de muerte “*in vitro*” e “*in situ*” sobre la carne de trucha adicionando el aceite de comino en el laboratorio. El Screening arrojó actividad antimicrobiana entre 10.000 a 1.250 mg/mL. La concentración mínima bactericida frente a *Escherichia coli* fue de 31.25 mg/mL.

El tiempo de muerte “*in vitro*” para *Escherichia coli* demostró una reducción de la población con un decrecimiento de 2 a 4 log 10 UFC/mL, sin embargo “*in situ*” no se determinó actividad antimicrobiana.

Las bacterias *Proteolíticas* tampoco fueron controladas por el aceite de comino a excepción de *Pseudomonas* spp, que redujo su población en 1.55% por cada cm<sup>2</sup> de carne y por cada hora de tratamiento. El aceite esencial de comino usado en la concentración apropiada puede usarse como biopreservativo para prevenir el deterioro por *Pseudomonas* spp para el filete de trucha.

Por lo que se recomienda a la industria alimentaria el uso del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) como una alternativa natural a los productos sintéticos para controlar la putrefacción de los alimentos susceptibles al deterioro.

## CAPÍTULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍA

1. **BOQUET, E.**, y otros., Manual de técnicas de Microbiología Clínica., 3a. ed., Zaragoza-España., 1995. P. 225
2. **BURBANO, J.**, Plantas Medicinales, Hierbas y Vitaminas., 3a. ed., Guayaquil-Ecuador; 2008., P. 41
3. **BURGESS, C.**, y otros., El Pescado y las Industrias Derivadas de la Pesca., Zaragoza – España., 1997., Pp. 725,728, 733, 735
4. **BLANCO, M.**, La Trucha., 2a. ed., Madrid- España., 1984., P. 17
5. **BRUNETON, J.**, Fotoquímica Plantas Medicinales; 2a. ed., Zaragoza- España; 2001., pp. 129,130
6. **CABALLERO, A.**, Protección Sanitaria de Alimentos., S. ed., Riobamba-Ecuador., 1999., Pp. 63,60

7. **CARRERA, J.**, Ciencia, Tecnología e Industria de Alimentos., Colombia- Bogotá., 2008., Pp. 725,728, 733-735
8. **DE LAS CUEVAS, V.**, APPCC BASICO: Funcionamiento de un Sistema de Peligros y Puntos de Control., Madrid - España., 2006. Pp. 4,5
9. **DOMÍNGUEZ X.**, Métodos de Investigación Fitoquímica., Chiros- México., 1979., P. 229
10. **ELEY, R.**, Intoxicaciones Alimentarias de Etiología Microbiana., 3a. ed., Zaragoza- España., 1994., Pp. 37-39
11. ENCICLOPEDIA Guía práctica ilustraciones., 3a. ed., Barcelona-España., 1. V., 1983., P. 52
12. ENCICLOPEDIA Plantas que curan., 2a. ed., Barcelona- España., 2. v., 1994., Pp. 162-163
13. ENCICLOPEDIA Salvat., 2a. ed., Barcelona-España., 3. v., 1999., P. 825
14. **FRAZIER, W., y WESTHOFF, D.**, Microbiología de los Alimentos., Zaragoza- España., 3a. ed., 1985., P.163

15. **GALLEGOS, J.**, Manual de Prácticas de Microbiología de Alimentos.,  
Riobamba- Ecuador., 2003., Pp. 95,99
16. **HOBBS, B. y ROBERTS, D.**, Higiene y Toxicología de los Alimentos., 3a. ed.,  
Zaragoza- España., 1999., Pp. 33, 34, 39, 40
17. **JAMES, J.**, Microbiología Moderna de los Alimentos., 2 a. ed., Zaragoza-  
España., 1997., Pp. 138,139
18. **JÁTIVA, C.**, Texto Básico de Fitoquímica., Riobamba- Ecuador., 2000., Xerox  
Pp. 16,17
19. **LARRAÑAGA, J. CARBELLO, J. RODRIGUEZ, M.**, Control de Higiene de  
los Alimentos., Madrid- España., 2010., Pp. 339
20. **MULLER, G.**, Microbiología de los Alimentos Vegetales., 3a. ed.,Zaragoza –  
España., 1981., P. 151
21. **PÉREZ, A.**, Cultivos Marinos: Peces-Moluscos, Crustáceos., 2a. ed., Zaragoza-  
España., 1999., Pp. 14,15, 221,222
22. **SEDGWICK, S.**, Cría de la Trucha., 3a. ed., Zaragoza - España., 1997., pp.  
1,2

23. **WESTHOFF, C.**, Microbiología de los Alimentos., 3a. ed., Madrid-España., 1998., Pp. 240- 243,246-248
24. **AL-KHAMIS, KI.** y otros., Anfertility anti-implantation and abortifacient activity of the aqueous extract of *Cuminum cyminum.*, Vol. 7 No. 23., 2006., Pp. 5-9
25. **ARASHISAR, S.** y otros., Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*). International Journal of Food Microbiology., Vol. 97., 2004., Pp. 209- 214
26. **BAKKALIA F.** y otros., Biological effects of essential oils., Food and Chemical Toxicology., Vol. 46., 2008., Pp. 446-475
27. **BURT, S.**, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology., Vol. 2 No 94., 2004., Pp. 223-253.
28. **BLOEMBERG, GV., Lugtenberg and Kolter.**, Department of Microbiology., and Molecular Genetics, Harvard Medical School., Vol. 63. No. 11., 1997.Pp. 4543-4551



29. **CHYTIRI S.** y otros., Microbiology, chemical and sensory assensment of whole and letedaqua cultured rain bown trout. Food Microbiology., Vol. 21., 2004., Pp 157-165
30. **DERAKHSHAN, S., SATTARI, M., BIGDELI, M.,** Evaluation of antibacterial activity and biofilm formation in Klebsiella neumoniae in contact with essential oil and alcoholic extract of cumin seed (*Cuminum cyminum*)., Vol. 8 No 14., 2007., P. 154
31. **FAN, W.,** y otros., The use of tea polyphenol dip to extend the sehelf life silves corp during storage in ice. Food chemisty., Vol. 6., 2008., Pp 108, 148-153
32. **GUTIERREZ, J., BARRY, R., BOUKE, P.,** Antimicrobial Activity of Plant Essencial Oils using Food model media: Efficacy synergistic potencial and interaction with food components. International Journal of food Microbiology., Vol. 26., 2009., Pp. 142-150
33. **GRAM L.** y otros., Fish spoiloge bacteria-problems and solutions. Current opinión in Bacteriology., Vol. 1 No. 348., 2002., Pp. 262-266
34. **HOLLEY, R.,** Improvement in Shelf-Life and Safety of Perishable foods by Plant Essential Oils and Smoke Antimicrobials. International Journal – rewie Food Microbiology., No. 22., 2005., Pp. 273–292

35. **ISENBERG, H.**, Clinical Microbiology Procedures Handbook. Guide to Regulatory Requirements a Special Supplement for Users of the Clinical Microbiology Procedures Handbook., WASHINGTON, D.C. USA., Vol. 1., 1995. Pp. 5.16.1 a 5.20.20
36. **MUKHOPADHA, Y.**, Antimicrobial Activity of (*Cuminum cyminum*).of Biochemistry, University Collage of Science. Vol 3 No. 16., 2008., P. 162
37. **NIMSHA, S. WEERAKKODY, A.**, In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria School of Land, Crop and Food Science, University of Queensland, St. Lucia 4072, Australia. Internaciona Journal of Food Microbiology., No. 22., Pp 1410-1414
38. **TAJKARIMI, M., IBRAHIM, D., CLIVER, B.**, Food Microbiology and Biotechnology Laboratory., Carolina-Estados Unidos., 2010., Pp. 27411-1064
39. **TAYLOR, S., SUMMER, S.**, Determination of histamine, Putrescine and cadaverine. Seafood Quality Determination. Proceeding of an International Symposium., Santa Lucia Australia., 1986., Pp. 253-255.

40. **TURGIS, M., HAN, J., CAILLET, S., & LACROIX, M.**, Antimicrobial  
Activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and  
*Salmonella typhi*. *Food Control* Vol. 5 No. 20., 2009., Pp. 1073–1079.
41. **WILLEY J, SHERWOOD, L., WOOLVERTON, C.**, Antimicrobial  
Chemotherapy in Prescott, Harley, and Klein's. 2008.  
*Microbiology*. McGraw-Hill International Edition, Seventh Ed 1997., Pp:  
837,840
42. **CONGELADO O FRESCO**  
(Documents and Settings\Administrador\Mis documentos\informa de  
pescado TESIS\Congelado o Fresco.mht)  
2011/08/12
43. **ACEITE DE COMINO**  
<http://www.aceiteaceites.com>  
2010/03/15
44. **ACEITES ESENCIALES: BIOCONSERVADORES CON ALTO  
POTENCIAL EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**  
<http://www.alfaeditores.com>  
2010/06/24
45. **ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*)**  
[http://www.natupedia.org/Aceite\\_essencial\\_de\\_comino](http://www.natupedia.org/Aceite_essencial_de_comino)  
2010/13/29

**46. ALIMENTOS SU CONSERVACION, ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCION**

<http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/revistas/index/assoc/HASH6c0e/96d6d631.dir/doc.pdf>

2010/04/19

**47. BIOCONSERVADORES BOTANICOS EN ALIMENTOS**

[http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MLC013\\_BIOCONSERVADORES\\_F.pdf](http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MLC013_BIOCONSERVADORES_F.pdf)

2010/09/08

**48. CARACTERÍSTICAS DEL COMINO ( *Cuminum cyminum* )**

<http://www.plantasparacurar.com>

2010/11/25

**49. COMINO ( *Cuminum cyminum* L.)**

<http://www.food-info.net/es/products/spices/cumin>

2010/05/18

**50. CÓMO HACER UN MARINADO**

[www.directoalpaladar.com](http://www.directoalpaladar.com)

2010/05/11

**51. COMPOSICION DEL COMINO**

<http://www.plantasparacurar.com>

2010/11/25

**52. CONSERVACION**

[www.http://fromm.mapa.es/esp/consumo/manual/conservación](http://fromm.mapa.es/esp/consumo/manual/conservación)

2010/09/13

**53. CONSERVACIÓN Y ENVASADO DEL PESCADO**

<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia>  
2010/05/24

**54. CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DEL COMINO**

[http://es.wikipedia.org/wiki/Cuminum\\_cyminum](http://es.wikipedia.org/wiki/Cuminum_cyminum)  
2010/07/14

**55. CRECE CONSUMO DE MUNDIAL DE PESCADO**

<http://www.Fao.org/fishery/countrysector>  
2011/10/31

**56. LA PÁGINA DE BEDRI**

[http://www.bedri.es/Libreta\\_de\\_apuntes/C/CO/Comino](http://www.bedri.es/Libreta_de_apuntes/C/CO/Comino)  
2010/09/09

**57. LA PISICULTURA EN EL MUNDO**

<http://www.pisiculturah.blogst.com>  
2011/07/10

**58. LOS ACEITES ESENCIALES EN LAS PLANTAS**

<http://www.gastrobotanica.com>  
2010/03/20

**59. LOS CONSERVANTES EN LOS ALIMENTOS**

<http://www.alimintacionsana.com>  
2010/06/03

**60. LOS ADITIVOS CONSERVANTES**

<http://www.suite101.net/content/aditivos-colorantes-y-conservantes-en-los-alimentos>

2010/05/19

**61. MICROBIOLOGIA DEL PESCADO**

<http://www.scribd.com/doc/8717475/Cap-1-Microbiologia-del-pescado>

2010/12/08

**62. TRUCHA Y SALMON**

<http://www.lacsdespyrenees.com>

2010/10/28

## CAPÍTULO VIII

### 8. ANEXOS

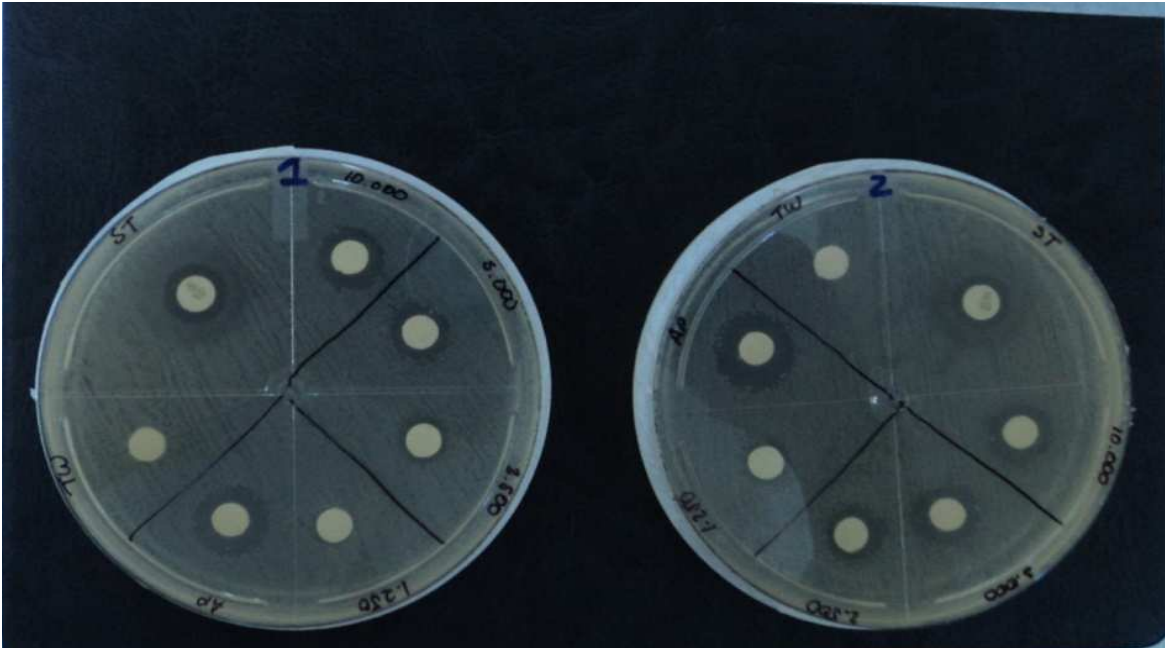
#### ANEXO 1: FOTOGRAFÍAS DE LA PARTE EXPERIMENTAL

##### Determinación de NBVT en la carne de Trucha arco iris



#### ANEXO 2: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE DE COMINO (*Cuminum cyminum*) SOBRE LAS BACTERIAS AISLADAS CAUSANTES DE LA DEGRADACIÓN DE LA CARNE DE TRUCHA

Método de difusión de disco.



### Método macrodilución



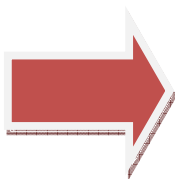


### Determinación de la Concentración Mínima Bactericida

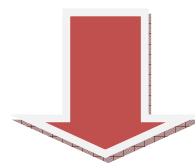


**ANEXOS No 3: ENSAYO “IN SITU” DE ACEITE DE COMINO (*Cuminum cuminum*), CON TRES TIPOS DE BACTERIAS *Escherichia coli*, *Proteolíticos* y *Pseudomonas spp.***

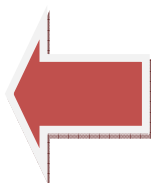
Descamación de la Trucha



Medición de 5x5 cm de los pedazos de Trucha



Pedazos para ser colocados en fundas Ziploc



Se hacen hervir lo pedazos por 2 min



Colocación del aceite de comino a una concentración de 312.5 mg/mL a tres tipos de bacterias, almacenadas a Temperatura de refrigeración 4 C°

