

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



**“EVALUACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum
cuminum* L.), EN LA VIDA ÚTIL DE LA CARNE FRESCA DE RES Y
LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA DE *Escherichia coli*”**

TESIS

**PRESENTADA POR
NELY YOLANDA YUCRA TICONA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

PUNO - PERU

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

“EVALUACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*L.),
EN LA VIDA ÚTIL DE LA CARNE FRESCA DE RES Y LA CONCENTRACIÓN
INHIBITORIA DE *Escherichia coli*”

TESIS PRESENTADA POR:

NELY YOLANDA YUCRA TICONA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE

.....

Ing. M.Sc. Luis Alberto JIMÉNEZ MONROY

PRIMER MIEMBRO

.....

Ing. Saime Roenfi GUERRA LIMA

SEGUNDO MIEMBRO

.....

Ing. M.Sc. Rosario Edely ORTEGA BARRIGA

DIRECTOR DE TESIS

.....

Ing. M.Sc. Florentino Víctor CHOQUEHUANCA CÁCERES

ASESOR DE TESIS

.....

Ing. Marienela CALSÍN CUTIMBO

PUNO – PERÚ

2015

Área: Ingeniería y tecnología

Tema: Desarrollo de procesos y productos agroindustriales sostenibles y eficientes

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y acompañarme en cada uno de mis pasos.

A mis queridos padres Félix y Julia quienes me enseñaron a luchar por alcanzar mis metas para seguir adelante, a mis hermanos y sobrinos, por sus palabras que siempre me llenaron de fortaleza, a ellos mi eterna gratitud.



AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional del Altiplano, a la Facultad de Ciencias Agrarias en especial a la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial por haberme brindado mi formación profesional.

A mi director de tesis Ing. M.Sc. Florentino Víctor Choquehuanca Cáceres por haber confiado en mi persona, por disposición y apoyo incondicional brindado. A la Ing. Marienela Calsín Cutimbo por su constante apoyo durante la ejecución de este trabajo de investigación.

A los miembros del jurado Ing. M.Sc. Luis Alberto Jiménez Monroy por sus valiosos comentarios y acertadas sugerencias, al Ing. Saire Roenfi Guerra Lima, y a la Ing. M.Sc. Rosario Edely Ortega Barriga por su atenta lectura y correcciones de este trabajo de investigación.

Finalmente agradezco a toda mi familia por el ánimo y apoyo que siempre me dieron para lograr este objetivo, y un agradecimiento especial a mis amigos quienes me apoyaron en toda circunstancia, a pesar de las adversidades.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISION BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	CARNE.....	3
2.1.1	Carne fresca.....	3
2.1.2	Proteína de la carne	4
2.1.3	Principales factores que causan la pérdida de calidad de los productos	4
2.1.4	Métodos para la evaluación de la calidad de la carne	6
2.2	COMINO (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	7
2.2.1	Clasificación taxonómica	7
2.2.2	Características del comino	8
2.2.3	Composición química de la semilla de comino.....	8
2.3	ACEITE ESENCIAL.....	9
2.3.1	Distribución y estado natural.....	10
2.3.2	Función de los aceites esenciales en las plantas.....	10
2.3.3	Extracción y aislamiento del aceite esencial.	11

2.3.4	Aceite esencial de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.)	12
2.3.5	Toxicidad de los aceites esenciales	13
2.4	EFFECTO ANTIMICROBIANO	13
2.4.1	Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial.....	14
2.5	<i>Escherichia coli</i>	16
2.5.1	Alimentos implicados.....	16
2.6	VIDA UTIL	17
2.6.1	Principales métodos para determinar la vida anaquel para alimentos.....	17
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	21
3.2	MATERIAL EXPERIMENTAL.....	22
3.3	EQUIPOS Y MATERIALES	22
3.3.1.	Equipos y materiales	22
3.3.2.	Materiales de vidrio.....	23
3.3.3.	Reactivos e insumos	23
3.3.4.	Medios de cultivo	24
3.3.5.	Otros materiales.....	24
3.4	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	24
3.4.1.	Aislamiento e identificación de las cepas de <i>Escherichia coli</i>	25
3.4.2.	Concentración inhibitoria de <i>Escherichia coli</i> en la placa.....	27
3.4.3.	Evaluación de la carne fresca de res con adición del aceite esencial de comino y su período de vida útil	27

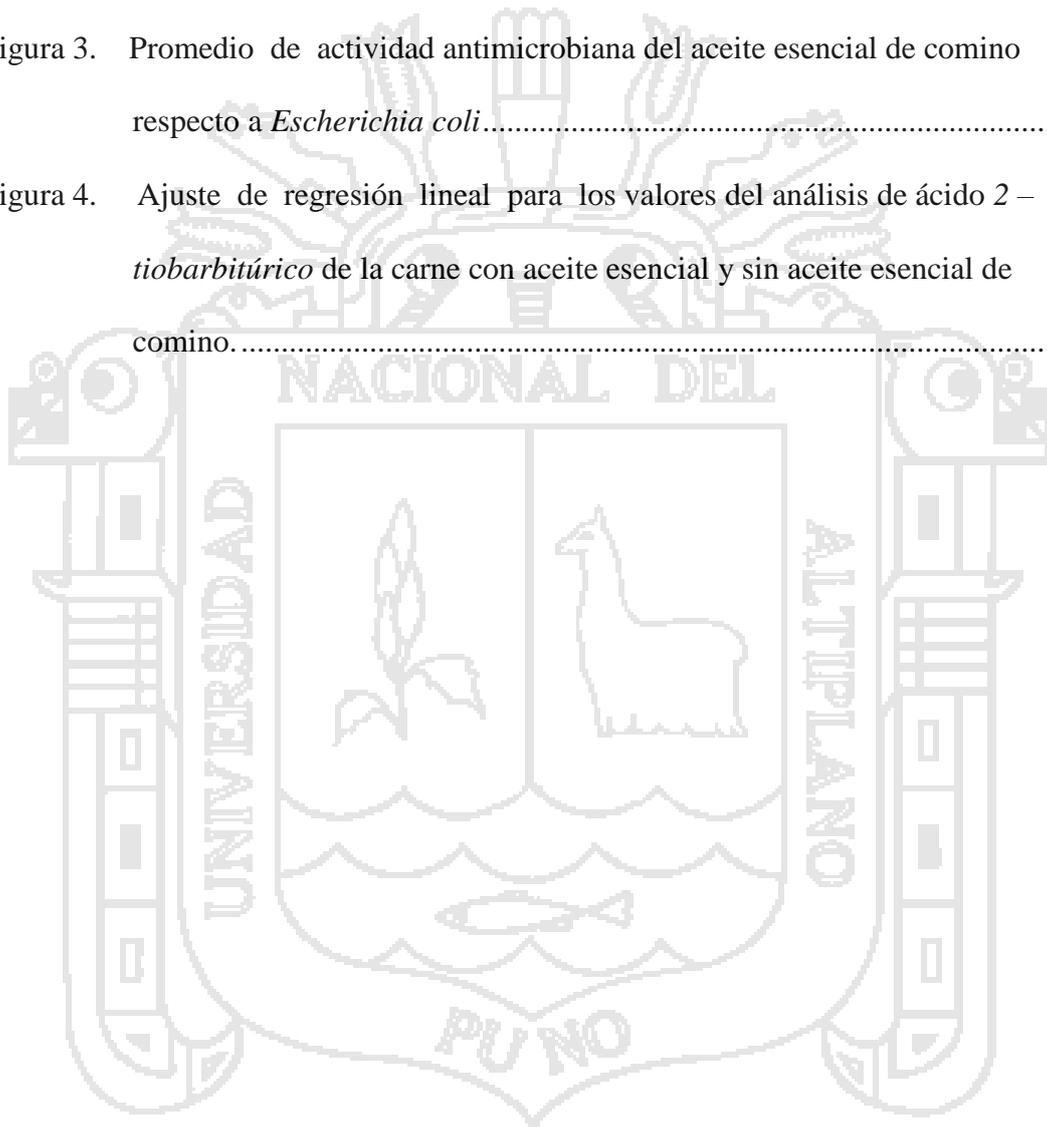
3.4.4. Evaluación de las propiedades químicas (pH y ácido 2- tiobarbitúrico) y microbiológico de la carne de res con aceite esencial de comino.....	28
3.4.5. Diseño estadístico.....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	32
4.1 Evaluación de diferentes concentraciones del aceite esencial de comino para inhibir el crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	32
4.2 Evaluación de la influencia del aceite esencial del comino en la vida útil de la carne fresca de res	34
4.2.1 Cálculo del tiempo de vida útil de la carne de res tratada con aceite esencial de comino	35
4.3 Evaluación de las características químicas (pH y ácido 2-tiobarbitúrico) y microbiológico de la carne de res tratada con aceite esencial de comino	37
4.3.1 Evaluación del pH.....	38
4.3.2 Evaluación del ácido 2-tiobarbitúrico.....	41
4.3.3 Evaluación de <i>Escherichia coli</i> de la carne de res tratada con aceite esencial de comino	43
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFIA.....	49
ANEXOS.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Análisis químico representativo de la carne	4
Tabla 2.	Recopilación de datos de las variables de respuesta	30
Tabla 3.	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino	33
Tabla 4.	Tiempo de vida útil de la carne de res con tratamiento y sin tratamiento con aceite esencial de comino	36
Tabla 5.	Valores de pH de la carne tratada con aceite esencial y sin aceite esencial de comino a través del tiempo de almacenamiento.....	38
Tabla 6.	ANVA del pH de la carne de res tratada con aceite esencial y sin aceite esencial de comino a través del tiempo de almacenamiento.....	39
Tabla 7.	Prueba de Duncan del pH con respecto al tiempo	40
Tabla 8.	Prueba de comparación de Duncan del pH con respecto al tratamiento	40
Tabla 9.	ANVA del análisis de ácido 2-tiobarbitúrico de la carne tratada con aceite esencial y sin aceite esencial de comino a través del tiempo.....	41
Tabla 10.	Prueba de comparación de Duncan del ácido 2-tiobarbitúrico con.....	42
Tabla 11.	Prueba de comparación de Duncan del ácido 2 - tiobarbitúrico con respecto a los tratamientos.....	43
Tabla 12.	Recuento microbiano de <i>Escherichia coli</i> viable de la carne de res con tratamiento y sin tratamiento del aceite esencial de comino en ufc/g.	44
Tabla 13.	ANVA del recuento de <i>Escherichia coli</i> de la carne de res tratada con aceite esencial y sin aceite esencial de comino a través del tiempo.....	45
Tabla 14.	Prueba de comparación de Duncan del <i>Escherichia coli</i> con respecto a los tratamientos	45
Tabla 15.	Prueba de comparación de Duncan del recuento de <i>Escherichia coli</i> viable con respecto al tiempo.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición química de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.)	9
Figura 2. Descripción del flujo experimental de la evaluación del aceite esencial de comino, en la vida útil de la carne fresca de res y la concentración inhibitoria de <i>Escherichia coli</i>	25
Figura 3. Promedio de actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino respecto a <i>Escherichia coli</i>	34
Figura 4. Ajuste de regresión lineal para los valores del análisis de ácido 2 – tiobarbitúrico de la carne con aceite esencial y sin aceite esencial de comino.....	36



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%	: Porcentajes
°C	: Grados Celsius
AES	: Aceites Esenciales
ALS	: Diferencia Limite Significativa
ANOVA	: Análisis de Varianza
CVBB	: Caldo Verde Brillante Bilis
DBCA	: Diseño Bloque Completo al Azar
EMB	: Agar Eosin Methylene-blue Lactose Agar acc.
ETAS	: Enfermedades de Transmisión Alimentaria.
GL	: Grados de Libertad
HCL	: Ácido clorhídrico
mm	: Milímetros
ml	: Mililitros
N.M.P.	: Número más probable.
Q_0	: Valor inicial del ácido <i>2-tiobarbiturico</i>
Q	: Valor del ácido <i>2-tiobarbiturico</i> máximo permitido
K	: Pendiente de Ecuación
TBARS	: Ácido <i>2-tiobarbitúrico</i>
pH	: Potencial de iones hidrógeno
UFC/g	: Unidad Formadora de Colonia por Gramo

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo la finalidad de evaluar el efecto del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum* L.), en la vida útil de la carne fresca de res y la concentración inhibitoria de *Escherichia coli*. Esta investigación buscó determinar la influencia del aceite esencial de comino en *Escherichia coli* para ello, las concentraciones de aceite esencial de comino fueron de 0%, 10%, 20%, 60% y 100%, se inoculó en placa petri una cantidad de 25 µl de las concentraciones preparadas al agar EMB. Considerando el resultado la concentración mínima inhibitoria a 20%, se aplicó a la carne 0,2ml/20g y se refrigeró las muestras a 4 °C, por tiempos de 0, 4, 8 y 12 días; Durante el proceso de conservación, se realizó el análisis de pH, TBARS, *Escherichia coli* viable; Los resultados fueron de alta inhibición a *Escherichia coli* al 100% de aceite esencial que se observó un halo de inhibición de 8.66 mm, esta inhibición fue gradual a menor porcentaje menor halo de inhibición, a 20% de concentración se observó que el halo de inhibición fue de 3.98 mm; Teniendo este resultado se evaluó el aceite esencial de comino en la carne de res inoculado con *Escherichia coli* viable durante el almacenamiento; el resultado de pH y TBARS mostraron un ligero incremento a lo largo del período de evaluación. Con respecto al recuento de *Escherichia coli* viable, se redujo durante el tiempo de análisis, la vida útil fue hasta 16 días, por la influencia del aceite esencial de comino al 20% de concentración. Concluyéndose que el aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum* L.) inhibe a *Escherichia coli*, alargando el tiempo de vida útil de la carne de res.

I. INTRODUCCIÓN

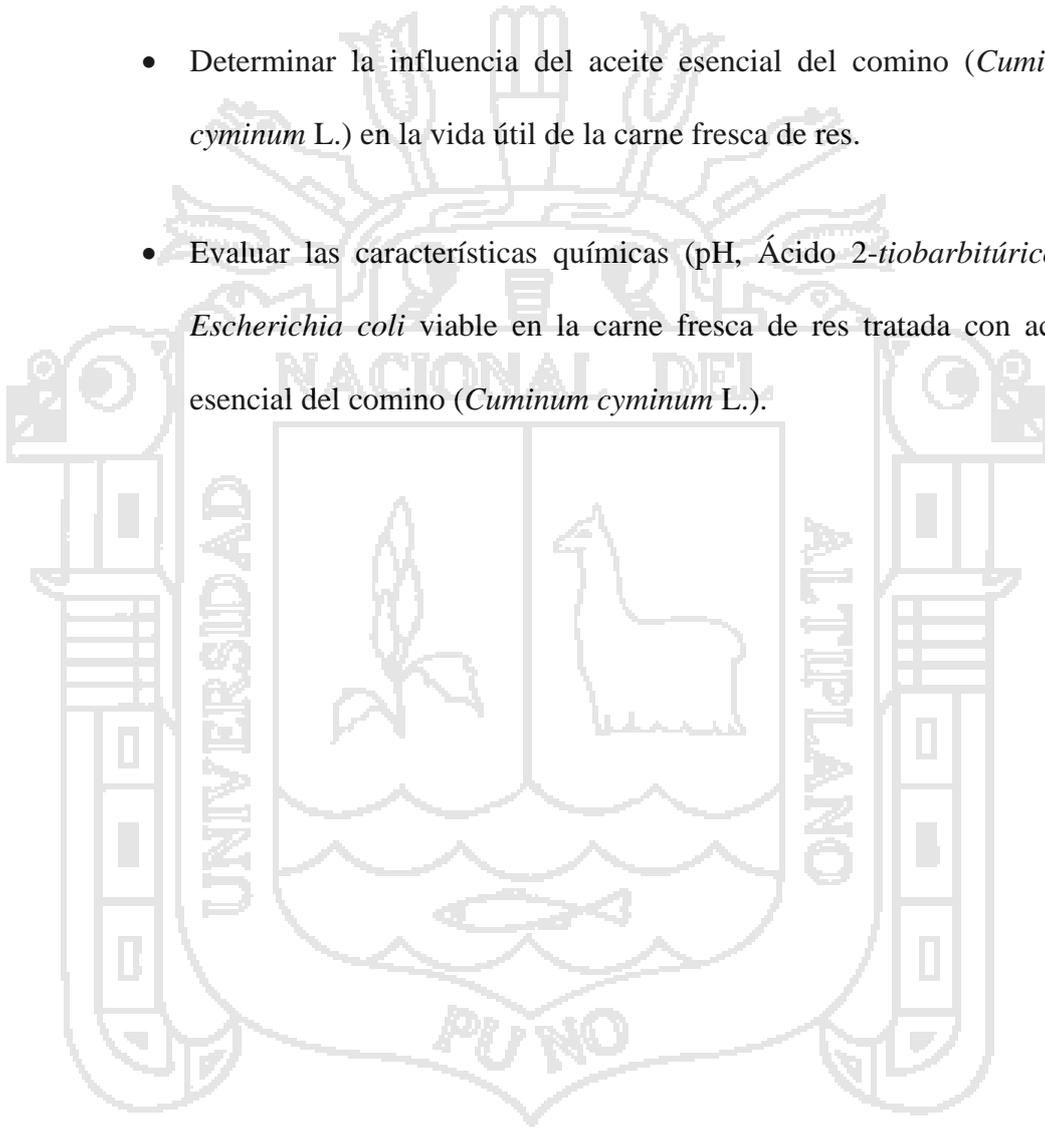
Hoy en día la tendencia mundial está orientada hacia la importancia del uso de sustancias naturales que pueden prolongar la vida útil de los alimentos, por lo que cada vez cobra mayor importancia (Brack, 2008). En este sentido, las plantas aromáticas son en la actualidad ampliamente estudiadas y utilizadas por su gran potencial terapéutico y beneficios como conservantes naturales puesto que contienen una mezcla compleja de compuestos bio activos que cubren una serie de demandas para la salud humana (Djenane *et al.*, 2001).

Los aceites esenciales tienen como ventaja, que son obtenidos de material vegetal, que han sido consumidos históricamente como alimentos de uso común y tienen demostrada su inocuidad en humanos; los aceites esenciales en hierbas y especias como el comino, en la que se identificó componentes mayoritarios como el aldehído cumínico y taninos (Rea, 2011), estos componentes determinantes en preparaciones médicas, veterinarias, industria alimentaria y preparación de fungicidas.

La carne de res es un producto alimenticio, proveniente de la carcasa entera de vacuno, Esto implica mantenerlo en estado fresco refrigerado, a condiciones ambientales, resulta difícil mantener la carne en estado fresco por la proliferación de bacterias de los géneros *Pseudomonas* principalmente y la contaminación de *Escherichia coli* y otros, que se encuentran en el tracto intestinal de los animales, que son contaminantes durante el beneficio del animal en muchos casos suele ocurrir una contaminación cruzada y proliferarse restando la inocuidad de la carne,

consecuentemente un riesgo para la salud del consumidor, por esta causa se plantea las siguientes objetivos:

- Evaluar diferentes concentraciones del aceite esencial para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* en placa petri.
- Determinar la influencia del aceite esencial del comino (*Cuminum cyminum* L.) en la vida útil de la carne fresca de res.
- Evaluar las características químicas (pH, Ácido 2-tiobarbitúrico) y *Escherichia coli* viable en la carne fresca de res tratada con aceite esencial del comino (*Cuminum cyminum* L.).



II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARNE

Es el tejido muscular de los animales utilizado como alimento, la fuente principal es el ganado vacuno, ovino y porcino, en la sierra peruana, el camélido sudamericano (alpaca). En un sentido más amplio del término carne también abarca la de ave y pescados. Estructuralmente la carne está constituida por fibras musculares; células multinucleadas, largas y delgadas que se unen entre sí en haces por medio de tejido conjuntivo. Cada fibra muscular está rodeada por una membrana celular, el sarcolema, en cuyo interior están contenidas las miofibrillas, complejas de las dos principales proteínas musculares, la actina y la miosina (Alcázar del Castillo, 2002).

2.1.1 Carne fresca

Se considera fresca a la carne que no se ha dado ningún tratamiento distinto del envasado en atmosfera modificada o envasado al vacío para asegurar su conservación, salvo en caso de que haya sido sometida solamente a refrigeración (Alcázar del Castillo, 2002).

El tejido muscular está recubierto por sus fascias protectoras y las miofibrillas contenidas dentro del sarcolema. Una vez que han sido descuartizadas las reses, gran parte de su protección inicial se destruye y durante el picado desaparece por completo. Los alimentos de origen animal poseen sustancias inhibidoras como las inmunoproteínas, muy específicas en

su acción pero con un reducido espectro de actividad antimicrobiana, que no proveen protección práctica alguna (Mossel, 2003).

2.1.2 Proteína de la carne

De referencia los músculos de los distintos animales (porcinos, vacunos, ovinos), la fracción proteínica es la más abundante ya que llega a representar 70% del total por su función biológica y su solubilidad, en la Tabla 1 se muestra las concentraciones de esta proteína.

Tabla 1. Análisis químico representativo de la carne

COMPONENTES	%
Agua	70
Proteína	20
Grasa	6
Sustancias nitrogenadas no proteínicas	1,5
Hidratos de carbono y sustancias no nitrogenadas	1,5
Sales inorgánicas	0,7

Fuente: Badui (1990).

2.1.3 Principales factores que causan la pérdida de calidad de los productos

Desrosier, (1978) citado por Quilca, (2010). Menciona los principales factores que causan en la pérdida de calidad de los productos cárnicos que son:

- a) **Deterioro biológico:** Esta relación con el rigor mortis del animal es decir ante el mortem y post mortem que aquellos que no cumplen con las normas técnicas y reglamento tecnológico de carnes. Vale decir que el animal parte desde su nacimiento crianza, alimentación en donde en estos pueden estar

infectados por alguna enfermedad crónica avanzada que ésta atenta contra la salud humana. Este proceso bioquímico también opera en la maduración de la carne para lograr el deseado grado de ternura.

b) Deterioro microbiológico: El conocimiento de la velocidad del crecimiento de los microbios está en función de las condiciones ambientales y así la previsión de la vida en anaquel. Los microbios pueden crecer rápida mente en la carne es decir cuando comienza un microbio que se divide cada 10 minutos presenta nutrientes disponibles en 5 horas habrá sobre un billón de microbios presentes. Es el problema de los microorganismos que algunos son patógenos y pueden causar enfermedades a los consumidores, es decir estos causan infección cuando son ingeridos o producen sustancias químicas en carnes que son toxicas al humano. La contaminación en la carne con la presencia de coloraciones amorfas y dispersas en la superficie del producto son desarrollados por las bacterias. Entre las bacterias cromógenas entre ellos tenemos: *Micrococcus auriantica*, *Micrococcus musea*, *Micrococcus flavus*, *Pesudomonas*, *Chronobacterium lividum* que producen coloraciones amarillas, rojas, verdes, en la carne; microorganismos toxigénicos son: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Aspergillus*, *flavus* e infecciones causadas por especies de *Salmonellas* y *Escherichia coli*.

c) Deterioro químico: Durante el procesamiento de carnes, ocurren daños a los tejidos musculares, que pueden ocasionar la liberación de diversos constituyentes químicos, pueden reaccionar con otros factores externos para producir al deterioro de la carne.

2.1.4 Métodos para la evaluación de la calidad de la carne

a) pH

El pH produce concentración de ácido láctico a partir del glucógeno muscular en función de la glucólisis anaerobia que tiene lugar al detenerse el aporte de oxígeno, mientras haya glucógeno se produce ácido láctico descendiendo el pH hasta que se interrumpen los fenómenos glucolíticos. Estos contribuyen al descenso del pH *post mortem* en un 10% (Warris, 2003). El pH de los animales se sitúa en un rango entre 7.08 y 7,30. Tras la muerte del animal se produce un descenso del mismo hasta valores entre 5,4 y 5,6. Existen diferentes factores que influyen en la caída del pH y en el valor final alcanzado, este valor se mide con un pH metro que registra la diferencia de potencial eléctrico entre un electrodo de medición y otro de referencia (Tarrant *et al.*, 1980).

b) TBARS Acido 2-tiobarbiturico

El índice de TBARS se define como el incremento de absorbancia medido a 530 nm luego de la reacción del equivalente de 1mg/ml con ácido 2-tiobarbiturico. Los puntos de oxidación secundaria de aceites y grasas reaccionan con el ácido 2-tiobarbiturico formando productos de condensación cuya absorbancia es medida a 530 nm, longitud de onda de máxima absorbancia de uno de dichos productos. Este método permite la determinación directa del índice TBARS en aceites y grasas sin tener que aislar previamente los productos de oxidación secundaria (Tarrant *et al.*, 1980).

Valores de TBARS por encima de 0.60 mg MDA/kg pueden ser reconocidos por consumidores inexpertos, y valores por encima de 2.00 mg MDA/kg se consideran rancios e inaceptables para el consumidor (Nassu, 2001).

2.2 COMINO (*Cuminum cyminum* L.)

El comino es una planta herbácea anual que pertenece a la familia *apiaceae* (antes llamadas umbelíferas), 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 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 (Muller, 1981).

El cultivo puede llevarse a cabo en llanuras y por encima de 3.335 m. prefiere un clima templado a uno cálido y puede soportar fuertes lluvias. A partir de las lluvias, se cultiva generalmente tras los primeros avisos de los monzones, pudiendo tener dos veces la cosecha al año, una a mediados de abril y otra a finales de octubre (Mukhopadhyay *et al.*, 2003).

2.2.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del comino según Larragaña *et al.*, (2010), menciona lo siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Apiales

Familia: Apiaceae

Género: *Cuminum*

Especie: *Cuminum cyminum*.

2.2.2 Características del comino

Es una planta anual, herbácea, que puede alcanzar de 40 a 60 cm hasta 120 cm de altura. Sus hojas son glabras, ordenadas en roseta, son pinnadas o bipinnadas. Al segundo año se desarrollan 1 a 3 tallos carenados. Las flores, de 5 pétalos, son pequeñas y blancas agrupadas en umbelas compuestas. El fruto es un diaquenio, de 3 a 6 mm, levemente curvado, de color marrón y un olor característico. El comino presenta diversas propiedades medicinales, es una hierba aromática y astringente que beneficia el aparato digestivo y actúa como estimulante de los órganos sexuales. Ha sido usado en el tratamiento de trastornos digestivos leves, como carminativo, eupéptico y astringente, en afecciones broncopulmonares y tos, y como analgésico (Cameroni, 2012).

2.2.3 Composición química de la semilla de comino

El comino posee, aceites esenciales, estos se encuentran constituidos principalmente por mono terpenos, como el aldehído cumínico (p-isopropil benzaldehído) (figura 1) y el terpinol. Además, está conformada por taninos, los cuales resultan ser unos excelentes antioxidantes. 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 (Mukhopadhyay *et al.*, 2003).

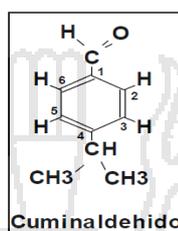


Figura 1. Composición química de comino

2.3 ACEITE ESENCIAL

Con este nombre se conoce el líquido oleoso volátil, generalmente insaponificable que se obtiene de las diferentes partes de una planta (hojas raíces, flores, semillas y frutos) por algún método físico de extracción, representa la fracción aromática más importante del vegetal; está constituido por una mezcla muy compleja de compuestos, principalmente terpenos, alcoholes, cetonas, fenoles, ácidos, aldehídos y ésteres, se solubiliza parcialmente en etanol, es insoluble en agua (Badui, 1990).

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones posteriores o sea que son los compuestos tal como se destilan de la planta; los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento del mismo aceite con uno o varios de sus componentes o mezclas de varios aceites o productos de

refinación; y los aceites esenciales sintéticos, son mezclas de componentes sintetizados, que emulan la composición de la esencia natural (Sánchez, 2006). Desde el punto de vista químico pueden ser clasificadas según el predominio de algunos componentes como por ejemplo monoterpenoides (hierbabuena, albahaca, salvia), sesquiterpenoides (aceite de cedro, jengibre), y del tipo de mezcla donde los compuestos oxigenados son mayoritarios, entre estos los fenoles (clavo, canela, anís, albahaca, laurel, tomillo, entre otras) (Sánchez, 2006).

2.3.1 Distribución y estado natural

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen los Compuestos, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajenjo, albahaca, buchú, cedrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil), en las raíces (angélica, ásaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino), en el tallo (canela), en las flores (árnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa) y en los frutos (alcaravea, cilandro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta) (Guignard *et al.*, 1985).

2.3.2 Función de los aceites esenciales en las 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 (Burt, 2004).

2.3.3 Extracción y aislamiento del aceite esencial.

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: Destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos (Martínez, 2001), menciona en los siguientes conceptos.

a) Destilación por arrastre con vapor de agua

La muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.

b) Extracción con solventes volátiles

La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo.

c) Enflorado

El material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor.

d) Extracción con fluidos supercríticos

Es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico.

2.3.4 Aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum* L.)

El comino pertenece a la familia de las umbelíferas a la que pertenecen otras conocidas especias como el anís, hinojo, eneldo, coriandro. Su aceite se extrae mediante la destilación de las semillas. En un principio es incoloro pero amarilla con el tiempo, tiene un aroma parecido al del anís, aunque ligeramente amargo. El olor del comino proviene 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 α - y β -pireno (21%), dipentano, p-cimeno y β -felandreno. (Burbano, 2008).

La proporción del aceite esencial de comino varía entre 2,5% y 5% en base a diferentes condiciones de clima y suelo, cuminaldehido, cimeno y terpenoides son los principales constituyentes de los aceites volátiles de comino, las semillas contienen aceites esenciales y compuestos fenólicos que se utilizan para alimentos aromatizantes, tratamiento de dolor de muelas, diarrea, epilepsia y antioxidante natural (Bettaieb *et al.*, 2011).

2.3.5 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 la 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 sistema central nervioso, se han descrito así mismo, efectos narcóticos y de estupefacientes para el comino, cilantro y tomillo (Al-Khamis, 2006). El aceite esencial del 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 (Mukhopadhyay *et al.*, 2003).

Por regla general, los aceites esenciales por vía oral poseen una toxicidad débil o muy débil, la mayoría de los que se utilizan frecuentemente tienen una DL₅₀ comprendida entre 2 y 5 g/Kg (anís, eucalipto, clavo, comino, etc.), o lo que es más frecuente, superior a 5 g/Kg (manzanilla, lavanda, etc.), similar caso se da con los componentes de los aceites esenciales (Lis-Balchin *et al.*, 2014).

2.4 EFECTO ANTIMICROBIANO

Los microorganismos desempeñan importantes papeles de interés en diferentes áreas de la industria de los alimentos. Algunos se emplean ventajosamente en la elaboración de los productos, salmueras de curado, encurtidos y en otros productos fermentados, pero en la mayor parte de los casos alteran los alimentos deteriorándolos hasta hacerlos repugnantes. Toda acción inhibitoria frente al crecimiento microbiano generalmente se expresa como acción antimicrobiana, incluyendo las acciones anti bacteriostática o fúngica (prevención del crecimiento microbiano y de su propagación) y muchas especias poseen propiedades antimicrobianas y/o fúngicas (Hirasa y Takemasa, 2002).

Las propiedades antimicrobianas de las especias se han conocido durante siglos. Por ejemplo la canela, el comino y el tomillo se emplearon en la modificación en el antiguo Egipto y las especias en la antigua India y China se empleaba ya para conservar alimentos, así como también con fines medicinales (Hirasa y Takemasa, 2002).

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 del inóculo, la fase de crecimiento, el medio de cultivo, el pH, el emulsificante, el tiempo y la temperatura de incubación (Burt, 2004).

2.4.1 Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial

Los métodos actualmente utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales son:

a) Método de difusión en agar

El método consiste en aplicar una cantidad determinada del extracto en estudio, en un disco de papel que se coloca sobre la superficie de la placa donde se ha distribuido el inóculo con el microorganismo sobre el que se quiere ver el poder antimicrobiano. Por gradiente de concentración, el extracto difunde alrededor del disco. La sensibilidad del microorganismo al extracto se relaciona con el tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano. Según el diámetro del halo de inhibición, los microorganismos se clasifican en: no sensibles ($d < 8\text{mm.}$), sensibles ($9\text{mm.} < d < 14\text{mm.}$), muy sensibles ($14\text{mm.} < d < 19\text{mm.}$) Y extremadamente sensibles ($d > 20\text{mm}$) (Burt, 2004).

b) Método de dilución en medio de cultivo y en agar

El extracto se incorpora al medio con agar cuando aún está líquido. Para lograr el rango de dilución deseado se preparan una serie de placas con diferentes Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) como Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMB). CMI se define como la menor concentración del extracto que produce el 90% de reducción en el crecimiento de las colonias. La CMB se define como la mínima concentración del extracto que produce al menos un 99.9% de reducción en el crecimiento de las colonias. Si se usan medios líquidos, el procedimiento es el mismo, sólo que se usan tubos de ensayo para las diferentes diluciones. Ambos métodos permiten obtener datos cuantitativos (Burt, 2004).

2.5 *Escherichia coli*

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Se trata de una bacteria gram negativo flagelada y de forma bacilar. Este microorganismo es anaerobio facultativo (es decir, posee las dos rutas metabólicas, la respiratoria y la fermentativa), oxidasa negativo, y no utiliza los citratos. Esta bacteria fermenta la glucosa y otros carbohidratos produciendo ácido y gas. (Yousef y Carlstrom, 2006).

Escherichia coli son bacilos de 1 a 3 μm por 0.5 μm , 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 gram negativos. 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 facultativos, produce dos tipos de fibras que rigen su capacidad patógena (Rea, 2011).

2.5.1 Alimentos implicados

La contaminación de los alimentos se debe fundamentalmente a una falta de higiene, por los manipuladores de los alimentos, etc. No sobrevive a temperaturas de congelación durante largos periodos. Jay, (2002) citado por Luna y Aguilar, (2011) El ganado vacuno es el principal reservorio de *Escherichia coli*, por lo que frecuentemente se asocia a este patógeno con carne picada de vacuno insuficientemente cocinada. Esta bacteria se ha aislado de

muchos productos alimenticios como leche cruda y pasteurizada, cuajadas de queso, sidra y zumo de manzana, ambos sin pasteurizar (Yousef y Carlstrom, 2006).

2.6 VIDA UTIL

La vida de anaquel de un alimento comprende el periodo desde su elaboración hasta su consumo, en el cual es de calidad satisfactoria. Entonces la vida en anaquel esperada de un alimento procesado depende de las condiciones ambientales a las que será expuesto este, así como el grado de calidad inicial que puede perder, antes ser vendido al consumidor, por cualquiera de las siguientes causas: pérdida inaceptable de valor nutricional, cambios indeseables de color o el desarrollo de una textura indeseable (Núñez y Chumbiray, 1991).

2.6.1 Principales métodos para determinar la vida anaquel para alimentos

a) Reacción cinética básica para determinar la pérdida de la calidad de los alimentos:

(Núñez y Chumbiray, 1991), señalan que la mayor parte de las reacciones de deterioro que ocurren en los productos alimenticios, en condiciones de almacenamiento, se ajusta a la siguiente expresión matemático:

$$\frac{dQ}{dt} = KQ^n$$

Donde:

Q = Factor de calidad.

t = Tiempo

k = Pendiente de la ecuación.

n = Factor de potencia llamado el orden que define si la velocidad es depende de Q . en el caso de alimento varía entre 0 y 2.

$\frac{dQ}{dt}$ = velocidad de cambio de Q con respecto al tiempo. El signo negativo es utilizado si el deterioro es una pérdida de Q y un signo positivo si es por producción final deseable.

Una disminución lineal del atributo implica que su variación con respecto al tiempo constante, y que, por lo tanto, la pérdida de dicho atributo no depende de su concentración. La reacción lineal entre atributo y tiempo se obtiene cuando la reacción es de orden cero, por lo tanto si en la ecuación anterior se hace $n=0$, tendremos:

$$-\frac{dQ}{dt} = k$$

Integrando esta ecuación se obtiene:

$$Q = Q_0 - kt$$

Donde Q_0 representa el valor inicial del atributo de calidad y Q es el valor que toma dicho atributo después de transcurrido en tiempo t .

Si el final de vida útil, $t_{\text{útil}}$, se alcanza cuando el atributo de calidad toma un cierto valor, llamado Q_f , tenemos:

$$Q_f = Q_0 - kt_{\text{útil}}$$

En consecuencia, la vida útil $t_{\text{útil}}$ será:

$$k_{\text{útil}} = \frac{Q_0 - Q_f}{k}$$

Donde:

Q_0 = Valor inicial del ácido 2-tiobarbitúrico.

Q_f = 2 mg MDA/kg, el valor de ácido 2- tiobarbitúrico máximo permitido.

k = pendiente de la ecuación.

El empleo de una ecuación de orden cero es útil en la descripción de procesos como la oxidación de los lípidos que lleva al desarrollo de olores rancios (Caps *et al.*, 1999 citado por Luna *et al.*, 2011).

b) Método del Q_{10} para determinación de vida útil

Los modelos matemáticos, se utilizan para describir o predecir cuán rápido iría una reacción (bioquímica), si el producto alimenticio es mantenido relativamente alto.

Si el factor aceleratriz de la temperatura de almacenamiento es conocido, entonces; extrapolando a temperaturas más bajas, tales como las que ocurren durante su distribución o comercialización de los productos alimenticios, se puede estimar la vida en anaquel del producto en estudio. (Nuñez y Chumbiray, 1991).

El factor es conocido como el “Factor Q_{10} ”, que está definido como:

$$Q_{10} = \frac{\text{velocidad a temperaturas } (T + 10^{\circ}\text{C})}{\text{velocidad a temperaturas } T^{\circ}\text{C}}$$

Donde T y T+10 °C son temperaturas a la que se evalúa la vida en anaquel.

El Q_{10} también puede ser calculado como:

$$Q_{10} = \frac{\text{vida en anaquel a } T}{\text{velocidad a temperaturas } (T + 10^{\circ}\text{C})}$$

Para cualquier diferencia de temperatura θ que no sea 10°C , aquello se convierte en:

$$Q_{10} = \frac{\text{vida en anaquel a } T_1}{\text{vida en anaquel a } T_2}$$

Los cuales asumen a la velocidad son inversamente proporcionales a la vida en anaquel. Para una reacción cero esto es exactamente desde que:

$$\text{velocidad} = K = \frac{\text{cantidad de perdida en el punto final}}{\theta_s}$$

Entonces:

$$\text{tiempo en dias} = \theta_s = \frac{\text{cantidad de perdida en el punto final}}{K}$$



3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La ejecución del presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología de los Alimentos, laboratorio de Análisis Nutricional y en la planta piloto de la Escuela Profesional de Ingeniería

Agroindustrial de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, del departamento de Puno.

3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

- Se utilizó las semillas de Comino (*Cuminum cyminum* L.), adquiridas en la ciudad de Juliaca, como materia prima para la extracción del aceite esencial y su posterior aplicación como conservante antimicrobiano.
- Cepas de *Escherichia coli*, obtenidas del laboratorio de microbiología de alimentos por aislamiento.
- Carne de res, muestra proveniente del camal Azoguini de la ciudad de Puno.

3.3 EQUIPOS Y MATERIALES

3.3.1. Equipos y materiales

- Autoclave modelo LS-BSOL-II, volumen 50 L.
- Equipo de destilación por arrastre de vapor.
- Refrigeradora marca ICECROWN modelo 456C.009 (capacidad 200 kg).
- Refrigeradora LEHEL COL-EIPH-ME-042.
- Balanza electrónica ACCULAB SARTORIUS sensible al 0.0001 g.
- Balanza analítica a precisión marca AND FR-300 Japón, Capacidad de 0,0001 a 310 g.
- Cuenta colonias marca LIGHTBOX.
- Selladora.
- Estufa marca LMN tipo LP5 – 402.

- Estufa MEMMERT Universal, 30-120°C, modelo TV-40.
- Termómetro marca HANNA de -40 a 150 °C.
- Espectrofotómetro UV.
- Licuadora de vidrio marca ÓSTER capacidad máxima 1,25Lts.
- Cámara fotográfica SAMMSUNG.
- Balón de Destilación.
- Espátula ACERO INOX.
- Mechero de bunsen.
- Crisoles de porcelana.
- Piceta (PVC).

3.3.2. Materiales de vidrio

- Erlenmeyer (250, 500 y 1000ml).
- Probetas (10, 50 y 100ml).
- Pipetas (1, 5 y 10ml).
- Tubos de ensayo PIREX.
- Placas petri PIREX.
- Matraz PIREX.

3.3.3. Reactivos e insumos

- Ácido 2-tiobarbitúrico TBARS.
- Ácido clorhídrico 4N.
- Alcohol de 96°.
- Agua destilada.
- Agua de peptona (Merck peruana SAC).

3.3.4. Medios de cultivo

- Caldo Verde Brillante Bilis (CVBB)
- Agar Bilis Rojo Violeta (Agar VRB)
- Agar Eosin Methylene-blue Lactose Agar acc. (Agar EMB)
- Agar ENDO.

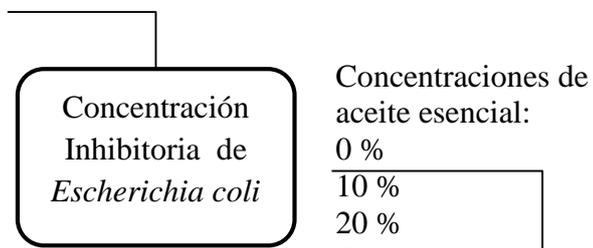
3.3.5. Otros materiales

- Papel aluminio.
- Papel kraft.
- Cinta masking tape.
- Bolsas de polietileno.
- Lapiceros (rojo, azul, negro).
- Marcadores.
- Tabla de picar.
- Caja isotérmica (tecnopor).

3.4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

La metodología utilizada durante el proceso de investigación fue de tipo experimental cuyos procesos de obtención, producción, control y análisis son los siguientes.

Aceite esencial del Comino.



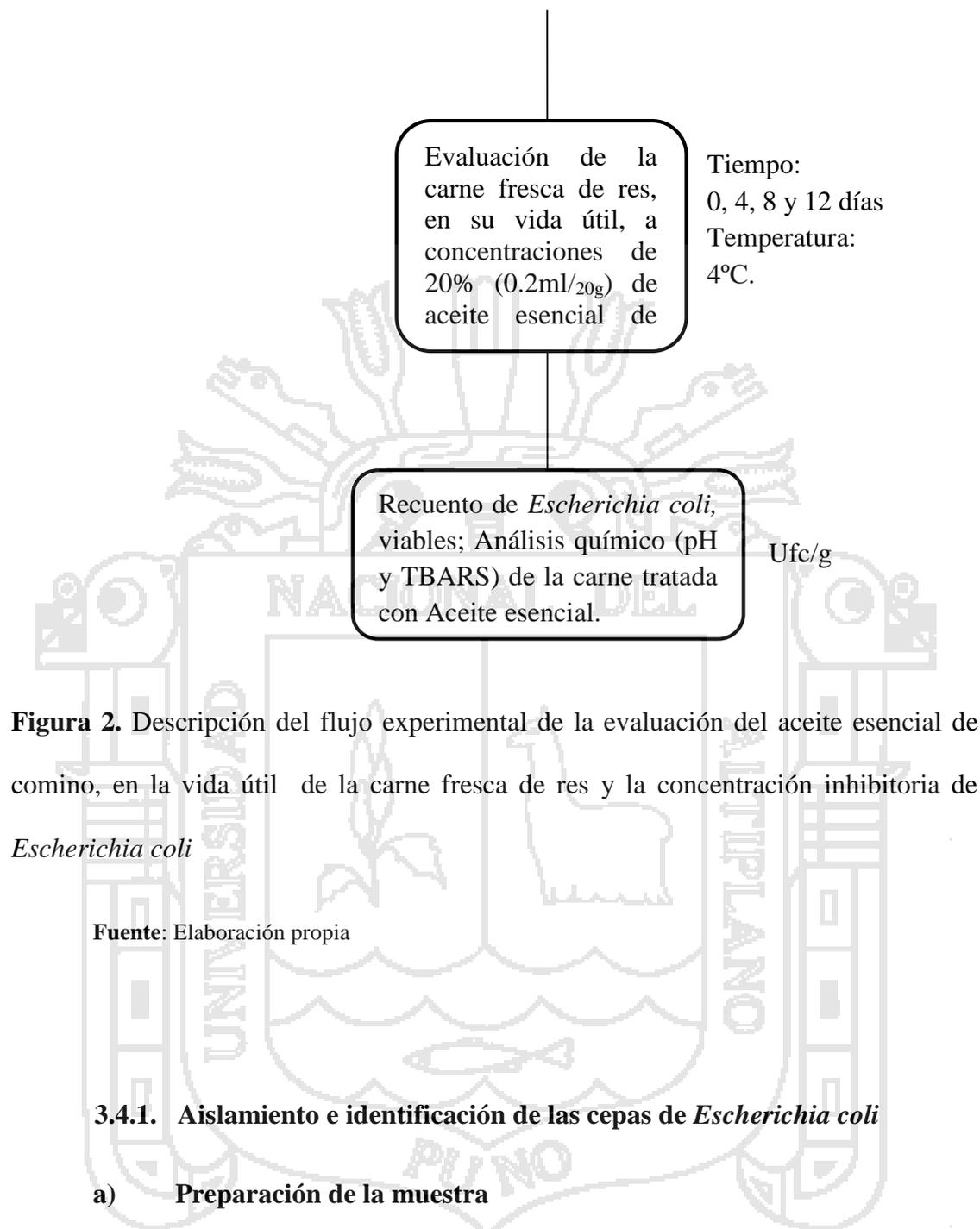


Figura 2. Descripción del flujo experimental de la evaluación del aceite esencial de comino, en la vida útil de la carne fresca de res y la concentración inhibitoria de *Escherichia coli*

Fuente: Elaboración propia

3.4.1. Aislamiento e identificación de las cepas de *Escherichia coli*

a) Preparación de la muestra

Para aislar la *Escherichia coli* primero se utilizó una prueba de identificación usando el método de N.M.P. se pesó 5 g de carne de res y se diluyó en 45 ml de agua peptona estéril, se homogeneizó, obteniéndose así la dilución 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} en tres repeticiones.

b) Siembra e incubación

Se preparó en una gradilla 3 series de 3 tubos cada dilución. Los tubos contienen 10 ml de caldo Verde Brillante Bilis (CVBB), luego de esterilizar se incubó a 30°C durante 24 horas, se observó presencia de gas en la campana de Durham con formación de ácido y gas en presencia de sales biliares.

A partir de los tubos de caldo CVBB positivos, se realizó la prueba confirmativa usando 1 ml de la muestra positiva en un 1 tubo del mismo caldo CVBB. A continuación se incubó a 44,5°C durante 24 h. concluido el tiempo se observó si hay tubos de CVBB positivos (gas), se añadió 0.2 ml de reactivo de Kovacs en los tubos de CVBB. La aparición de color rojo en la parte superficial del cultivo indica que es positivo para la presencia de *Escherichia coli*. La última confirmación se sembró en agar de EMB que se incubó por 24 h a 37°C. Las colonias de *Escherichia coli* son de 2-3 mm de diámetro de color oscuro y con un brillo verde metálico muy característico en agar EMB. (ICMSF, 2006.)

Para confirmar las cepas de *Escherichia coli* se hizo las pruebas bioquímicas siguientes:

- Prueba de catalasa (+)
- Prueba de indol (+)
- Prueba de Simmons (-).

c) Conformación de banco de cepas

Las cepas se conservan en tubos inclinados con Caldo Nutritivo que se almacenaron a 4 °C, durante el estudio se mantuvieron su viabilidad y pureza. El procedimiento se observa en el anexo 1.

3.4.2. Concentración inhibitoria de *Escherichia coli* en la placa

Para la concentración inhibitoria de *Escherichia coli* se aplicó el método de ICMSF (2006).

- Medio de cultivo en placa, se preparó el LEVINE EMB Agar (Eosin Methylene-blue Lactose Agar acc. To LEVINE) usando la metodología de ICMSF (2006).
- Siembra en superficie de la placa con *Escherichia coli*, se estriaron las cepas de *Escherichia coli* en el medio de cultivo en agar EMB.
- Apertura de orificio en el agar de la placa, una vez sembrados la *Escherichia coli*, los orificios fueron de 4 mm de diámetro.
- Se preparó el aceite esencial de comino en porcentajes de 10%, 20%, 60% y 100% diluido en aceite vegetal comestible, y se inoculó 25 µl de las diluciones en los pocitos de agar en placa.
- Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas.
- Finalmente se midió el diámetro del contorno de la zona de inhibición en milímetros como se muestra en la imagen del anexo 2.

3.4.3. Evaluación de la carne fresca de res con adición del aceite esencial de comino y su período de vida útil

Usando la metodología de Rea, (2011). Para la preparación del inóculo de *Escherichia coli* la carne fresca de res, se cortó la carne en pedazos de 5cm x 5cm, para luego impregnar las colonias de *Escherichia coli* que contenía aproximadamente 6×10^4 ufc/g. Masajeando por un lapso de 2 minutos a cada muestra. Se añadió el aceite esencial de comino a una concentración de 0.2 ml/20g de 20% de dilución, se masajeó de igual forma. Finalmente la carne se envasó al vacío y se almacenó en una refrigeradora a 4°C.

3.4.4. Evaluación de las propiedades químicas (pH y ácido 2-tiobarbitúrico) y microbiológico de la carne de res con aceite esencial de comino

a) Análisis de pH

La medición de pH fue realizada a los 0, 4, 8 y 12 días de almacenamiento de la carne de res con un pH-metro, de acuerdo a la metodología descrita por AOAC (2012).

Se pesaron 5g de muestra, a las que se les adicionaron 45 ml de agua destilada, posteriormente se realizó un homogeneizado en una licuadora a máxima velocidad, durante 5 minutos.

A partir de esta solución se tomaron 10 ml a los cuales se les midió el pH por introducción directa del electrodo en la misma. Cada medición se realizó por triplicado.

b) Determinación de ácido 2-tiobarbitúrico

La oxidación de lípidos se midió por el método del ácido *2-tiobarbiturico* (TBARS) como se describe por Suárez (2008). La muestra de 5 g carne de res fue picado, se agregó 2,5 ml de HCl 4 N y 97.5 ml de agua destilada. Esta muestra se sometió a una destilación separándose a los primeros 50 ml del destilado; la destilación fue realizada por triplicado. Posteriormente, a 5 ml del destilado se le adicionaron 5 ml de 0.021 M de TBARS a un tubo de ensayo con tapa rosca y calentando en baño maría a 90 °C/40 min para el desarrollo de color rosa. Posteriormente fue determinada la densidad óptica a 532 nm en un espectrofotómetro Secomam Anthelie modelo 70ST0375 (Secomam, Francia) usando como control la solución que contenía 5ml de agua destilada, 5 ml de solución de TBARS. Los valores de TBARS fueron expresados como mg de malonaldehído (MDA)/kg de muestra.

c) Análisis microbiológico de la carne de res con aceite esencial

Los análisis se realizaron de acuerdo a la metodología de ICSMF, 2006.

c.1. Preparación de diluciones

Se pesaron en un vaso previamente tarado, 5g representativos de carne de res, seguidamente se añadió un volumen de diluyente igual a 9 veces la muestra (45ml), homogenizándolo hasta conseguir 15.000 a 20.000 revoluciones en la licuadora y finalmente se obtuvo una dilución 10^{-1} . Luego se tomó 1 ml del homogenizado y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de diluyente, obteniéndose así la dilución 10^{-2} , prosiguiendo hasta obtener más diluciones.

c.2. Siembra

Se pipetearon alícuotas de 1 ml de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , sobre placas con Agar EMB previamente temperadas. Seguidamente se mezclaron las alícuotas con el agar, mediante movimientos de vaivén y rotación para su posterior incubación $35 - 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

c.3. Conteo de colonias.

Transcurridas 24 horas de incubación se procedió al conteo de colonias en las placas, haciendo el cálculo correspondiente, expresando el número de colonias de *E. coli* viables por gramo de muestra.

3.4.5. Diseño estadístico

a) Concentración inhibitoria de *Escherichia coli* en placa

Para determinar la concentración mínima inhibitoria se empleó Diseño Completamente Al Azar, este diseño nos permitió determinar la efectividad de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del comino. De las que se obtuvieron 5 tratamientos con tres repeticiones.

Tabla 2. Recopilación de datos de las variables de respuesta

CONCENTRACION	REPITICIONES			PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
	R1	R2	R3		
0%					
10%					
20%					
60%					

100%					
------	--	--	--	--	--

$$y_{ij} = u + \tau_i + E_{ij}$$

y_{ij} = Es una observación en la j-esima unidad experimental, sujeto al i-esimo tratamiento.

τ_i = Es el efecto del i-esimo tratamiento.

u = Es el efecto de la media general o constante común.

E_{ij} = Efecto verdadero de la j-esima unidad experimental (replica), sujeta al i-esimo tratamiento (error experimental).

b) Para la evaluación de la carne fresca de res con adición del aceite esencial de comino y su periodo de vida útil

Para procesar los datos obtenidos durante la investigación se aplicó el análisis de varianza (ANVA), con un nivel de confianza del 95% y el test de Duncan ($p \leq 0.05$) para determinar las posibles diferencias entre los filetes de carne de res con la adición del aceite esencial de comino, para lo cual se empleó el software *Statgraphics*.

Para comparar el efecto del aceite esencial de comino en la carne de res, se aplicó el diseño estadístico completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 2x8 (2 tratamientos de aceite esencial de comino y evaluados a los 0, 4, 8 y 12 días) con 3 repeticiones. También se determinó si existieron diferencias significativas en el pH, ácido 2-tiobarbitúrico y *Escherichia coli* viable.

En el que se considera el siguiente modelo lineal aditivo:

$$y_{ijk} = u + d_i + t_i + dt_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

y_{ij} = ij- ésima variable de respuestas (pH, ácido 2-tiobarbitúrico, *E. coli* viable).

u = Media general del experimento.

d_i = Es el efecto del i-esimo tratamiento.

t_i = Es el efecto del i-esimo tratamiento (días).

$(dt)_{ijk}$ = Es el efecto del ij-esima interacción de tratamiento y tiempo.

e_{ijk} = Error experimental.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Evaluación de diferentes concentraciones del aceite esencial de comino para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*.

La evaluación de diferentes concentraciones del aceite esencial de comino se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino

Concentraciones (%)	Diámetro del halo de inhibición en (mm)				Promedio
	0%	0.00	0.00	0.00	
10%	0.25	0.40	1.40	0.87	0.73±0.52
20%	3.31	4.20	4.30	4.10	3.98±0.45
60%	5.04	4.24	4.82	5.46	4.89±0.51
100%	7.63	9.90	10.11	7.00	8.66±0.58

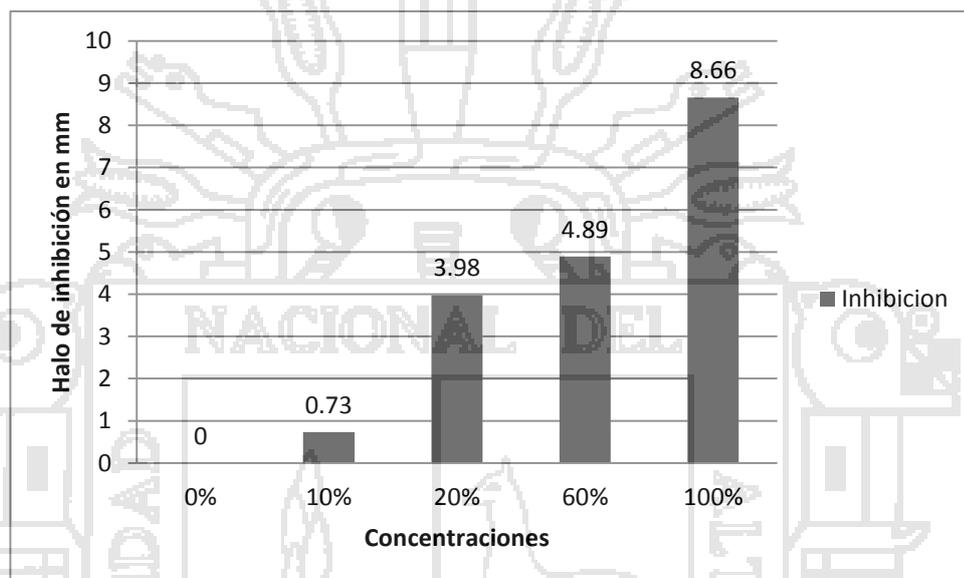
mm: Milímetros

% : Porcentaje.

El mayor efecto inhibitorio correspondió al mayor porcentaje del aceite de comino, que alcanzó 10.11 mm de halo de inhibición, al respecto Rea, (2011) concluye que el halo es 12 mm, mostrando mediante su estudio el efecto antibacteriano del aceite esencial de comino frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas ssp* y las especies proteolíticas dando la efectividad de concentración mínima bactericida. Las concentraciones 10% a 60% en la presente investigación también mostraron actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* (Ver tabla 3). Por otro lado Bakkalia, *et al*, (2008) afirma que 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 de 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 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 de sus

componentes individuales, en este estudio el producto ensayado fue el aceite extraído de la semilla de comino.

Figura 3. Promedio de actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino respecto a *Escherichia coli*



En la figura 3, se observa que existe un ligero incremento del halo de inhibición a medida que van aumentando las concentraciones, el mayor diámetro de inhibición promedio fue de 8.66 mm al 100%, según Burt (2004), menciona que la sensibilidad del microorganismo al extracto se relaciona con el tamaño de halo de inhibición: sensibles (9mm. < d < 14mm.), muy sensibles (14mm. < d < 19mm.) y extremadamente sensibles (d > 20mm) viendo el resultado de las pruebas consideramos que la *Escherichia coli* es sensible al extracto de aceite esencial de comino.

4.2 Evaluación de la influencia del aceite esencial del comino en la vida útil de la carne fresca de res

Para la determinación del tiempo de vida útil se realizó una evaluación del análisis del ácido 2- *tiobarbitúrico* durante un periodo de 12 días en condiciones de refrigeración (4 °C) cuyos resultados y discusiones se detallan a continuación.

4.2.1 Cálculo del tiempo de vida útil de la carne de res tratada con aceite esencial de comino.

Utilizando las ecuaciones de (Nuñez y Chumbiray, 1991) tenemos:

$$t_f = \frac{Q_0 - Q_f}{k}$$

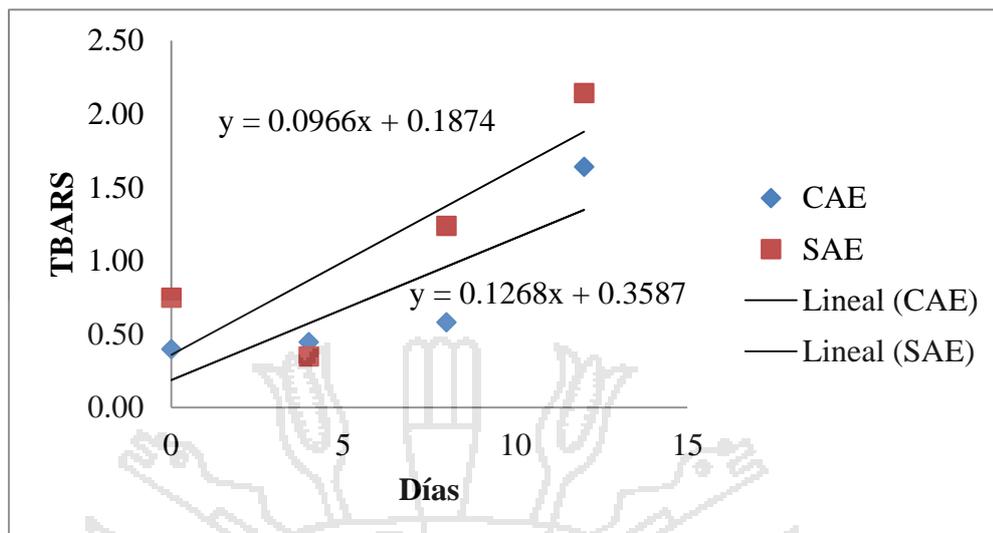
Donde:

Q_0 = Valor inicial del ácido 2- *tiobarbitúrico*.

Q_f = 2 mg MDA/kg, el valor de ácido 2- *tiobarbitúrico* máximo permitido.

k = Pendiente de la ecuación.

Ácido 2-tiobarbitúrico - Tiempo



CAE: Carne de res con aceite esencial
 SAE: Carne de res sin aceite esencial
 TBARS: Ácido 2-tiobarbitúrico.

Figura 4 Ajuste de regresión lineal para los valores del análisis de ácido 2 – tiobarbitúrico de la carne con aceite esencial y sin aceite esencial de comino.

En la figura 4 se presenta el ajuste de regresión lineal para los valores del TBARS con y sin tratamiento del aceite esencial del comino, para determinar el valor de K, representado por la pendiente de la ecuación, tal como se observa a continuación.

Tabla 4. Tiempo de vida útil de la carne de res con tratamiento y sin tratamiento con aceite esencial de comino

	CAE	SAE
Valor de k	0.0966	0.1268
Vida útil (días)	16.5859	9.8675

CAE: Carne de res con aceite esencial
 SAE: Carne de res sin aceite esencial

En la tabla 4, se comprueba que la carne de res tratada con aceite esencial presentan mayor tiempo de vida útil, con 16 días; respecto a los filetes sin el

tratamiento de la carne con aceite esencial de la carne de res con 10 días, estos datos registrados pueden ser considerados mucho más satisfactorios que los datos resultados presentados por Aberle (2002), quien reporta una estabilidad de la carne de res empacado en envase permeable al oxígeno, puede durar hasta 5-7 días en almacenamiento, este hecho puede ser atribuido a que existen factores implicados desde la alimentación, condiciones de beneficio y procesamiento de la carne de res, que pueden influir directamente en su vida útil.

De lo anteriormente expuesto, en la tabla 5 se puede inferir que se logró prolongar el tiempo de vida útil de la carne de res tratada con aceite esencial de comino por 6 días de diferencia respecto a la muestra sin aceite esencial, lo que coincide con el estudio realizado por Khanjari *et al.*(2013) quien consiguió aumentar la vida útil los filetes de la carne de pollo crudo en 6 días conservando a 4°C mediante la utilización del aceite esencial de orégano, que se manifestó por una disminución del inóculo de *Listeria monocytogenes*.

Por otro lado Bonilla (2012), reporta un tiempo de vida útil de 12 días para la hamburguesa tratados con orégano como conservante en refrigeración, resulta dentro del margen de tiempo encontrado en el presente trabajo de investigación.

4.3 Evaluación de las características químicas (pH y ácido 2-tiobarbitúrico) y microbiológico de la carne de res tratada con aceite esencial de comino

Para la determinación del análisis fisicoquímico se realizó una evaluación de pH, ácido *2-tiobarbitúrico* y microbiológicas durante un periodo de 12 días en condiciones de refrigeración (4 °C) cuyos resultados y discusiones se detallan a continuación.

4.3.1 Evaluación del pH

En la tabla 5, se observa que el pH de la carne con aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum* L.), se encuentra entre los rangos de 5.46 a 5.63 con mayor cercanía dentro de los rangos para la carne de vacuno entre 5,4 a 5,6 (Tarrant y Sherinton, *et al* 1980); Con respecto a la carne de res con aceite esencial (anexo 7) se muestra un ligero aumento a partir de 4 días, mientras tanto en la muestra control se muestra un mayor incremento a medida que va aumentando el tiempo de almacenamiento, probablemente sea debido a las condiciones particulares como el estado nutricional del ganado, la cantidad y grado de agotamiento al momento de la muerte, que produce concentración de ácido láctico a partir del glucógeno muscular en función de la glucólisis anaerobia que tiene lugar al detenerse el aporte de oxígeno, mientras haya glucógeno se produce ácido láctico descendiendo el pH hasta que se interrumpen los fenómenos glucolíticos, Warris, (2003). Arribando que el pH está dentro del rango permisible.

Tabla 5. Valores de pH de la carne tratada con aceite esencial y sin aceite esencial de comino a través del tiempo de almacenamiento

Día	CAE	SAE
	\bar{x}	\bar{x}

0	5.46±0.06	5.50±0.01
4	5.60±0.01	5.76±0.06
8	5.63±0.03	5.83±0.03
12	5.63±0.03	5.90±0.01

CAE : Carne de vacuno con aceite esencial.

SAE : Carne de vacuno sin aceite esencial.

\bar{x} : Promedio.

Al día 8 se aprecia un incremento de pH ya que durante las etapas posteriores a los cambios *post mortem*, la descomposición de los compuestos nitrogenados provoca el incremento de pH en la carne de res (Herrero y Romero, 2006), así mismo así como se muestra en el anexo 7.

Tabla 6. ANVA del pH de la carne de res tratada con aceite esencial y sin aceite esencial de comino a través del tiempo de almacenamiento

F. de V.	G. L.	C. M.	Fc	P	Nivel Signif.
A: Tiempo	3	0.0966667	7.25	0.0027	**
B: Tratamientos	1	0.1666667	12.50	0.0027	**
Interacciones AxB	3	0.0144444	1.08	0.3844	
Error expe.	16	0.0133333			
TOTAL	23				

En la tabla 6, se observa que existe una diferencia altamente significativa entre los valores de pH para el tiempo y los tratamientos, es decir, que existe diferencia entre la carne con aceite esencial y sin aceite esencial de comino, con un 95% de nivel de confianza, por lo que fue necesario realizar la prueba de Duncan, para los mencionados casos, tal como se presenta en la tabla 9 y 10, en caso para la interacción del tiempo – tratamiento no hay significancia por lo que no es necesario realizar la prueba de Duncan.

Tabla 7. Prueba de Duncan del pH con respecto al tiempo

TIEMPO (Días)	Número de observaciones	Media	Duncan ($P \leq 0.01$)
0	6	5.48	a
4	6	5.68	b
8	6	5.73	b
12	6	5.76	b

En la tabla 7, se presenta la prueba de Duncan para el efecto de los días en el análisis del pH, se puede observar que el efecto de los días de tratamiento aplicado en la evaluación de la carne de res, muestran una diferencia de la carne tratada con aceite esencial de comino a lo largo de los 12 días de la evaluación. Podemos mencionar que los días 4, 8 y 12 días muestran una similitud en el análisis de pH, estos resultados muestran que a mayor tiempo de conservación el pH aumentará según transcurran los días de conservación de la carne.

Tabla 8. Prueba de comparación de Duncan del pH con respecto al tratamiento

TRATAMIENTO	Número de observaciones	Media	Duncan ($P \leq 0.01$)
CAE	12	5.58	a
SAE	12	5.75	b

CAE: Carne de res con aceite esencial
SAE: Carne de res sin aceite esencial

En la tabla 8, muestra una clara diferencia de los tratamientos, entre la carne tratada con aceite esencial y la carne sin aceite esencial con respecto a los resultados de los pH obtenidos durante el periodo de almacenamiento, se observa además que la muestra sin aceite esencial permitió un incremento promedio hasta

5.75 de pH, lo que hace dar cuenta que el aceite esencial influye, en la variabilidad del pH.

4.3.2 Evaluación del ácido 2-tiobarbitúrico

En el anexo 9 se presentan los valores del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) durante el almacenamiento de la carne tratada con aceite esencial de comino en condiciones de refrigeración.

Se puede observar que los resultados del análisis de TBARS de la carne de res sin aceite esencial son mayores a los valores registrados con aceite esencial de comino como se muestra en el gráfico del anexo 7. El ácido 2-tiobarbitúrico en la muestra control no sobrepasa al límite permisible para el consumo de 3.60 mg MDA/kg de grasa (Djenane *et al.*, 2001) lo que indica su inocuidad de la carne.

Las muestras tratadas con aceite esencial de comino, presentan valores menores que sin tratamiento, lo cual está dentro del rango reportado por (Djenane *et al.*, 2001). Quien afirma que los valores de 0.93 – 3.60 mg MDA/kg de grasa en aceites esenciales en la carne picada inoculado con *E. coli* O157: H7 y *S. aureus* durante el almacenamiento a temperatura de refrigeración, mostró efectos antioxidantes y antibacterianos.

Tabla 9. ANVA del análisis de ácido 2-tiobarbitúrico de la carne tratada con aceite esencial y sin aceite esencial de comino a través del tiempo

F. de V.	G. L.	C. M.	Fc	P	Nivel Signif.
----------	-------	-------	----	---	---------------

A: Tiempo	3	2.68127	19.85	0.0000	**
B: Tratamientos	1	0.739978	5.48	0.0325	**
Interacciones AxB	3	0.158928	1.18	0.4649	ns
Error expe.	16	0.135097			
TOTAL	23				

En la tabla 9, se observa que existe diferencia altamente significativa entre los valores de ácido *2-tiobarbitúrico* para los tratamientos y tiempo, es decir, que existe diferencia entre el tratamiento con aceite y sin tratamiento, así como para el tiempo de evaluación, con un 95% de nivel de significancia; por lo que fue necesaria la realización de la prueba de comparación de Duncan para los mencionados factores (tratamientos y tiempo), tal como se muestra en la tabla 9 y 10.

Tabla 10. Prueba de comparación de Duncan del ácido *2-tiobarbitúrico* con respecto al tiempo

TIEMPO	Número de observaciones	Media	Duncan (P≤0.01)
4	6	0.40	a
0	6	0.57	a b
8	6	0.91	b
12	6	1.89	c

La tabla 10, de la prueba de comparaciones de Duncan para el efecto de los días hay una diferencia entre los tiempos 0 - 4 días y 0- 8 días, con respecto a los resultados del ácido *2-tiobarbitúrico* durante el periodo de almacenamiento, lo que hace dar cuenta que guardó una relación directamente proporcional con respecto al tiempo. Es decir, que a medida que el tiempo de

almacenamiento incrementó, el ácido *2-tiobarbitúrico*, actuó de la misma manera, tal como lo confirman los resultados de (Nishimoto *et al.*, 1985). En su estudio sobre la estimación de mantener periodo fresca y vida útil de almacenamiento de caballa (*Scomber japonicus*) muscular durante el almacenamiento a baja temperatura.

Tabla 11. Prueba de comparación de Duncan del ácido 2 - *tiobarbitúrico* con respecto a los tratamientos

TRATAMIENTO	Número de observaciones	Media	Duncan ($P \leq 0.01$)
CAE	12	0.77	a
SAE	12	1.12	b

CAE: Carne de res con aceite esencial

SAE: Carne de res sin aceite esencial

La tabla 11, indica la prueba comparación de Duncan del ácido 2-*tiobarbitúrico* con respecto a los tratamientos, que existe diferencias, entre la carne tratada con aceite y sin tratamiento con aceite esencial de comino, la carne de res sin aceite esencial presenta un incremento promedio hasta 1.12 MDA/kg del contenido de grasa, lo que hace dar cuenta que el aceite esencial, indica claramente, una función como medio protector contra la oxidación lipídica.

4.3.3 Evaluación de *Escherichia coli* de la carne de res tratada con aceite esencial de comino

En la tabla 12, se presenta el recuento total de *Escherichia coli* viable analizado, la carga microbiana disminuye con respecto al tiempo, asimismo

observamos que el efecto del aceite esencial de comino tiene un efecto bactericida, llegando a reducir a cero la presencia de *Escherichia coli* en el octavo día, luego se muestra en el doceavo día que aparecen 3ufc de *Escherichia coli*, que probablemente sea por efecto de una inadecuada manejo del análisis microbiológico. Con respecto a la muestra de carne sin aceite esencial de comino en la misma tabla se muestra el incremento de la bacteria con relación al tiempo. Al respecto Rea, (2011), señala que la disminución de la carga microbiana en su estudio de conservación de truchas con aceite esencial de la comino (*Cuminum cyminum* L.), mostró una reducción poblacional de del 1.55% en cada cm^2 .

Tabla 12. Recuento microbiano de *Escherichia coli* viable de la carne de res con tratamiento y sin tratamiento del aceite esencial de comino en ufc/g.

TIEMPO/TRAT.	Carne de res con AE ufc/g	Carne de res sin AE ufc/g
0	43×10^1	41×10^1
4	14	10×10^2
8	0	69×10^2
12	3	150×10^2

AE: Aceite esencial

Ufc/g: Unidades formadoras de colonia por gramo.

También se aprecia claramente la diferencia entre la carne tratada y muestra control, la misma que no mostró crecimiento de microorganismos, frente a la carne sin aceite esencial, que evidenció la subsistencia del periodo de evaluación.

Tabla 13. ANVA del recuento de *Escherichia coli* de la carne de res tratada con aceite esencial y sin aceite esencial de comino a través del tiempo

F. de V.	G. L.	C. M.	Fc	P	Nivel Signif.
A: Tiempo	3	6.79521E7	9.85	0.0006	**
B: Tratamientos	1	2.00213E8	29.01	0.0001	**
Interacciones AxB	3	7.27422E7	10.54	0.0005	**
Error expe.	16	6.90058E6			
TOTAL	23				

En la tabla 13, se observa que existe una diferencia altamente significativa entre los valores de *Escherichia coli* viables para los tratamientos y tiempo como para la interacción de ambos factores, es decir que existe diferencia entre la carne de res tratada con aceite esencial y muestra control. Con un 95% de nivel de confianza. Por lo que fue necesario realizar la prueba de Duncan, para los mencionados casos, tal como se presenta en las tablas 14 y 15.

Tabla 14. Prueba de comparación de Duncan del *Escherichia coli* con respecto a los tratamientos

TRATAMIENTO	Número de observaciones	Media	Duncan (P≤0.01)
CAE	12	11x10	a
SAE	12	59x10 ²	b

CAE: Carne de res con aceite esencial.

SAE: Carne de res sin aceite esencial.

En la tabla 14, se presenta la prueba de Duncan con respecto a los tratamientos, lo que muestra diferencias, entre la carne de res tratada y sin tratamiento con aceite esencial con respecto a los resultados de *Escherichia coli* viable obtenidos durante el periodo de almacenamiento, lo que hace dar cuenta que el aceite esencial de comino presenta, claramente una función como medio inhibidor de *Escherichia coli*.

Tabla 15. Prueba de comparación de Duncan del recuento de *Escherichia coli* viable con respecto al tiempo

TIEMPO	Número de observaciones	Media	Duncan (P<0.01)
4	6	42x10	a
0	6	52x10	a
8	6	35x10 ²	a
12	6	76x10 ²	b

La tabla 15, muestra diferencias de *Escherichia coli* viable, entre los días de 0 a 4 día y 12 día que fueron llevadas a cabo de las evaluaciones, podemos mencionar que los días 4, 0 y 8 existe una similitud en el contenido de *Escherichia coli*.

El aceite esencial de comino, influyó en el crecimiento de las *Escherichia coli*, considerándose como. Este hecho puede justificar Rea, (2011), quien evaluó los filetes de la trucha utilizando como conservante natural el aceite esencial de comino inoculado con *Escherichia coli*.



CONCLUSIONES

- Las diferentes concentraciones del aceite esencial para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* en placa petri, obteniéndose mejores resultados al 100% de aceite esencial de comino generando 8.66 mm de halo de inhibición.

- El tiempo de vida útil de la carne de res tratada con aceite esencial al 20% fue de 16 días, conservada en refrigeración a 4 °C.
- Las características químicas (ácido *2-tiobarbitúrico* y pH) y *Escherichia coli* viable en la carne de res tratada con aceite esencial de comino, el cual está dentro del rango permisible.



RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de aceites esenciales de otras especies vegetales nativas, como conservante en productos diversos.

- Realizar trabajos de investigación con el aceite esencial de comino a distintas concentraciones y en diferentes bacterias, causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS).
- Realizar trabajos de investigación que incluyan la utilización de aceite esencial de comino y otras especies nativas, como conservante en otros tipos de carnes.



BIBLIOGRAFIA

ALCÁZAR del CASTILLO J. 2002. "Diccionario Técnico de Industrias Alimentarias"
2da Edición. Cusco - Perú.

ABERLE E.D. 2002. Principles of Meat Science 4ta Edition. Kendall Hunt Publishing
Company . Capitulo 9. Storage and Preservation of Meat.

- AL-KHAMIS, KI. 2006. “Antirtility anti-impantation and aborti facient activity of the aqueous axtract of *cuminum cyninum*”. Vol. 7.
- A.O.A.C, 2012 “Normas Químicas para Determinar Métodos de Análisis” 6ta edición, Asociación de Oficial en Análisis Química, Argentina, U. S. A.
- BADUI, S. 1990. “Química de los Alimentos” Editorial Alhambra Mexicana S. A. España.
- BAKKALIA F. 2008. Efectos biológicos del aceite esencial, alimentos y Toxicología Química., vol. 46.
- BETTAIEB S., KNIQUA I., HAMROUNI F., LIMAM B., 2011 “Impacto del agua por déficit de ácidos grasos y la composición del aceite esencial y las actividades antioxidantes de comino (*Cuminum cyminum L.*)” Laboratorio de Sustancias Bioactivos. Centro de biotecnologías a la Tecnología de Borj’Cédria.
- BONILLA T. 2012. “Aplicación del orégano como conservante para extender el tiempo de vida útil de hamburguesa refrigerada” Universidad Tecnológica Equinoccial Quito. Ecuador.
http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/14955/1/51567_1.pdf
- BRACK, A. 2008. “La Biodiversidad como una fuente y oportunidad de bionegocios” Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Oficina de Cooperación Técnica Internacional. Iquitos, Perú.
- BURBANO, J., 2008. “Plantas Medicinales, Hierbas y Vitaminas”., 3ra. Edición, Guayaquil Ecuador.
- CAMERONI, M. 2012. “Comino (*Cuminum cyminum*)” Ministerio y Agricultura.

(<http://www.alimentosargentinos.gov.ar>)

BURT, S. 2004. “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Foods Microbiology, Vol. 2 No 94., 223-253.

CASTAÑO M. 2012. “Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*), sobre la levadura (*Rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada comino (*Cuminum cyminum L.*)”. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Agropecuarias UNC-Colombia.

CHOQUEHUANCA F. 2009 “Manual de Practicas de Microbiología Agroindustrial” FCA-EPIA UNA Puno-Perú.

CORRY J.; CURTIS W.; BAIRD R., 2003. “Handbook of Culture Media for Food Microbiology”, volume 37, Elsevier Science.
(http://www.britanialab.com/productos/288_hoja_tecnica_es.pdf).

DJENANE, A., SÁNCHEZ-ESCALANTE, J.A. BELTRÁN, P. RONCALÉS, 2001. Extension of the retail display life of fresh beef packaged in modified atmosphere by varying lighting conditions Journal of Food Science, 66 pp. 181–186.

GALLEGOS J.; QUILCA E. 2010. “Evaluación de la sustitución de carne de alpaca en la elaboración de chorizo parrillero ahumado y su vida útil”. Tesis FCA-EPIA UNA Puno-Perú.

JULIO, M.; RODRIGUEZ, E.; 2011. “Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial extraído de la candía (*Hibiscus esculentus*) aplicada a la conservación de hamburguesa de res” Universidad de Cartagena. Facultad de Ingeniería de Alimentos. Cartagena de Indias.

- GUIGNARD, J. L.; COSSON, L.; HENRY, M. 1985 "Abrege de Phytochimie", Masson, Paris-New York-Barcelona.
- HERRERO Y ROMERO. 2006 "Innovaciones en el procesado de alimentos": Tecnologías no térmicas. Revista Médica de Navarra. Vol. 50, España.
- HIRASA K.; TAKEMASA M. 2002 "Ciencia y Tecnología de las Especies" Editorial Zaragoza-España.
- IBAÑEZ, V. 2009 "Análisis y Diseño de Experimentos" 1ra Edición Ciudad Universitaria UNA Puno-Perú.
- ICMSF, 2006. "Microorganisms in Foods - Microbial Ecology of Food Commodities". Vol. 6, Blackie Academic & Professional, London.
- JAY J. M. 2005. "Modern Food Microbiology". 7ª ed, Springer, New York, p 63.
- KHANJARI, A.; KARABAGIAS, IK.; KONTOMINAS, MG.; 2013 "Efecto combinado de N, O-Carboximetil quitosano y aceite esencial de orégano para extender la vida útil y el control de *Listeria monocytogenes* en filetes de carne de pollo cruda" Artículo científico. Departamento de higiene de los alimentos. Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Teherán, Irán.
- <http://ezproxy.concytec.gob.pe:2063/science/article/pii/S0023643813000686>
- LARRAÑAGA, J.; CARBELLO. J.; RODRÍGUEZ, M., 2010. "Control de Higiene de los Alimentos". Madrid-España.
- LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S.; EAGLESHAM, E.; 2014. "Relación entre bioactividad y composición química de los aceites esenciales"

- LUNA, G.; AGUILAR, S.; 2011. "Conservación de los Alimentos y Predicción de su Vida Útil" 1ra Edición Biblioteca Nacional del Perú Puno-Perú.
- MARTÍNEZ, M. 2001. "Aceites Esenciales". Facultad Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia. Medellín.
- MOSSEL, DAA. 2003. "Microbiología de los Alimentos". 2ª edición, Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- MULLER, G. 1981. "Microbiología de los Alimentos Vegetales", 3ra edición, Zaragoza-España.
- MUKHOPADHYAY R.; BANERJEE AB.; MIRO M. 2003. "Actividad Antimicrobiana de *Cuminum cyminum L.*" Departamento de Farmacología, Universidad de Granada, Granada España.
(<http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/266.pdf>).
- NASSU, R.T. 2001. Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. Meat Science Journal, 63: 43-49.
- NISHIMOTO, J.; SUWETJA, I.K. AND MIKI, H. 1985. "Estimation of keeping freshness period and practical storage life of mackerel (*Scomber japonicus*) muscle during storage at low temperature". In Memoirs of Faculty of Fisheries, Kagoshima University, Japan.
- NUÑEZ C. Y CHUMBIRAY M. 1991 Determinación de Vida en Anaquel de Productos Alimenticios procesados mediante pruebas aceleradas. Universidad de Lima.
- REA V. 2011. "Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) como Potencial Bioconservador en la Trucha". Tesis de Grado Facultad de Ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia-ESP-Chimborazo-Ecuador.

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1622/1/56T00293.pdf>

SÁNCHEZ, F.J. 2006. “Extracción de Aceites Esenciales”-Experiencia Colombiana.

En: II Segundo Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas.

Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Palmira-Colombia.

SOLIS, P. 2011. “Evaluación de la Actividad Microbiana de los Aceites Esenciales de

Orégano (*Origanum vulgare L.*) Y Tomillo (*Thymus vulgaris L.*) Como Potenciales

Bioconservadores en Carne de Pollo”. Tesis de Grado Facultad de Ciencias Escuela

de Bioquímica y Farmacia Riobamba-Ecuador.

WARRIS, P. D. 2003. Ciencia de la Carne. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza. España.

WENTWORTH BB, BASELKIVS, DOERN GV 1987. “Diagnostic procedures for bacterial infections” 7th Ed. 1987. Washington, D.C. AM Pub Health Ass.

<http://www.bioacter.com/INSERTOS/AGAR%20NUTRITIVO%20%20pg%201.pdf>

YOUSEF A.; CARLSTROM C. 2006 “Microbiología de los Alimentos” Editorial

Zaragoza-España.

ANEXOS

ANEXO 1

PANEL FOTOGRÁFICO DEL AISLAMIENTO DE *Escherichia coli*.



Aislamiento de *E. coli*

Observación en microscopio.

E. coli en agar EMB.

Confirmación de *E. coli*

Tinción gram de *E.coli*.

Cepas de *E. coli* conservadas.

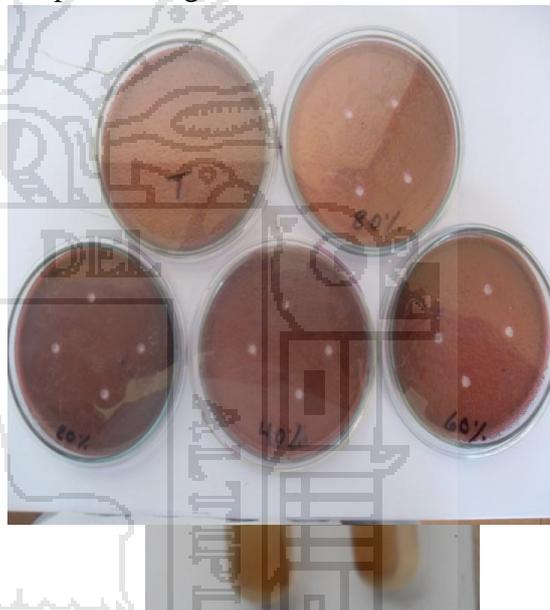
ANEXO 2

PANEL FOTOGRÁFICO DE LA INHIBICION DE *E. coli* REALIZADAS EN LAS PLACAS.

Inoculación de aceite esencial en la placa.



Reposo del agar con diferentes %



Halo de inhibición del aceite esencial de comino en la placa.



Determinación de la distancia de halo de inhibición (mm).

ANEXO 3

PANEL FOTOGRÁFICO DEL TRATAMIENTO CON ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*Cuminum cyminum*), DE LA CARNE DE RES.

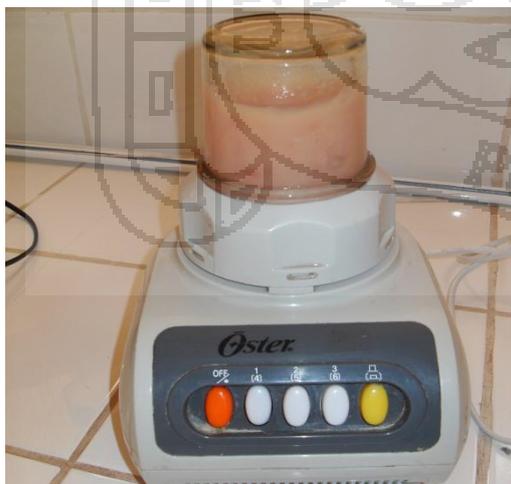


Muestras de carne con aceite esencial de comino.



Pesado de la carne de res.

Licuada de la carne de res.



Muestras licuadas de la carne de res.



ANEXO 4**PANEL FOTOGRÁFICO DE PRUEBAS DE pH**

Muestra para el análisis de pH.



Análisis de pH de la muestra.



ANEXO 5

PANEL FOTOGRÁFICO DE LAS PRUEBAS DE TBARS.



Pesado de la muestra a analizar.



Medición del CHL 4N.



Preparación de muestra.



Destilación de la muestra.



Observación en espectrofotometría de la muestra destilada.

Espectrofotometría.

ANEXO 6

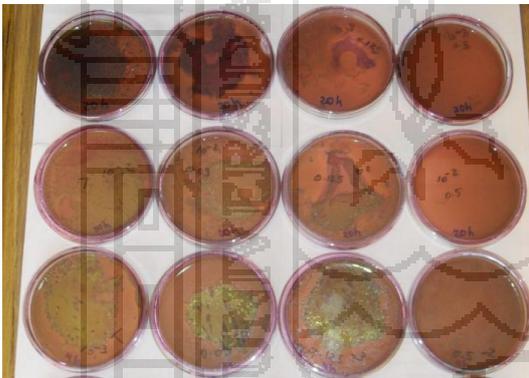
PANEL FOTOGRÁFICO DE LAS PRUEBAS de *Escherichia coli* VIABLE



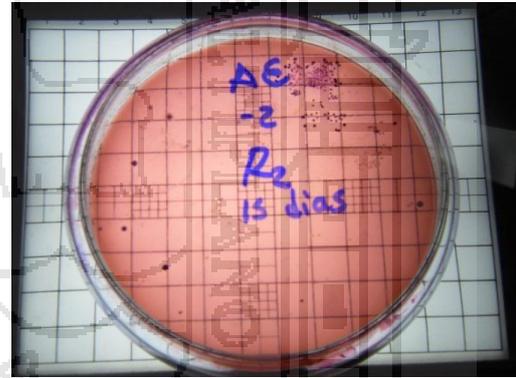
Plaqueo de inóculo en agar.



Incubación de placas.



Conteo de ufc placas.



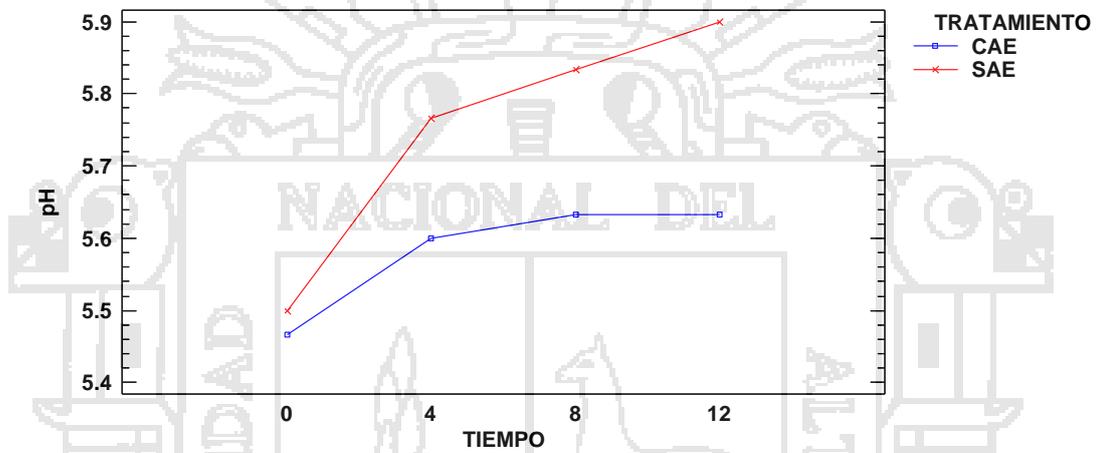
Conteo de placas en cuenta colonias.

ANEXO 7

FIGURAS DE PRUEBAS QUIMICAS

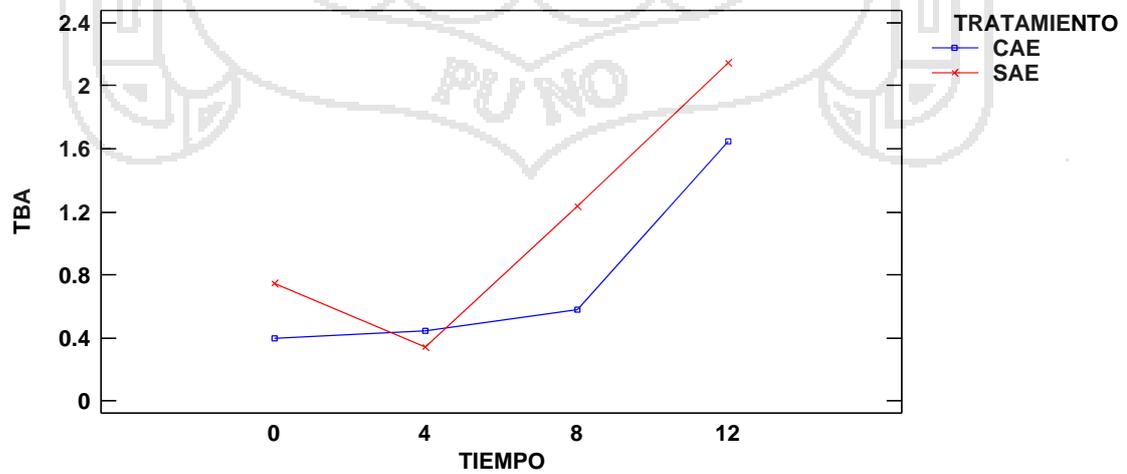
pH – TIEMPO (días)

Gráfico de Interacciones



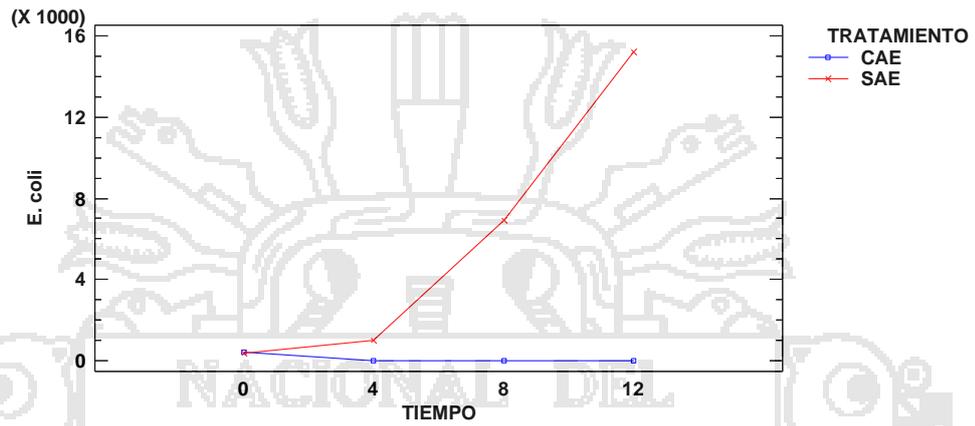
TBARS – TIEMPO (días)

Gráfico de Interacciones



Escherichia coli VIABLES – TIEMPO (Días)

Gráfico de Interacciones



ANEXO 8**RESULTADO DE LA EVALUACION DEL PH**

MUESTRA TIEMPO (Días)	TRATAMIENTO							
	MUESTRA CON AE				MUESTRA SIN AE			
	0	4	8	12	0	4	8	12
R1	5.5	5.5	5.6	5.4	5.5	5.7	6	5.9
R2	5.4	5.7	5.6	5.7	5.6	5.8	5.8	5.8
R3	5.5	5.6	5.7	5.8	5.4	5.8	5.7	6
PROMEDIO	5.467	5.600	5.633	5.633	5.500	5.767	5.833	5.900

Ri : Repetición

AE: Aceite esencial.



ANEXO 9

RESULTADOS DE LA EVALUACION DEL ACIDO 2 – TIOBARBITURICO

MUESTRA	TRATAMIENTO								
	TIEMPO (Días)	MUESTRA CON AE				MUESTRA SIN AE			
		0	4	8	12	0	4	8	12
R1	0.5304	0.4680	0.5932	2.25	0.6006	0.4290	1.1154	2.5190	
R2	0.3120	0.4446	0.6572	1.7082	0.8814	0.2730	1.6536	1.3416	
R3	0.3510	0.4290	0.4954	0.9672	0.7644	0.3432	0.9438	2.5678	
PROMEDIO	0.3978	0.4472	0.5819	1.6406	0.7488	0.3484	1.2376	2.1428	

Ri: Repetición

mg MDA/kg: mg de malonaldehído/kg

AE: Aceite esencial.



ANEXO 10

RESULTADO DE LA EVALUACION DE *Escherichia coli* VIABLE DURANTE EL ALMACENAMIENTO.

MUESTRA	TRATAMIENTO								
	TIEMPO (Días)	MUESTRA CON AE				MUESTRA SIN AE			
		0	4	8	12	0	4	8	12
R1	21x10 ¹	0	1	1	45x10 ¹	67x10 ¹	82x10 ²	11x10 ³	
R2	53x10 ¹	42	0	7	56x10 ¹	89x10 ¹	13x10 ³	12x10 ³	
R3	54x10 ¹	0	0	0	23x10 ¹	15x10 ²	12x10 ²	21x10 ³	
PROMEDIO	43x10 ¹	14	0	3	41x10 ¹	10x10 ²	69x10 ²	15x10 ³	

Ri: Repetición

ufc/g: Unidades formadoras de colonias por gramo

AE: Aceite esencial.

