



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE GIRÓN  
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**Evaluación de la eficacia antibacteriana del aceite esencial de comino (*Cuminum cuminum*) frente a *Escherichia coli* en la elaboración de embutidos frescos de cerdo**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:  
Ingenieras en Biotecnología**

**AUTOR:** Liseth Estefanía Carmona Guachamín

Eliana Lízbeth Alvarado Martínez

**TUTOR:** Kenny Jesús Lugo Ávila

**Quito-Ecuador**

**2023**

## CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Liseth Estefanía Carmona Guachamín con documento de identificación N° 1721153474 y Eliana Lízbeth Alvarado Martínez con documento de identificación N° 1726344805; manifestamos que:

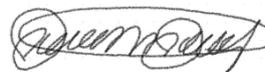
Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 04 de Agosto del año 2023

Atentamente,



-----  
Liseth Estefanía Carmona Guachamín  
1721153474



-----  
Eliana Lízbeth Alvarado Martínez  
1726344805

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Liseth Estefanía Carmona Guachamín con documento de identificación No. 1721153474 y Eliana Lízbeth Alvarado Martínez con documento de identificación No. 1726344805, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Evaluación de la eficacia antibacteriana del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) frente a *Escherichia coli* en la elaboración de embutidos frescos de cerdo” el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

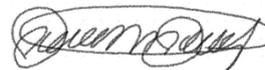
En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 04 de Agosto del año 2023

Atentamente,



-----  
Liseth Estefanía Carmona Guachamín  
1721153474



-----  
Eliana Lízbeth Alvarado Martínez  
1726344805

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Kenny Jesús Lugo Ávila con documento de identificación N° 1757287543, docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE COMINO (*CUMINUM CYMINUM*) FRENTE A *ESCHERICHIA COLI* EN LA ELABORACIÓN DE EMBUTIDOS FRESCOS DE CERDO, realizado por LISETH ESTEFANÍA CARMONA GUACHAMÍN con documento de identificación N° 1721153474 y por ELIANA LÍZBETH ALVARADO MARTÍNEZ con documento de identificación N° 1726344805, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 04 de Agosto del año 2023

Atentamente,



---

Lic. Kenny Jesús Lugo Ávila Mgtr.  
1757287543

## Dedicatoria y agradecimiento

Dedico este trabajo primeramente a Dios por permitirme haber llegado a este momento importante de mi formación profesional, por darme la fortaleza y sabiduría necesaria todos estos años de carrera. A mis padres, Luis Carmona y Teresa Guachamin, por creer en mí, ser un ejemplo de cariño y perseverancia, por apoyarme en cada momento, por su amor y sacrificio durante estos años. A mis abuelitos Manuel Guachamin y Aida Erazo, que con sus valores y enseñanzas fueron una parte fundamental en este largo camino, gracias por su apoyo incondicional. A todos mis tíos y a toda mi familia por darme su mano en todo momento, por esas palabras de aliento y sobre todo por ese cariño tan grande que me impulsaba a culminar mi carrera.

**Liseth Carmona**

Quiero dedicar este trabajo experimental primero a Dios por otorgarme fuerza y valentía durante este larga y hermoso ciclo de mi vida, a mi padre Hugo Alvarado por brindarme consejos valiosos que me mostraron que el camino hacia la superación y la perseverancia son pilares para una evolución demostrándome que los errores son baches para enfrentarlos de manera directa, a mi madre Mercy Martínez por otorgarme su bendición y apoyo incondicional y siempre sentirme segura ante cualquier peligro, a mi hermana Josselyn por enseñarme que la fortaleza y el compromiso constante serán otorgados con éxito al término de una etapa, a mi pequeña sobrina Karive por su cariño, amistad y grandes sonrisas. A todo el resto de mi familia y amigos que de una u otra manera me han permitido aprender de la vida a su lado. Esto es posible gracias a ustedes.

**Eliana Alvarado**

## Resumen

En los últimos años, el uso de aceites esenciales (AE) en la conservación de alimentos ha ido en aumento, y la investigación se ha centrado en sus propiedades antimicrobianas, especialmente el AE de comino, así como las moléculas terpénicas las cuales brindan una actividad antimicrobiana. La presente investigación tuvo la finalidad de evaluar la eficacia antimicrobiana del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) frente a *Escherichia coli* en embutidos frescos de cerdo. Este trabajo experimental buscó extraer el aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor, para la formulación de la concentración adecuada de aceite esencial se utilizó el método de difusión en agar estableciendo las concentraciones de 5%; 2,5%; 1,25%; 0,6% y 0,3%, una vez obtenido el porcentaje de inhibición se realizó el ensayo de toxicidad frente a *Artemia salina* para comprobar su DL<sub>50</sub> de igual forma para establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se utilizó el método de dilución en caldo a partir de las mismas concentraciones ya mencionadas, para determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial en el embutido se realizó una mezcla de Aceite Esencial (AE) con la carne del embutido mediante las cuales fueron evaluadas con pruebas rápidas Petrifilm. Los resultados presentaron un mayor efecto inhibitorio al 5%, con un diámetro de halo de inhibición de 16mm, mientras que para la CMI se obtuvo un porcentaje de 1,25%, con respecto al DL<sub>50</sub> se obtuvo un rango óptimo entre 0,6% y 0,3%, con relación al recuento de *Escherichia coli* viable en el embutido se redujo notablemente en la concentración 1,25%. Concluyendo que el aceite esencial de comino si presenta una actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, pero su uso no es recomendable como aditivo alimentario debido a que su aceite esencial presenta una alta toxicidad.

Palabras clave: Aditivos alimentarios, antimicrobiano, CMI, conservante, toxicidad

## **Abstract**

In recent years, the use of essential oils (EOs) in food preservation has been increasing, and research has focused on their antimicrobial properties, especially cumin EO, as well as terpene molecules which provide antimicrobial activity. The purpose of this investigation was to evaluate the antimicrobial efficacy of cumin essential oil (*Cuminum cyminum*) against *Escherichia coli* in fresh pork sausages. This experimental work sought to extract the essential oil of cumin (*Cuminum cyminum*) by means of the steam distillation technique, for the formulation of the adequate concentration of essential oil, the agar diffusion method was used, establishing the concentrations of 5%; 2.5%; 1.25%; 0.6% and 0.3%, once the inhibition percentage was obtained, the toxicity test against *Artemia salina* was carried out to verify its LD<sub>50</sub>. In the same way, to establish the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the broth dilution method was used from the same concentrations already mentioned, to determine the antimicrobial activity of the essential oil in the sausage, a mixture of Essential Oil (EA) was made with the meat of the sausage by means of which they were evaluated with Petrifilm rapid tests. The results presented a greater inhibitory effect at 5%, with a 16mm inhibition halo diameter, while for the MIC a percentage of 1.25% was obtained, with respect to the LD<sub>50</sub> an optimal range between 0.6% and 0.3% was obtained, in relation to the count of viable *Escherichia coli* in the sausage it was significantly reduced in the 1.25% concentration.

Concluding that cumin essential oil does have antibacterial activity against *Escherichia coli*, but its use is not recommended as a food additive because its essential oil has high toxicity.

Key words: Food additives, antimicrobial, MIC, preservative, toxicity.

# Índice de Contenido

## Contenido

<b>1</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Fundamentación Teórica .....</b>	<b>5</b>
2.1	Embutidos .....	5
2.1.1	Definición.....	5
2.1.2	Clasificación de los embutidos.....	5
2.2	Aditivos alimentarios.....	5
2.2.1	Definición.....	5
2.2.2	Aditivos químicos.....	6
2.2.3	Aditivos naturales .....	7
2.3	Parámetros microbiológicos de la carne para embutidos.....	7
2.3.1	Enfermedades transmitidas por el consumo de carne en embutidos.....	8
2.4	Bacteria de interés en inocuidad para embutidos. ....	9
2.4.1	<i>Escherichia coli</i> .....	9
2.5	Aceites esenciales.....	11
2.5.1	Composición química de los aceites esenciales .....	11
2.5.2	Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales .....	11
2.6	Comino .....	12
2.6.1	Taxonomía del Comino .....	12
2.6.2	Descripción Botánica del comino.....	12
2.6.3	Composición química de la semilla del comino .....	13
2.6.4	Toxicidad del comino .....	13
2.6.5	Aceite esencial de comino .....	13
<b>3</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>16</b>
3.1	Trabajo de campo.....	16
3.2	Diseño Experimental .....	16
3.3	Análisis Estadístico .....	17
3.4	Población y Muestra .....	17
3.4.1	Población .....	17
3.4.2	Muestra .....	18
3.5	Variables.....	18
3.5.1	Variable Independiente .....	18
3.5.2	Variable Dependiente .....	18
3.6	Procedimiento de Laboratorio.....	18
3.6.1	Obtención del aceite esencial de comino .....	18

3.6.2	Propiedades físicas del aceite esencial de comino.....	24
3.6.3	Activación de la cepa bacteriana de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	26
3.6.4	Determinación de la actividad del aceite esencial de comino mediante el método de Kirby-Bauer.....	26
3.6.5	Determinación de la CMI del aceite esencial de comino mediante el método de dilución en caldo .....	28
3.7	Ensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i> .....	29
3.8	Elaboración del embutido.....	31
3.8.1	Análisis microbiológico del embutido fresco de cerdo .....	35
3.9	Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino en el embutido fresco de cerdo.....	36
3.9.1	Activación de la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y preparación de escala McFarland .....	36
3.9.2	Inoculación de <i>Escherichia coli</i> en el embutido .....	36
3.10	Evaluación de las características organolépticas del embutido .....	37
<b>4</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>39</b>
4.1	Extracción del aceite esencial de comino .....	39
4.2	Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino por el método de difusión de agar.....	40
4.3	Determinación de la CMI del aceite esencial de comino por el método de micro dilución en caldo .....	42
4.3.1	Prueba cualitativa adicional de la CMI del aceite esencial de comino .....	44
4.4	Ensayo de toxicidad .....	45
4.4.1	Ensayo del control positivo y negativo.....	46
4.4.2	Dosis letal 50 con aceite esencial de comino .....	46
4.5	Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino y las sales nitrates en el embutido .....	47
4.5.1	Análisis estadístico del análisis microbiológico .....	48
<b>5</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>52</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>62</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 Descripción botánica.....	12
Figura 2 Obtención de la semilla de comino.....	19
Figura 3 Pesaje de la semilla .....	20
Figura 4 Adición de núcleos de ebullición y la semilla en el matraz de fondo redondo.....	20
Figura 5 Semillas de comino sumergidas en agua .....	21
Figura 6 Equipos de destilación.....	21
Figura 7 Extracción de aceite .....	22
Figura 8 Diagrama de flujo de la extracción del aceite esencial de comino por arrastre de vapor .....	23
Figura 9 Modelo del diseño del antibiograma con las diferentes concentraciones del aceite de comino .....	28
Figura 10 Diagrama de flujo de la elaboración del embutido fresco de cerdo .....	31
Figura 11 Materia prima.....	32
Figura 12 Carne y grasa de cerdo cortada en cubos.....	32
Figura 13 Pesaje de la carne y grasa de cerdo.....	33
Figura 14 Troceado de la carne y grasa .....	34
Figura 15 Mezclado de los aditivos y la carne molida .....	34
Figura 16 Producto final.....	35
Figura 17 Diagrama de flujo experimental de las características organolépticas .....	37
Figura 18 Medición de halos de inhibición.....	40
Figura 20 Porcentaje de inhibición del AEC .....	44
Figura 21 Microplaca con TTC luego de 2 horas de incubación.....	45
Figura 22 Diagrama de barras de los tratamientos.....	49
Figura 23 Diagrama de barras de los tratamientos .....	51

## Índice de tablas

Tabla 1 Taxonomía del Comino .....	12
Tabla 2 Tratamientos Experimentales .....	16
Tabla 3 Escala utilizada para la evaluación sensorial del embutido fresco de cerdo.....	38
Tabla 4 Condiciones de la extracción del aceite esencial de comino .....	39
Tabla 5 Diámetro de los halos de inhibición en mm conseguidos por el aceite esencial de comino .....	41
Tabla 6 Determinación de la CMI del aceite esencial de comino. ....	43
Tabla 7 Ensayo del control positivo de toxicidad con etanol al 70% .....	46
Tabla 8 Ensayo del control negativo de toxicidad con agua salina .....	46
Tabla 9 $DL_{50}$ con aceite esencial de comino a las distintas concentraciones.....	46
Tabla 10 Análisis microbiológico en embutido fresco de cerdo .....	47
Tabla 11 Análisis de varianza entre AEC-Sn y Testigo .....	48
Tabla 12 Análisis de varianza entre el AEC-Sn.....	50

## Índice de ecuaciones

Ecuación 1 Fórmula para la densidad .....	24
Ecuación 2 Fórmula para determinar el rendimiento del aceite esencial.....	25
Ecuación 3 Fórmula para calcular la humedad en semilla .....	25
Ecuación 4 Fórmula para determinar la CMI.....	43

## Índice de Anexos

Anexo 1 Pruebas Petrifilm aceite esencial.....	62
Anexo 2 Pruebas Petrifilm sales nitrales .....	63
Anexo 3 Ensayo de toxicidad .....	64
Anexo 4 Activación de la cepa bacteriana.....	65
Anexo 5 Determinación de la humedad.....	65
Anexo 6 Determinación del rendimiento del aceite esencial .....	66

## 1 Introducción

Se conoce como embutido a la carne procesada o condimentada con diversas hierbas y especias introducidas en tripas naturales de origen animal, cuyo inicio se da en los tiempos más remotos de la humanidad, razón por la cual se buscó la forma de conservar los alimentos a base de sal desde el año 2600 A.C. Es por ello, que el ser humano ha buscado aumentar la duración de vida en los alimentos con el propósito de conservarlos para su consumo (Sugawara & Nikaido, 2014).

El desarrollo del proceso de conservación de alimentos comenzó a partir de la necesidad de alargar la vida útil de los mismos y se ha basado en una lucha insistente contra los microorganismos que los destruyen, por lo cual su consumo será inseguro, siendo una preocupación en la industria alimentaria y en las agencias gubernamentales (Cevallos & Londoño, 2018).

Los embutidos son consumidos en muchas partes del mundo y dado que son elaborados principalmente con proteína cárnica porcina pueden representar riesgos en la salud pública por su origen (López & Rojas, 2021). Si bien es cierto que la carne es importante para la alimentación del hombre también se puede decir que es uno de los alimentos más perecederos si no se aplica buena higiene y sanitización durante su manipulación llegará a contaminarse, siendo portadora de microorganismos patógenos, causando daños en la salud del consumidor (Suarez, 2015).

Según Yalta, (2019) en los países industrializados, el mercadeo de carne de cerdo tiene una eminente carga de microorganismo con propiedades patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*, esto se debe a que no existen controles sanitarios estrictos en su proceso de fabricación en carne cruda y cocida; con

lo antes mencionado, es conveniente considerar la existencia de microorganismos que son patógenos en gran medida, ya que estos últimos son los que predominan en enfermedades de transmisión alimenticia (ETA) y la aparición de graves infecciones. Para el año 2019, en Ecuador se reportó doce mil doscientos tres casos por intoxicaciones alimentarias bacterianas debido al consumo de alimentos cuya manipulación, cocción o conservación no es la adecuada (Publica, 2021). Así como también en la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportan que, uno de diez individuos se enferma y 420 mil personas mueren cada año como resultado de ingerir alimentos contaminados.

Por consiguiente, se conoce que, para productos cárnicos crudos y procesados, hay algunos parámetros microbiológicos que tienen un cierto rango de valores máximos permitidos para identificar su nivel de calidad, según la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN) nos menciona que para Aerobios mesófilos ( $1,0 \times 10^7$  ufc/g), *Escherichia coli* ( $1,0 \times 10^3$  ufc/g) *Staphylococcus aureus* ( $1,0 \times 10^4$  ufc/g) y *Salmonella* (ausencia/ 25 g).

Por ende, a nivel industrial, los productos derivados cárnicos requieren por necesidad y exigencia de los consumidores el uso de aditivos químicos conformados por nitratos y nitritos, siendo estos un ingrediente primordial en el proceso de preservación, así como también a las características organolépticas del producto. De acuerdo con Briones & Velásquez (2020) estos conservantes mencionados al ingerirlos podrían provocar alteraciones de la salud al consumidor, por lo tanto, en la actualidad se ha investigado alternativas naturales para reemplazar nitratos y nitritos, una de las opciones más favorables es utilizar aceites esenciales que ayuden como antimicrobianos en productos cárnicos.

Los aceites esenciales se han utilizado desde la antigüedad como parte de las prácticas tradicionales para controlar una variedad de plagas agrícolas debido a su potencial insecticida. Tassou et al., (2000) menciona que la actividad antimicrobiana de plantas se le atribuye a los

compuestos orgánicos que contienen en sus aceites esenciales, también se le adjudica que la adiposidad, proteína, acumulación salina, pH y temperatura afecta la acción contra microorganismos, sin embargo, su uso como antibacteriana y antioxidante es una tendencia nueva y creciente, que refleja el interés en el “consumismo verde” y la extensión de la vida útil de los productos alimenticios.

En un estudio realizado por Huq et al. (2015), alude que los aceites esenciales son más eficaces en bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, esto puede deberse a la estructura de la pared celular, la composición de la membrana externa y su interacción con los aceites esenciales de naturaleza lipofílica; además los AE han demostrado tener una capacidad antibacteriana para evitar la proliferación frente a microorganismos, según lo mencionado por Rea (2012), entre estos productos naturales se destaca el aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*), el cual, se ha considerado un agente efectivo por su actividad antimicrobiana y antioxidante que se le asigna 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.

Por consiguiente, el presente trabajo de investigación se enfoca en la evaluación del aceite esencial de comino como un tratamiento alternativo con actividad antimicrobiana; con esta propuesta se intenta disminuir los efectos nocivos que producen los conservantes químicos en el ser humano al consumir embutidos, brindándole más seguridad al consumidor. Además, se planteó extraer el aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor; formular la concentración adecuada de aceite esencial a utilizarse como antimicrobiano en el embutido porcino; elaborar un embutido fresco a base de carne de cerdo según la Norma INEN AOAC 991.16; identificar la actividad antimicrobiana y las características organolépticas del aceite esencial de comino sobre *Escherichia coli* en el embutido artesanal de cerdo.

Lo descrito anteriormente nos lleva a realizar la siguiente pregunta: ¿Existen propiedades antimicrobianas frente a *Escherichia coli* en el aceite esencial de comino que alcancen los efectos similares a los aditivos químicos en la elaboración de embutidos frescos de cerdo?

La hipótesis de este trabajo experimental se enmarcó en si el aceite esencial de comino es un antimicrobiano eficaz frente a *Escherichia coli* en la elaboración de embutidos frescos.

## **2 Fundamentación Teórica**

### **2.1 Embutidos**

#### **2.1.1 Definición**

De acuerdo con Jimenez & Carballo (2015) se entiende por embutidos aquellos productos y derivados cárnicos preparados a partir de una mezcla de carne picada, grasas, sal, condimentos, especias y aditivos e introducidos en tripas naturales o artificiales. Para Córdova & Velásquez(2020) el método de curación ha permitido que estos productos sean de fácil conservación durante largos periodos de tiempo.

#### **2.1.2 Clasificación de los embutidos**

Según Alvarado (2020) los embutidos se pueden clasificar de acuerdo a cada región, entre esos se describen los siguientes:

- **Frescos:** Elaborados en crudo, sin curado o maduración. En estos se puede encontrar a la chistorra (longaniza) esta se airea tres días y también el chorizo que puede ser curado o fresco.
- **Secos:** Elaborados y posteriormente cocidos, curados, fermentados y ahumados.
- **Fiambres:** Forman una pasta homogénea, que no se pueden distinguir las diferentes partes de las carnes e ingredientes que los componen
- **Crudos:** Su fundamentación es adobar la carne en especias o pimentón, se debe secar en aire seco y frío hasta que llega a una consistencia dura, como las longanizas, el chorizo, el lomo, el beicon (tocino), el jamón serrano (Sugawara & Nikaido, 2014).

### **2.2 Aditivos alimentarios**

#### **2.2.1 Definición**

Se consideran sustancias o productos biotecnológicos naturales, semisintéticos o sintéticos y sensoriales que “no se consumen normalmente como un alimento en sí, ni se emplean como

ingredientes característicos de un alimento, ya sea que posean o no un valor nutritivo” (Diario Oficial de la Unión Europea, 2008).

Están presentes en pequeñas cantidades (mg/kg o 1 % en peso del producto final considerando esta la concentración máxima) y se usan de forma directa o indirectamente durante el procesamiento o almacenamiento de alimentos para producir productos de expectativas de grado alimentario deseables para el consumo humano (Cofre, 2022).

### **2.2.2 Aditivos químicos**

Según Piñeiros & Delgado (2015), consideran que es “cualquier material que pueda convertirse en un agregado de dicho alimento y de modo que no afecte a sus características originales”, incluyendo cualquier producto utilizado para procesamiento, embalaje, transporte o almacenamiento de alimentos que ayude a mejorar sus cualidades físicas, sabores, protección, entre otros. Su función principal es proteger la salud de la población, de igual forma estas sustancias deben registrar parámetros estrictos de calidad de modo que puedan ser aprobadas por las autoridades sanitarias para su posterior consumo.

Los aditivos químicos más utilizados en la conservación de productos cárnicos son las sales de nitritos, para Alvarado (2020), son esenciales dado que contribuyen al desarrollo del aroma de la carne curada, de igual forma presentan un efecto antioxidante que este ayuda a retrasar el progreso de la rancidez, por lo tanto, reprimen la aparición de alteraciones de las particularidades sensoriales.

Según Córdova & Velásquez (2020), las sales de nitritos suelen ser la base de todas las carnes curadas, cumplen con la función de ácido nitroso no disociado, actúan como poderosos combatientes contra todos aquellos organismos que causan alteraciones, infecciones o intoxicaciones cárnicas.

### **2.2.3 Aditivos naturales**

Para Duran, (2001) define que estos se extraen a partir de fuentes vegetales, animales y microbianas que son aptas para el consumo humano, de igual forma que se use como ingrediente característico en la alimentación, independientemente de que tenga o no valor nutritivo.

La Unión Europea dispone de una lista de conservantes naturales permitidos para su uso en alimentos, en los cuales se encuentran los espesantes, gelificantes y estabilizadores entre los que se pueden incorporar aditivos de origen natural.

### **2.3 Parámetros microbiológicos de la carne para embutidos.**

Según la Norma ecuatoriana INEN 1338:2012 (2012), “Un producto cárnico procesado, está elaborado a base de carne, grasa, vísceras u otros subproductos de origen animal comestibles, con adición o no de sustancias permitidas, especies o ambas, sometido a métodos tecnológicos adecuados”.

La calidad en los embutidos es un tema de interés en la industria alimenticia, dado que presentan propiedades que las consideran un excelente medio para el desarrollo de microorganismos, encontramos que es una matriz alimentaria compuesta por carbohidratos solubles como el glucógeno, ácido láctico, aminoácidos y proteínas, estos pueden ser utilizados por bacterias como fuente de energía favorable para su metabolismo y reproducción.

Según Izquierdo et al. (1997), el embutido no es una materia prima estéril, los condimentos y las especias pueden contener microorganismos, que no mueren en el proceso de escaldado, ocasionando una aceleración en el deterioro de los productos finales. De acuerdo a la norma INEN 1344:96 (1996), los requisitos específicos de los aditivos empleados para la conservación de embutidos son los siguientes: ácido ascórbico e isoascórbico y sus sales sódicas, su máximo

admitido es 500 mg/kg, mientras que para los nitratos de sodio y/o potasio lo permitido es de 125 mg/kg, para los polifosfatos ( $P_2O_5$ ) es de 3000 mg/kg.

Para Tinoco (2018), existen otros tipos de productos cárnicos elaborados de manera artesanal como longaniza, chorizo, morcilla, salchicha que no presentan los mismos procesos tecnológicos e industriales, por otra parte, no contienen conservantes generando la necesidad que el producto requiera de refrigeración también al no tener una buena manipulación y asepsia de la materia prima, proceso, transporte y equipos; va a existir la presencia de microorganismos como Aerobios mesófilos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* causando enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) y en casos extremos hasta la muerte (Melendrez, 2021).

También hay algunos factores extrínsecos que afectan a la población microbiana, tales como procesos especializados aplicados para la elaboración de los diferentes productos cárnicos, empleo de tratamientos térmicos, procesos de empaquetado (empaque al vacío, atmósfera controlada o modificada), además de las condiciones de almacenamiento (refrigeración o congelación) y distribución del producto. Para algunos autores el sacrificar animales que presenten niveles de estrés altos y que estén cansados podría favorecer a que su pH se vuelva ácido y por ende la carne no se podría consumir.

### **2.3.1 Enfermedades transmitidas por el consumo de carne en embutidos.**

Por su composición y características físico-químicas, la carne y sus derivados pueden ser invadidos por numerosos tipos de microorganismos y parásitos, cuyas particularidades son importantes para evitar el deterioro de los productos y evitar riesgos involucrados en brotes o casos de ETA (Enfermedades de transmisión alimentaria).

La microflora de los productos cárnicos incluye géneros de microorganismos deteriorativos proteolíticos (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, entre otros) que producen

cambios de color, textura, sabor y olor no deseados en los productos; y los patógenos (*Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, esta última es capaz de producir enteritis hemorrágica, que puede complicarse con el síndrome hemolítico urémico (Margall et al., 1997).

## **2.4 Bacteria de interés en inocuidad para embutidos.**

### **2.4.1 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa móvil y fermentadora de lactosa que fue definida por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich después de un brote de gastroenteritis infantil. En la actualidad, se han encontrado diversas cepas patógenas de *Escherichia coli* promotores de cuadros diarreicos peligrosos, lo que ha vuelto a esta bacteria en una complicación de salud pública a nivel mundial (Gomes et al., 2016).

Según Larrondo (2010), *Escherichia coli* se puede dividir en tres grupos: comensales, patógenas extraintestinales y patógenas intestinales entéricas o diarreogénicas. Las cepas de comensales son parte de la flora intestinal de los individuos sanos y han establecido esta relación de ayuda mutua. Por otro lado, la extraintestinal tiene un factor de virulencia que causan infecciones, neumonía, septicemia y meningitis neonatal. Las enteropatógenas son raras en la flora fecal y provocan gastroenteritis cuando se ingieren en cantidades suficientes.

### **Enfermedades de transmisión alimentaria asociada a *Escherichia coli***

En los últimos años, han aumentado brotes relacionada con *Escherichia coli*, lo que significa que tiene un impacto en los sistemas de salud y la producción agrícola. La fuente más común de ETA incluye productos lácteos, carne hecha con un tratamiento térmico insuficiente. Los malos hábitos de higiene y el almacenamiento deficiente también pueden afectar la presentación de los casos (FAO, 2016).

Las cepas de *Escherichia coli* originan algunos tipos de enfermedades según sus tipologías patogénicas. Por ejemplo, *Escherichia coli* shigatoxigénica provoca diarrea con sangre, cerca del 10% de los afectados por esta cepa entre ellos niños y adultos 28 mayores, la enfermedad se puede desarrollar hasta el síndrome urémico hemolítico. *Escherichia coli* enterohemorrágica igualmente se asocia a diarreas con sangre y síndrome urémico hemolítico por la producción de toxinas como verotoxinas y shigatoxinas. En la salud pública, el serotipo más importante es *Escherichia coli* O157:H7, el mismo que está atado a una alta incidencia de contagios y decesos cada año (Salazar, 2016).

### **Otras bacterias relacionadas con enfermedades de transmisión alimentaria**

Para Soto et al.(2016), los principales patógenos etiológicos descritos en brotes de ETA fueron *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*.; bacterias determinadas en la normativa nacional para los diferentes tipos de alimentos; no obstante, se demostró la presencia de otras bacterias, como *Listeria monocytogenes* en varios alimentos.

En la actualidad la *Salmonella entérica* tiene un gran impacto en la salud pública, de acuerdo a datos epidemiológicos este serotipo es responsable de enfermedades como gastroenteritis de origen alimentario y fiebre tifoidea, los alimentos en los que se encuentran presentes son la carne de pollo, cerdo, pavo y productos crudos; otra bacteria asociada a ETA es *Listeria monocytogenes* es el agente causal de la listeriosis, el cual produce síntomas como fiebre, dolor de cabeza y diarrea, este patógeno se encuentra principalmente en alimentos como leche, queso, verduras frescas y productos cárnico (Mercado et al., 2012); también se puede mencionar a *Staphylococcus aureus* la cual es una bacteria causante de gastroenteritis que se manifiesta por náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal debido al consumo de alimentos crudos (Márquez, 2012).

## **2.5 Aceites esenciales**

Un aceite esencial es un líquido aromático de aspecto fluido o espeso y de color variable según las plantas de las que esté extraído (Luengo, 2004).

Para Martínez (2001), los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre de vapor, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes).

Los aceites esenciales son generalmente líquidos a temperatura ambiente. Su principal diferencia con respecto a los aceites fijos (lípidos) reside en su volatilidad o capacidad de evaporación al contacto con el aire a temperatura ambiente (Mestanza, 2017).

### **2.5.1 Composición química de los aceites esenciales**

Se consideran agregados complejos de constituyentes muy variables, de forma casi exclusiva, al grupo de los terpenos y, en menor medida, al conjunto de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano (aldehído cinámico, eugenol, anetol, aldehído anísico y safrol, entre otros). Los compuestos terpénicos están constituidos por unidades de isopreno (5 carbonos), pueden ser parte de los monoterpenos (10 carbonos) y sesquiterpenos (15 carbonos). Estos monoterpenos y sesquiterpenos pueden ser, a su vez, acíclicos, monocíclicos y bicíclicos, y también oxigenados y no oxigenados (M. López, 2004).

### **2.5.2 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales**

Varios estudios han demostrado la efectividad de los aceites esenciales en la inhibición de crecimiento de diversos microorganismos, la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se asocia principalmente a los terpenoides que contienen grupos alcoholes, aldehídos y por último grupos cetónicos (Orozco, 2020).

## 2.6 Comino

### 2.6.1 Taxonomía del Comino

Tabla 1 Taxonomía del Comino

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Apiales
Familia	Apiaceae
Género	Cuminun
Especie	<i>Cuminun cyminum</i>

Fuente: (Ludeña, 2021)

### 2.6.2 Descripción Botánica del comino



Su nombre botánico, *Cuminum cyminum*, procede del griego kyminon (que significa comunión), corresponde la familia Umbelíferas (apiaceae). Una umbelífera es una planta con racimos de flores planos o redondeados, que sobresalen de la parte alta de los tallos partiendo desde un magnífico punto central (como una sombrilla) (Mohammadpour et al., 2012).

Gonzales (2018), indica que la planta del comino es pequeña y anual, creciendo hasta una altura de aproximadamente 30 cm y originando pequeñas flores blancas, rosas o lilas, comprendidas en umbelas con 10 a 20 flores. El fruto, se le conoce como semilla de comino, es amarillo pardo, extenso y con nueve protuberancias.

### **2.6.3 Composición química de la semilla del comino**

Ludeña (2021), menciona que en estudios anteriores sobre la composición de las semillas de comino *Cuminum cyminum* indican que contienen aceite fijo (10%), aceite volátil (1-5%), compuestos principalmente por monoterpenos, aldehído cumínico, terpineol y taninos, además conformada por proteínas, celulosa, azúcar, y minerales.

Por otra parte, según Rea (2012), el comino muestra también entre sus componentes resinas, sustancias albuminosas y flavonoides. Estos últimos poseen muchas propiedades medicinales como, anticancerígenas, antioxidantes, antimicrobianas, entre otras.

### **2.6.4 Toxicidad del comino**

Para Abbaszadegan et al. (2016), este tipo de aceite de comino no debe tomarse en mujeres embarazadas, bebés o niños menores de 6 años. También muestra que tiene reacciones adversas en personas alérgicas o pacientes con enfermedades inflamatorias de la piel.

Según Martínez et al. (2011), el uso del aceite esencial de comino es tóxico a altas concentraciones que van desde el 20% hasta 1,25%, las cuales fueron evaluados en organismos vivos, dando como resultado una mortalidad al 100%. Tabarraei et al. (2019), nos menciona en su estudio toxicológico realizado con trucha arcoíris, se evidenció que el comino presenta toxicidad a una dosis de 35 mg/L en donde su mortalidad fue más del 50%.

### **2.6.5 Aceite esencial de comino**

El aceite esencial de comino recién destilado es incoloro o amarillo pálido, pero con el tiempo se torna color ámbar. Para Quiroga (2019), el porcentaje de aldehído o compuestos carbonílicos expresados como aldehído cumínico va de 35 % a 63 %

De acuerdo con Rea (2012), el olor y sabor del comino proviene 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, pcimeno y  $\beta$ -felandreno.

Estudios realizados en Italia sobre el aceite esencial de *Cuminum cyminum* revelan los siguientes componentes mayoritarios: p-mentha1,4-dien-7-al (27,4%), aldehído cumínico (16,1%),  $\gamma$ -terpineno (12,8%), y  $\beta$ -pineno (11,4%) (Romero et al., 2007).

#### **2.6.5.1 Método de extracción por arrastre de vapor**

Según Bardales & Farfán (2018), la destilación por arrastre de vapor es un método en el cual se coloca la planta seca, o parte que contenga el principio activo en la estufa de un destilador de hierro, acero inoxidable, cobre o vidrio, y se cubre con agua. Al calentar la caldera se evapora el agua y el aceite volátil, que se condensa en el refrigerante, acumulándose en el colector, del cual se disgrega al cabo de un periodo determinado por diferencia de densidades, y se separa con un embudo provisto de un grifo en la parte más estrecha.

#### **2.6.5.2 Método de la Artemia Salina para detención de la actividad toxica del aceite de comino**

El crustáceo filtrador *Artemia salina* es uno de los individuos modelo más utilizados para observar el efecto tóxico (Bhuvaneshwari et al., 2018). El uso de bioensayos controla la bioactividad de extractos, fracciones y compuestos aislados de plantas que se ha asociado con la investigación fitoquímica; entre estos ensayos biológicos se encuentra la prueba de toxicidad con *Artemia salina* que fue desarrollado con el fin de detectar compuestos bioactivos en esencias de plantas (Asadi et al., 2019). Para Jin (2019), esta prueba es una técnica fácil en el estudio de productos naturales o químicos, que tiene una buena analogía con los ensayos de toxicidad *in vivo*.

### ***2.6.5.3 Método de Kirby-Bauer para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales***

Cockerill (2018), señala que es un método estandarizado en el cual se pone en la superficie de un agar anticipadamente sembrada por el agente en estudio por medio de estriación múltiple, los discos de papel filtro son humedecidos por las concentraciones de las sustancias como pueden ser antibióticos, extractos o aceites esenciales a evaluar, mediante la asistencia de una pinza se colocan sobre la superficie húmeda del agar y de esta manera los discos surgen rodeados por un círculo de inhibición, los cuales se medirán con la ayuda de una regleta milimétrica (Wikler et al., 2018). Es la técnica más empelada para la evaluación de la sensibilidad antimicrobiana, la cual permite apreciar el impacto de los componentes sobre agentes microbianos.

### ***2.6.5.4 Método de microdilución en caldo para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales***

Este método radica en determinar cualitativamente la existencia o ausencia de la bacteria en un medio de cultivo líquido junto con la presencia de un antimicrobiano. Se señala como “microdilución” porque se emplea placas multiposillos para establecer la turbidez (Argote et al., 2017).

Según Ortuño (2019), en este procedimiento se utilizan microplacas plásticas de fondo redondo, donde se consiguen experimentar 8 diluciones de 12 antimicrobianos. En los pocillos de las microplacas se coloca el medio líquido, se añaden las distintas concentraciones de sustancias a analizar (antibióticos, aceites esenciales, extractos vegetales, etc.). Se llevan a incubar por un tiempo de 24 a 48 horas, a 37 °C, posteriormente se determina la CMI a través del crecimiento visible o empleando el quipo Lector de Microplacas para su observación de los resultados alcanzados.

### 3 Materiales y métodos

#### 3.1 Trabajo de campo

El trabajo experimental se llevó a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida ubicados en la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito campus Girón precisamente en los Laboratorios de Investigación y Desarrollo II, Microbiología y Ciencias Generales I.

#### 3.2 Diseño Experimental

El presente trabajo de investigación tuvo la finalidad de alcanzar el mejor tratamiento para elaborar embutidos frescos de cerdo mediante el estudio del efecto antimicrobiano del aceite de comino (semillas) en cinco concentraciones (0,3%; 0,6%; 1,25%; 2,5% Y 5%). Se utilizó un diseño con cuatro tratamientos más el control positivo y negativo Tabla 2 considerando sus tres repeticiones.

*Tabla 2 Tratamientos Experimentales*

Tratamiento	Tipo de agente	Concentración/ volumen de agente
T <sub>1</sub>	Aceite de comino	0,3%
T <sub>2</sub>	Aceite de comino	0,6%
T <sub>3</sub>	Aceite de comino	1,25%
T <sub>4</sub>	Aceite de comino	2,5%
T <sub>5</sub>	Aceite de comino	5%
C+	Antibiótico cloranfenicol	30 $\mu$ L
C-	DMSO	1%

**Elaborado:** (Las autoras, 2023)

\*C+: control positivo; C-: control negativo; T<sub>n</sub>: número de tratamientos

Para una repetición se utilizó 250g de carne de cerdo con 75g de grasa, considerando que cada formulación será de 325g. De los 325g, 75g se destinaron para la evaluación con aceite esencial de comino, otros 75g a la evaluación con sales nitrales, 75g en embutidos sin ningún conservante y los últimos 50g con el fin de realizar el control de calidad del embutido y mientras que en la caracterización organoléptica se utilizaron dos embutidos de 25g cada uno.

Para la toma de muestra de la carne en el embutido se utilizó la NORMA INEN 1529-2:2013 (2013), la cual nos menciona que la unidad de muestreo en ensayos microbiológicos se debe utilizar una cantidad de 10g a 25g, en este trabajo experimental se optó por tomar 10g de un embutido de 25g.

### **3.3 Análisis Estadístico**

Los resultados del análisis microbiológico del aceite esencial de comino en el embutido fueron analizados estadísticamente en el programa INFOSTAT el cual se usó una comparación ortogonal y un análisis factorial mediante el método Tukey.

### **3.4 Población y Muestra**

#### **3.4.1 Población**

Aceite esencial de comino: Semilla comprada en una tienda de abastos “Comercial López” ubicada en la calle Versalles RG22+4HR, Quito, esta semilla procede de la provincia de Loja. Esta región es conocida por su producción de comino de alta calidad ya que cuenta con condiciones climáticas, y suelos favorables para el cultivo del mismo.

Carne de cerdo: Se obtuvo del supermercado Supermaxi ubicado en la Av. 12 de octubre N1486 y Madrid, Quito.

### **3.4.2 Muestra**

Aceite esencial de comino: Utilizaremos aproximadamente 20 ml obtenidos de la destilación por arrastre de vapor.

Carne de cerdo: La muestra estará constituida por 325g de carne de cerdo la cual será distribuida para evaluar los tratamientos con sales nitrales, aceite esencial de comino y su control de calidad.

## **3.5 Variables**

### **3.5.1 Variable Independiente**

Efecto antibacteriano del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) en el embutido fresco de cerdo

Toxicidad del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) en la elaboración del embutido fresco de cerdo.

### **3.5.2 Variable Dependiente**

Cantidad de ufc/ g de *Escherichia coli* totales presente en el embutido fresco de cerdo.

Mortalidad de la arteria salina evaluada para la toxicidad del aceite esencial de comino.

## **3.6 Procedimiento de Laboratorio**

### **3.6.1 Obtención del aceite esencial de comino.**

El aceite esencial de comino es un compuesto que se ha convertido en una alternativa como aditivo natural y conservante cárnico. Para la extracción del aceite esencial de comino seleccionamos semillas limpias, libres de cualquier impureza que puedan influir de manera negativa en el proceso y la calidad de las mismas., a continuación, se describirá mediante un diagrama de flujo su extracción.

## Descripción del proceso

### 1. Recepción de la semilla de comino

La recepción de la semilla de comino fue adquirida el mismo día en el que se iba a realizar la extracción.

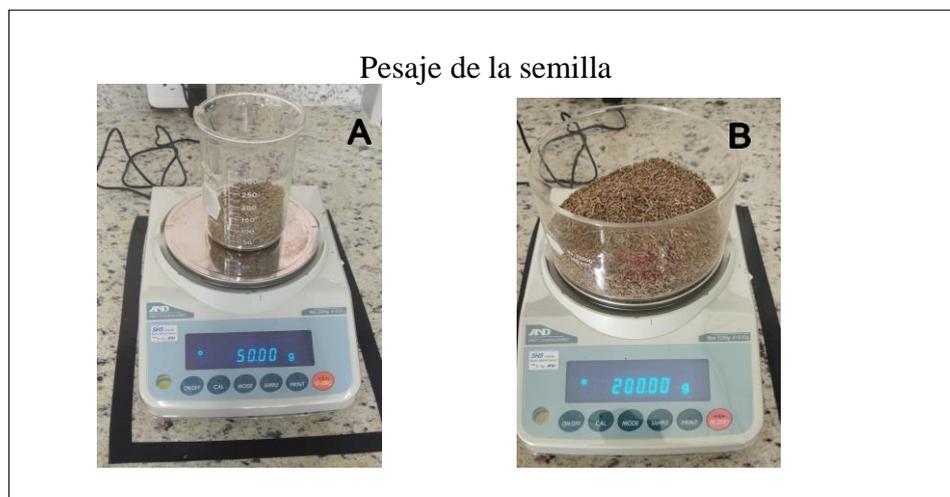


### 2. Limpieza

Se observó que las semillas estén libres de impurezas para que esto no afecte el rendimiento en el proceso de extracción.

### 3. Pesado

Se determinó en gramos la cantidad de semillas que se iba a utilizar en la destilación.



*Figura 3* Pesaje de la semilla

A: pesaje de semillas de comino 50 g; B: pesaje de semillas de comino 200 g  
Fuente: (Las autoras, 2023)

#### 4. Añadir los núcleos de ebullición y la semilla en el balón

Se procedió a introducir 8 núcleos de ebullición en el matraz de fondo redondo, posteriormente se colocó 200 g de la semilla para proceder a la destilación.

Adición de núcleos de ebullición y la semilla en el matraz de fondo redondo



*Figura 4* Adición de núcleos de ebullición y la semilla en el matraz de fondo redondo

A: se coloca los núcleos de ebullición; B: se introduce las semillas en el matraz de fondo redondo.

Fuente: (Las autoras, 2023)

#### 5. Adición de agua destilada

En el matraz de fondo redondo adicionamos agua destilada con el fin de cubrir toda la semilla para que tenga una adecuada hidratación.

Adición de agua



*Figura 5* Semillas de comino sumergidas en agua

Fuente: (Las autoras, 2023)

## 6. Destilación por arrastre de vapor de la semilla de comino

Una vez ya colocado la semilla en el matraz de fondo redondo se sujetó con sus respectivas uniones acoplando el refrigerante, también se coloca sobre una manta de calor para producir la ebullición de agua a 92 °C de manera que produzca suficiente vapor, para que pueda arrastre la mayor cantidad de aceite esencial generado, el condensado de la mezcla agua- aceite se recoge en un embudo decantador.

Equipos de destilación armados

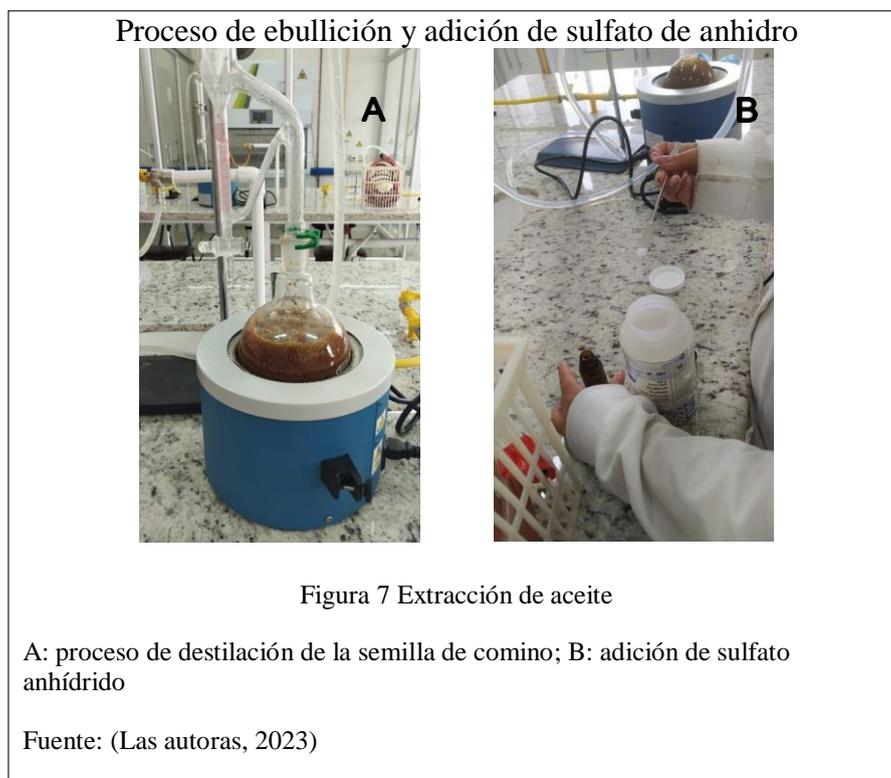


*Figura 6* Equipos de destilación

Fuente: (Las autoras, 2023)

## 7. Adición de sulfato anhidro para la obtención del aceite esencial.

En la muestra obtenida se adiciona una pequeña cantidad de este producto con la finalidad de asegurarnos que no exista ningún rastro de agua en el aceite esencial.



## 8. Envasado

Una vez asegurándonos que no exista agua en el aceite esencial se procede a transvasar, con ayuda de una pipeta Pasteur se absorbe el aceite esencial y se traslada a un frasco ámbar de 10 mL.

*Diagrama de flujo para la extracción del aceite esencial de comino.*

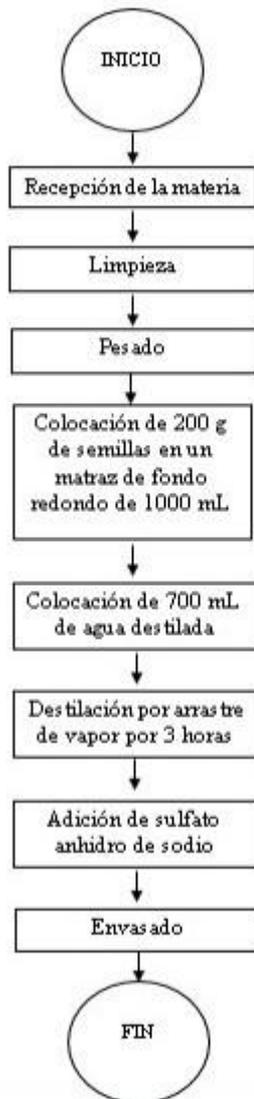


Figura 8 Diagrama de flujo de la extracción del aceite esencial de comino por arrastre de vapor

Elaborado por: (Las autoras ,2023)

### 3.6.2 Propiedades físicas del aceite esencial de comino

#### 3.6.2.1 Densidad

Para determinar la densidad del aceite esencial se hará uso de la siguiente **Ecuación 1**:

<p>Densidad</p> $d = \frac{m}{v}$ <p><i>Ecuación 1 Fórmula para la densidad</i></p> <p>Fuente: (Coronel &amp; Piedra, 2014)</p>
---

Donde:

$d = \text{densidad}$

$m = \text{masa } v = \text{volumen}$

Para determinar la densidad del aceite esencial se empleó el método de picnómetro el cual se debe limpiar y secar dejándolo libre de humedad, por lo que se utiliza un desecador hasta que tenga un peso constante, o exista diferencia entre dos pesadas consecutivas y no exceda el 0,001g; posterior a esto se coloca en una balanza analítica registrando su peso en gramos para conseguir el peso inicial, se llenó con el aceite esencial el picnómetro de un volumen de 5 mL, con el fin de obtener el peso final y se procedió a realizar los cálculos para definir la densidad del aceite esencial de comino.

#### 3.6.2.2 Rendimiento

El rendimiento del aceite esencial de comino es obtenido en relación en gramos del aceite esencial con respecto a la cantidad del material vegetal y se calcula en base a la **Ecuación 2**

### Rendimiento

$$\%R = \frac{Pf - P}{Pf} \times 100\%$$

*Ecuación 2 Fórmula para determinar el rendimiento del aceite esencial*

Fuente: (Escalante, 2020)

Donde:

%R= Porcentaje de rendimiento

Pf= Peso final del aceite

Pi=Peso inicial del frasco de aceite

### 3.6.2.3 Humedad

El método que empleo es del horno a temperatura constante. Para esta prueba se utilizó una caja Petri, se distribuyó uniformemente la muestra (semilla de comino) sobre la superficie de la caja Petri, se pesó el recipiente con la tapa antes y después de llenarlo, procediendo a colocar rápidamente en una estufa a temperatura de 130-133°C, dejándolo secar por un periodo de 3 horas, posteriormente colocamos en un desecador durante 30-45 minutos para enfriarlo y se pesa el contenido junto con la tapa, este ensayo se llevó a cabo por triplicado realizando el mismo procedimiento para las 3 muestras.

El contenido de humedad se calculó mediante la Ecuación 3

### Humedad

$$H = (M_2 - M_3 \times \frac{100}{(M_2 - M_1)})$$

*Ecuación 3 Fórmula para calcular la humedad en semilla*

Fuente: (Poulsen, 2015)

Donde:

H= humedad

M<sub>1</sub>= Peso del recipiente en gramos

M<sub>2</sub>= Peso del recipiente y la muestra en gramos antes del secado

M<sub>3</sub>=Peso del recipiente y la muestra en gramos después del secado

### **3.6.3 Activación de la cepa bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 25922**

La cepa bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 25922, se obtuvo del Criobank de los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

En base a la metodología de Solera et al. (2006), el tubo de Criobank que contenía las perlas de *Escherichia coli* se removió de la congeladora, se descongeló a temperatura ambiente alrededor de 5 minutos, con una asa recta se seleccionó una perla y se depositó en un caldo de cultivo TSB(Caldo de Soja Tréptico) con un volumen de 10mL, posterior a esto, se llevó a la incubadora durante 24 horas a una temperatura de 37°C.

### **3.6.4 Determinación de la actividad del aceite esencial de comino mediante el método de Kirby-Bauer.**

*Preparación de medios de cultivo.*

Según Tovar (2018), para la preparación del medio de cultivo TSA(Agar Triptona Soja) se utilizará 12 gramos del medio en 300 mL de agua fría destilada, está se calienta hasta su ebullición, lo que permite la disolución total del agar, este medio se procede a esterilizar en un autoclave durante 15 minutos a una temperatura 121 °C, finalmente se repartió el medio en cajas Petri hasta que solidifiquen para su posterior utilización.

### *Resiembra de la cepa de Escherichia coli ATCC 25922*

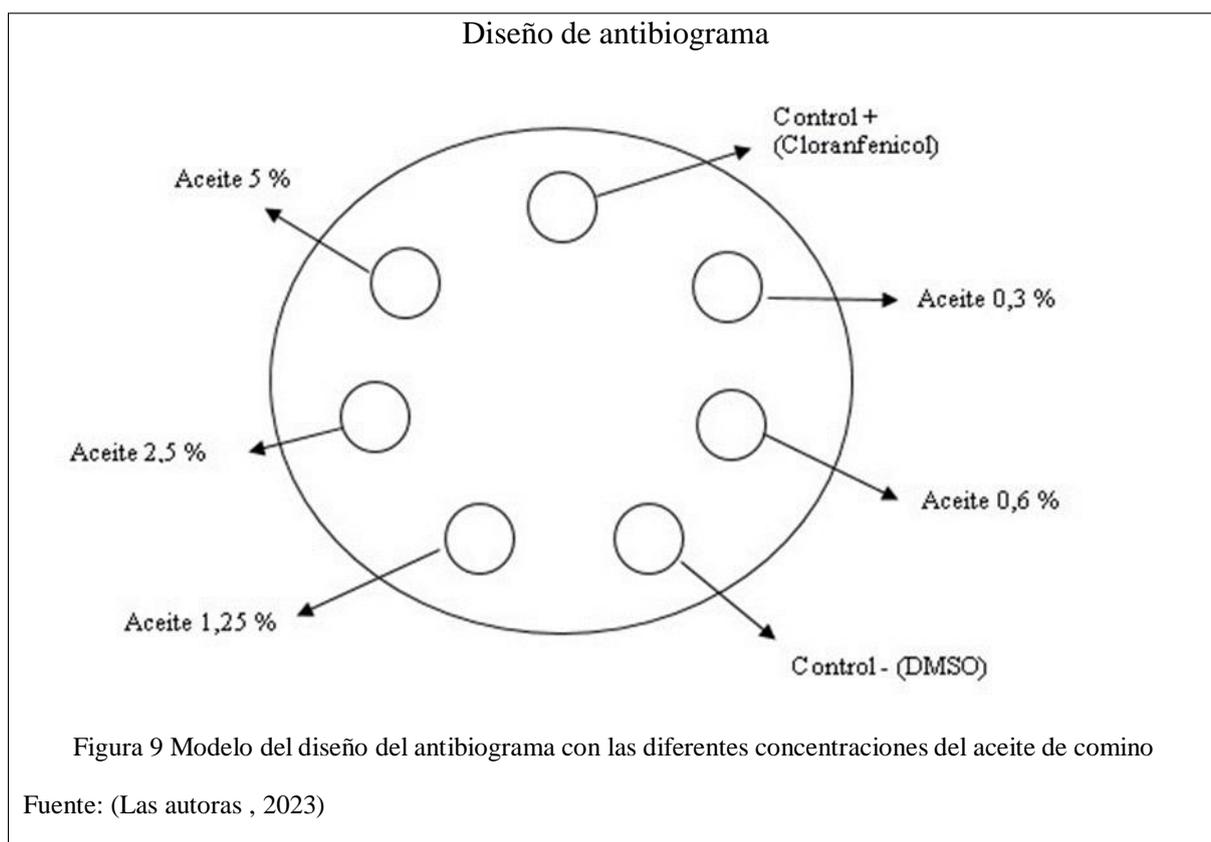
Se realizó un cultivo de la cepa bacteria de *Escherichia coli* en los medios de cultivo TSA con un volumen de 150mL, se tomó con un asa de inoculación de 1 a 2 ufc (unidades formadoras de colonias) aisladas para ser estriadas, se incubó por 24 horas a 37°C.

### *Inoculación en cajas Petri*

De acuerdo a la metodología descrita por Ibarra & Paredes (2013), a partir de la resiembra de la cepa bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 25922, se tomó varias colonias con un asa y se inoculo en un tubo de ensayo 10 mL con solución salina. Posteriormente se ajustó este inculo a una concentración  $1,5 \times 10^8$  ufc/mL escala de McFarland, observando en un espectrofotómetro a 625 nm esto con la finalidad de comprobar la absorbancia en el rango de 0,08-0,1.

Se tomó 100µL del inculo bacteriano, se dejó caer en el centro de la caja Petri y con ayuda de un asa drigalsky se esparció por toda la caja, posterior a esto se dejó secar por 5 minutos para colocar los discos de antibiograma. Se empleó un disco de antibiótico Cloranfenicol con control positivo, un disco en blanco con DMSO como control negativo y por último 5 discos con las distintas concentraciones de aceite esencial a 0,3%; 0,6%; 1,25%; 2,5% y 5% en un volumen de 20µL.

Transcurrido 25 minutos luego de la aplicación de los discos se llevaron a incubación a 37°C durante 24 horas.



### **3.6.5 Determinación de la CMI del aceite esencial de comino mediante el método de dilución en caldo.**

#### **3.6.5.1 Preparación del inóculo bacteriano**

El procedimiento para el inóculo es el mismo que se realizó para el apartado anterior de la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar.

#### **3.6.5.2 Preparación del control positivo**

Se utilizó un antibiótico comercial que fue Penicilina- Estreptomicina, para Montiel et al. (2006), esta combinación se usa para impedir la contaminación bacteriana debido que actúa eficazmente en bacterias Gram negativas gracias a su amplio espectro antibacteriano, esta solución se preparó a una concentración del 1% en donde se diluyó 10 mg del antibiótico con 1000  $\mu\text{L}$  de agua previamente esterilizada.

### **3.6.5.3 Preparación del control negativo**

Se preparó una solución de DMSO a 150  $\mu\text{L}$  y 1350  $\mu\text{L}$  de agua estéril con un volumen final de 1500  $\mu\text{L}$ .

### **3.6.5.4 Preparación del colorante TTC**

Para este reactivo se utilizó 10 mg de TTC y se diluyó en 10 mL de agua fría en un frasco ámbar debido a que es fotosensible.

### **3.6.5.5 Preparación de microplacas**

Se utilizó microplacas de 96 pocillos donde se puso un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , se inicia llenando la fila A donde se colocó 100  $\mu\text{L}$  de MHB(Müller Hinton Broth) este medio es recomendable para pruebas de sensibilidad cuantitativas para analizar bacterias anaerobias y aerobias facultativas más comunes en alimentos (Milipore, 2018), a partir de la segunda fila (B, C y D) se colocó 100  $\mu\text{L}$  de MHB y de aceite esencial de comino, se traspasó 100  $\mu\text{L}$  desde el pocillo 1 hasta el pocillo 12, para la fila E se colocó 100  $\mu\text{L}$  de MHB y de aceite esencial de tomillo esto nos servirá como una comparación en lo cual se realizó el mismo procedimiento que las filas anteriores (B,C y D), para los controles se utilizó la F como control positivo en el cual lleva la preparación del antibiótico ya antes descrita, para la fila G se utilizó como control negativo la solución de DMSO y en la fila H se utilizó el control de esterilidad donde se colocó solo el medio MHB.

## **3.7 Ensayo de toxicidad con *Artemia salina***

### *Obtención de Artemia Salina*

Para la evaluación la toxicidad el aceite esencial de comino se tomó como referencia la metodología propuesta por Saetama et al., (2018), utilizando *Artemia salina*. Se empleó huevos de *Artemia salina* comercial.

### *Incubación de huevos*

En este proceso se utilizó como referencia la metodología propuesta por Armas (2012), para la preparación de agua salina se empleó 1000 mL de agua deionada y 20 gramos de sal marina. Para el proceso de incubación se cortó una botella de plástico de 3L utilizando la parte en la que contiene la tapa; a dicha botella se le agrega el agua salina previamente preparada y se medirá la temperatura en un rango de 25-30°C, una vez realizado este paso se le agrega 1 gramo de huevos de *Artemia salina*, en el equipo de incubación se colocó un aireador para mantener la oxigenación y un termostato que controlara su temperatura, seguido de esto se tapa con papel film la botella, dicho paso ayudará a que el proceso de incubación sea más eficiente y el tiempo de incubación fue de 48 horas.

### *Emulsión del aceite esencial de comino*

Para realizar las distintas emulsiones con el aceite esencial de comino usaremos como emulsificante Tween 80 al 0,1% dado que este no es tóxico para la *Artemia salina*, está se realizó en proporción 1:1 con el aceite a las distintas concentraciones 0,8%; 1,6%; 3,2%; 4,5% y 5%.

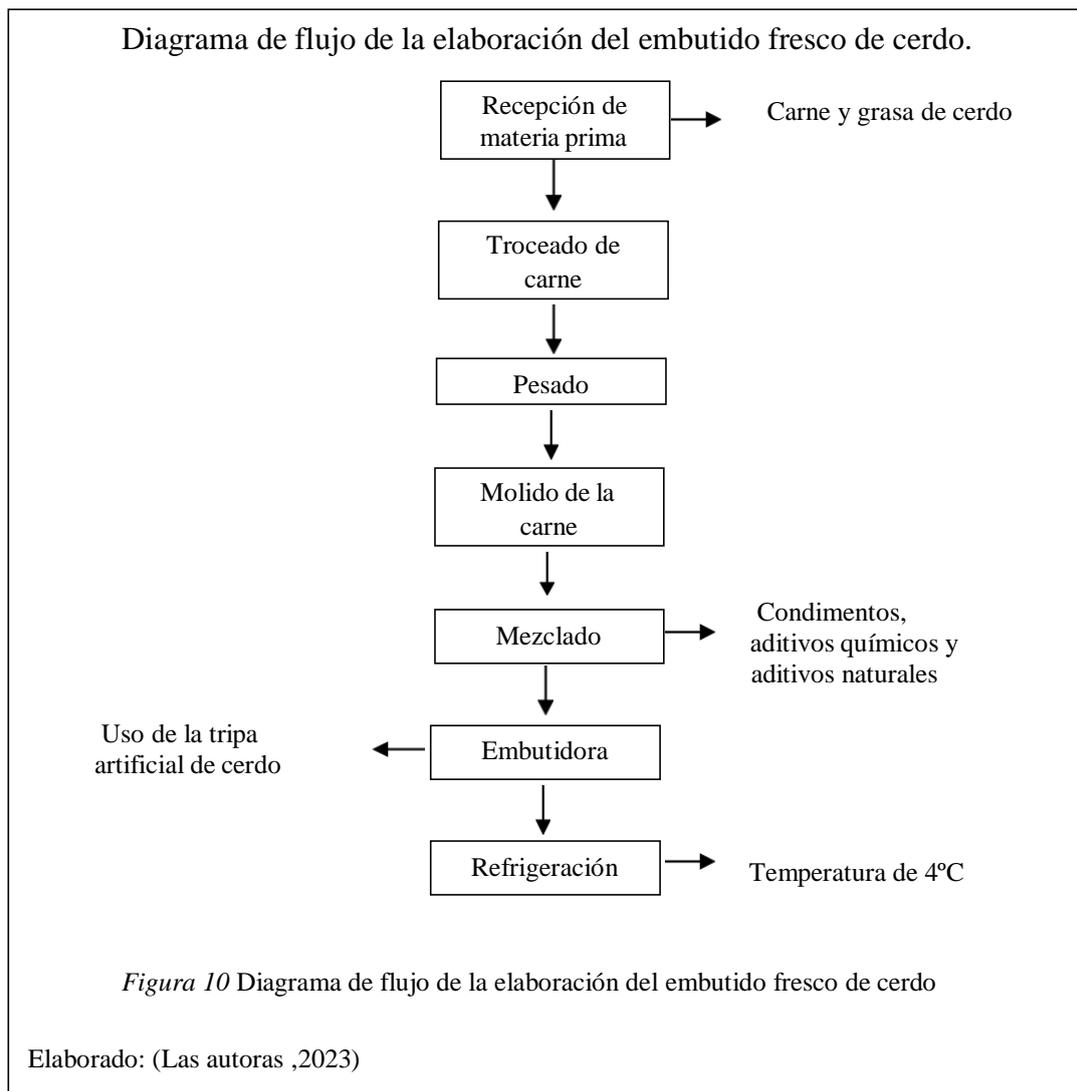
Para este proceso se utilizó el método descrito por Pila & Segarra (2022), donde menciona que una vez que los huevos hayan eclosionado se debe tomar 10 nauplios con ayuda de una pipeta Pasteur y colocarlos en tubos de ensayo con 10 mL de agua salina, se adicionó 500µL del aceite de comino a las distintas concentraciones, este proceso se realizó por triplicado consiguiendo un total de 15 tubos y estos se dejan incubar por 24 horas a temperatura de 27°C.

Hay que tener en cuenta que para el control positivo se empleó alcohol al 96% esto con la finalidad de que se evidencie la mortalidad total de los individuos, mientras que para el control negativo fue agua salina con el propósito de demostrar que la *Artemia salina* no presente problemas de nado y por ende su supervivencia sea asegurada.

### Conteo de nauplios muertos

Transcurrido las 24 horas de incubación, se procedió a contar los nauplios muertos con la ayuda de un estereoscopio NIKON SMZ745, registrando aquellos como muertos los que no realizan ningún movimiento durante algunos segundos.

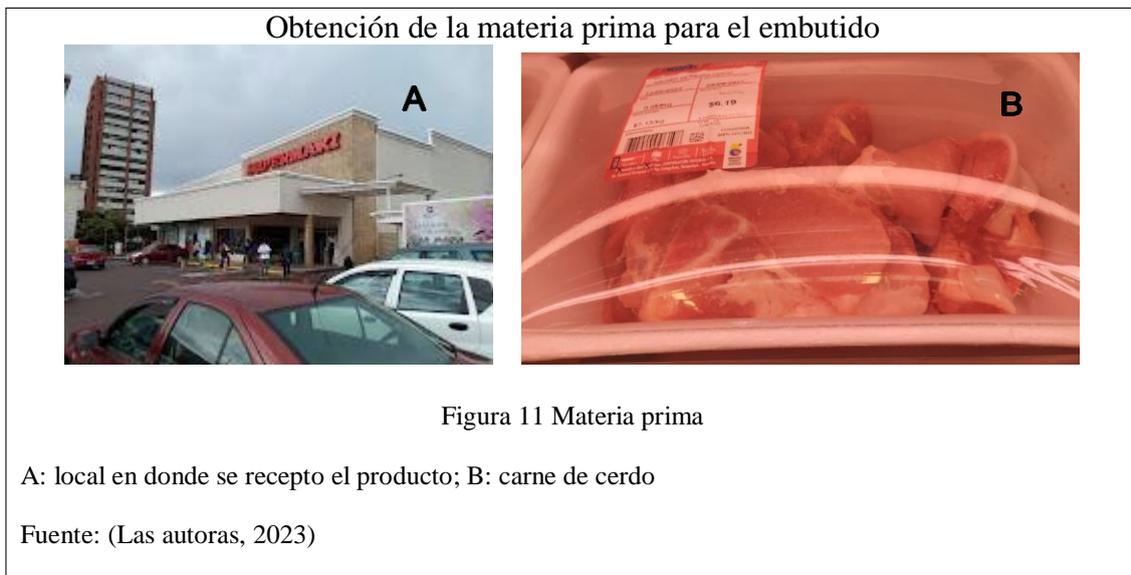
### 3.8 Elaboración del embutido



### Descripción del proceso

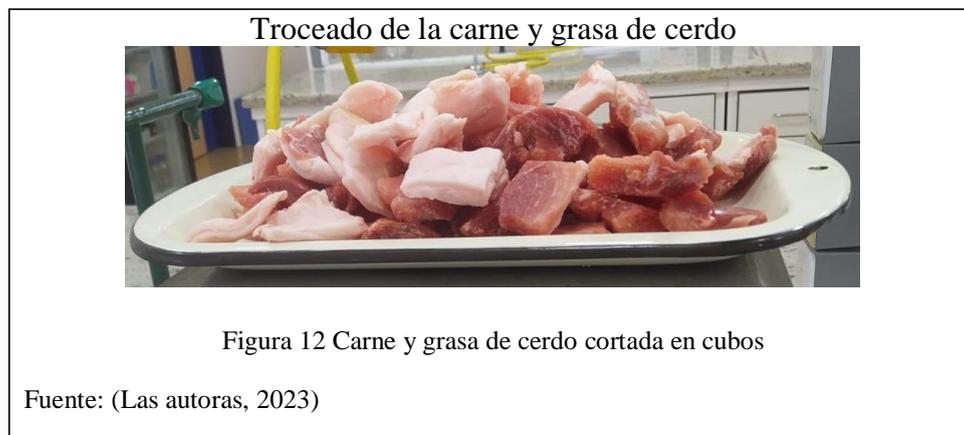
## 1. Recepción de la materia

La materia prima (carne y grasa de cerdo) debe ser comprado en un lugar aséptico en este caso se obtuvo del supermercado Supermaxi, tomando en cuenta que la carne no debe pasar el 10% de grasa.



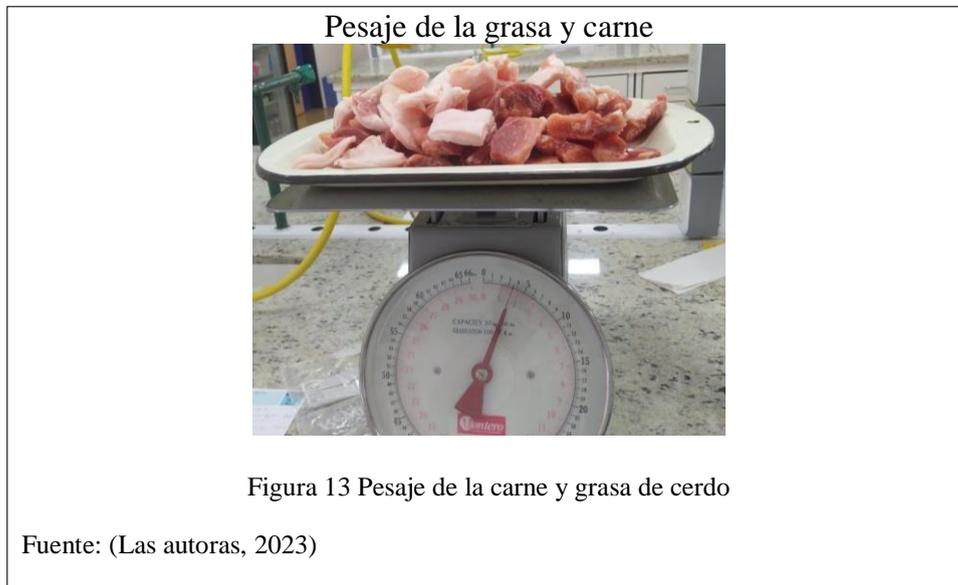
## 2. Troceado

La carne y la grasa debe cortarse en cubos de aproximadamente 4 cm, seguido de esto se llevará a congelar durante 12 horas.



### 3. Pesado

Se tomará en cuenta que la carne y la grasa deben tener relación en su peso, es decir, se utilizara 275 gramos de carne con 87,5 gramos de grasa.



### 4. Molido

Los cubos pequeños se muelen pasando por un disco de 3 mm adicionando la grasa que también será molida por el mismo disco. Hay que tomar en cuenta que si la carne no está bien molida será necesario volver a moler por segunda vez.

### Molienda de la amteria prima



Figura 14 Troceado de la carne y grasa

Fuente: (Las autoras, 2023)

## 5. Mezclado

Una vez que la carne esta molida se procede a colocar los condimentos y aditivos químicos previamente pesados.

### Mezcla de la carne y aditivos



Figura 15 Mezclado de los aditivos y la carne molida

Fuente: (Las autoras,2023)

## 6. Embutido

La masa será embutida en una tripa natural de cerdo calibre 28-30mm de diámetro, previamente lavada e hidratada con el fin de eliminar el exceso de sal. Se tomará en cuenta que el embutido será de aproximadamente de 25 gramos.



## 7. Refrigeración

Se mantendrá en refrigeración con una temperatura de 4°C.

### 3.8.1 Análisis microbiológico del embutido fresco de cerdo

Se realizó mediante el método de ensayo proporcionado por la norma AOAC (2020), en donde nos dice que para la selección de la muestra se seleccionó una muestra representativa de los embutidos y se tomó 25 gramos de carne del interior del producto, esta muestra se coloca en un frasco boheco de 100 mL de agua peptonada al 0,1%, se homogeniza durante unos minutos.

Posteriormente se toma 10 mL de la solución homogenizada y se traslada a otro frasco boheco con 90 mL de agua peptonada, este proceso se repite hasta obtener una dilución de  $10^{-6}$ . Se procede a sembrar un 1 mL en las Petrifilm las cuales se incuban a 37°C durante 24 horas.

Este proceso se realizó por triplicado de acuerdo a la norma requerida.

### **3.9 Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino en el embutido fresco de cerdo**

Para la actividad antimicrobiana del aceite de comino (*Cuminum cyminum*) se realizó un ensayo con un volumen de 100µL.

#### **3.9.1 Activación de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 y preparación de escala McFarland**

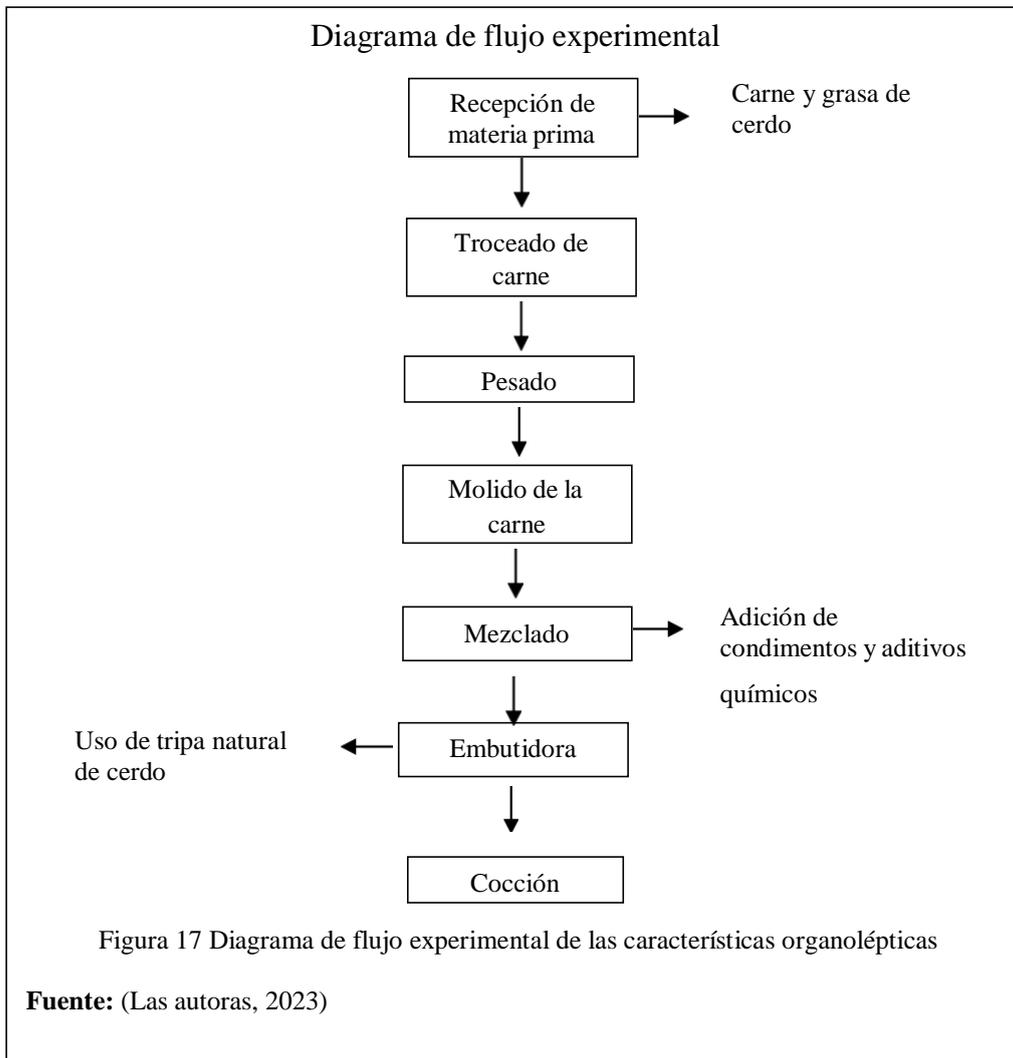
Se realizó una nueva siembra de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 y se incubó a 37°C durante 24 horas. Para saber la concentración de *Escherichia coli* que se inoculará en el embutido fresco de cerdo, se deberá tomar varias colonias de modo que llegue a  $1 \times 10^8$  ufc/ mL (escala de McFarland) y se añadirá en una solución de NaCl (cloruro de sodio) para determinar su absorbancia.

#### **3.9.2 Inoculación de *Escherichia coli* en el embutido**

Con el fin de que la concentración de *Escherichia coli* este entre los parámetros permitidos se realizaron 5 diluciones hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^3$  ufc/mL, la cual está estipulada en la norma INEN (1338:2012) (2012).

Se introduce la carne en una funda ziploc estéril, con ayuda de una jeringa se inyecta 10 mL de este inóculo en relación a 25 gramos del embutido, esto con la finalidad de que el inóculo se distribuya de forma homogénea posterior a esto se coloca el embutido en un Erlenmeyer y se tapó con parafilm y se llevó a incubar en el shaker durante 24 horas. Pasado este tiempo se procedió a colocar 90 mL de agua peptonada, se tomó un 1 mL de la dilución y se inoculó en las placas de recuento *E. coli* / Coliformes 3M™ Petrifilm™, se incubaron durante 24 horas a 37°C para su posterior lectura.

### 3.10 Evaluación de las características organolépticas del embutido



La prueba sensorial fue realizada en la Universidad Politécnica Salesiana, para llevar a cabo esta prueba se empleó una preparación parecida a la que realiza un usuario ordinario. Según la metodología de Córdova & Rosales (2009), la prueba sensorial se evaluó en base a una escala similar de 5 puntos, considerando la calificación de 5 como excelente hasta el 1 muy malo. El valor mínimo a considerar aceptable el producto es de 4 global. Dentro del análisis organoléptico del producto terminado se realizaron distintas apreciaciones de las características del alimento entre las cuales son: el color, el olor y el sabor.

Los criterios asignados para el color son los siguientes: muy pálido el puntaje correspondiente sería mínimo (1), muy oscuro o rosáceo el puntaje correspondiente sería el máximo (5). Para la característica de olor el criterio a determinar es si es muy intenso su puntaje correspondería al mínimo (1) pero si su olor es tenue (embutido común) se calificaría con el puntaje máximo (5). Finalmente, para el criterio del sabor el puntaje máximo (5) corresponde si es muy agradable, y si su sabor es desagradable se puntuaría con una calificación mínima (1) (Pérez & Ponce, 2013).

*Tabla 3 Escala utilizada para la evaluación sensorial del embutido fresco de cerdo*

Características	Calificación
Excelente	5
Bueno	4
Regular	3
Malo	2
Muy malo	1

**Elaborado:** (Las autoras, 2023)

## 4 Resultados y discusión

### 4.1 Extracción del aceite esencial de comino

Se realizó la extracción del material vegetal seleccionado (semillas de comino), para determinar la densidad, rendimiento y la humedad, así como también determinar las condiciones que se emplearon en la extracción que se encuentran descritas en la **Tabla 4**

*Tabla 4 Condiciones de la extracción del aceite esencial de comino*

CONDICIONES	Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> )
Cantidad de material vegetal	2000 g
Cantidad de agua destilada	3 L
Tiempo de extracción	4 h
Total de aceite extraído	20 mL
Total de extracciones	16 extracciones
Color	Amarillento
Rendimiento	1%
Humedad	9,60%
Densidad	0,9578 g/cm <sup>3</sup>

Elaborado: (Las autoras, 2023)

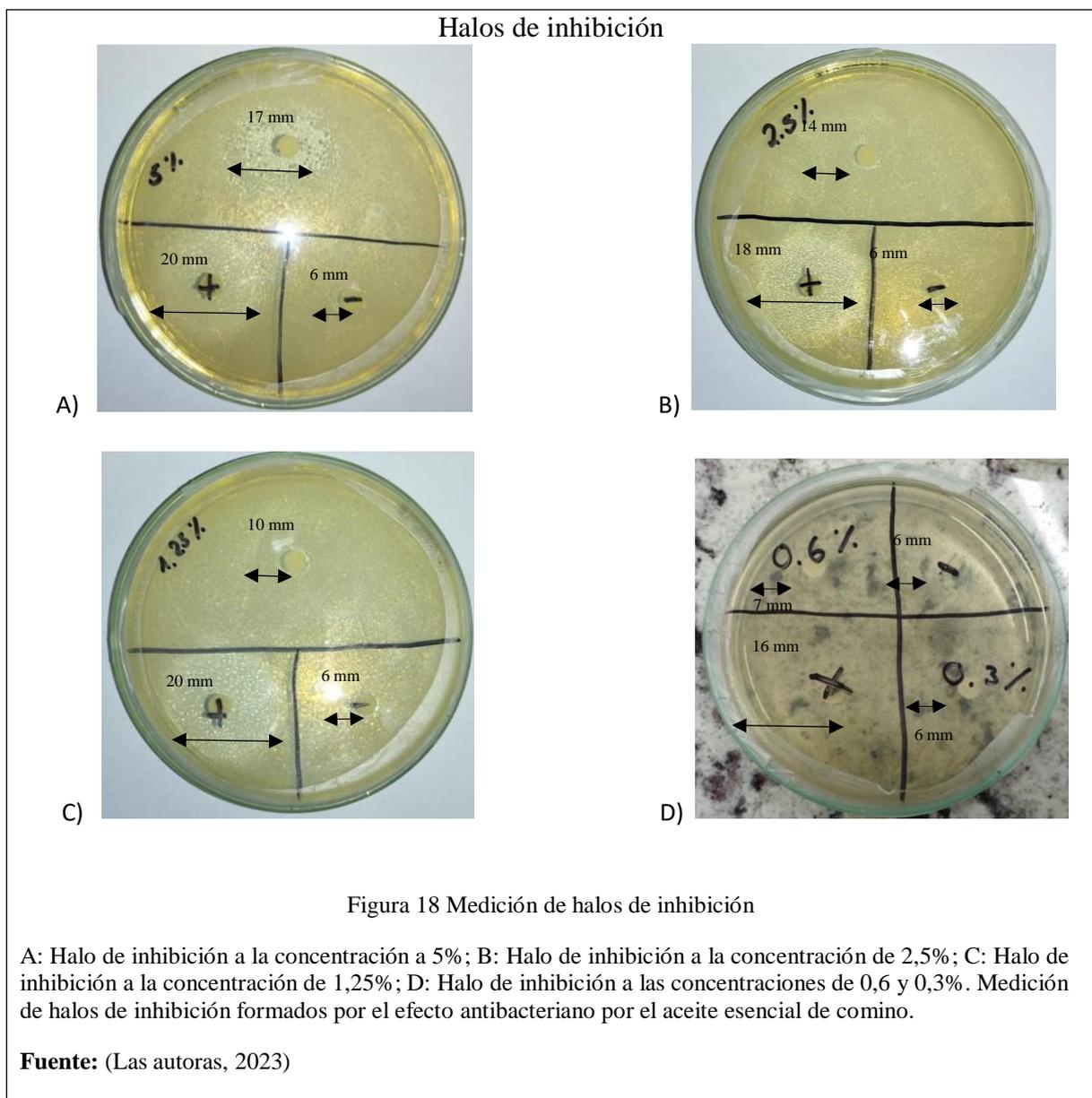
En base a la **Tabla 4** el aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) tuvo un rendimiento del 1% en comparación a un estudio realizado por Sowbhagya et al ( 2008), en donde menciona haber obtenido un rendimiento del 3,4% utilizando el mismo método de extracción, así como también un estudio publicado por Juárez (2015), en donde el rendimiento obtenido es de 2%. Este resultado depende mucho de las condiciones geográficas, cosecha, suelo entre otras, así como el método de extracción empleado para obtener el aceite esencial.

Con respecto a la humedad se obtuvo un porcentaje de 9,60% mayor en comparación a resultados obtenidos por Singh & Goswami (2000), en donde mencionan que la humedad de

las semillas de comino es de 9,53%, siendo este un porcentaje permitido en base a las Normas internacionales de Alimento (CODEX, 2021), el cual menciona que el comino no debe contener más de un 10% de humedad.

En cuanto a la densidad el resultado obtenido es de  $0,9578 \text{ g/cm}^3$ , este tiene una relación con el estudio de Sedláková et al (2003), en donde nos menciona que su densidad es de  $0,95 \text{ g/cm}^3$ , este resultado nos muestra el nivel de pureza del aceite esencial de comino.

#### 4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino por el método de difusión de agar



Para determinar los resultados del diámetro de inhibición conseguidos, se tomará como referencia las pautas de Lagos (2012), en base a la sensibilidad del aceite esencial de comino frente a la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25992, las cuales son:

1. Nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm
2. Sensible (Sensible = +) de 9 a 14 mm
3. Muy sensible (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm
4. Sumamente sensible (S.S = +++) si fue igual o superior a 20 mm

Los diámetros de los halos de inhibición obtenidos por los discos sumergidos en aceite esencial de comino a diferentes concentraciones se describen en la siguiente tabla:

*Tabla 5 Diámetro de los halos de inhibición en mm conseguidos por el aceite esencial de comino*

Agente de control	Concentración	Promedio	Desvest.	Control (-)	Control (+)
Aceite esencial de comino	5%	16 mm	1	6 mm	20 mm
	2,5%	13 mm	1	6 mm	18 mm
	1,25%	9,66 mm	0,57	6 mm	20 mm
	0,6%	6,66 mm	0,57	6 mm	16 mm
	0,3%	5 mm	1	6 mm	16 mm

Elaborado: (Las autoras, 2023)

En base a los resultados obtenidos en la Tabla 5 se determinó que la concentración con un mayor efecto inhibitorio fue de 5% con un promedio de inhibición 16 mm para el aceite esencial de comino, considerando a *Escherichia coli* como una cepa bacteriana muy sensible a esta concentración del aceite esencial. Por consiguiente, las concentraciones de aceite esencial de comino de 2, 5 % y 1,25 % estarían dentro de la clasificación de sensible.

Los resultados obtenidos en este estudio se pueden sustentar en base a una investigación realizado por Teneva et al (2016), donde demostraron que las bacterias Gram negativas

ensayadas mostraron zonas de inhibición de 8 a 12,5 mm, con un efecto inhibitorio mayor al 0,06 %. Esto se debe a la estructura y composición de la pared celular. En donde la presencia de una membrana externa en las bacterias Gram negativas impide la difusión de los aceites esenciales a través de la membrana hasta el citoplasma celular, lo que las hace más resistentes a la acción de los aceites. Con respecto al antibiótico que se manejo fue el cloranfenicol donde mostro una zona de inhibición de 20 mm según Mosquito et al. (2011), esto podría ser a que este antibiótico inhibe la biosíntesis de las proteínas por lo que previene la elongación de la cadena de péptidos al unirse al centro de la peptidiltransferasa del ribosoma 70S

Otro estudio denominado “Inhibitory activity of essential oils on *Escherichia coli*” se demostró que el efecto antibacteriano del aceite esencial de comino se obtuvo un halo de 9 mm a una concentración de 1,85%, en este estudio se empleó la misma escala de inhibición a partir del diámetro calificándolo como sensible concluyendo que poseen una relación con nuestros resultados obtenidos (Pirliteanu et al., 2020).

#### **4.3 Determinación de la CMI del aceite esencial de comino por el método de micro dilución en caldo**

El análisis cuantitativo se efectuó calculando las absorbancias de cada una de las celdas mediante el lector de microplacas, en el cual se sabe que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración bacteria. Para la microplaca se calculó el promedio de las absorbancias de repetición para obtener el análisis de datos (véase Tabla 6). Seguidamente, se consiguió el porcentaje de inhibición para *E. coli* ATCC® 25922™. Para el porcentaje de inhibición se calcula con la siguiente **Ecuación 4**.

Concentración mínima inhibitoria

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(A_o - A_m)}{A_o} \times 100$$

Ecuación 4 Fórmula para determinar la CMI

Fuente: (Doroteo et al., 2013)

Donde:

**A<sub>o</sub>**= Absorbancia del control negativo

**A<sub>m</sub>**= Absorbancia de cada formulación

*Tabla 6 Determinación de la CMI del aceite esencial de comino.*

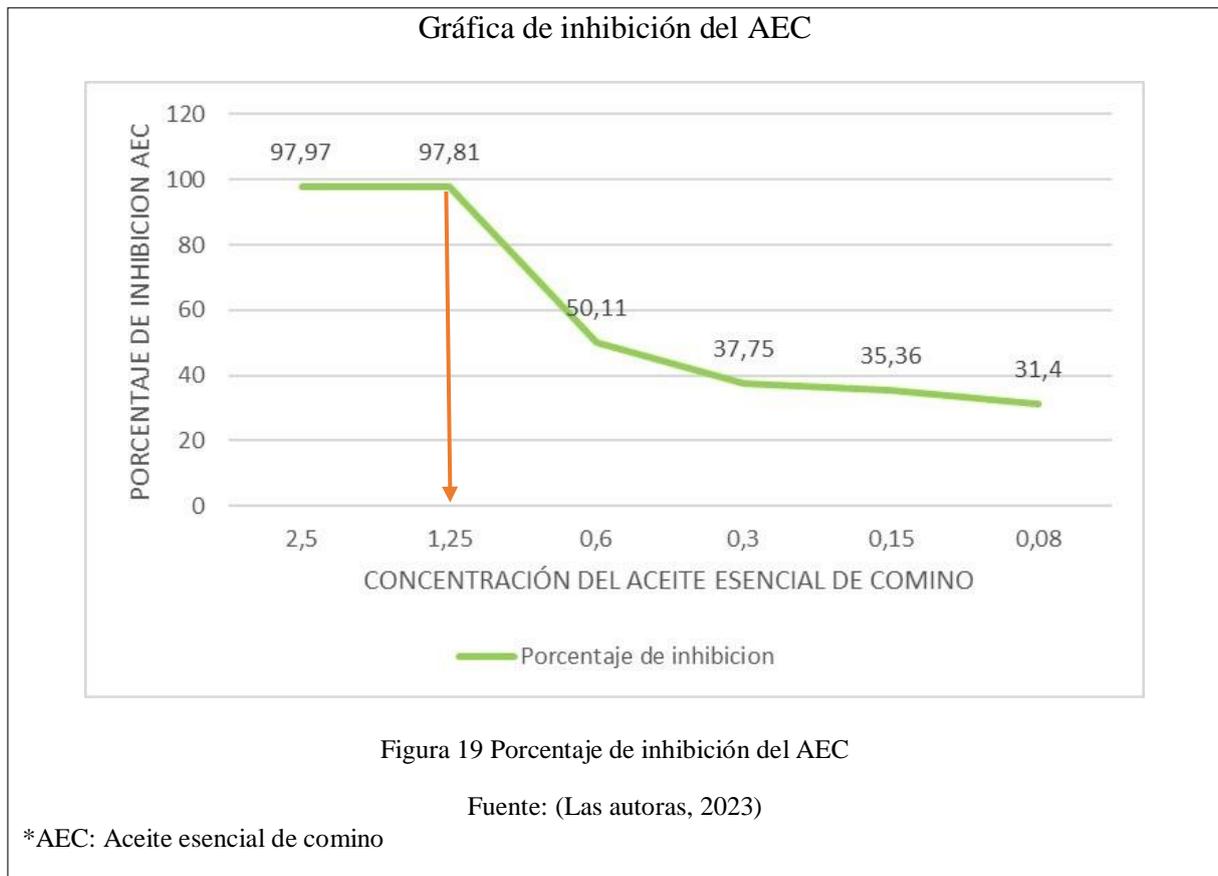
Agente de control	<i>Escherichia coli</i>		
	Concentración	Porcentaje de inhibición	CMI (mg/μL)
Aceite esencial de comino	2,5	97,97%	1,66
	1,25	97,81%	0,83
	0,6	50,11%	0,42
	0,3	37,75%	0,21
	0,15	35,36	0,105
	0,08	31,4	0,052

\*CMI: Concentración mínima inhibitoria

Elaborado: (Las autoras, 2023)

En la **Tabla 6** se resume el resultado de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de comino frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922, por consiguiente se obtuvo una CMI de 0,83 mg/μL lo cual es un resultado ligeramente mayor a lo reportado por Sae et al (2016), donde indica que su CMI fue de 0,25 mg/μL , con respecto al % de CMI se obtuvo un resultado del 1,25% en comparación con lo reportado por Mohamadein et al (2015), donde mencionan que el aceite de comino inhibió al 10% ,según Özean & Erkmen (2001), la diferencia puede deberse a sus componentes esenciales como monoterpenos dado que poseen una estructura química específica incluyendo anillos aromáticos, son capaces de descomponer

la membrana externa de las bacterias Gram positivas y aumentar la permeabilidad de la citoplasmática interna a diversos compuestos (Helander et al., 1998).



El porcentaje de inhibición se cuantificó en base a la lectura del lector de micro placas a una longitud de 630 nm, en la **Figura 19** se evidencia el punto de declive de inhibición bacteriana, por ende, se concluye que la CMI del aceite esencial de comino es de 1,25%.

#### **4.3.1 Prueba cualitativa adicional de la CMI del aceite esencial de comino**

Se realizó una valoración cualitativa donde se observó la presencia o ausencia de crecimiento de *Escherichia coli* empleando TTC, en el cual se constata un bajo crecimiento bacteriano desde la columna 1 hasta la columna 2 y que a partir de la columna 3 hasta la columna 12 se empieza a volver de un color rojo intenso eso se debe a que en estas concentraciones el aceite no se comporta como un antibacteriano; es decir que el reactivo TTC (cloruro de trifeniltetrazolio) desempeña una acción deshidrogenasa, convirtiéndose en 2,3,5

trifeniltetrazolio e induciendo a tornarse de color rojo o violeta en el citoplasma de las células bacterianas vivas (Myszograj et al., 2018).

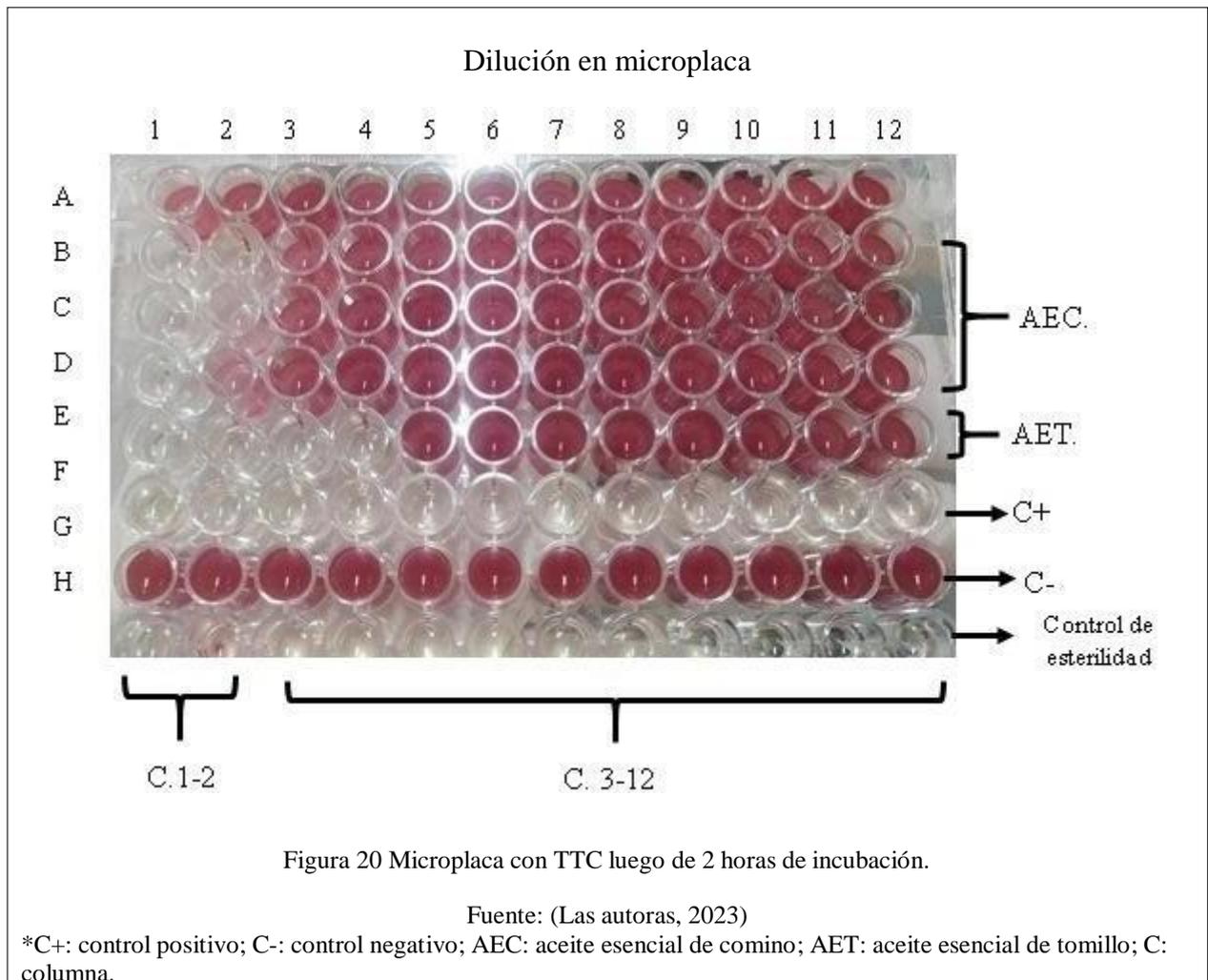


Figura 20 Microplaca con TTC luego de 2 horas de incubación.

En la **Figura 20** se visualiza la Microplaca luego de dos horas de incubación con TTC en los 96 pocillos, se constató que la tinción dado por el reactivo concuerda con las lecturas obtenidas en el lector de microplacas en el cual se obtuvo una MIC de 1,25% a una longitud de 630 nm.

#### 4.4 Ensayo de toxicidad

Se preparan 5 soluciones cada uno por triplicado considerando las siguientes concentraciones del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) al 0,3%; 0,6%; 1,25%; 2,5%; 5% en un volumen final de 10 mL en cada tubo; asimismo se utilizó control positivo se tomó referencia el etanol 70% y como control negativo se empleó agua salina.

#### 4.4.1 Ensayo del control positivo y negativo

Tabla 7 Ensayo del control positivo de toxicidad con etanol al 70%

Agente	N° Nauplios	N° Nauplios			Total	% de mortalidad
		T1	T2	T3		
Etanol 70%	10	T1	T2	T3	0	100%
		0	0	0		

Elaborado: (Las autoras, 2023)

Los resultados obtenidos para el control positivo de etanol al 70% en el ensayo de toxicidad es del 100% mortalidad esto se puede confirmar como indica en el estudio de Bajracharya & Tuladhar (2012), donde su mortalidad también es del 100%.

Tabla 8 Ensayo del control negativo de toxicidad con agua salina

Agente	N° Nauplios	N° Nauplios			Total	% de mortalidad
		X1	X2	X3		
Agua salina	10	X1	X2	X3	30	0%
		10	10	10		

Elaborado: (Las autoras, 2023)

Con respecto al resultado del ensayo de control negativo con agua salina el porcentaje de mortalidad es 0% de tal manera que este agente es óptimo para el uso en toxicidad esto se debe a que no presenta compuestos que puedan alterar la composición del agente resultando eficaz para la supervivencia de la *Artemia salina* como lo indica Saetama et al (2018), en su estudio de “Evaluación toxicológica de soluciones acuosas de ibuprofeno mediante bioensayos con *Artemia salina*, *Allium schoenoprasum L.* y *Lactuca sativa*.”

#### 4.4.2 Dosis letal 50 con aceite esencial de comino.

Tabla 9  $DL_{50}$  con aceite esencial de comino a las distintas concentraciones

Agente	Concentraciones	N° Nauplios	N° Nauplios muertos	Total	% de mortalidad	Observaciones
--------	-----------------	-------------	---------------------	-------	-----------------	---------------

			C1	C2	C3			
Aceite esencial de comino	5%	10	10	10	10	30	100%	
	2,5%	10	10	10	10	30	100%	
	1,25%	10	10	10	10	30	100%	
	0,6%	10	3	3	4	20	33,3%	2 individuos presentaron problemas de nado
	0,3%	10	2	3	2	23	23,3%	

Elaborado: (Las autoras, 2023)

En base a la **Tabla 8**, el DL<sub>50</sub> con respecto al aceite esencial de comino en concentración de 0,6 % y 0,3% se considera óptimo ya que no presenta un alto grado de toxicidad en comparación con las otras concentraciones, en un estudio publicado por Cerda (2021), se muestra que los valores obtenidos del DL<sub>50</sub> del aceite de comino es altamente tóxico dado que a concentraciones más bajas presentadas en nuestro estudio demuestra toxicidad.

#### 4.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino y las sales nitrales en el embutido.

*Tabla 10 Análisis microbiológico en embutido fresco de cerdo*

Agente		

	<b>Recuento de <i>Escherichia coli</i></b>	<b>Recuento permitido de <i>Escherichia coli</i></b>
	<b>ufc/g</b>	<b>ufc/g NTE INEN 1529-8</b>
<b>Aceite esencial de comino</b>	$8,15 \times 10^2$	$1 \times 10^3$
<b>Sales nitrales</b>	$6,93 \times 10^2$	$1 \times 10^3$
<b>CONTROL POSITIVO</b>	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$
<b>CONTROL NEGATIVO</b>	No hay crecimiento	Ausencia total

Elaborado: (Las autoras, 2023)

En la **Tabla 10** se puede observar que el embutido con la aplicación del aceite esencial de comino se encurta dentro de los parámetros establecidos por la INEN (1338:2012) ( 2012), debido a que hay que tomar en cuenta que para el embutido se trabajó con una materia prima de alta calidad ya que al momento de realizar el análisis microbiológico de la carne de cerdo junto con la grasa no se obtuvo un crecimiento de *Escherichia coli*. Para inocular la bacteria en la carne se estimó aplicar una cantidad de 1000 ufc/g siendo la cantidad máxima que nos permite la norma y al aplicar el AEC como las sales nitrales se observó si existe una disminución en el crecimiento de *E. coli*.

#### 4.5.1 Análisis estadístico del análisis microbiológico

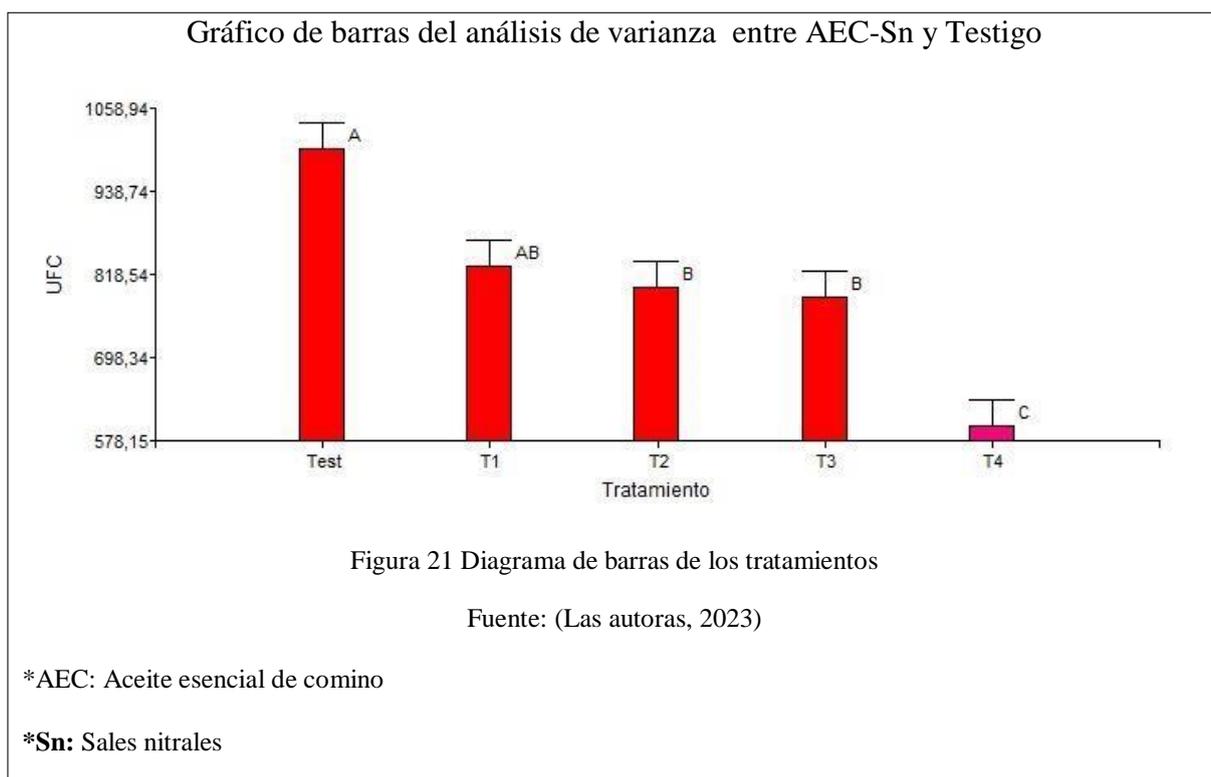
*Tabla 11 Análisis de varianza entre AEC-Sn y Testigo*

<b>Agente</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Diferenciación de las medias</b>
Aceite esencial de comino	T1	830,00	20,00	AB

Aceite esencial de comino	T2	800,00	100,00	B
Sales Nitrales	T3	786,67	15,28	B
Sales Nitrales	T4	600,00	100,00	C
Testigo	Test.	1000,00	0,00	A

Elaborado: (Las autoras, 2023)

En base a los resultados obtenidos en la **Tabla 11** se realizó una comparación entre el testigo y los tratamientos presento un  $p > 0,003$ , lo cual demuestra que existe diferencia estadística, por lo tanto, se evidencio que la aplicación de estos tratamientos tanto como sales nitrales y el aceite esencial de comino si reduce el crecimiento bacteriano en el embutido fresco de cerdo.



$H_0$  = Todos los aditivos son iguales

$H_a$  = Al menos un aditivo es diferente

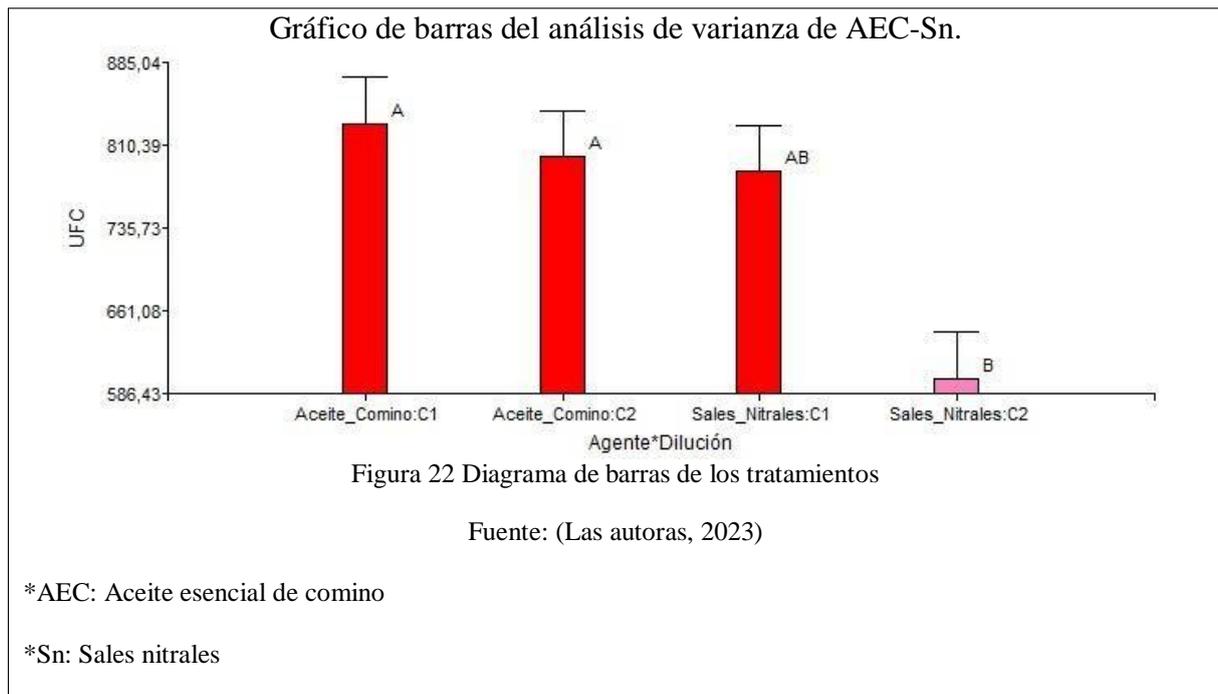
De acuerdo a los resultados obtenidos en la **Tabla 11** se obtuvo un  $p < 0,05$ , por lo cual se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_a$  tal como se muestra en la **Figura 21**, en donde podemos observar que el T4 (sales nitriles) presenta un menor crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* con respecto al testigo y al aceite esencial de comino.

*Tabla 12 Análisis de varianza entre el AEC-Sn*

<b>Agente</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Diferenciación de las medias</b>
Aceite esencial de comino	C1	830,00	20,00	A
Sales nitriles	C1	786,67	15,28	A
Aceite esencial de comino	C2	800,00	100,00	AB
Sales Nitriles	C2	600,00	100,00	B

Elaborado: (Las autoras, 2023)

En cuanto a la **Tabla 12** se realizó una comparación entre los aditivos, de manera que en el análisis de varianza se delimitó la variable agente en donde se demostró que al menos uno es diferente, esto quiere decir, que estadísticamente los aditivos no son iguales, por consiguiente, se obtuvo un p valor de 0,0189 dando como resultado que las sales nitriles son el mejor conservante para los embutidos.



$H_0$  = Todos los aditivos son iguales

$H_a$  = Al menos un aditivo es diferente

Referente a los resultados obtenidos en la **Tabla 12** se consiguió un  $p < 0,05$ , por lo cual se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_a$ , en donde las sales nitrales presentan un menor contenido de UFC, por lo tanto, existe una mejor inhibición de *Escherichia coli* a comparación del aceite esencial de comino. También se puede mencionar que hay una diferencia estadística entre las diluciones donde la C2 presentó un bajo contenido de actividad antimicrobiana, pero hay que tener en cuenta que los agentes y las concentraciones son independientes ya que no muestran una interacción como se observa en la **Figura 22**.

## 5 Conclusiones y recomendaciones

Mediante la investigación realizada con aceite esencial de comino, se logró obtener 20 ml por cada 2 kg de la semilla de las cuales se realizaron 16 extracciones para obtener el volumen final mediante el método de destilación por arrastre de vapor.

En base a la metodología realizada aceite esencial de comino presento una actividad antibacteriana a concentraciones de 5%; 2,25% y 1,25%, teniendo un promedio de halo de 16 mm, 13 mm y 9,66 mm respectivamente para *Escherichia coli* ATCC 25922 , estas concentraciones fueron utilizadas debido a que se realizó un previo ensayo toxicológico a concentraciones mayores al 10% lo cual resultó con un porcentaje de mortalidad al 100%, es por ello que se optó por escoger rangos menores al 5% para conocer la actividad antimicrobiana en porcentajes menores, de igual forma para la obtención de la CMI se utilizó el método de Microdilución en caldo dando como resultado una concentración de 1,25% el cual presenta un efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli* en embutido fresco de cerdo, sin embargo al realizar la prueba de toxicidad mediante *Artemia salina* el cual nos permite calcular el DL<sub>50</sub> (Dosis letal media) se pudo evidenciar que a esta concentración el aceite esencial de comino no es óptimo ya que resulto con un porcentaje de mortalidad al 100%, sin embargo se demostró que este aceite puede ser optimo en pequeñas concentraciones como 0,6% y 0,3% dado que tiene un porcentaje de DL<sub>50</sub> menor al 50%.

Al concluir nuestro trabajo experimental se deduce que los resultados obtenidos demuestran que el uso del aceite esencial de comino presenta actividad antibacteriana, pero a concentraciones mayores al 1,25% debido a esto no se podría considerar como una alternativa a manera de aditivo, no obstante, se realizaron pruebas estadísticas donde se hizo una comparación entre las sales nitrales y el aceite esencial de comino, lo cual, se evidencio que las sales nitrales son un mejor conservante dado que presenta una mayor actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*.

Finalmente con los ensayos ya realizados se llegó a la conclusión que el aceite esencial de comino es un antimicrobiano eficaz frente a *Escherichia coli* pero a concentraciones altas a partir del 1,25%, sin embargo este aceite presenta toxicidad a concentraciones mayores a las realizadas, es por esto que la hipótesis planteada no se logró, ya que al colocar en el embutido fresco de cerdo el aceite esencial de comino a la concentración que presenta actividad antimicrobiana como conservante no sería óptimo para el consumo humano.

Por consiguiente, se recomienda combinar con otro aceite esencial que presente actividad antibacteriana más potente, pero a menores concentraciones de este modo podrá ser utilizado para conservar embutidos.

Se sugiere ensayar otra forma de extracción para obtener una mayor cantidad aceite y por ende optimizar su concentración, de igual forma se puede hacer uso de distintas bacterias que pueden ser causantes de enfermedades transmitidas por alimentos.

Se plantea el uso de otros emulsificantes para que los aceites esenciales se pueden mezclar con mayor facilidad al momento de realizar la prueba de toxicidad y que no presente micropartículas suspendidas en el agua dado que estas podrían dificultar el conteo de la *Artemia salina* en el ensayo.

Se aconseja probar el tiempo de vida útil del embutido a diversas concentraciones del aceite esencial para demostrar si su efecto antimicrobiano podría reemplazar a los aditivos químicos.

Se propone estudiar el uso de aceite esencial de comino, así como también las ventajas y desventajas económicas para el mercadeo dentro del Ecuador como conservante natural para productos cárnicos.

## **Bibliografía**

- Alvarado, M. (2020). Comparación del efecto microbiano del aceite de albaca ( *Ocimum basilicum* ) frente al uso de nitritos en la elaboración de un embutido. [Universidad Agrarias del Ecuador]. In *Universidad Agraria del Ecuador*.  
[https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/ALVARADO\\_TOALA\\_MARITZA\\_ELIZABETH.pdf](https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/ALVARADO_TOALA_MARITZA_ELIZABETH.pdf)
- AOAC. (2020). *Instructivo técnico de análisis/ ensayo para recuento de coliformes y E. coli mediante técnica Petrifilm* (p. 12).
- Argote, F., Suarez, Z., Tobar, M., Perez, J., Hurtado, A., & Delgado, J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2, 52–60.
- Armas, G. (2012). Estudio de la actividad antibacteriana y tóxica del Kuiship (*Jacaranda copaia*). In *Tesis*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Bajracharya, G., & Tuladhar, S. (2012). Brine-shrimp Bioassay for Assessment of Anticancer Property of Essential Oils from Spices. *Nepal Journal of Science and Technology*, 12, 163–170. <https://doi.org/10.3126/njst.v12i0.6495>
- Briones, M., & Velásquez, P. (2020). *Extracción y aplicación de aceites esenciales de la feijoa como conservante en la elaboración de embutidos de masa fina*. UIVERSIDAD DE GUAYAQUIL.
- Cerda, I. (2021). *Análisis de las interacciones entre aceites esenciales y/o moléculas terpénicas incorporadas como aditivos alimentarios antimicrobianos con proteínas y lípidos de la carne roja*. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Cevallos, V., & Londoño, L. (2018). *ACEITES ESENCIALES EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS*. 1–13.

CODEX. (2021). *Norma para el comino*.

Cofre, D. (2022). *Aplicación de aceites esenciales como aditivos naturales en los sistemas alimentarios* [Universidad Técnica de Ambato]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>

Córdova, L., & Rosales, K. (2009). *Características organolépticas del embutido prensado de carne de alpaca (lama pacos) con diferentes porcentajes de insumos en el distrito de Junín*. Universidad Nacional del Centro del Perú.

Coronel, I., & Piedra, J. (2014). Estudio de las propiedades físicas y composición química de los aceites esenciaales de las hojas de *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. y *Piper pubinervulum* C. DC., y del rizoma de *Renealmia thyrsoides* subsp. *thyrsoides*. In *Tesis*.

Diario Oficial de la Unión Europea. (2008). Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios. *Diario Oficial de La Unión Europea*, L354, 16–33.

Doroteo, V., Díaz, C., Terry, C., & Rojas, R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 79(1), 13–20. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2013000100003&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v79n1/a03v79n1.pdf](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000100003&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v79n1/a03v79n1.pdf)

Duran, L. (2001). Aditivos naturales. *Arbor*, CLXVIII(661), 87–107.

Escalante, V. (2020). *Evaluación de la capacidad conservante del aceite esencial del clavo de olor (Syzygium aromaticum) aplicado en la elaboracion de un yogurt tipo II*. Universidad Politécnica Salesiana.

- Helander, I., Alakomi, H., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E., Gorris, L., & Von Wright, A. (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590–3595. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>
- Huq, T., Vu, K., Riedl, B., Bouchard, J., & Lacroix, M. (2015). Synergistic effect of gamma ( $\gamma$ )-irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat. *Food Microbiology*, 46(April), 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.013>
- Ibarra, M., & Paredes, E. (2013). Eficacia antibacterina in vitro de marco ( *Ambrosia arborescens* Mill) y paico ( *Chenopodium ambrosioides* L.) en una formulación cosmética. In *Tesis*. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- INEN (1338:2012), E. (2012). Nte Inen 1338:2012. In *Instituto Ecuatoriano de Normalización*.
- INEN (1529-2:2013), E. (2013). Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. In *Nte Inen 1529-2:2013*. <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte1/1529-2-1R.pdf>
- INEN 1344:96, E. (1996). NTE INEN 1344:96. In *Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) 1 344:96*.
- Jimenez, F., & Carballo, J. (2015). Principios básicos de elaboración de embutidos. *Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación*, 4, 1–20.
- Juárez, O. (2015). Contribución de preservantes naturales en la obtención de futuros alimentos, ligados a la alimentación saludable. *Producción Agropecuaria y Desarrollo*

*Sostenible*, 4, 65–75.

- Lagos, E. (2012). *Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial Thymus Vulgaris “Tomillo” frente a Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 causante de gingivitis* [Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna].  
[http://www.tesis.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/2304/38\\_2012\\_lagos\\_la\\_rosa\\_er\\_fac\\_s\\_farmacia\\_y\\_bioquimica.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.tesis.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/2304/38_2012_lagos_la_rosa_er_fac_s_farmacia_y_bioquimica.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- López, J., & Rojas, L. (2021). *Ingredientes de origen natural como alternativa para incrementar la vida útil de los productos cárnicos: Una revisión sistemática*.
- Márquez, J. (2012). Recuento de Staphylococcus aureus y detección de enterotoxinas estafilocócicas en queso blanco venezolano artesanal tipo telita expandido en mercados de la ciudad de Caracas. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(2), 112–115.
- Martinez, M., Castillo, G., Rosario, R., Flores, J., Lopez, J., Hernandez, R., & Del Carmen Lugo, E. (2011). Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 108(2), 481–487. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2069-6>
- Mercado, M., Ávila, J., Rey, M., Montoya, M., Gamboa, A., Carrascal, A., & Correa, D. (2012). Brotes por salmonella spp., staphylococcus aureus y Listeria monocytogenes asociados al consumo de pollo. *Biomedica*, 32(3), 3575–385.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.697>
- Mestanza, M. (2017). *Caracterización fisicoquímica de aceite esencial de romero (Rosmarinus officinales) de la región Amazonas*. Universidad Nacional.

- Milipore, C. (2018). 70192 *Mueller Hinton Broth ( M-H Broth )*.
- Mohamadein, M., Farrag, R., & Mekawey, A. (2015). Antiviral and antidermatophytic activity of a compound extracted from *Cuminum cyminum* seeds. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 8(2), 573–580. <https://doi.org/10.13005/bpj/800>
- Montiel, M., Ugarte, C., & Vargas, C. (2006). Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Médica Peruana*, 23(1), 15–20.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., & Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648–656.  
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.284.430>
- Myszograj, S., Bydałek, F., & Płuciennik, L. (2018). Evaluation of seasonal activity of various bacteria in a constructed wetland using AT4 and TTC tests. *Desalination and Water Treatment*, 134(December 2017), 188–198.  
<https://doi.org/10.5004/dwt.2018.22840>
- Ortuño, W. (2019). *Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de chilca (Baccharis latifolia) y cilantro (Coriandrum sativum) para el control de la Xanthomona sp., en condiciones in vitro* [Universidad Politécnica Salesiana].  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17341/1/UPS-CT008278.pdf>
- Özean, M., & Erkmen, O. (2001). Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *European Food Research and Technology*, 212(6), 658–660.  
<https://doi.org/10.1007/s002170100310>
- Pérez, M., & Ponce, E. (2013). Tecnología de Carnes. In *División de Ciencias Biológicas y de la Salud*.

- Pila, G., & Segarra, D. (2022). *Efecto antibiótico del aceite de Cannabidiol frente a Propionibacterium acnes y nivel de toxicidad frente Artemia salina*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Piñeiros, P., & Delgado, D. (2015). Aditivos Alimentarios definición ¿Por qué se utilizan ? *Fundación Vaca Para La Seguridad Alimentaria*, 1(1), 1–10.
- Pirliteanu, M., Miron, R., Bosioc, F., Tulcan, C., & Nicolin, A. (2020). Inhibitory Activity of Essential Oils on *Staphylococcus Aureus*. *Research Journal of Agricultural Science*, 52(3), 153–162.
- Poulsen, K. (2015). *Analisis De Semilla* (pp. 1–34).
- Publica, M. de S. (2021). Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica MSP. *Msp*, 2, 1–6.
- Rea, V. (2012). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial de Comino (*Cuminum cyminum*) como Potencial Bioconservador en la Carne de Trucha. [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. In *Facultad de Ciencias: Vol. Bachelor*.  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1622>
- Saeed, Y., Dadashi, M., Eslami, G., Goudarzi, H., Taheri, S., & Fallah, F. (2016). Evaluation of Antimicrobial Activity of Cuminum Cyminum Essential Oil and Extract against Bacterial Strains Isolated from Patients with Symptomatic Urinary Tract Infection. *Novelty in Biomedicine*, 4(4), 147–152.
- Saetama, V., Vera, L., Vanegas, M., Cruzat, C., & Brazales, D. (2018). Evaluación toxicológica de soluciones acuosas de ibuprofeno mediante bioensayos con Artemia salina, *Allium schoenoprasum L y Lactuca sativa*. *Revista Toxicológica*, 35, 112–118.
- Sedláková, J., Lojková, L., & Kubáň, V. (2003). Gas Chromatographic Determination of

- Monoterpenes in Spruce Needles (*Picea abies*, *P. omorica*, and *P. pungens*) after Supercritical Fluid Extraction. *Chemical Papers*, 57(5), 359–363.
- Singh, K., & Goswami, T. (2000). Thermal properties of cumin seed. *Journal of Food Engineering*, 45(4), 181–187. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00049-2)
- Solera, J., Goyeneche, B., Pozuelo, S., Roldán, S., & González, N. (2006). *Conveniente Sistema De Perlas Para Almacenar y Reactivar Cultivos de Bacteria*.
- Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos : una mirada en colombia. *Revista Salud Uninorte*, 32(1), 1–13.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-55522016000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0120-55522016000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522016000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-55522016000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Sowbhagya, H., Sathyendra Rao, B., & Krishnamurthy, N. (2008). Evaluation of size reduction and expansion on yield and quality of cumin (*cuminum cyminum*) seed oil. *Journal of Food Engineering*, 84(4), 595–600.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.001>
- Suarez, L. (2015). *Aplicación de aceite esencial de naranja para la reducción de microorganismos en canales de res faenada en el camal de Paccha. 1*, 1–27.
- Sugawara, E., & Nikaido, H. (2014). Properties of AdeABC and AdeIJK efflux systems of *Acinetobacter baumannii* compared with those of the AcrAB-TolC system of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7250–7257.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.03728-14>
- Tabarraei, H., Hassan, J., & Mosavi, S. (2019). Determination of LD50 of some essential oils and histopathological changes in short-term exposure to one of them in rainbow trout (

*Oncorhynchus mykiss* ). *Toxicology Research and Application*, 3, 1–7.

<https://doi.org/10.1177/2397847318820719>

Tassou, C., Koutsoumanis, K., & Nychas, G. J. E. (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33(3–4), 273–280. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00047-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00047-8)

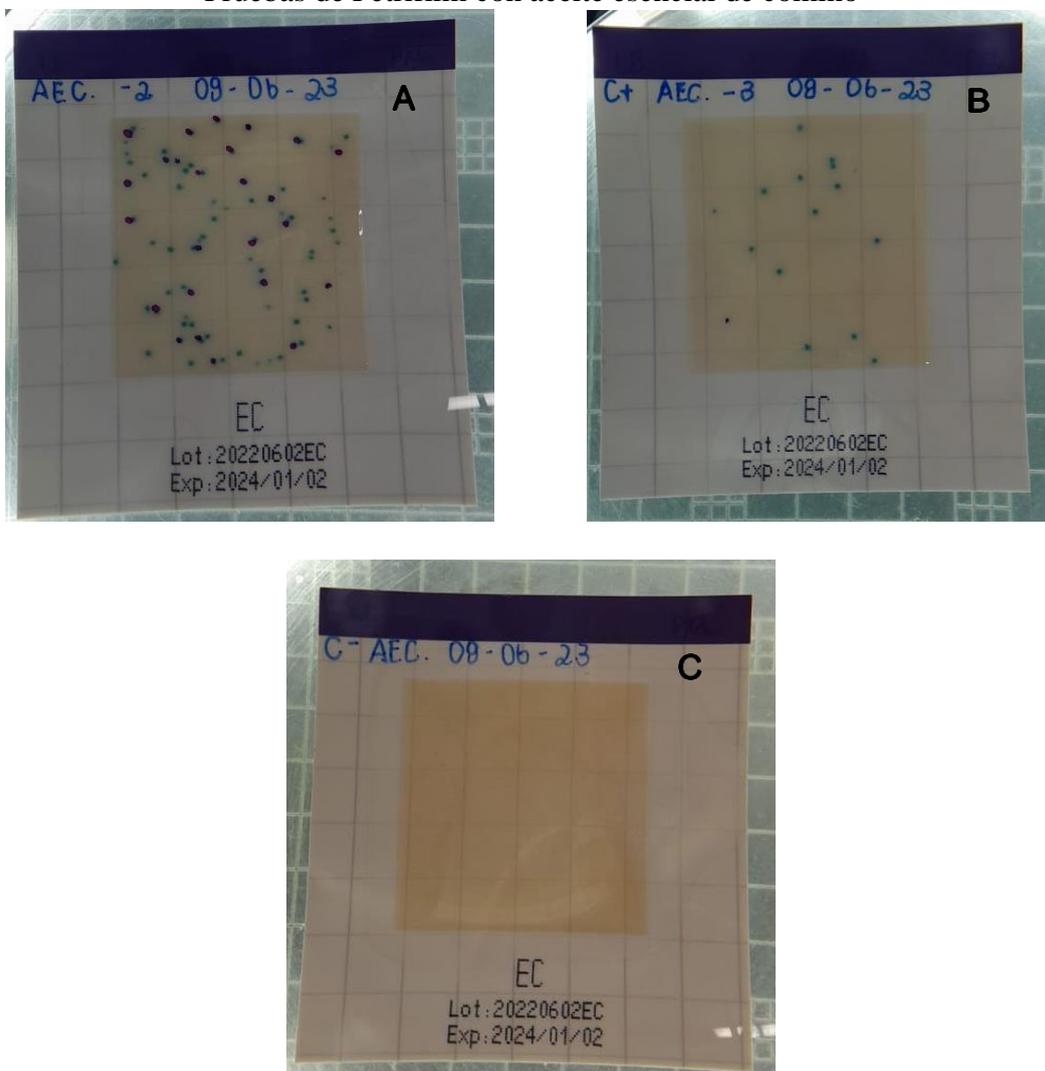
Teneva, D., Denkova, Z., Goranov, B., Denkova, R., Kostov, G., Atanasova, T., & Merdzhanov, P. (2016). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Black Pepper, Cumin, Coriander and Cardamom Against Some Pathogenic Microorganisms. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 20(2), 39–52. <https://doi.org/10.1515/aucft-2016-0014>

Tovar, V. (2018). *Actividad antibacteriana y antioxidante del aceite esencial extraído del tronco y corteza de la especie Handroanthus chrysanthus (Guayacán)*. Universidad Central del Ecuador.

Yalta, M. (2019). *Efecto de aceites esenciales de Huacatay ( Tagetes minuta L .) y mariasacha ( Tagetes elliptica Sm .) como conservante en la carne de cerdo*. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

## 6 Anexos

### Pruebas de Petrifilm con aceite esencial de comino

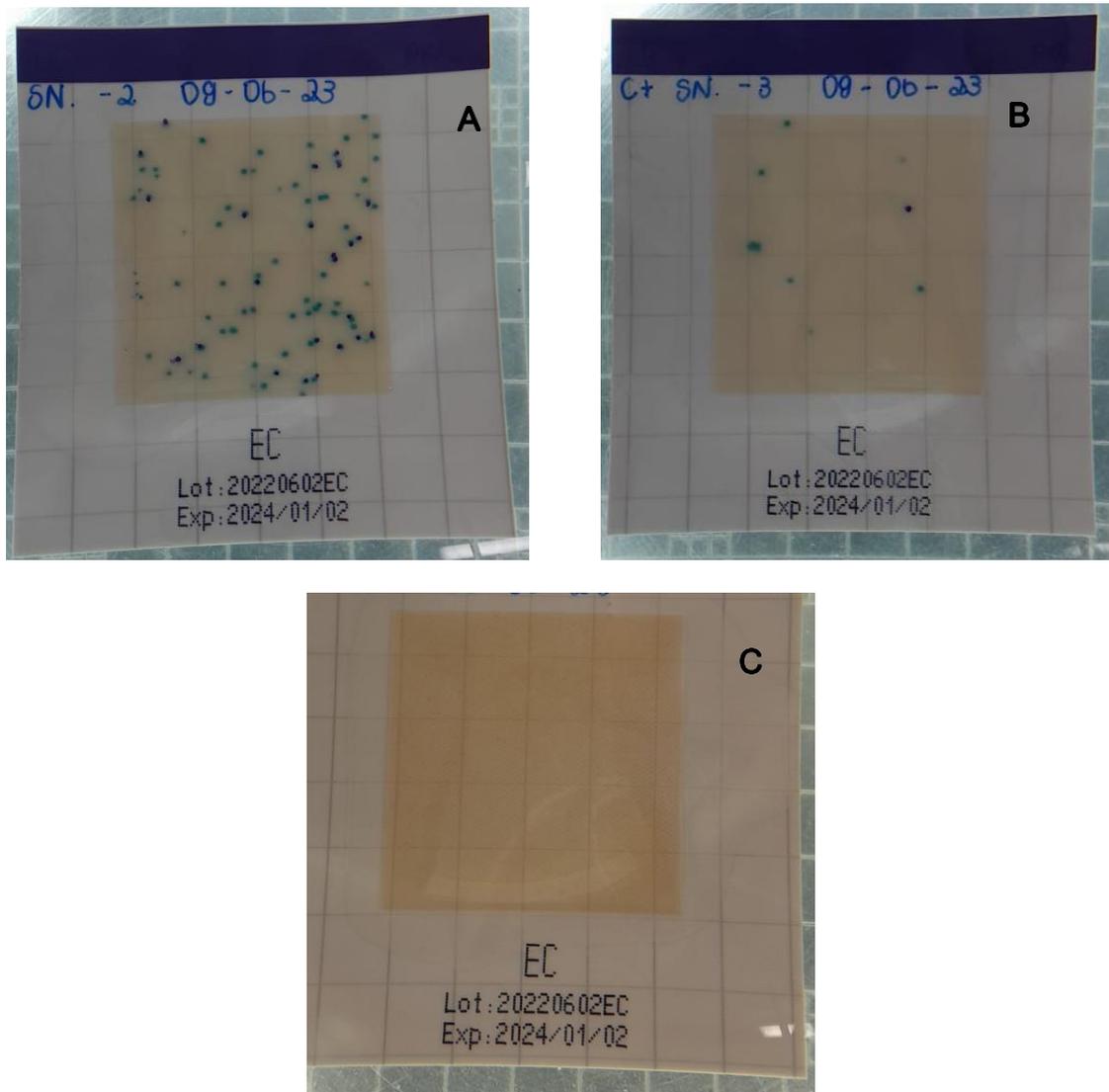


#### Anexo 1 Pruebas Petrifilm aceite esencial

A: prueba del aceite esencial de comino en Petrifilm; B: control positivo del aceite esencial de comino; C: control negativo del aceite esencial de comino

Fuente: (Las autoras, 2023)

## Pruebas de Petrifilm con sales nitrates

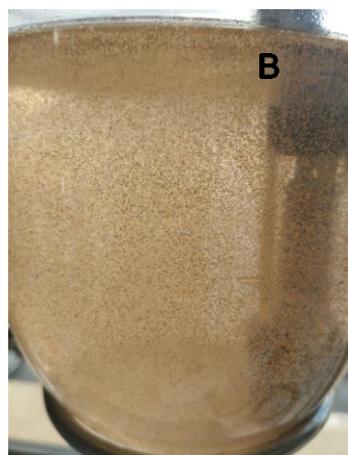


### Anexo 2 Pruebas Petrifilm sales nitrates

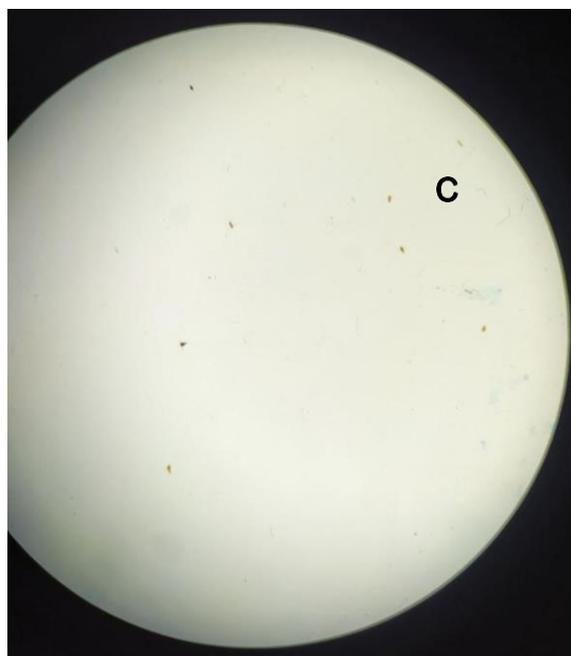
A: prueba de sales nitrates en Petrifilm; B: control positivo de sales nitrates; C: control negativo de sales nitrates

Fuente: (Las autoras, 2023)

### Ensayo de toxicidad con *Artemia salina*



Q

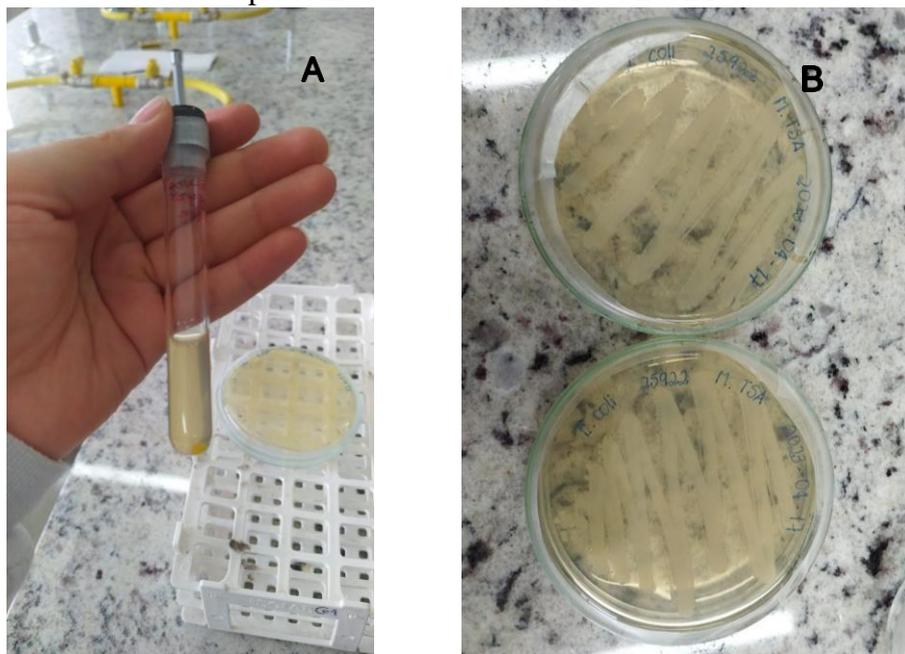


Anexo 3 Ensayo de toxicidad

A: Equipo para eclosión de *Artemia salina*; B: *Artemia* ya eclosionada; C: Visualización de *Artemia salina* en el Macroscopio

Fuente: (Las autoras ,2023)

### Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922

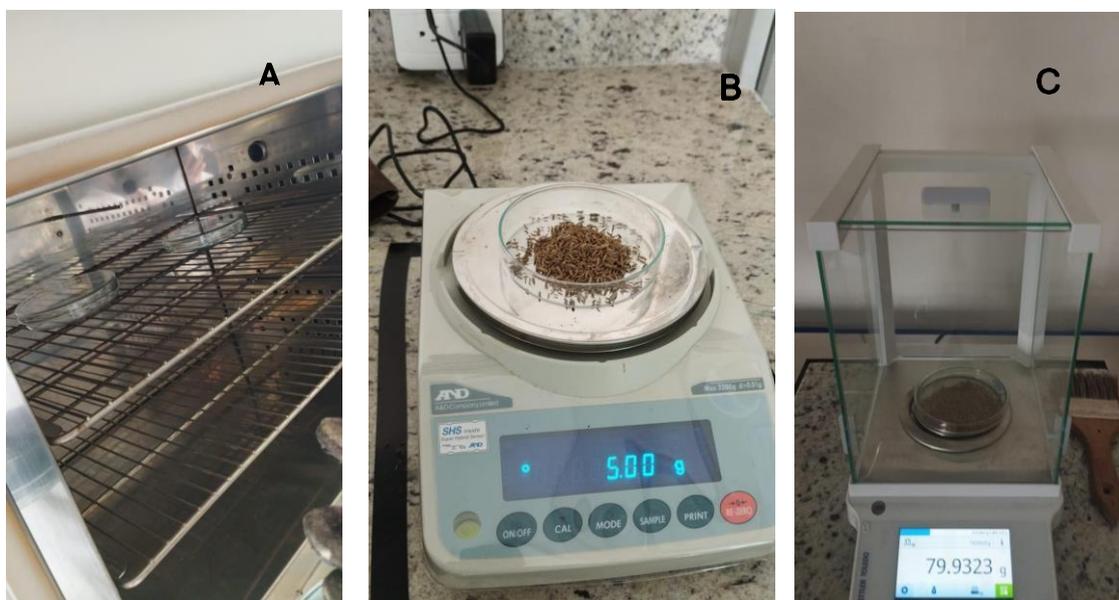


Anexo 4 Activación de la cepa bacteriana

A: activación de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922; B: resiembra de la cepa bacteriana

Fuente: (Las autoras,2023)

### Determinación de la humedad

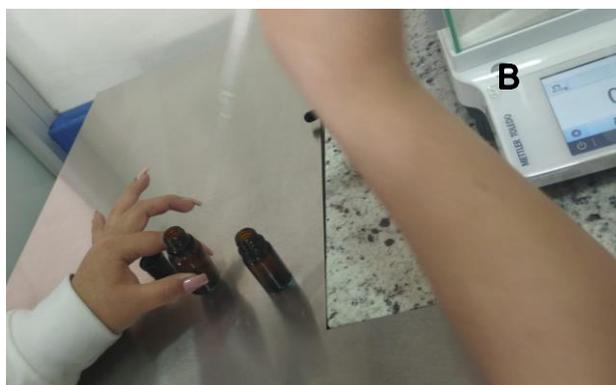
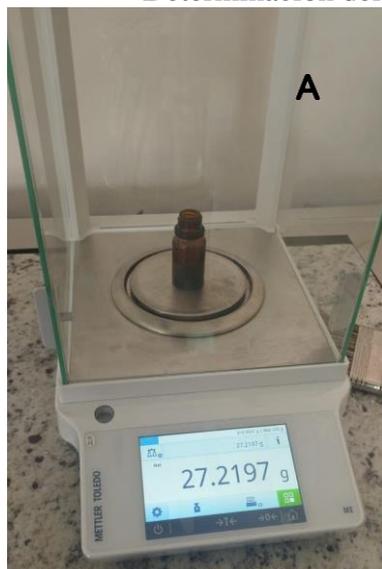


Anexo 5 Determinación de la humedad

A: secado de la caja Petri en la estufa; B: pesado de la semilla antes del secado; C: pesaje de la semilla después de 3 horas de secado

Fuente: (Las autoras,2023)

## Determinación del rendimiento del aceite esencial de comino



### Anexo 6 Determinación del rendimiento del aceite esencial

A: pesaje del frasco vacío; B: traspaso del aceite esencial al frasco; C: pesaje del frasco con aceite

Fuente: (Las autoras, 2023)