

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE AGRONOMIA
ESCUELA DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

EFEECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE CITRICOS
Y SU EFECTO SOBRE LA CALIDAD DEL CAMARON FRESCO

PROYECTO DE GRADUACION PRESENTADO A LA ESCUELA DE
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL
GRADO DE LICENCIATURA EN TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Ma ELIZABETH ARIAS ROSABAL

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

1995

DEDICATORIA

A DIOS,

A MIS PADRES,

A FEDE, LAURA, OSCAR Y ROBERTO,

A ALVARO.

AGRADECIMIENTO

A Dios y a la Virgen por permitirme concluir una etapa más de mi vida.

A mis padres por su amor, por su ejemplo de esfuerzo y trabajo incansable.

A Fede, Laura, Oscar y Roberto por su cariño y su apoyo en todo lo que hago.

A Alvaro por su amor y ayuda incondicional en la elaboración de la tesis.

A don Carlos Herrera por su entrega al proyecto y su total disposición en todo momento.

A los esposos Gené por su interés, guía y apoyo en todo momento.

A Eric Wong por sus sabios consejos.

A Doña María Isabel y Randall por la asesoría estadística.

A Lissett Rojas por su buena disposición a lo largo del proyecto. A la empresa Langostinos del Pacífico por facilitarme los langostinos para el proyecto.

A don Uladislavo Guevara por su buena disposición y por su contribución con langostinos para los estudios preliminares del proyecto.

A mis compañeros Randall García, Ana María Slattery, Alejandro Palacios, Susan Artiñano, Randall Mora, Viviana Castro, Luis Eladio González, Luciana Jiménez, Darling Berrocal, Julio César Ortega, Alvaro Sanabria y José Gerardo por los momentos inolvidables que compartimos durante mi vida universitaria.

A Irene Córdoba, Mariadilia Sánchez, Rosibel y Oscar Castillo por compartirme información de mucha ayuda y por su buena disposición en todo momento.

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito
parcial para optar al grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos

Ma ELIZABETH ARIAS ROSABAL

Aprobado por:

M.Sc. Carlos Herrera Ramírez
Director del Proyecto

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'CHERRERA', written over a horizontal line.

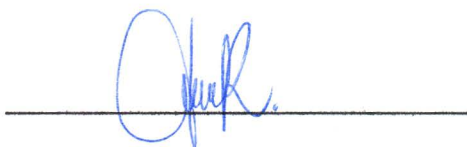
M.Sc. Jose Antonio Gené Valverde
Profesor Asesor

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'JAV', written over a horizontal line.

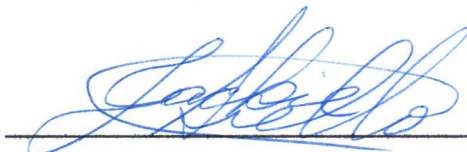
M. Sc Florencia Antillón Guerrero
Profesora Asesora

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'FROG', written over a horizontal line.

Lic. Lissette Rojas Morales
Profesor Designado

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'LROJAS', written over a horizontal line.

Lic. Jacqueline Aiello Ramírez
Presidente del Tribunal

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'JAIELLO', written over a horizontal line.

INDICE GENERAL

	Página
Dedicatoria	i
Agradecimiento	ii
Tribunal examinador	iii
Indice general	iv
Indice de cuadros	vii
Indice de figuras	viii
Resumen	ix
CAPITULO 1 : INTRODUCCION	1
1.1. JUSTIFICACION	1
1.2. OBJETIVOS	6
1.2.1. Objetivo general	6
1.2.2. Objetivos específicos	6
CAPITULO 2 : MARCO TEORICO	8
2.1. DESECHOS CITRICOS Y SUBPRODUCTOS	8
2.2. SEMILLAS DE CITRICOS	11
2.3. EXTRACTOS CITRICOS	13
2.4. PRODUCTOS COMERCIALES A BASE DE SEMILLAS DE CITRICOS	15
2.4.1. Azutrex	15
2.4.2. Kilol DF-100	16
2.5. CAMARONES	20
2.5.1. Situación en Costa Rica	20
2.5.2. Generalidades	23
2.5.3. Vida útil del camarón	24
2.5.4. Microbiología del camarón	32
2.5.5. Características de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	34
2.5.6. Preservadores de frescura	37
2.6. CONTROL DE CALIDAD: METODOS DE EVALUACION DE PESCADO Y MARISCOS	38
CAPITULO 3 : METODOLOGIA	41
3.1. ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE SEMILLAS DE CITRICOS Y DE EXTRACTOS OBTENIDOS CON SOLVENTES ORGANICOS	42

3.1.1.	Evaluación del efecto antimicrobiano de semillas de naranja (<i>Citrus sinensis</i>), grapefruit (<i>Citrus paradisi</i>) y limón (<i>Citrus aurantifolia</i>)	42
3.1.2.	Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos de semillas de cítricos	42
3.1.3.	Comparación entre los extractos obtenidos y el Azutrex, mediante cromatografía de capa fina sobre gel de sílice ...	44
3.2.	ESTUDIO DEL EFECTO DEL pH, CONCENTRACION Y TIEMPO DE CONTACTO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL KILOL	45
3.2.1.	Evaluación del efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del Kilol	45
3.2.2.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria del Kilol	45
3.2.3.	Determinación del tiempo de contacto óptimo del Kilol aplicado en camarones frescos	46
3.3.	ESTUDIO DE LA CALIDAD FISICO-QUIMICA Y MICROBIOLOGICA DEL CAMARON FRESCO TRATADO CON KILOL Y ALMACENADO EN HIELO	47
3.3.1.	Evaluación del pH	48
3.3.2.	Evaluación de la presencia de melanosis	49
3.3.3.	Determinación de bases volátiles nitrogenadas totales	49
3.3.4.	Evaluación microbiológica	50
3.4.	ANALISIS ESTADISTICO	50
CAPITULO 4 : RESULTADOS Y DISCUSION		52
4.1.	ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE SEMILLAS DE CITRICOS Y DE EXTRACTOS OBTENIDOS CON SOLVENTES ORGANICOS	52
4.1.1.	Evaluación del efecto antimicrobiano de semillas de naranja (<i>Citrus sinensis</i>), toronja (<i>Citrus paradisi</i>) y limón (<i>Citrus aurantifolia</i>)	52
4.1.2.	Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos de semillas de cítricos	53
4.1.3.	Comparación entre los extractos obtenidos y el Azutrex, mediante cromatografía de capa fina sobre gel de sílice ...	56
4.2.	ESTUDIO DEL EFECTO DEL pH, CONCENTRACION Y TIEMPO DE CONTACTO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL KILOL	57
4.2.1.	Evaluación del efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del Kilol	57
4.2.2.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria del Kilol	60

	Página
4.2.3. Determinación del tiempo de contacto óptimo del Kilol aplicado en camarones frescos	62
4.3. ESTUDIO DE LA CALIDAD FISICO-QUIMICA Y MICROBIOLOGICA DEL CAMARON FRESCO TRATADO CON KILOL Y ALMACENADO EN HIELO	64
4.3.1. Evaluación del pH	64
4.3.2. Evaluación de la presencia de melanosis	66
4.3.3. Determinación de bases volátiles nitrogenadas totales ...	69
4.3.4. Evaluación microbiológica	72
CAPITULO 5 : CONCLUSIONES	76
CAPITULO 6 : RECOMENDACIONES	79
CAPITULO 7 : BIBLIOGRAFIA	80
APENDICE A. ENCUESTA TELEFONICA REALIZADA SOBRE EL USO DE KILOL EN EMPRESAS COMERCIALIZADORAS DE MARISCOS	87
APENDICE B. PROMEDIOS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL ESTUDIO DE VIDA UTIL DE CAMARONES TRATADOS CON KILOL	89

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.1. Características del Kilol, Citrex y Azutrex	2
Cuadro 1.2. Exportación de productos marinos	4
Cuadro 2.1. Subproductos cítricos	11
Cuadro 2.2. Contenido porcentual de semillas en frutas cítricas y pulpa seca .	12
Cuadro 2.3. Porcentaje de ácidos grasos en semillas de naranja y grapefruit .	13
Cuadro 2.4. Formulación del Azutrex	16
Cuadro 2.5. Dosis (mL/L) de Kilol recomendado para productos alimenticios y áreas de proceso	20
Cuadro 2.6. Rechazo de camarones de exportación entre 1987 y 1990	22
Cuadro 4.1. Efecto antimicrobiano de semillas de cítricos y extractos obtenidos	53
Cuadro 4.2. Valores de pH de los extractos etéreos, acetónicos y metanólicos acidificados	54
Cuadro 4.3. Diámetros de los halos de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> obtenidos al variar el pH del Kilol	58
Cuadro 4.4. Diámetros de los halos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> obtenidos al variar el pH del Kilol	59
Cuadro 4.5. Concentración mínima inhibitoria de Kilol para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
Cuadro 4.6. Concentración mínima inhibitoria de Kilol para <i>Staphylococcus aureus</i>	61

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1. Diagrama de flujo y balance de materiales de desechos generados en la elaboración de jugos cítricos	9
Figura 2.2. Diagrama de flujo para la obtención de subproductos cítricos ...	10
Figura 2.3. Estructuras de los compuestos aislados por HPLC en el Kilol	18
Figura 2.4. Mecanismo de reacción para la producción de melaninas	31
Figura 4.1. Efecto de la concentración de Kilol sobre el diámetro de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Figura 4.2. Recuento total superficial según tiempo de contacto entre los camarones y el Kilol	64
Figura 4.3. Efecto del Kilol sobre el pH del músculo del camarón en función del tiempo	66
Figura 4.4. Efecto del Kilol sobre el oscurecimiento del músculo del camarón en función del tiempo	69
Figura 4.5. Efecto del Kilol sobre la producción de bases volátiles totales en el músculo del camarón en función del tiempo	71
Figura 4.6. Recuentos totales superficiales en el tejido del músculo de camarones tratados con Kilol en función del tiempo	75

RESUMEN

Se realizó una evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de cítricos y de extracciones de estas con solventes orgánicos: éter etílico, acetona y metanol. El efecto antimicrobiano se determinó mediante la técnica de difusión en agar.

Además, se realizó un estudio de vida útil para camarones tratados con dos concentraciones de Kilol: 1 / 100 y 1 / 20 durante un tiempo de contacto de 30 minutos.

De la evaluación el efecto antimicrobiano de semillas molidas de naranja, grapefruit y limón se obtuvo que no hubo efecto antimicrobiano sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Por otra parte los extractos de semillas de naranja, a diferencia del producto comercial a base de extractos de semillas de cítricos, no mostraron efecto antimicrobiano alguno sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium sp.*, *Saccharomyces sp.* y *Escherichia coli*.

La actividad antimicrobiana del Kilol-DF 100 no se ve afectada al variar el pH del mismo. Sin embargo al variar la concentración sí existe diferencia significativa ($p=0.0001$) sobre la actividad antimicrobiana.

Se obtuvo que los microorganismos Gram negativos son más resistentes al Kilol que los Gram positivos; la concentración mínima inhibitoria de Kilol para *Staphylococcus aureus* es de 1 / 8000 y para *Pseudomonas aeruginosa* es de 1 / 20.

El tiempo de contacto Kilol-camarones es significativo ($p=0.0001$). Se determinó que el tiempo de contacto óptimo es de 30 minutos.

Del estudio de vida útil realizado para camarones (*Penaeus vannamei*) tratados con Kilol en concentraciones de 1 / 20 y 1 / 100, con un tiempo de contacto de 30 minutos se concluye que:

El pH de camarones (*Penaeus vannamei*) tratados con Kilol es significativamente diferente ($p=0.0001$) a través del tiempo y para cada concentración de Kilol que se utilice.

Las bases volátiles nitrogenadas totales (BVNT) en camarones (*Penaeus vannamei*) tratados con Kilol son significativamente diferentes ($p=0.0001$) a través del tiempo y para cada concentración de Kilol que se utilice.

Los recuentos microbiológicos de los camarones (*Penaeus vannamei*) tratados con Kilol son significativamente diferentes ($p=0.0001$) a través del tiempo y para cada concentración de Kilol que se utilice.

La reducción de microorganismos en el camarón utilizando una concentración de Kilol de 1 / 20 es de 2 logaritmos, mientras que para una concentración de 1 / 100 es de 1 logaritmo.

El fenómeno de la melanosis para los camarones tratados con Kilol, sin importar la concentración, se presenta en menos de 3 días. La melanosis que se presenta en camarones tratados con Kilol no es causada por efecto de los microorganismos sino, por una reacción que se ve favorecida con la adición de Kilol.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1. JUSTIFICACION

En virtud de los grandes volúmenes de sustancias eliminadas por la agroindustria, junto con el creciente problema de la contaminación ambiental, existe interés a nivel mundial sobre el control de ambos aspectos, enfocado hacia una disminución de la contaminación ambiental, y por ende, necesariamente a una reducción de los desechos generados por la industria.

Una alternativa para reducir estos volúmenes de desechos industriales, es su utilización para elaborar subproductos útiles para el ser humano. Esto implica una serie de estudios sobre usos potenciales de los desechos, considerando aspectos tecnológicos, nutricionales y económicos relacionados con el aprovechamiento de dichas sustancias. En la elaboración de jugos cítricos, el volumen de desechos generados alcanzan fácilmente al 40 - 50 % de la materia prima procesada (Garrido, 1992)

En la actualidad, Costa Rica importa productos comerciales a base de extractos de semillas de cítricos que son utilizados en la industria alimenticia como antimicrobianos. Dichos productos se pueden adquirir comercialmente bajo el nombre de Kilol, Citrex y Azutrex, estos productos al estar constituidos por extractos de semillas de naranja, grapefruit y mandarina; como afirma PROVEQUI (1994) presentan ciertas ventajas: (1) son productos

naturales, (2) de amplio espectro de acción, (3) no son corrosivos, (4) son biodegradables, (5) no dañan el medio ambiente y (6) no tóxicos, entre otras.

En el Cuadro 1.1. se resumen algunas de las características que presentan los productos comerciales a base de extractos de cítricos. El pH que presentan se encuentra en un rango entre 2,5 - 3,5 por lo que se consideran productos ácidos. El pH que presentan estos extractos de cítricos no sólo se debe a la fuente de la que provienen sino también a que en su formulación se incluyen mezclas de ácidos (PROVEQUI, 1994).

Cuadro 1.1. Características del Kilol, Citrex y Azutrex

Producto	Fuente	Fórmula	pH	Uso	Efecto
Kilol	Extracto de semillas de toronja	Biomasa compleja	2,5 -3,0	Pescado, camarones, productos agrícolas, cosméticos y veterinaria.	Bactericida fungicida y antioxidante
Citrex	Extracto de semillas naranja y de mandarina	Biomasa compleja	2,5-3,5	Agricultura, nutrición animal y desinfección	Bactericida y fungicida
Azutrex	Extracto de semillas de cítricos	Biomasa compleja	2,5-3,5	Jugo caña de azúcar	Bactericida y fungicida

Fuente: PROVEQUI, 1994.

Según Monge (1995), al momento en que se realizó esta investigación, ninguno de estos productos se encontraba registrado en el Departamento de Control de Alimentos del

Ministerio de Salud. Sólo el Azutrex tenía en trámite el registro correspondiente. En una encuesta telefónica realizada el 19 de abril de 1995 a 27 compañías exportadoras de mariscos, cuya lista se incluye en el apéndice A, se encontró, que un 30 % de estas no usan Kilol en sus productos. Un 52 % de las empresas lo están usando y el 18 % lo usaron y descontinuaron su uso. Un 70 % de las compañías consultadas informaron haber usado Kilol alguna vez.

En la encuesta realizada se encontró que no está estandarizado el modo de empleo del Kilol en los mariscos, sino que varía mucho de una empresa a otra.

En Costa Rica, los mariscos se exportan principalmente a: Estados Unidos, Canadá, España, Japón, México, Francia, Hong Kong, Puerto Rico, Aruba y Honduras entre otros (CENPRO, 1993). Durante el período entre 1° de enero de 1994 y el 30 de abril de 1995, 77 empresas exportaron pescado (Ministerio de Comercio Exterior, 1995). La situación actual de exportación de productos marinos en Costa Rica se resume en el Cuadro 1.2. del mismo se concluye que aunque la cantidad de pescado fresco que se exporta es mayor en comparación con la de los demás productos marinos, el camarón presenta el mayor ingreso.

Cuadro 1.2. Exportación de productos marinos

Producto	Cantidad (en miles de kg)	Monto (en miles de \$)
Pescados frescos	4 974	29 539
Camarones frescos	2 155	33 247
Langostas frescas	22	714
Los demás crustáceos y moluscos frescos	256	5 393

Fuente: Acumulado de exportaciones a setiembre de 1993
 Ministerio de Economía y Comercio
 Dirección General de Estadística y Censos

La disminución de la frescura del camarón se debe a la descomposición de las proteínas y la oxidación de sus grasas y pigmentos, mediante la acción de las enzimas y bacterias, ocasionando el deterioro de la carne. Este deterioro se evita mediante el uso de agentes preservantes en cantidades permisibles. El preservante por su efecto químico, inhibe la acción de las enzimas, y por su efecto bacteriostático o bactericida, no permite el desarrollo bacteriano (Maza, 1986).

La frescura del camarón es determinada por métodos de control físico, químico y microbiológico. Entre los métodos físicos se encuentra la medición de pH en el tejido muscular. El pH del camarón fresco está comprendido entre 6,8 - 7,9 mientras que al disminuir la frescura éste presenta un pH mayor de 8,0 (Maza, 1986).

Una gran variedad de compuestos químicos o grupos de compuestos se acumulan en el tejido muscular del camarón, como productos intermedios o finales de diferentes cambios

bioquímicos que ocurren después de su muerte o como resultado de la acción de bacterias exógenas. Las cantidades formadas de estos productos pueden ser utilizadas como índices de frescura o descomposición. Los valores de 20 a 23 mg % de bases volátiles nitrogenadas Totales (BVNT) corresponde al camarón fresco y los de baja frescura son de 30 a 45 mg % (Maza, 1986).

El crecimiento bacteriano es la principal causa de deterioro del camarón. Para determinar la actividad bacteriana en el camarón el método más sencillo y práctico es el conteo total de bacterias a temperatura ambiente. La materia prima fresca contiene entre 1×10^4 UFC / ga 1×10^5 UFC / g y el límite considerable máximo es de 1×10^6 UFC / g (Maza, 1986)

Con base en lo anterior, se justifica la presente investigación sobre el efecto antimicrobiano de los extractos de semillas de cítricos y su efecto sobre la calidad físico, química y microbiológica del camarón, ya que:

(1) En algunos casos, se está usando como preservante un producto no registrado en el Departamento de Control de Alimentos del Ministerio de Salud.

(2) El pH del producto en estudio cuestiona si el efecto del mismo se debe a la alta acidez o a la presencia de un agente activo.

(3) Las empresas exportadoras de mariscos podrían reducir sus gastos conociendo la concentración mínima inhibitoria del producto que utilizan como preservante.

(4) Los volúmenes de mariscos que se exportan en Costa Rica son considerables.

(5) No existe un estudio de este tipo.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano de extractos de semillas de cítricos y el efecto de un producto comercial a base de extractos de semillas de grapefruit sobre la calidad físico, química y microbiológica del camarón fresco (*Penaeus vannamei*).

1.2.2. Objetivos específicos

- Estudiar el efecto antimicrobiano de semillas de naranja, limón y grapefruit sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Estudiar el efecto antimicrobiano de extractos de semillas de naranja obtenidos con éter de petróleo, acetona, metanol y una mezcla de ácidos, sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces sp.*, *Penicillium sp.* y *Escherichia coli*.
- Evaluar el efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de un producto comercial a base de extractos de semillas de grapefruit.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de un producto comercial a base de extractos de semillas de grapefruit sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

- Determinar el tiempo de contacto óptimo de un producto comercial a base de extractos de semillas de grapefruit aplicado en camarones frescos.
- Evaluar los cambios en el pH, luminosidad (melanosis), bases volátiles nitrogenadas totales y recuento total microbiológico del camarón fresco tratado con un producto comercial a base de extractos de semillas de grapefruit, durante un periodo de 13 días y almacenados en hielo a 0°C.

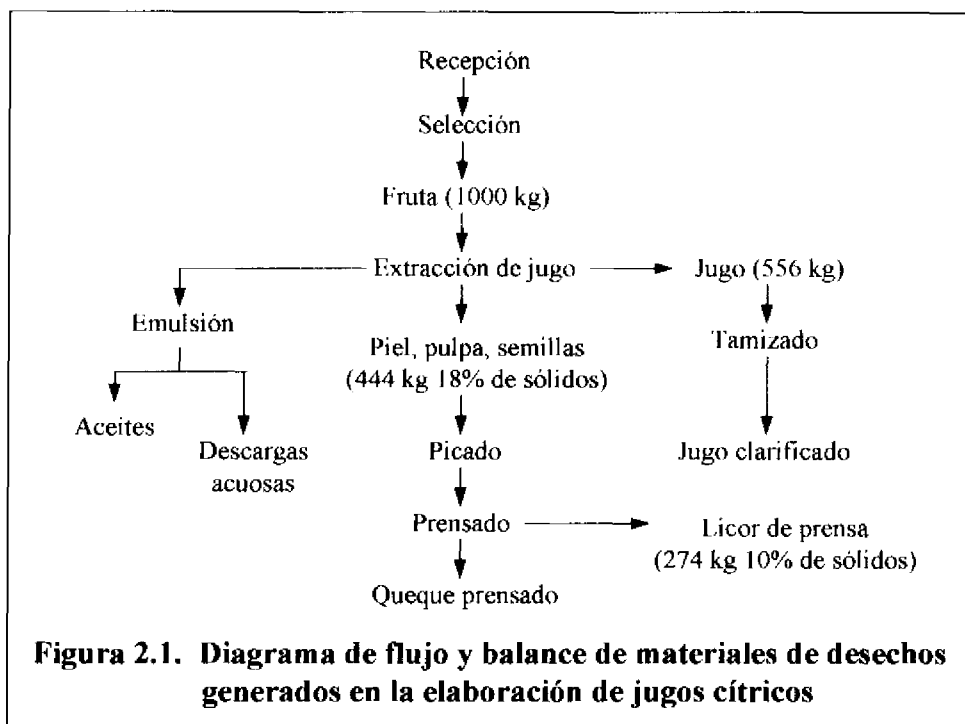
CAPITULO 2

MARCO TEORICO

2.1. DESECHOS CITRICOS Y SUBPRODUCTOS

La producción de cítricos en el mundo reportada por 20 países fue cerca de 58 millones de T.M. para el período de cosecha 1993-94 (Florida Department of Agriculture, 1995). Estados Unidos y Brazil produjeron el 60 % de las naranjas del mundo y procesaron el 85 % de su producción (Braddock, 1995) . Sin embargo, una producción significativa está emergiendo de los países del Mediterráneo. Con estas cantidades significativas de fruta procesada para la obtención de jugo, ha nacido una industria de subproductos para utilizar las cáscaras residuales, membranas, semillas y otros componentes (Braddock, 1995).

Según Garrido (1992), en la elaboración de jugos de naranja el 44 % de la fruta elaborada se elimina en forma de pulpa, semillas y piel (Figura 2.1). Esta mezcla se puede aprovechar para otros productos cítricos, disminuyendo así, el volumen de desechos al 24,7 % que se elimina en forma de licor de prensa, el que puede ser concentrado para obtener melazas, o bien someterlo a fermentaciones para obtener alcoholes u otros productos fermentados.

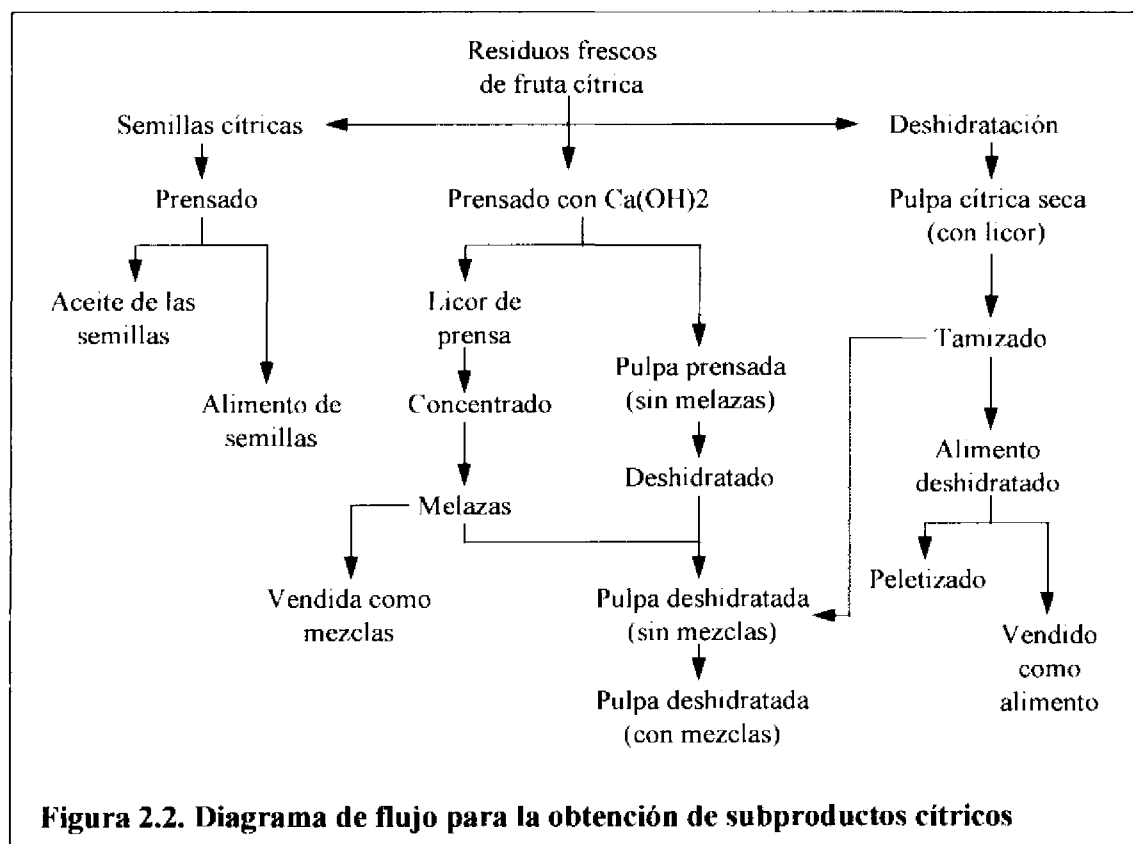


Fuente: Garrido et al., 1992

Existe un gran número de productos derivados de desechos cítricos que tienen un mercado potencial como subproducto de la industria citrícola (Garrido et al., 1992). Históricamente, el aceite de limón es el producto más antiguo, inicialmente fue el producto principal y luego se elaboró como subproducto. Actualmente, la variedad de subproductos es enorme.

Dada la compleja estructura morfológica de los frutos cítricos, se deben aplicar complejos procedimientos (Figura 2.2) para procesar todos los desechos de la industria. Para obtener los subproductos se utilizan operaciones de evaporación, destilación, secado,

prensado, cristalización, filtración, tratamientos alcalinos, ácidos y térmicos, fermentaciones y extracciones con solventes orgánicos (Garrido et al., 1992).



Fuente: Garrido et al., 1992

Cuadro 2.1. Subproductos de cítricos

<p>1. Subproducto de piel entera o pericarpio</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Corteza seca ➤ Pastas saborizantes ➤ Mermeladas ➤ Piel deshidratada ➤ Cítricos curados ➤ Confitos cítricos ➤ Flavonoides
<p>2. Subproductos de flavedo o epicarpio</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Aceites esenciales ➤ Pigmentos
<p>3. Subproductos de albedo o mesocarpio</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Pectinas ➤ Pectinas demetoxiladas ➤ Pectato de pulpa
<p>4. Subproductos de pulpa o endocarpio</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Vesículas de jugo
<p>5. Subproductos de residuos de pulpa</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Pulpa deshidratada ➤ Melazas cítricas ➤ Ácido cítrico ➤ Jarabe rico en fructosa ➤ Productos fermentados
<p>6. Subproductos de semillas</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Aceite de semillas ➤ Queque de semillas

Fuente: Garrido et al., 1992

2.2. SEMILLAS DE CITRICOS

Según Braddock (1995) el aceite de semilla de cítricos no había sido obtenido comercialmente por muchos años debido a que se requería de muchas semillas para obtener una extracción eficiente. Aún con un volumen de fruta muy grande la masa de semillas por caja de fruta es pequeña. Para una exitosa extracción de aceite de semillas se debe de recolectar semillas de cierto número de plantas procesadoras, llevarlas a un solo lugar y usar la deshidratación para prevenir el crecimiento de hongos, antes de extraer el aceite. La

cantidad de semillas en varias frutas cítricas varía desde 0,2 % para las llamadas variedades de pocas semillas hasta 7 % para las grapefruits (*Citrus paradisi*) (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Contenido porcentual de semillas en frutas cítricas y pulpa seca

Tipo de Fruta	Semillas % m/m	
	Fruta entera ^a	Pulpa Seca ^b
Grapefruit Duncan	4,8	15,2
Grapefruit Marsh	0,3	1,9
Naranja Parson Brown	2,4	7,5
Naranja Hamlin	0,4	1,8
Piña	3,2	11,2
Naranja Valencia	0,7	3,2
Naranja Acida	4,0	--
Tangerina Dancy	1,0	--
Limón Silicano	0,7	--
Lima Mexicana	2,0	--
Lima Persa	0,1	--

^a Base peso seco

^b Base 10 % humedad

Fuente: Braddock, 1995.

La composición de la semilla es de 40 % aceite en base seca. La composición de los ácidos grasos de las semillas de naranja (*Citrus sinensis*) y grapefruit se muestra en el Cuadro 2.3. Los aceites de diferentes variedades son similares en composición excepto que las semillas de limón (*Citrus aurantifolia*) y lima (*Citrus reticulata*) tienen de 2-3 veces más ácido linoleico que las otras variedades. La semilla luego de la extracción del aceite contiene 25 % de proteína y se ha determinado que contiene cantidades significativas de

glicina, cisteína, metionina y triptofano. Además, las semillas contienen cantidades significativas (0,5-1 % en base seca) del muy amargo e insoluble en agua triterpenoide, limonina y sus glicósidos, los cuales pueden tener aplicaciones quimioterapéuticas (Braddock, 1995), lo cual concuerda con lo citado por Ozaki (1995).

Cuadro 2.3: Porcentaje de ácidos grasos en semillas de naranja y grapefruit

Acidos Grasos	Naranja	Grapefruit
Palmitico	26	36
Palmitoleico	0,1	0,3
Estearico	1	5
Oleico	18	28
Linoleico	32	40
Linolénico	2	6

Fuente: Braddock, 1995.

2.3. EXTRACTOS CITRICOS

Se ha demostrado que diferentes extractos de plantas poseen efecto inhibitorio sobre algunos microorganismos al utilizarlos en la preparación de alimentos (Mata, 1992, Rivera, 1994). Este efecto puede deberse a uno o más componentes que actúan directamente sobre los microorganismos, o indirectamente modificando condiciones que tienen algún efecto sobre los microorganismos como es el caso del pH. La eficacia de los agentes microbianos depende de diferentes factores como la concentración de materia

orgánica, temperatura, concentración del agente activo, carga inicial microbiana y pH (Block, 1983).

Para controlar las poblaciones microbianas en los alimentos se utilizan diferentes productos, algunos de los cuales son de origen natural y tienden a ser más aceptados por los consumidores, debido a que se presume que tienen menos efectos perjudiciales para la salud. Recientemente en Costa Rica se han utilizado productos comerciales cuyo ingrediente activo aparentemente se extrae de cítricos.

Se han realizado una serie de estudios con relación a efectos antimicrobianos de extractos de plantas medicinales. González (1994) trabajó con extractos de dos familias de plantas: Celastraceae y Lamiaceae y encontró que el 53 % de los ensayos realizados mostraron actividad antimicrobiana contra dos o más microorganismos; un 64,7 % de los extractos presentaron acción antimicrobiana contra bacterias Gram positivos y un 23,5 % contra bacterias Gram negativos. Además González (1994) menciona como regla general que los extractos con acetona fueron más activos que los extractos etanólicos.

Srivastava (1986) realizó extracciones de semillas de *Melia azedarurach* utilizando etanol bajo condiciones de reflujo y posteriormente esto se extrajo con éter etílico y benceno. Al evaluar la sensibilidad de las bacterias: *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, a diferentes concentraciones del extracto, obtuvo que para todos los casos fue positiva y concluyó que el extracto posee características antimicrobianas.

En Japón, Sung (1994) añadió a ciertas frutas y vegetales un extracto de semillas de grapefruit para prevenir el deterioro poscosecha, dicho extracto inhibió el crecimiento de bacterias y hongos presentes en el deterioro de frutas y vegetales, siendo el rango de concentración mínima inhibitoria entre 250 y 500 ppm. Por otra parte Cho (1991) utilizó el extracto de semillas de grapefruit en la preservación de satsumas (*Poncirus trifoliata*) dando resultados positivos y obtuvo que el rango para la preservación de esta fruta está entre 250 y 500 ppm.

Los limonoides son uno de los dos grupos responsables de el sabor amargo en los cítricos. Entre ellos la limonina, que es muy insoluble en agua, es la que produce dicho efecto en una gran variedad de jugos cítricos. Las investigaciones de limonoides se han centrado en la determinación de métodos para la eliminación de los compuestos que producen el amargo en los productos cítricos (Ozaki, 1995).

El efecto de los extractos de limonina sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus oryzae* en naranjas demostraron que existe un efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* y ninguno sobre *Aspergillus oryzae*. (Gnan y Rana, 1982).

2.4. PRODUCTOS COMERCIALES A BASE DE SEMILLAS DE CITRICOS

2.4.1. Azutrex

El Azutrex es un compuesto natural producto de los extractos de semillas de cítricos. La formulación del Azutrex se muestra en el Cuadro 2.4.

Cuadro 2.4 Formulación del Azutrex

Compuesto	Proporción (%)
Extracto de semillas de cítricos	50,00
Acido láctico 85 % u.s.p	2,25
Acido cítrico u.s.p	1,25
Agua desionizada	46,50
Total	100,00

Fuente: PROVEQUI, 1991

2.4.2. Kilol DF-100

a) Generalidades

El Kilol DF-100 es un producto de origen orgánico natural, cuyo ingrediente activo lo constituye el extracto de semilla de grapefruit (PROVEQUI, 1991). Dicho ingrediente activo es un compuesto muy complejo, el cual está estabilizado físicamente e integrado por pequeñas trazas de elementos químicos naturales tales como:

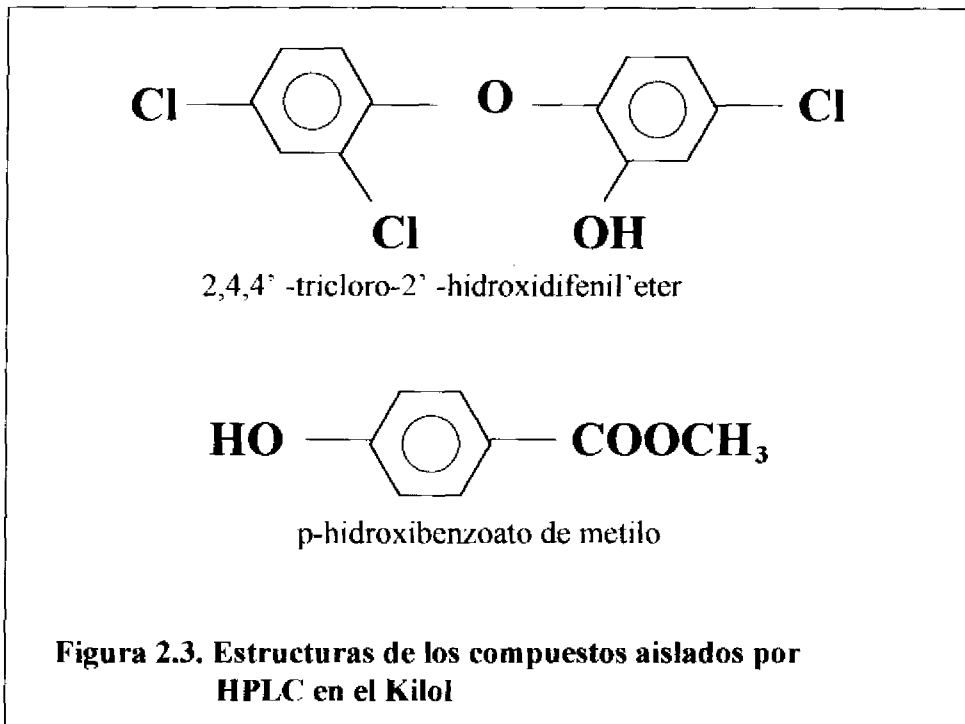
- ácido ascórbico (vitamina C)
- ácido dehidroascórbico
- ácido palmítico
- glicéridos
- grupos de la familia del tocoferol (vitamina E)
- aminoácidos
- grupo metil-hidroxi no identificado.

Aunque se dice que el componente activo del Kilol es un extracto de semillas de grapefruit, no se conoce exactamente la estructura de este compuesto. Estudios realizados en Japón por Nishina (1991), determinaron la presencia de dos compuestos responsables del efecto antimicrobiano en el Kilol: el 2,4,4' tricloro-2'hidroxidifenil éter y p-hidroxibenzoato de metilo (metil parabeno) (Figura 2.4).

Cabe destacar que el metil parabeno es un compuesto antimicrobiano utilizado en la industria alimenticia. A diferencia del ácido benzoico, este compuesto puede ser utilizado en una amplia gama de alimentos pues su actividad es muy poco dependiente del pH del medio (Belitz, 1988). Además, Taylor (1992) menciona que la acción antimicrobiana de los metilparabenos es mayor sobre bacterias Gram positivas que sobre Gram negativas.

En ese mismo estudio realizado en Japón, se obtuvo que la actividad antimicrobiana del Kilol DF-100 es mayor que la de cinco preservantes incluyendo los ácidos propiónico, benzoico y sórbico. (Nishina, 1991).

PROVEQUI (1995) menciona que el Kilol es un producto que presenta características especiales como: 100% natural, no tóxico, no irritante, biodegradable, no corrosivo y con amplio espectro de acción contra bacterias, hongos, levaduras y otros.



Fuente: Nishina, 1991

b) Actividad antimicrobiana

Actualmente, en Costa Rica el Kilol es utilizado como agente preservante para proteger a los alimentos de la contaminación por hongos y bacterias; además, se utiliza como antioxidante de los ácidos grasos para protegerlos de la degradación y rancidez.

PROVEQUI (1995), menciona que el Kilol es un antimicrobiano que actúa contra un gran número de bacterias, hongos y virus patógenos. Es un bactericida que actúa contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos tales como: *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Diplococcus*, *Proteus*, *Shigella*, *Erwinia*, *Bacillus*,

Mycobacterium, Klebsiella, Brevibacterium, Listeria, Pasteurella y hasta protozoarios como las Eimerias (excepto la Tenella).

Es un fungicida que actúa contra hongos del género: *Aspergillus, Penicillium, Trichophyton, Fusarium, Chaetomiun, Poria, Pullularia, Microsporium, Candida* y *Epidermophyton*.

Posee acción contra los virus: New Castle, viruela aviar, bronquitis infeccioso aviar, encefalomiелitis aviar, enfermedad de Marek, fiebre aftosa, enfermedad vesicular porcina, fiebre porcina africana.

c) Acción desinfectante

El Kilol actúa por contacto através del sistema de oxidación y reducción drástica de dióxido de carbono en las células, explotando la pared celular del citoplasma, erradicando así la proliferación de los microorganismos indeseables (PROVEQUI, 1991).

c) Uso y aplicaciones

En Costa Rica, el Kilol se consigue en forma líquida 100% natural y el Kilol en polvo 100 % natural (PROVEQUI, 1995).

El Kilol se puede aplicar mediante inmersión, aspersión y nebulización sobre los alimentos; manteniendo un contacto mínimo en el primer caso de 10 minutos (Cuadro 2.5). No se recomienda hacer la dilución y almacenarla con el fin de utilizarla posteriormente. El Kilol puede ser utilizado también como desinfectante de las áreas donde se trabaja con alimentos (Cuadro 2.5)

Cuadro 2.5. Dosis (mL/L) de Kilol recomendado para productos alimenticios y áreas de proceso

Alimentos o Areas de Proceso	Dosis (mL/L)
Frutas, Vegetales y Tubérculos	5 - 10
Carne de pollo, res y cerdo	5 - 10
Filetes de pescado	5 - 10
Langostas, camarones	5 - 10
Pisos	10 - 20
Paredes	10 - 20
Baños y sanitarios	10 - 20
Equipos en general	5 - 10
Frigoríficos	5 - 10
Manos	5
Utensilios en general	5
Mesas de operación	10

Fuente: PROVEQUI, 1991.

2.5. CAMARONES

2.5.1. Situación en Costa Rica

Las exportaciones de los productos de la pesca, han venido creciendo desde los 3,7 millones de dólares en 1973 hasta los 130 millones de dólares en 1993 (Chacón, 1994). Los recursos históricamente explotados son unas 120 especies entre peces, camarones, langostas y moluscos, tanto en la zona Atlántica como en la Pacífica. De esta última se extrae el 98 % de la producción nacional. La acuicultura ha venido en incremento tantos en peces de agua dulce como camarones marinos. (Chacón, 1994).

La flota camaronera en el Pacífico se ha mantenido constante a partir de 1965 y hasta 1984 con 69 embarcaciones. A partir de esta fecha se incrementaron en 19 los permisos de pesca para camarón de profundidad. En la actualidad se cuenta con una flota camaronera de 82 embarcaciones, de las cuales 14 están autorizadas (con 2 inactivas) para la pesca de camarón de profundidad únicamente y el 68 restante (con 12 inactivas) para la pesca de camarón de costa y profundidad (Chacón, 1994).

Los desembarques de camarón blanco provenientes del Golfo de Nicoya se han venido reduciendo en los últimos cinco años pasando de 82 TM en 1989 a 55 TM en 1993, con un esfuerzo pesquero similar durante dicho período. Esta disminución en el rendimiento del recurso corrobora las conclusiones de los diagnósticos efectuados por la Autoridad Pesquera y por la FAO que indican que el mismo está siendo sobreexplotado (Chacón, 1994).

En Costa Rica existen tres empresas importantes productoras de camarón: Cosechas Marinas, Langostinos del Pacífico ubicadas en Quepos, y Chomes Mar en el Golfo de Nicoya. Esas tres empresas y otras de menor importancia, cultivan una extensión de 659 hectáreas y generan una producción equivalente a las 1, 582 TM de camarón con cabeza (Zavala, 1995).

El camarón representó cerca de un 8 % del volumen total de la producción pesquera de Costa Rica en 1994. La producción de camarones aportó seis millones de dólares a la economía de ese año y se calcula que para el año actual la participación del sector

camaronero será de al menos nueve millones de dólares. Pues para este año, las tres empresas más importantes aumentarán el área de cultivo en 150 hectáreas. (Zavala, 1995).

El mercado nacional consume alrededor del 5 % de la producción camaronera y el restante 95 % se exporta. Los principales destinos del comercio internacional son Estados Unidos, donde se envía camarón sin cabeza, y varias naciones de Europa, que lo reciben entero. La especie predominante en el cultivo de camarón costarricense es *Penaeus vannamei* (Zavala, 1995).

En el Cuadro 2.6 se presenta la cantidad de camarón y las causas de las devoluciones de camarón exportado entre los años 1987 y 1990.

Cuadro 2.6. Rechazo de camarones de exportación entre 1987 y 1990

Fecha de devolución	Producto	Cantidad (kg)	Causa de devolución
Julio-Diciembre 1987	Pescado y camarón	513, 271	Sulfitos, descomposición, contaminación por insectos
Marzo-Octubre 1988	Camarón	510,2	Sulfitos
Enero-Diciembre 1989	Camarón	8, 294	Sulfitos no declarados y descomposición
Enero-Diciembre 1990	Camarón	48, 089	Descomposición

Fuente: Ministerio de Comercio Exterior.

2.5.2. Generalidades

El camarón está protegido por una caparazón o exoesqueleto unido mediante articulaciones. La mayor parte de sus órganos internos se encuentran en la región de la cabeza denominada cefalotórax, y su músculo concentrado en la región de la cola denominada abdómen. La piel o hipodermis de un camarón se encuentra justo por debajo de la caparazón, la cual sirve para la formación del nuevo exoesqueleto mediante una secreción después de cada muda (Maza, 1986).

La parte comestible comercial de la especie es la cola, que se congela con o sin caparazón, en forma individual o en bloque, usualmente, como un producto de tipo exportación. Los residuos de la cabeza por sus componentes ricos en sabor (mejores que su carne) son utilizados en la elaboración de saborizantes naturales.

La manipulación y preservación de la materia prima en forma adecuada es la base fundamental para mantener la alta calidad del producto final.

El transporte del camarón sin previo enfriamiento y sin adición de hielo desde su captura hasta la planta o un almacenamiento a temperaturas mayores de refrigeración prolongado antes del proceso ocasiona la rápida disminución de su frescura debido a la degradación de sus tejidos por la acción de las enzimas del músculo y de bacterias. Este deterioro es minimizado con un enfriamiento rápido del camarón después de la captura mediante la adición de hielo abundante a fin de mantener la temperatura cerca de 0 °C durante el transporte. El camarón entero no solamente debe ser muy fresco, sino también

debe de estar libre de toda sustancia contaminante nociva para la salud, tales como gasolina, insecticida, petróleo, D.D.T, etc. (Maza, 1986).

La especie capturada es lavada con agua limpia a fin de retirar la arena y fango adherido a las patas y agallas del camarón. Inmediatamente es enfriado con hielo en escamas hasta obtener una temperatura cercana a 2 °C. Posteriormente, el camarón es estibado con hielo (en una proporción de 70 %) en cajas de plástico para mantener una baja temperatura (Maza, 1986).

2.5.3. Vida útil del camarón

Según Brenner (1994), en el Golfo de México, los camarones comúnmente presentan recuentos iniciales de 1×10^4 y 1×10^5 UFC/g y que la vida útil de los camarones en hielo se espera que sea de 12 a 14 días. Numerosos tipos de bacterias están presentes en los camarones pero la microflora predominante es: *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Micrococcus*. La microflora que predomina durante el almacenamiento en hielo está compuesto por: *Pseudomonas*, *Moxarella* y *Acinetobacter sp.* Estas bacterias proteolíticas especialmente la *Pseudomonas* producen sabores y olores indeseables en camarones almacenados en hielo lo que da como resultado un producto inaceptable.

Durante el tratamiento tecnológico y la conservación del camarón o bien los productos derivados de la pesca se producen una serie de cambios que provocan su deterioro con la consiguiente pérdida de calidad. La disminución de la frescura del

crustáceo se debe a la descomposición de la proteína y la oxidación de sus grasas y pigmentos, mediante la acción de las enzimas y bacterias, ocasionando deterioro de la carne (Brenner, 1994).

a) Descomposición de proteínas

Las proteínas contribuyen de manera importante en la calidad de los alimentos en general y del pescado en particular. El conjunto de alteraciones que se producen en las proteínas del músculo debido tanto al tratamiento tecnológico como al método de conservación aplicados se manifiestan en cambios en las propiedades funcionales, es decir, en el conjunto de propiedades físico-químicas que son las que inciden directamente en las características y calidad del producto final. Los cambios que se producen en las proteínas del músculo durante su conservación difieren dependiendo del tratamiento tecnológico empleado pero se pueden resumir en general en tres tipos de alteraciones: hidrólisis, desnaturalización y agregación.

Frecuentemente estas reacciones se producen simultáneamente, las modificaciones de las proteínas como consecuencia de un tipo de cualquiera de estas reacciones promueven el desarrollo de las restantes (Montero, 1988).

Hidrólisis: Principalmente debido a la acción de enzimas proteolíticas, procedentes del propio camarón o liberadas al medio por microorganismos, de manera que se acelera la degradación de los componentes del músculo.

Desnaturalización: Se asocia a cambios conformacionales de la proteína. De acuerdo con esto es presumible que se alteren las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias; de hecho que se produce ruptura de puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas y enlaces salinos todo lo cual hace que la molécula se despliegue. Entre las modificaciones que sufren las proteínas desnaturalizadas son de destacar:

- Descenso o incluso pérdida de actividad enzimática
- Nuevas interacciones con el medio y con la propia proteína (nuevas zonas de interacción)
- Disminución de la solubilidad
- Mayor susceptibilidad del enlace peptídico a los fenómenos de hidrólisis provocados por enzimas proteolíticas.

La ruptura de uniones “no covalentes” puede producirse por diferentes tratamientos físicos y químicos dependiendo de su intensidad y duración. La desnaturalización de una proteína mediante distintos agentes no provoca los mismos cambios. Así por ejemplo, la desnaturalización por calor no provoca las mismas alteraciones que las producidas al someterlas a otros tratamientos tecnológicos.

El fenómeno de desnaturalización casi siempre va asociado a otras modificaciones, e incluso se podría considerar como un paso previo, mediante el cual la proteína nativa cambia de conformación, por lo que facilita el establecimiento de interacciones de muy diversos tipos.

Agregación: Dentro de este tipo de reacciones cabe distinguir dos clases según se establezcan entre una molécula de proteína nativa o desnaturalizada con otra nativa o bien entre moléculas proteicas desnaturalizadas.

Las reacciones del primer tipo transcurren con la formación de puentes de unión entre proteínas y son responsables en parte del incremento de la dureza y de la pérdida de solubilidad y retención de agua.

El segundo tipo de reacciones estaría provocado por grupos reactivos situados en el interior de la molécula proteica y que, al modificarse su estructura por la desnaturalización, quedan accesibles y en posición de reaccionar, generalmente con formación de enlaces tipo sulfhidrilo, disulfuro, fenólicos, en las proteínas miofibrilares (Monero, 1988). Sin embargo, en las del estroma tienden a formar enlaces entre los grupos amino de lisina e hidroxilisina próximas formando aldíminas o cetoiminas.

Un mayor conocimiento de las alteraciones que se producen en las proteínas del músculo del camarón, ya sea por enzimas endógenas, microbianas, por ácidos, sales, calor o frío, así como las interacciones con otros constituyentes del camarón o por incorporación de aditivos, es un requisito imprescindible para determinar los parámetros a tener en cuenta en los procesos tecnológicos con el fin de obtener una adecuada calidad, así como nuevos métodos de elaboración de productos pesqueros.

b) Oxidación de pigmentos

La vida útil del camarón fresco se ve limitada por la melanosis y el crecimiento microbiológico. La melanosis en camarones, comúnmente conocida como “mancha negra”, es un defecto de color en la superficie del camarón causado por la actividad de la enzima endógena, polifenoloxidasas (PPO), la cual permanece activa durante el almacenamiento en congelación o refrigeración (Benner, 1994).

Históricamente la melanosis ha sido controlada mediante el uso de agentes como el bisulfito de sodio. Sin embargo, existen personas que han resultado alérgicas, sensibles y hasta presentan asma por causa de los sulfitos lo que ha aumentado la preocupación por su uso. El 4-hexilresorcinol ha sido introducido como alternativa de sustitución de los sulfitos (Benner, 1994).

El pardeamiento enzimático es una transformación oxidativa de tipo radicalario de los compuestos fenólicos en polímeros coloreados de estructura quinónica, cuyo color oscila de pardo a negro. Es un proceso catalizado enzimáticamente por la polifenoloxidasas (PPO), siendo necesaria la presencia de oxígeno (Junquera, 1992).

El mecanismo de la reacción es el siguiente:

1. Hidroxilación enzimática en la posición orto de un monofenol incoloro, para dar un orto-difenol, también incoloro.

2. Oxidación enzimática, que da lugar a orto-quinonas, que suelen ser coloreadas (rojizas). Esta etapa consiste en la eliminación de un átomo de hidrógeno de uno de los

hidroxilos fenólicos, por acción de un agente oxidante, formando un radical libre. Este radical es inestable y, tras su isomerización a la forma quinónica, reacciona rápidamente.

3. Polimerización no enzimática, que origina polímeros coloreados de la gama marrón a negro: El radical, formado en la etapa anterior, puede dimerizarse o reaccionar con otro radical, formando, por orden de importancia, los enlaces C-C, C-O ó O-O, dando lugar a compuestos condensados.

La reactividad de los compuestos mono-,di- y polifenólicos depende de su estructura y del origen de las enzimas que catalizan las reacciones de oxidación. Estas enzimas tienen un carácter oxidante, por lo que Oslow, (1920) las llamó oxidasas. Sin embargo, se les conoce como fenolasas, polifenoloxidasas (PPO), catecolasa y tirosinasa.

Junquera (1992) menciona que las fenolasas catalizan dos tipos de reacciones: una hidroxilación, referida a la actividad de la fenolhidroxilasa o cresolasa, causante de la o-hidroxilación de un monofenol y una oxidación, referida a la actividad de la fenoloxidasas propiamente dicha, que origina la oxidación del difenol a su correspondiente ortoquinona. Dentro de este grupo podemos distinguir dos clases según el grupo oxidado. Así, cuando el sustrato es un o-difenol se habla de orto-difenoloxidasas, catecolasa o tirosinasa (E.C.1.10.3.1.) y si el sustrato es un p-difenol se denomina p-difenoloxidasas o catecolasa (E.C.1.10.3.2.). Estas enzimas contienen cobre como grupo prostético y son activas entre pH 5,0 y 7,0 y más concretamente, entre 6,0 y 6,5 careciendo de un pH óptimo muy definido. A pH próximo a 3,0 se inactivan irreversiblemente (Junquera, 1992).

El pardeamiento enzimático es directamente proporcional a la concentración de PPO y a la concentración de compuestos fenólicos. Por otra parte, este fenómeno es inversamente proporcional a la concentración de sustancias reductoras como el ácido ascórbico. Junquera (1992), estudiando la relación entre los compuestos fenólicos y la actividad de polifenoloxidasas, peroxidasa y catalasa de hojas de té, se encontró que la actividad de peroxidasa no se manifiesta a bajas concentraciones de compuestos fenólicos, mientras que la actividad de la polifenoloxidasa parece ser independiente de la concentración de estos sustratos en el medio, manifestándose en un amplio intervalo de concentraciones.

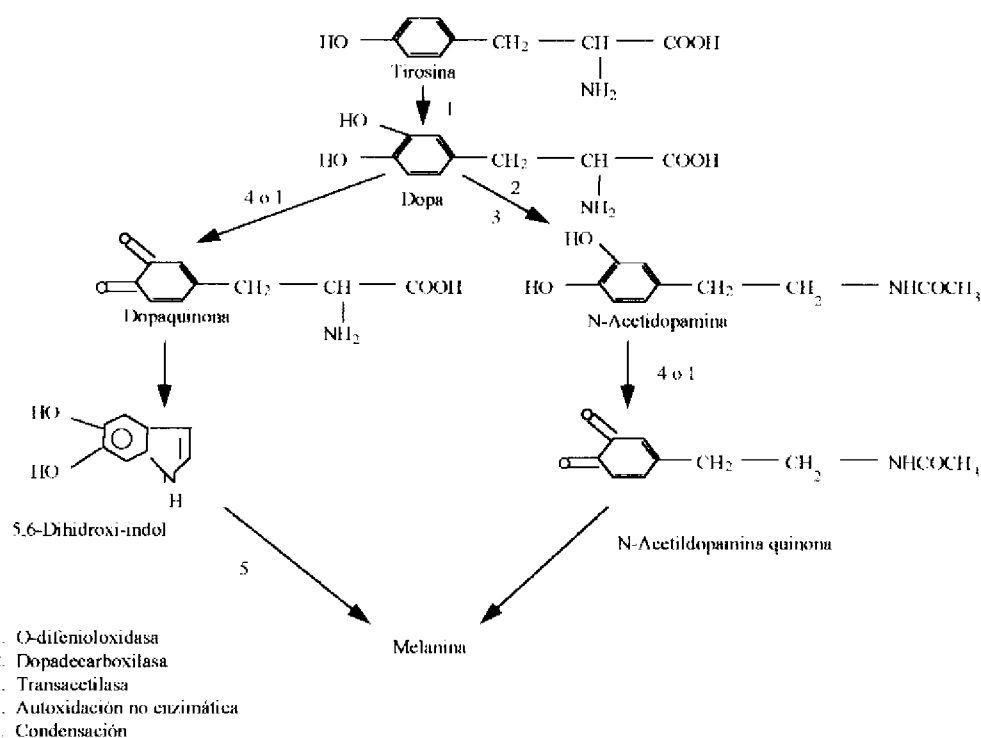


Figura 2.4. Mecanismo de reacción para la producción de melaninas

Fuente: Morais, 1984

Según Junquera (1992) existen diversos mecanismos para impedir este tipo de pardeamiento pero, por razones de costo, toxicidad, reglamentación y efectos secundarios desfavorables sobre la calidad del producto final, se reduce el número de posibilidades a una: intentar reducir al máximo la presencia de compuestos esenciales para el desarrollo de la reacción como oxígeno, enzimas, cobre y sustratos. En este sentido, numerosos son

los trabajos desarrollados en los últimos años, en los que se estudia el efecto de diversas sustancias sobre la actividad de las enzimas responsables del pardeamiento.

2.5.4. Microbiología de camarón

Los productos marinos son más perecederos que otros alimentos con alto contenido de proteínas. En estos productos, cambios en el sabor, olor, textura y color son reflejados a causa de la descomposición causada principalmente por la actividad microbiana. El grado de descomposición se ve influenciado por el número inicial y tipos de bacterias y por las condiciones de almacenamiento como la temperatura, humedad y atmósfera gaseosa. Otro aspecto que afecta en la descomposición es el método y lugar de captura de las especies (Vanderzant, 1992).

La piel de los mariscos se considera bacteriológicamente estéril. Las mayores concentraciones de microorganismos se encuentran en los intestinos, agallas y en el limo superficial. El número y tipo de microorganismos que se encuentra en el producto fresco se ve influenciado por el lugar geográfico de captura, la estación y el método de captura. La microflora del producto se relaciona al ambiente del cual proviene.(Vanderzant, 1992). Las diferencias que se esperan encontrar incluyen variaciones en salinidad, temperatura, materia orgánica y calidad del agua de la cual proviene el producto.

La microflora del camarón consiste predominantemente en bacterias corineformes *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Micrococcus* (Vanderzant, 1992)

La vida útil está determinada por el número y tipo de microorganismos y la temperatura de almacenamiento. El número y tipo de microorganismos está determinado por la microflora natural y la manipulación entre el tiempo de pesca y el almacenamiento.

Vanderzant (1992), menciona que en camarones la descomposición se da principalmente por *Pseudomonas*. Estos microorganismos son capaces de causar la descomposición por dos factores: (1) son psicotrópicos por lo que se multiplican en temperaturas de refrigeración, (2) atacan varios compuestos en el tejido del camarón para producir compuestos asociados con olores y sabores desagradables. Estos compuestos se reportan como metilmercaptano, dimetil disulfuro, dimetiltrisulfuro, 3-metil-1-butanol, trimetilamina y ésteres de acetato, butirato y hexanoato (Vanderzant, 1992).

La microflora natural de productos de este tipo pueden contener *Pseudomonas* como una cantidad insignificante del total de la población. Sin embargo, por abuso en la manipulación y / o almacenamiento esta cantidad de microorganismos aumenta. Vanderzant (1992) cita posibles razones por las que se da la subsecuente descomposición por *Pseudomonas*: (1) posee un tiempo de generación más corto que otros microorganismos, (2) cuenta con reacciones sinérgicas, (3) posee habilidad para atacar largas moléculas de proteínas y (4) tiene actividad bioquímica.

2.5.5. Características de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

a) *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* es un microorganismo aerobio o anaerobio facultativo, Gram positivo y esférico. Es coagulasa positivo y fermenta glucosa. Además puede crecer en un medio con un 7,5-15 % de sal. Usualmente es sensible al cloro, cloraminas, iodo y iodóforos. Aunque es sensible al calor, es moderadamente resistente a la radiación (Banwart, 1979). Por lo general, no es capaz de competir con otros microorganismos.

Este microorganismo se multiplica con mayor rapidez a temperaturas comprendidas entre 20 y 45 °C. El intervalo de temperaturas dentro del cual tiene lugar la multiplicación y la producción de la toxina está comprendido entre los 4 y 46 °C (Frazier, 1993). El pH de crecimiento en la carne es de 4,8 en aerobiosis, mientras que el pH máximo es de 8 (Frazier, 1993). Normalmente este microorganismo penetra en los alimentos en escasa cantidad y son superados en número por las bacterias que compiten con ellos en los alimentos frescos.

El *Staphylococcus aureus* está presente en la piel y membrana mucosa de los humanos y de los animales de sangre caliente. Es un microorganismo potencialmente patógeno que produce enterotoxinas. Según Skinner (1976) la mínima dosis de enterotoxina que causa enfermedad es de 1 µg. Howell (1995) menciona que *S. aureus* puede ser la causa en el hombre de abscesos y furúnculos, puede infectar heridas y espinillas y además dar origen a un importante síndrome de intoxicación alimentaria.

La presencia de *Staphylococcus* en camarones es indicador de contaminación post-captura debida a una deficiente higiene personal. Según Rex (1976) con base en 600 análisis en camarones llegó a la conclusión de que los valores más altos de *Staphylococcus aureus* se producen en el descolado, por influencia de varios factores. El corto proceso de cocción no asegura el exterminio de la contaminación con que la materia prima entra a la planta, ni alcanza a inactivar totalmente su contenido de enzimas lipo-proteolíticas. Aún más, la cocción afecta a la fracción microbiana mayoritaria de tipo psicrófila que es sensible al calor, produciendo una inversión en la flora sobreviviente, con un amplio predominio de *Staphylococcus* por su resistencia relativa a los procesos térmicos.

Rex (1976) menciona que por las características propias del proceso de las plantas, parte del langostino cocido permanece en las mesas largos periodos sin descolarse, a temperaturas que fluctúan entre 25 y 40 °C, encontrándose allí una excelente oportunidad para la multiplicación de *Staphylococcus* y otros mesófilos. El langostino es descolado manualmente y, por razones prácticas, sin guantes, siendo este otro factor que contribuye al desarrollo y multiplicación del microorganismo.

La ICMSF (1974) sugiere un límite microbiológico de 1000 UFC/ g *Staphylococcus aureus*.

b) *Pseudomonas aeruginosa*

Las *Pseudomonas* se destacan por su actividad bioquímica, siendo capaces de atacar una gran variedad de compuestos orgánicos, incluyendo compuestos aromáticos y otros.

Las *Pseudomonas* tienen un metabolismo respiratorio no fermentativo. Producen catalasa y muchas producen oxidasa (Banwart, 1979).

Siendo aerobias las *Pseudomonas* necesitan oxígeno para su crecimiento. Estos microorganismos producen enzimas que catalizan las reacciones proteolíticas y contribuye al deterioro de los alimentos. Además, estos son importantes en alimentos frescos refrigerados, pues contribuyen con su deterioro. Algunas especies forman pigmentos (verde, azul-verdoso, rojo, amarillo, anaranjado ó café oscuro).

Frazier (1993) menciona además que este microorganismo presenta otras características: (1) capacidad para utilizar compuestos de carbono muy distintos que no son hidratos de carbono y su incapacidad para utilizar la mayoría de los hidratos de carbono; (2) su capacidad para producir diversas sustancias que influyen desfavorablemente en el sabor; (3) su capacidad para utilizar alimentos nitrogenados sencillos; (4) capacidad para sintetizar sus propios factores de crecimiento o vitaminas; (5) la actividad proteolítica y lipolítica de algunas especies y (6) su tendencia aerobia que le permite un crecimiento rápido y generar productos de oxidación y mucosidad en aquellas superficies de los alimentos en las que es más probable que exista una generación masiva.

El pH óptimo de acción de la *Pseudomonas aeruginosa* está entre 6,6 y 8,4 y el rango de temperatura óptimo entre 5-42 °C (Banwart, 1979).

La *Pseudomona aeruginosa* produce una enterotoxina y puede causar gastroenteritis. Además esta especie es oportunista causando infecciones en pacientes con bajas defensas (Banwart, 1979).

2.5.6. Preservadores de frescura

El deterioro que se presenta en los camarones puede ser disminuido mediante el uso de agentes preservadores en cantidades permisibles. El preservador de frescura es una sustancia que inactiva la acción enzimática y elimina las bacterias del langostino, camarón, langosta, cangrejo, etc. El preservador, por su efecto químico, inhibe la acción de las enzimas, y por su efecto bacteriostático, no permite el desarrollo bacteriano (Maza, 1986).

El preservador no permite el cambio de coloración del caparazón del crustáceo, ni permite la contaminación bacteriana y evita el contacto directo del oxígeno del aire con los pigmentos, debido a la formación de una capa protectora sobre la caparazón. Por esta razón, el crustáceo tratado con el preservante mantiene su color característico y no presenta manchas oscuras y negras sobre la superficie del caparazón durante el almacenamiento después de la captura. La formación de las manchas negras denominada la melanosis se debe a la oxidación de tirosina mediante la acción de una enzima tirosinasa, ambas presentes en el caparazón. El agente preservador al inhibir la acción enzimática de la tirosinasa evita el fenómeno de la melanosis (Maza, 1986).

Existe una variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas que son recomendadas para usarlas como preservantes de crustáceos, eliminando los microorganismos y evitando la oxidación. Entre los preservantes orgánicos están considerados el ácido cítrico y sus derivados, el ácido ascórbico, el ácido láctico, el α tocoferol (vitamina E), butil

hidroxianisol (BHA) y butil hidroxitolueno (BHT). Entre los inorgánicos se encuentran el ácido fosfórico, metabisulfito de sodio, hidrosulfito sódico e hiposulfito sódico (Maza, 1986).

2.6. CONTROL DE CALIDAD: METODOS DE EVALUACION DE PESCADO Y MARISCOS

Uno de los grandes problemas de los investigadores en el deterioro de los camarones ha sido encontrar algún método mediante el cual esos cambios pueden ser medidos cuantitativamente. Numerosos procesos analíticos físicos, químicos, organolépticos y biológicos han sido sugeridos en este sentido, pero pocos han resultado útiles en cuanto a su aplicación general. Los métodos seleccionados para el presente trabajo han probado su utilidad en otros países en pescado y en camarones.

a) Métodos Químicos:

Una gran variedad de compuestos químicos o grupos de compuestos se acumulan en el tejido como productos intermedios o finales de diferentes cambios bioquímicos que ocurren en el camarón después de su muerte o como resultado de la acción de bacterias exógenas. Las cantidades formadas de estos productos pueden ser utilizadas como índices de frescura o descomposición del camarón. Sin embargo, estos métodos presentan una seria desventaja: los cambios post-mortem que sufren los camarones varían de especie a especie, con la época del año y lugar en que se realice la captura (Herrera, 1994). Entre

los métodos químicos más utilizados están la determinación de bases volátiles, amoníaco, hipoxantina, valor K, peróxidos, etc.

Como índice de frescura se tiene la aplicación de nitrógeno básico volátil total (BVNT), el cual a través de diferentes métodos ha permitido seguir la descomposición de diferentes muestras analizadas, estableciendo un valor de 20 a 23 mg % de BVNT correspondiente a un camarón fresco y los de baja frescura son de 30 a 45 mg % como indicativo de descomposición (Maza, 1986). Luna (1971) estableció un valor aproximado de 30 mg % como indicativo de descomposición.

b) Métodos Físicos:

El pH ha sido utilizado obteniéndose resultados que varían con la especie analizada, zona de pesca, estado de desarrollo, pero dentro de ciertos límites ha probado su aplicabilidad. El pH del camarón, después de su captura, decrece de 7,1-7,2 a 6,2-6,5 debido a la formación de ácido láctico como resultado de la glucólisis anaerobia. El pH aumenta otra vez en las últimas fases de descomposición, como resultado de la formación de aminas volátiles y otros compuestos básicos (Lima dos Santos, 1981). Sin embargo, el pH del músculo del camarón depende de muchos factores que hacen de esta determinación un índice poco preciso de evaluación de la frescura.

Maza (1986) estableció que el pH del camarón fresco está comprendido entre 6,8 a 7,9, mientras que el de baja frescura es mayor de 8,0.

En cuanto a los cambios oxidativos en el camarón se estudia el cambio de coloración, mancha negra, causada por un sistema enzimático presente en el animal y la oxidación enzimática del sustrato natural tirosina, lo cual ocurre por una secuencia de reacciones bioquímicas. Este cambio de color es posible medirlo utilizando un colorímetro como es el Hunterlab que mide la pérdida de luminosidad del camarón como consecuencia del oscurecimiento del mismo.

c) Métodos microbiológicos:

El examen microbiológico ha probado su utilidad siempre, no sólo como índice de descomposición, sino también de estado sanitario del producto a través del conteo total de bacterias, además constituye análisis obligatorio en los controles de calidad de casi todos los países que se dedican a la industrialización de camarones y mariscos en general.

Maza (1986) establece que la materia prima fresca contiene un recuento total de bacterias entre 1×10^4 y 1×10^5 UFC/g y que el límite considerable máximo es de 1×10^6 UFC/g.

CAPITULO 3

METODOLOGIA

El proyecto se llevó acabo durante el año 1995, en el laboratorio de Química Industrial de la Escuela de Química y en los laboratorios de Microbiología de Alimentos y de Inmunología Clínica de la Facultad de Microbiología y en el Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos (C.I.T.A) ubicados en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio en San Pedro de Montes de Oca.

Los medios de cultivo, las cepas de microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces sp*, *Penicillium sp* y *Escherichia coli*) así como todo el material requerido para el desarrollo de la parte microbiológica fue facilitado por las Secciones de Microbiología de Alimentos e Inmunología Clínica de la Facultad de Microbiología.

El pHmetro y el colorímetro HunterLab fue facilitado por el Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos.

3.1. ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE SEMILLAS DE CITRICOS Y DE EXTRACTOS OBTENIDOS CON SOLVENTES ORGANICOS

3.1.1. Evaluación del efecto antimicrobiano de semillas de naranja (*Citrus sinensis*, grapefruit (*Citrus paradisi*) y limón (*Citrus aurantifolia*)

La evaluación microbiológica de las semillas se realizó utilizando una de las técnicas de difusión en agar para la cual se prepararon suspensiones bacterianas de dos cepas: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, en agar estándar a una concentración final de aproximadamente 10^7 UFC/mL. De estas suspensiones se agregaron volúmenes de 10 mL en placas de petri. Posterior a la solidificación del medio se colocaron cilindros estériles de plástico de 200 μ L de capacidad, separados equidistantemente, en los cuales se agregaron las semillas molidas.

Las placas se incubaron 24 h a 37 °C. Se definió como efecto inhibitorio, la ausencia de crecimiento bacteriano alrededor del cilindro que contenía las semillas. La medición del diámetro (en mm) se hizo con un caliper.

3.1.2. Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos de semillas de naranja

a) Procedimiento para la obtención de los extractos de semillas

Se procedieron a secar (40-50 °C) semillas de naranja en una estufa durante 18 h, para luego ser molidas a alta velocidad en un homogenizador de cuchillas. Se realizaron

extracciones exhaustivas de las semillas utilizando: éter de petróleo, acetona, metanol y una mezcla de ácidos (ácido láctico 2,25 % y ácido cítrico 1,25 %).

Las extracciones se realizaron utilizando una columna la cual se llenó con 200 g de las semillas molidas y eluyendo con los solventes indicados en orden de creciente polaridad. Para acelerar el proceso de extracción se utilizó vacío.

Posteriormente los extractos fueron congelados (-20 C) y se realizó, para cada uno de los tres, la técnica de difusión en agar descrita en 3.1.1, utilizando como microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces sp*, *Penicillium sp* y *Escherichia coli*.

Se utilizó como patrón de comparación el producto comercial conocido como Azutrex (extracto de semillas de cítricos), el cual fue facilitado por el Departamento de Control de Alimentos del Ministerio de Salud.

b) Evaporación, emulsificación y acidificación de los extractos etéreos, acetónicos y metanólicos.

En vista de que los extractos obtenidos se encontraban disueltos en soluciones orgánicas se procedieron a colocarlos en un medio acuoso y ácido con la adición de un emulsificante. Para la acidificación se utilizaron ácido láctico en un 2,25 % y ácido cítrico en 1,25 % tal como se presenta en la formulación del Azutrex (Provequi, 1994).

Los extractos fueron evaporados en un rotavapor, para eliminar los solventes existentes en cada caso. Posteriormente se les añadió agua en relación 1:1 y 0,5 % de Tween como

emulsificante, se agitó con un vortex para obtener la disolución completa. Los extractos fueron acidificados con una mezcla de ácidos (ácido cítrico 1,25 % y ácido láctico 2,25 %) tal como lo presenta el Azutrex.

Utilizando la técnica de difusión en agar descrita en 3.1.1. y utilizando como patrón de comparación el Azutrex, se añadieron los diferentes extractos. Además se usó un control de mezcla de ácidos. Para esta prueba los microorganismos utilizados fueron: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces sp.*, *Penicillium sp.* y *Escherichia coli*.

3.1.3. Comparación entre los extractos obtenidos y el Azutrex mediante cromatografía de capa fina sobre gel de sílice

Con el fin de comparar los los extractos obtenidos con el Azutrex se realizó una separación de sus compuestos mediante cromatografía de capa fina (sobre gel de sílice), usando como solvente una mezcla de acetona:metanol (1:1). Las cromatoplasas fueron reveladas con vapores de yodo. Se utilizó como patrón de comparación el Azutrex.

Para determinar si el compuesto con efecto antimicrobiano de los extractos de las semillas se estaba logrando aislar, se procedió a añadir una línea continua de cada uno de los extractos sobre diferentes cromatoplasas de manera que lo arrastrable fue un área grande y quedaran así manchas de gran tamaño.

Las placas de sílica se dividieron (recortaron) en dos partes (la de mayor y menor Rf) y se colocaron en placas de petri que contenían 5 mL de agar tripticasa soya que servía como base para las cromatoplasas. Luego se virtio sobre las cromatoplasas recortadas agar tripticasa

soya con el microorganismo correspondiente. Se utilizaron dos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces sp*, *Penicillium sp* y *Escherichia coli*. Se dejaron incubando durante 24 h y se observó si presentaban halo de inhibición alrededor de estas.

3.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL pH, CONCENTRACION Y TIEMPO DE CONTACTO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL KILOL.

3.2.1. Evaluación del efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del Kilol

La evaluación se realizó a dos pH diferentes: (1) el de la solución original del Kilol y (2) el del Kilol tamponado con una disolución de fosfatos 1 M (pH 6.6). Para determinar el efecto de la concentración, se hicieron diluciones 1 / 5, 1 / 10 y 1 / 20.

El efecto antimicrobiano se evaluó mediante la técnica de difusión en agar descrita en 3.1.1., la prueba se realizó por triplicado para cada tipo de microorganismo. Los microorganismos usados fueron: *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

3.2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del Kilol

A partir del producto comercial concentrado se procedieron a preparar diluciones de 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000 y 1/16000. Los tubos contenían 4,5 mL de caldo tripticasa soya y fueron inoculados con 0,5 mL de un cultivo de caldo de tripticasa de soya que contenía 1×10^8 UFC/mL de *Staphylococcus aureus*.

Para el caso de las *Pseudomonas aeruginosa* se realizó el mismo procedimiento solo que se tuvieron que preparar diluciones del producto mucho menores : 1 / 5, 1 / 10, 1 / 20, 1 / 40, 1 / 80 y 1 / 160.

Los tubos se dejaron incubando a 37 °C durante 24 h y mediante la turbidez y el subcultivo en placas de agar tripticasa de soya; se seleccionó el tubo que presento la concentración mínima inhibitoria. (AOAC,1990).

3.2.3. Determinación del tiempo de contacto óptimo del Kilol aplicado en camarones frescos.

Para este estudio se utilizaron camarones de la especie *Penaeus brevirostris* (camarón rosado o Pinky) provenientes de Barranca, Puntarenas.

A partir de la concentración mínima inhibitoria para las *Pseudomonas aeruginosa*, se procedieron a colocar 36 camarones en un recipiente que contenía la disolución de agua (con hielo) y el Kilol.

Paralelamente se preparo una muestra control que no se sumergió en el Kilol, pero se dejó durante ese tiempo en agua con hielo. Esto con el propósito de conocer la carga inicial de los camarones y determinar la tasa de muerte de los microorganismo.

Cada 10 minutos partiendo de 0 y hasta 30 minutos se realizaron recuentos superficiales de 12 camarones por muestreo. Para ello se pesaron, se añadieron 90 mL de agua peptonada a cada una de las muestras, éstas se masajearon y de este caldo se extrajo 1 mL para realizar la primera dilución y así sucesivamente hasta llegar a la dilución de 10^{-5} .

Las diluciones respectivas fueron cultivadas en agar estándar. Las placas se incubaron durante 48 y 72 h a temperatura ambiente. Luego se procedieron a realizar los recuentos.

3.3. ESTUDIO DE LA CALIDAD FISICO-QUIMICA Y MICROBIOLOGICA DEL CAMARON FRESCO TRATADO CON KILOL Y ALMACENADO EN HIELO

Los camarones para el estudio fueron gentilmente suministrados por la empresa Langostinos del Pacífico. Dichos camarones son cultivados, son de la especie *Penaeus vannamei* y se usaron enteros (con cabeza).

Se tomaron 3,6 kg de camarones y se dividieron en tres partes iguales para ser sometidos a tres tratamientos diferentes. La primera parte se sometió a un tratamiento de agua con hielo (50:50) usando la concentración de Kilol obtenida de los resultados de la concentración mínima inhibitoria (1 / 20), la segunda parte se sometió a un tratamiento de agua con hielo (50:50) pero usando la concentración de Kilol que se recomienda en la etiqueta de dicha fórmula comercial (1/100) y la tercera parte se sometió simplemente a un tratamiento de agua con hielo (50:50) con el fin de usarlo como patrón de comparación.

Para cada 1,2 kg de camarón se preparo una solución con 1L agua y 1L hielo y se añadieron 20 y 100 mL de Kilol para obtener las diluciones 1 / 20 y 1 / 100 respectivamente. La temperatura de la solución fue de 0 °C. Los camarones se dejaron reposar en los tres tratamientos durante el tiempo de contacto óptimo obtenido anteriormente.

Luego de pasado el tiempo de contacto óptimo los camarones fueron colocados en bolsas de polietileno de baja densidad etiquetadas y provistas de perforaciones para que sirviera como drenaje, las bolsas se cerraron con cierres metálicos y se colocaron en neveras provistas con una capa de hielo escarchado colocando una bolsa de camarones y una capa de hielo y así sucesivamente; la última capa fue provista de hielo de manera que cubriera todas las partes expuestas. La nevera fue colocada por un período de 13 días dentro de una refrigeradora que mantiene la temperatura a 5 °C.

Cada día de muestreo, se procedió a extraer 12 camarones de cada una de las bolsas para determinar los análisis correspondientes. El día que correspondía muestrear se cambio el hielo de las neveras y se volvió a acomodar las bolsas como se mencionó.

Los análisis que se presentan a continuación se realizaron a los 1, 4, 6, 8, 11 y 13 días de captura para los tres tratamientos:

3.3.1. Evaluación del pH

Se siguió el método descrito por Herrera (1989). El cual consiste en la preparar la muestra para realizar la medición usando un pHmetro con electrodo de vidrio. El pH del camarón fresco está comprendido entre 6,8 - 7,9 mientras que cuando el camarón no es fresco el pH es mayor a 8,0 (Maza, 1986).

3.3.2. Evaluación de la presencia de melanosis

Se utilizó el colorímetro Hunter Lab DP9000 (lámpara de halógeno de 8 a 10 voltios) para analizar el color del producto. El parámetro de interés fue el de luminosidad, aunque este aparato posee además otras escalas, estos valores se midieron en la escala de color "Lab" tal como se muestra en el Cuadro 3.1 .

Las muestras se colocaron en una placa petri con un diámetro de 8,5 cm en la base y 9 cm en la cubierta. Luego se realizó la medición tomándose los valores máximos, mínimos y promedio que el colorímetro da para cada muestra.

Cuadro 3.1 : Descripción de la escala de color "Lab"

Parámetro	Escala Ambito	Tonalidad Ambito
L	0 a 100	Negro a Blanco
a	-50 a 50	Azul a Amarillo
b	-50 a	Verde a Rojo

3.3.3. Determinación de bases volátiles nitrogenadas totales (BVNT)

Se siguió el método descrito por Lima Dos Santos (1981) para determinación de bases volátiles totales (BVNT). Este método se basa en la medición del contenido total de compuestos básicos nitrogenados como producto de la descomposición del camarón,

determinando la cantidad de nitrógeno presente utilizando el aparato Kjeldahl. Los valores de 20 a 23 mg % de Bases Volátiles Nitrogenadas Totales corresponde al camarón fresco y los de baja frescura son de 30 a 45 mg % (Maza, 1986). Luna, (1971) menciona que los camarones con un valor aproximado de 30 mg % es un indicativo de descomposición.

3.3.4. Evaluación microbiológica

Se realizaron recuentos totales a la superficie de los camarones siguiendo el método 46.038 descrito en AOAC (1990).

Se utilizó la técnica de vaciado la cual se resume en el cultivo de 1 ml. de la muestra en placas petri sobre las que luego se agregó agar estándar. Las placas se incubaron durante 48 h a temperatura ambiente. El conteo de las bacterias se realizó en las placas que presentaron entre 25 y 250 colonias.

3.4. ANALISIS ESTADISTICO

Para el estudio de tiempo de contacto óptimo camarones-Kilol la evaluación se realizó por triplicado y para evaluar el efecto de la variación de pH sobre la actividad antimicrobiana del Kilol se aplicó un diseño factorial (2 x 2 x 4 x 3) constituido por dos bacterias, dos valores de pH, cuatro concentraciones por triplicado. Los valores se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA).

Las evaluaciones físicas, químicas y microbiológicas del estudio de vida útil de los camarones tratados con Kilol se realizaron por triplicado, para obtener el promedio y la desviación estándar correspondiente.

Para determinar si existía diferencia significativa (se uso un nivel de significancia del 1 %) en las características físicas, químicas y microbiológicas de los camarones tratados con el producto comercial a lo largo del tiempo se aplicó un ANDEVA para el análisis de los resultados.

Para el caso de los efectos que resultaron ser significativos aparece la probabilidad asociada para cada uno de estos. En aquellos casos en que la interacción entre los efectos resultaba ser significativa, no se analizaron los efectos simples, sólo la interacción.

Para el caso de los ajustes con el fin de simplificar, no se hizo la banda de confianza en las figuras. En los datos de análisis microbiológicos, los ajustes realizados son semilogarítmicos.

Para todos los parámetros evaluados en esta investigación el nivel de significancia utilizado fue de un 1 %.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE SEMILLAS DE CITRICOS Y DE EXTRACTOS OBTENIDOS CON SOLVENTES ORGANICOS

4.1.1. Evaluación del efecto antimicrobiano de semillas de naranja, limón y grapefruit

En el Cuadro 4.1 se presenta el resultado obtenido del estudio del efecto antimicrobiano de semillas de cítricos y de los extractos obtenidos.

Para el caso de las semillas de naranja, grapefruit y limón el efecto antimicrobiano que estas presentaron sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* fue negativo. Se asume que el componente antimicrobiano no se encuentra expuesto en la superficie de las semillas por lo que no se inhibe el crecimiento de microorganismos. Por tanto fue necesario realizar extracciones con solventes orgánicos, con el fin de extraer el compuesto de las semillas con efecto antimicrobiano.

Las extracciones realizadas con éter de petróleo, acetona, metanol y la mezcla de ácidos se hicieron de manera creciente en polaridad, de esta forma se aseguró que todos los compuestos existentes fueron extraídos.

El extracto etéreo presentó un color amarillo claro y aceitoso. Los extractos acetónicos y metanólicos fueron de color anaranjado fuerte y además en ambos casos, al evaporarse se formó un precipitado.

Cuadro 4.1. Efecto antimicrobiano de semillas de cítricos y extractos obtenidos

Tipo de Muestra	Tipo de microorganismos				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Saccharomyces sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
Semillas de naranja (*)	(-)	(-)			
Semillas de limón (*)	(-)	(-)			
Semillas de grapefruit(*)	(-)	(-)			
Extracto etéreo de semillas de naranja	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Extracto acetónico de semillas de naranja	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Extracto metanólico de semillas de naranja	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Extracto con mezclas de ácidos de semillas de naranja	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Extracto etéreo acidificado emulsificado	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Extracto acetónico acidificado emulsificado	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Extracto metanólico acidificado emulsificado	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Cromatoplacas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Producto comercial Azutrex	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(*) El efecto antimicrobiano de las semillas sólo se evaluó para *Staphylococcus* y *Penicillium*

El efecto inhibitorio de los extractos (etéreo, acetónico y metanólico) de semillas de naranja sobre el crecimiento de los microorganismos en estudio (Cuadro 4.1) fue negativo. El mismo efecto se presentó en todas las muestras y en el control sin extracto. Sin embargo, el extracto de semillas de cítricos, conocido comercialmente como Azutrex, sí presentó un halo de inhibición bastante claro.

Para el caso de los extractos acidificados el efecto antimicrobiano fue también negativo. Al añadir a los diferentes extractos obtenidos las mismas cantidades de ácido los valores de pH estos fueron diferentes (Cuadro 4.2). Los cambios de pH se deben a que por efecto de polaridad los compuestos que se extrajeron son diferentes. Entre mayor la polaridad de los solventes de extracción mayor el pH que presentan (Cuadro 4.2). Esto indica la presencia de compuestos básicos o la ausencia de compuestos ácidos en los compuestos extraídos con solventes más polares.

Cuadro 4.2: Valores de pH de los extractos etéreos, acetónicos y metanólicos acidificados

Extracto	pH
Eter de petróleo	2.1
Metanol	2.3
Acetona	2.7
Azutrex	2.6-2.9
Control: mezcla de ácidos cítrico y láctico	2.1

El extracto etéreo y el patrón de comparación de la mezcla agua y ácidos presentaron el mismo valor de pH, lo que indica que en esta extracción no se obtuvo nada que pudiera modificar el pH del mismo. Por otra parte el Azutrex presenta un valor de pH superior a los demás extractos con valores entre 2,6 y 2,9 (Cuadro 4.2).

Todos los extractos presentaron halos de inhibición de igual tamaño a los halos obtenidos para el control de la mezcla de ácidos. Mientras que el Azutrex presentó halos de inhibición de mayor tamaño, para todos los tipos de microorganismos, con respecto a los extractos de semillas obtenidos.

Los resultados sugieren que el efecto antimicrobiano de los extractos de semillas obtenidos se debe a el ácido añadido a estos y no a algún compuesto presente con características antimicrobianas. Miyake (1993) menciona que las semillas de cítricos son fuentes potenciales de limonoides. Por otra parte Gnan y Rana (1982) al evaluar extractos de limoninas sobre *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus oryzae* obtuvieron que los primeros mostraban efecto inhibitorio, mientras que este fenómeno no se observó en *Aspergillus oryzae*.

Probablemente el efecto antimicrobiano de los extractos fue negativo ya que el como mencionan Gnan y Rana (1988), la limonina es un compuesto con efecto antimicrobiano que se descompone fácilmente.

Otro aspecto importante a considerar es la cantidad de semillas que se utilizaron para la extracción. Braddock (1995) menciona que para una exitosa extracción de aceite de semillas se debe de recolectar semillas de cierto número de plantas procesadoras y que la masa de semillas por caja de fruta varía de 0,2 % y hasta 7 % como es el caso de las grapefruits. Es

posible que se requiera una cantidad de semillas muy grande para la extracción del compuesto que presenta efecto inhibitorio, por lo que en los experimentos realizados no se logró extraer el compuesto en la cantidad requerida.

El Azutrex presentó efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Penicillium sp.*, *Saccharomyces sp.* y *Escherichia coli*. El efecto antimicrobiano de este producto comercial puede deberse a un efecto puede deberse a un efecto sinérgico entre un agente activo y a la acción del pH.

4.1.3. Comparación entre los extractos obtenidos y el Azutrex mediante cromatografía de capa fina sobre gel de sílice

Las cromatografías se realizaron con el fin de determinar si los extractos presentaban compuestos similares a los del Azutrex. En ninguna de las cromatoplasmas se obtuvieron compuestos con Rf semejantes a los presentados por el Azutrex. Por lo tanto, se concluyó, que el componente activo del Azutrex es de naturaleza química diferente y de alta polaridad en comparación con los extractos obtenidos.

Al realizar la evaluación del efecto antimicrobiano de los compuestos separados mediante la cromatografías en capa fina, se obtuvo que para todas las cromatoplasmas el efecto resultó ser negativo. Para el caso del Azutrex el resultado fue positivo.

Lo anterior indica que entre los compuestos que contenían los extractos obtenidos ninguno presentó efecto antimicrobiano.

4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL pH, CONCENTRACION Y TIEMPO DE CONTACTO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL KILOL

4.2.1 Evaluación del efecto de pH sobre la actividad antimicrobiana del Kilol

Al realizar la evaluación mediante la técnica de difusión en agar para *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvo que en el análisis de variancia el diámetro promedio del halo de inhibición obtenido no difiere significativamente de un pH a otro. Dado que la *Pseudomonas aeruginosa*, bajo las concentraciones estudiadas, no presentó halos de inhibición (Cuadro 4.3) no fue posible analizar el efecto de la concentración de Kilol ni la interacción entre el pH y la concentración de ese producto.

Para este tipo de microorganismo se obtuvo que bajo las concentraciones utilizadas (1 / 5, 1 / 10 y 1 / 20) no se presentó efecto antimicrobiano alguno. El único halo inhibitorio obtenido fue el obtenido como resultado de la adición de Kilol concentrado, sin embargo, el halo que se obtuvo era tenue y no tan definido como el obtenido para *Staphylococcus aureus* a esa misma concentración. La *Pseudomonas aeruginosa* bajo las condiciones establecidas, es resistente a las concentraciones y pH del estudio.

Para el caso de *Staphylococcus aureus*, se obtuvo que el efecto de pH no fue significativo lo cual indica que los diámetros promedio del halo de inhibición son iguales de un pH a otro. La interacción pH-concentración para el microorganismo *Staphylococcus aureus* tampoco fue significativa, lo que quiere decir que el diámetro presenta la misma variación producto de la concentración en los dos niveles de pH dados.

Sin embargo, los resultados muestran significancia ($p = 0.0001$) en el efecto concentración de Kilol, esto es, existe una diferencia significativa en el diámetro explicada por el cambio en la concentración (Figura 4.1). El ajuste de regresión lineal entre las diferentes concentraciones de Kilol y el diámetro muestra una pendiente positiva: a mayor concentración de Kilol mayor el diámetro de inhibición ($p = 0.0001$ $m = 0.135$) como se observa en la Figura 4.1.

De lo anterior se puede deducir, que el efecto antimicrobiano del Kilol se debe en su totalidad a un componente activo que favorece la inhibición de ciertos microorganismos y no a el pH que este producto presenta.

Bajo las condiciones del estudio, el Kilol no mostró acción antimicrobiana contra la *Pseudomonas aeruginosa*, pero sí contra *Staphylococcus aureus*.

Es importante destacar que según Nishina (1991) el metilparabeno es uno de los compuestos con efecto antimicrobiano en el Kilol. Este compuesto es un antimicrobiano usado por la industria alimenticia y su acción antimicrobiana es independiente del pH del medio.

Cuadro 4.3. Diámetros de los halos de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos al variar el pH del Kilol.

Dilución	Diámetro (mm)	
	pH original	pH neutro
concentrado	1,68	1,58
1/5	0,00	0,00
1/10	0,00	0,00
1/20	0,00	0,00

Cuadro 4.4. Diámetros de los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* obtenidos al variar el pH del Kilol.

Dilución	Diámetro (mm)	
	pH original	pH neutro
concentrado	2,00	2,13
1/5	1,89	1,87
1/10	1,78	1,86
1/20	1,63	1,64

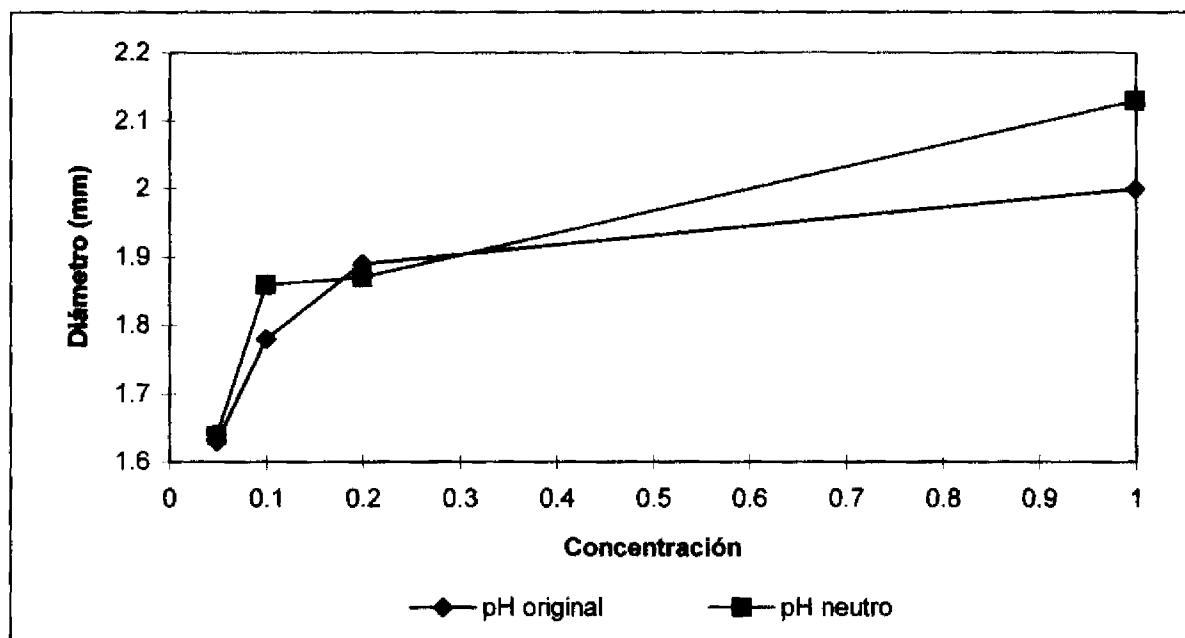


Figura 4.1. Efecto de la concentración de Kilol sobre el diámetro de inhibición para *Staphylococcus aureus*.

4.2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del Kilol

Se determinó la concentración mínima inhibitoria para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se obtuvo que para *Staphylococcus aureus* la concentración mínima inhibitoria fue de 1 / 8000 mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* fue de 1 / 20.

Los valores obtenidos son altos en comparación con los de un estudio similar utilizando jugo de limón Sánchez (1995), quien obtuvo que la concentración mínima inhibitoria para jugo de limón fue de 1 / 4 para *P. aeruginosa* y de 1 / 16 para *S. aureus*. El jugo de limón tiene efecto antimicrobiano que en adición al efecto de pH hace que la concentración mínima inhibitoria sea menor, mientras que para los extractos de semillas el efecto no resultó ser significativo para ninguno de los dos microorganismos estudiados.

Con los dos tipos de microorganismos se observó una diferencia muy marcada en las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas, siendo la *Pseudomonas* mucho más resistente que el *Staphylococcus* al tratamiento con Kilol. Este hecho, es de gran importancia para el estudio ya que se trataron, posteriormente, camarones con Kilol y la principal causa de deterioro microbiológico del camarón está asociada a este microorganismo.

Cuadro 4.5. Concentración mínima inhibitoria de Kilol para *Pseudomonas aeruginosa*

Dilución	Resultado
Concentrado	Negativo
1 / 5	Negativo
1 / 10	Negativo
1 / 20	Negativo
1 / 40	Positivo
1 / 80	Positivo
1 / 160	Positivo

Cuadro 4.6. Concentración mínima inhibitoria de Kilol para *Staphylococcus aureus*

Dilución	Resultado
Concentrado	Negativo
1 / 500	Negativo
1 / 1000	Negativo
1 / 2000	Negativo
1 / 4000	Negativo
1 / 8000	Negativo
1 / 16000	Positivo

Con base en los datos que se presentan en el Cuadro 4.5 se deduce que, para tratar camarones con Kilol se puede utilizar la concentración 1/ 20 pues se asegura la eliminación de la *Pseudomonas aeruginosa* y como es de esperar, se previene la presencia absoluta de *Stahylococcus aureus*. Esta concentración, se considera como la adecuada tomando en consideración: (1) que la concentración de microorganismos con la que se trabajó en la prueba fue entre 10^8 y 10^9 UFC / mL y (2) que el tiempo de contacto del Kilol con los microorganismos fue de 24 h.

4.2.3 Determinación del tiempo de contacto óptimo del Kilol aplicado en camarones frescos.

Una vez establecida la concentración de Kilol que debía ser utilizada, fue necesario establecer el tiempo de contacto óptimo entre los camarones y el Kilol. De manera que se asegurara la reducción inicial de microorganismos y por ende una mayor vida útil del músculo de camarón.

Para determinar el tiempo de contacto óptimo se realizaron recuentos microbiológicos superficiales de camarones durante 0, 10, 20 y 30 minutos de contacto de los camarones y el Kilol.

El hecho de que los recuentos microbiológicos iniciales obtenidos a los 0 minutos fueron muy altos, permitió tener valores que hicieron claras las diferencias entre los tratamientos a través del tiempo. Este recuento inicial obtenido concuerda con lo establecido por Brenner (1994), quien menciona que los camarones dependiendo de el lugar de donde se capturen presentan recuentos iniciales de 1×10^4 y 1×10^5 UFC / g. Los camarones utilizados para esta parte del estudio provenían de Puntarenas y fueron capturados por barcos camaroneros.

Las lecturas de los recuentos microbiológicos se realizaron para dos periodos de incubación: 48 y 72 h. Se encontró, que tanto el periodo de incubación como la interacción entre el periodo de incubación x tiempo de contacto resultaron no significativas. Lo que implica, que el periodo de incubación no influye en el recuento total de microorganismos, y que la tendencia en el tiempo de éste es la misma para cada uno de los periodos de incubación.

El tiempo de contacto camarón y el Kilol resultó ser significativo ($p = 0.0001$). Es decir, entre más tiempo estén en contacto los camarones con el Kilol se da una reducción significativa ($p = 0.0001$) de la carga microbiana. Este efecto fue estudiado por medio de un análisis de regresión que mostró, para el recuento total superficial de microorganismos, una tendencia exponencial descendente significativa ($p = 0.0001$, $m = -1.16$) ante cambios de 10 minutos en el tiempo de contacto del Kilol con los camarones (Figura 4.2).

Se concluyó, que el tiempo de contacto óptimo para camarones es de 30 minutos (Figura 4.2) ya que es el tiempo en el que se logra la mayor disminución de microorganismos (2 logaritmos), siendo esta disminución significativa ($p = 0.0001$) en el tiempo.

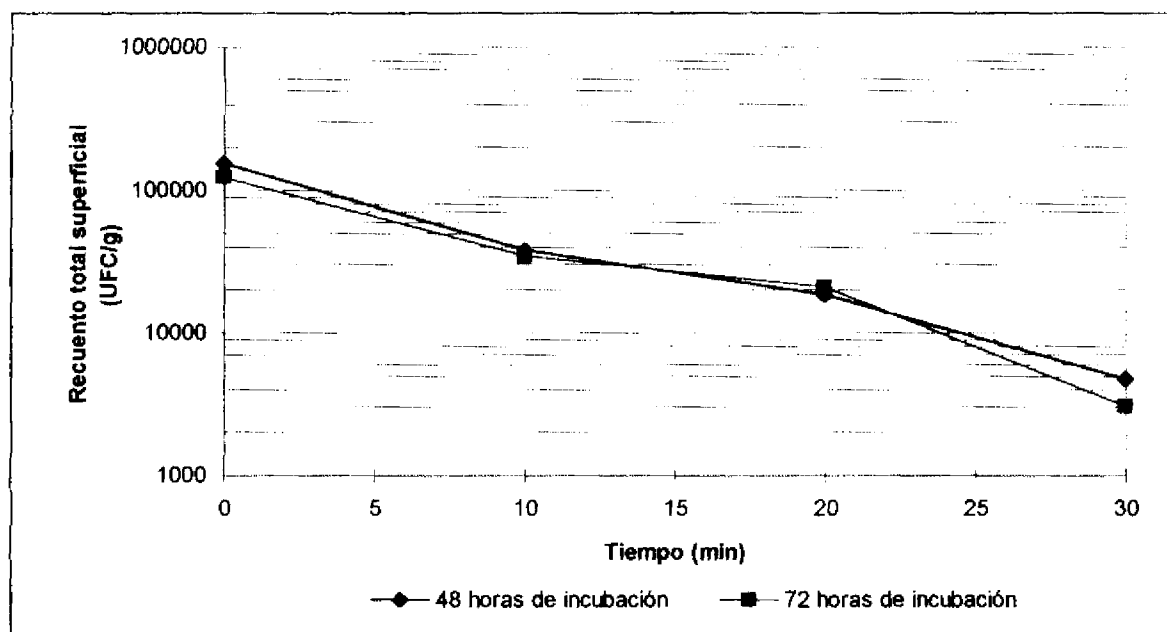


Figura 4.2. Recuento total superficial según tiempo de contacto entre los camarones y el Kilol.

4.3. ESTUDIO DE LA CALIDAD FISICO-QUIMICA Y MICROBIOLOGICA DEL CAMARON FRESCO TRATADO CON KILOL Y ALMACENADO EN HIELO.

4.3.1 Evaluación del pH en función del tiempo

Las evaluaciones de pH del músculo de camarón licuado revelaron que existen valores de pH significativamente diferentes ($p = 0.0001$) con un nivel de significancia de 1 % cuando el camarón fue tratado con diferentes concentraciones de Kilol. Así mismo, se encontró valores significativos ($p = 0.0001$) en los cambios de pH a través del tiempo.

El análisis de los resultados de la interacción concentración x tiempo mostraron valores significativos ($p = 0.0001$). Se deduce entonces que el comportamiento del pH es diferente entre las concentraciones y también es diferente para cada tiempo.

En los tres tratamientos, la tendencia del pH con respecto al tiempo es creciente, ajustándose al modelo lineal (Figura 4.3). De acuerdo con Maza (1986) a partir de un pH de 8 se considera que los camarones son de baja frescura. En la figura 4.3 se observa que para el día 13 el pH de los camarones sin Kilol es cercano a 7,5, mientras que los tratados con Kilol presentan un pH de 7,70. Esto indica que los camarones tratados con Kilol están próximos a no cumplir con las normas de calidad.

Los camarones tratados con Kilol, independientemente de la concentración, presentan un aumento constante y significativo ($p = 0.0001$, $m = 0.1$) de pH a través del tiempo. Esto concuerda con los valores obtenidos de BVNT como se verá más adelante (Figura 4.5.). Probablemente los aumentos de pH observados se deben a la formación de bases volátiles

nitrogenadas u otro tipo de compuestos producidos por reacciones químicas que ocurren entre el Kilol y el músculo del camarón.

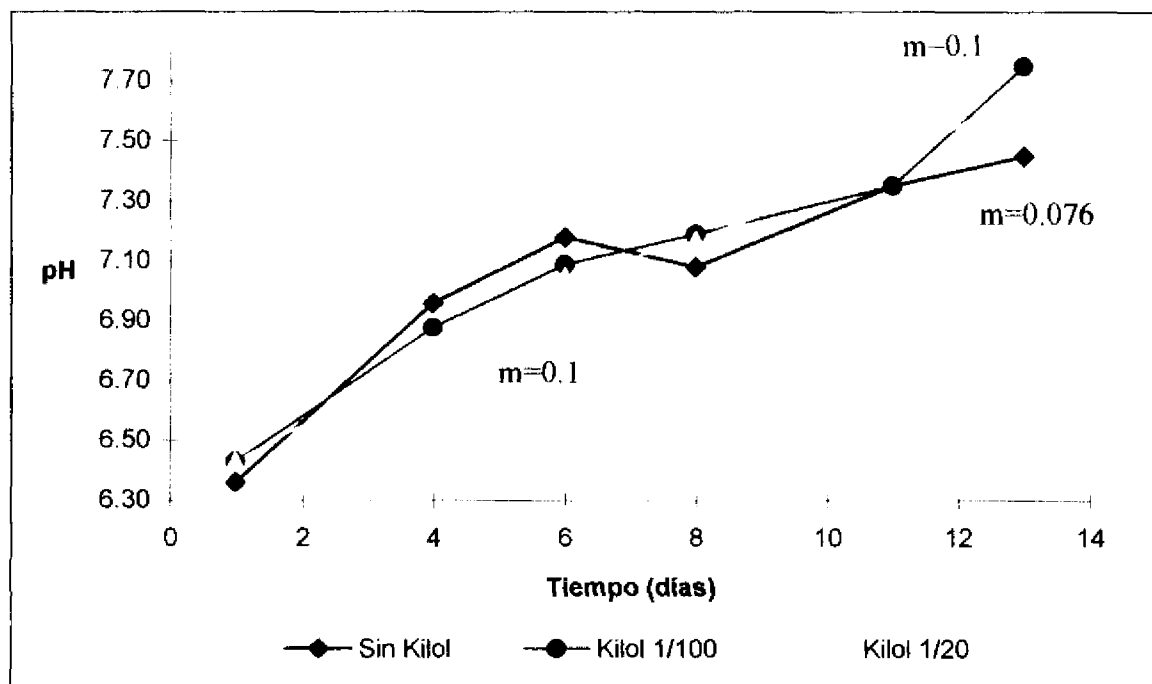


Figura 4.3. Efecto del Kilol sobre el pH del músculo del camarón en función del tiempo.

4.3.2. Evaluación de la presencia de melanosis

Al tratar los camarones con Kilol se observó, a simple vista, la aparición de melanosis acelerada que se podía diferenciar fácilmente al compararlo con los camarones sin tratamiento.

Por esta razón, se efectuó un análisis de las muestras utilizando el colorímetro Hunter-Lab. El parámetro de medición que se consideró fue "L", el cual va en una escala de 0 (negro) -100 (blanco).

Al evaluar la presencia de melanosis a través del tiempo en camarones tratados con diferentes concentraciones de Kilol, se obtuvo que la luminosidad no es significativa a través del tiempo, por lo que se deduce que el cambio de color de los camarones tratados con Kilol, se dio inmediatamente al entrar en contacto el producto con el músculo de camarón.

La interacción entre la concentración de Kilol y el tiempo de almacenamiento es significativa ($p = 0.0001$). Es decir, la presencia de melanosis es significativamente diferente dentro de cada concentración y a su vez es significativa para cada día de muestreo.

El análisis de tendencias reveló que estadísticamente los camarones sin Kilol no mostraron aumento de la melanosis en el tiempo. Como se observa en la Figura 4.4, el comportamiento a través del tiempo es casi constante, por lo que se puede decir que estos no cambiaron de color en el tiempo. A los 13 días de almacenamiento los camarones no presentaron melanosis.

En los camarones tratados con Kilol, se obtuvo que tanto para la concentración 1 / 20 como para la de 1 / 100 la luminosidad presenta una tendencia decreciente. Para el caso de

tratamiento 1 / 20 la disminución se da en forma más acelerada ($m = -1.24$) que para la concentración 1 / 100 ($m = -0.98$). Es decir, la presencia de melanosis aumenta en el tiempo y al aumentar la concentración de Kilol la melanosis es mayor.

Bioquímicamente se conoce que la melanosis se expresa en los tejidos del camarón por la reacción que ocurre entre la polifenoloxidasa que es una enzima endógena del camarón y la tirosina liberada durante la autólisis de las proteínas del mismo (Morais, 1984). Así mismo, es de esperar que el Kilol al ser un extracto natural que contiene la enzima polifenoloxidasa, la cual, contribuye también a la formación de la mancha negra (melanosis) observada en los camarones tratados con Kilol. Además la enzima requiere como cofactor cobre, el cual se encuentra presente en la sangre del camarón.

En investigaciones efectuadas en Japón (Nishina, 1991) en Kilol DF-100 se encontraron dos compuestos responsables de su efecto antimicrobiano: 2,4,4' tricloro-2' hidroxidifenil éter y p-hidroxibenzoato de metilo (Figura 2.3). Este último compuesto al presentar un grupo hidroxilo favorece la oxidación y degradación de los tejidos para la producción de compuestos que inducen el oscurecimiento.

En vista de que la enzima polifenoloxidasa se encuentra en el pH óptimo de acción se favorece también la formación de melanina. De acuerdo con lo mencionado por Morais (1984), el pH óptimo para la formación de melanosis está en un intervalo entre 6,7 y 8, lo cual es totalmente coincidente con lo obtenido en esta investigación (Figura 4.3), en donde, apartir del cuarto día del tratamiento, se observan valores de pH dentro del rango óptimo para la formación de melanosis que sugiere Morais (1984).

Las causas posibles que contribuyeron al oscurecimiento del Kilol mencionadas anteriormente, fueron estudiadas mediante un corto experimento, en el cual se añadió Kilol, tirosina en polvo y un alambre de cobre. Al agregar a estos una solución de hidróxido de potasio al 1 % como medio básico el resultado fue positivo, la solución se oscureció en forma inmediata.

En otra investigación, en donde se usó Kilol para la conservación de palmito de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K), se encontró, que el Kilol oscurece el palmito pero mantiene aceptable la calidad microbiológica del mismo, al ser tratado por inmersión y almacenado por 15 días (Córdoba, 1995).

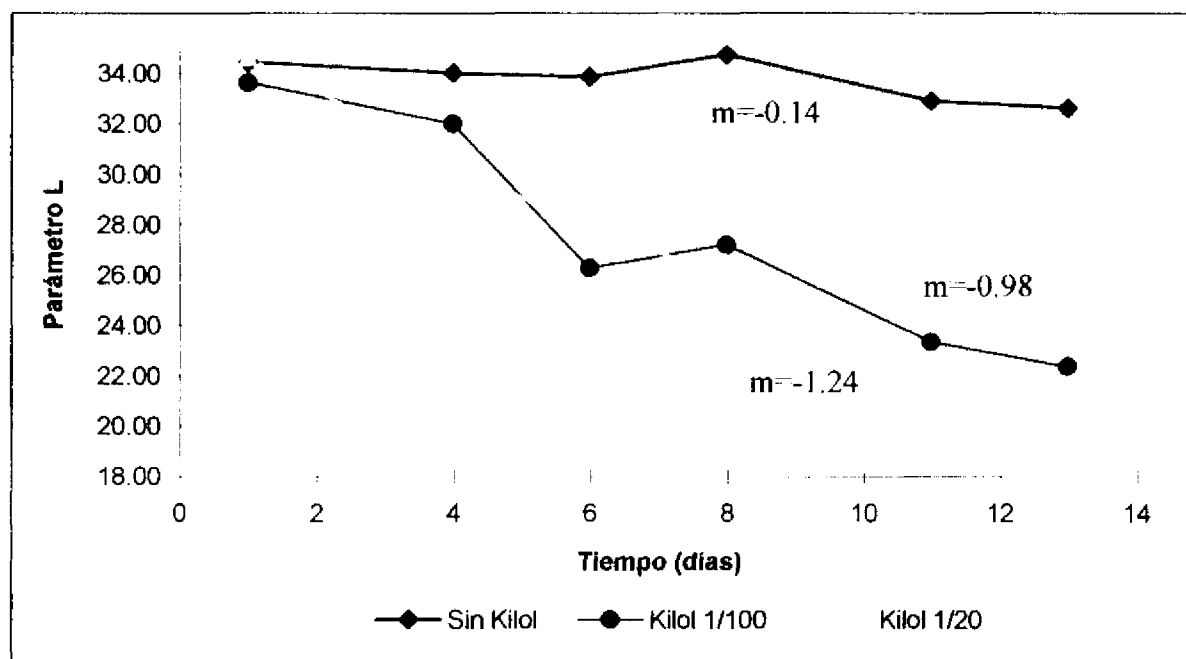


Figura 4.4. Efecto del Kilol sobre el oscurecimiento del músculo del camarón en función del tiempo.

La determinación de las bases volátiles nitrogenadas totales (BVNT) en tejidos de camarón tratado con Kilol presentaron dos efectos simples: el de la concentración de Kilol utilizada que es significativo ($p = 0.0001$) y el de tiempo de captura de los camarones que también es significativo ($p = 0.0001$).

La interacción es significativa, lo que indica que las bases volátiles nitrogenadas son significativamente ($p = 0.0001$) diferentes en las distintas concentraciones de Kilol y además las bases también son diferentes dentro de cada período de tiempo.

Como se observa en la Figura 4.5 la diferencia entre los tratamientos es significativa ($p = 0.0001$). La producción de bases volátiles es mayor ($m = 5.71$ y $m = 5.93$ para Kilol 1 / 100 y 1 / 20 respectivamente) en los camarones tratados con Kilol. Para descartar la posibilidad de que el Kilol residual en los camarones pudiera contener bases volátiles nitrogenadas que interfiriera con los resultados del experimento. Se efectuó un análisis a una muestra de Kilol concentrado. El resultado de la determinación fue de 1.28 mg %, lo cual sugiere que el aumento en las BVNT no se debe a la presencia de Kilol.

En la Figura 4.5 se observa que entre el día 1 y el 4 hay un aumento muy importante en el contenido de bases volátiles en los camarones tratados con Kilol, a diferencia de los no tratados, en donde no presentan cambios durante ese período. A partir del cuarto día, los camarones tratados con Kilol tienden a no producir más bases volátiles mientras que en aquellos no tratados el aumento es gradual.

Probablemente en los camarones tratados con Kilol ocurre un estímulo en la producción de bases volátiles, que se evidencia claramente en la medición efectuada a los 4 días (Figura 4.5). A partir de ese momento, la producción de las bases volátiles se estabiliza. En el día 4 se observó la aparición de la melanosis por lo que se infiere que los compuestos intermedios de la reacción de melanosis, como es el 5,6 dihidroxi- indol, interfieren en la producción de bases volátiles nitrogenadas. Este hecho podría explicar porque los resultados de BVNT son mayores para los camarones tratados con Kilol.

Como se observa en la Figura 4.5, los camarones sin Kilol, muestran un comportamiento estable de bases volátiles hasta el cuarto día. Apartir de ese día se da un aumento considerable en las bases volátiles nitrogenadas; esto se debe a que de 1 a 4 días las enzimas proteolíticas, procedentes del propio camarón o liberadas al medio por microorganismos, producen hidrólisis de las proteínas del camarón liberándose los aminoácidos correspondientes. De manera que se acelera la degradación de los componentes del músculo, hasta el día 8 en el que las BVNT vuelven a ser estables.

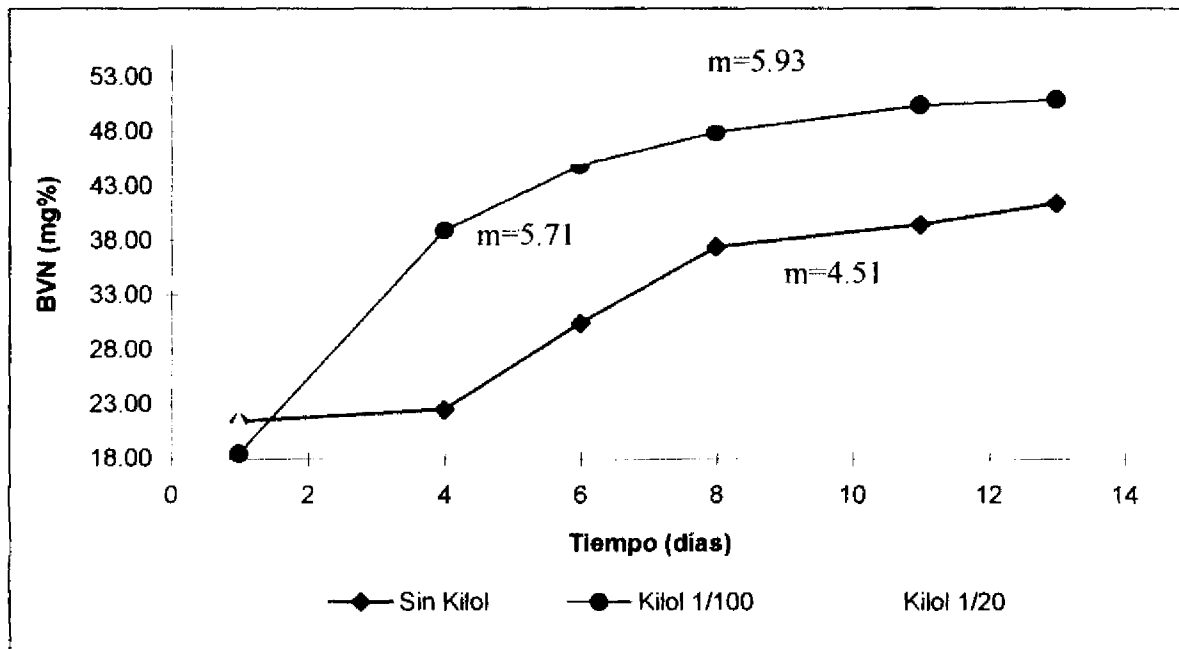


Figura 4.5. Efecto del Kilol sobre la producción de bases volátiles nitrogenadas totales en el músculo del camarón en función del tiempo.

4.3.4 Evaluación microbiológica

Estadísticamente la tendencia en el tiempo del cambio en el recuento microbiológico así como la concentración de Kilol resultaron ser significativos ($p = 0.0001$). La interacción tiempo x concentración también resultó ser significativa ($p = 0.0001$). Lo que implica que la tendencia de disminución en el recuento microbiológico a través del tiempo es diferente para cada una de las concentraciones de Kilol utilizadas.

En la Figura 4.6 se observa, que la carga inicial de microorganismos es baja en comparación con los camarones utilizados para el estudio de tiempo óptimo de contacto (Figura 4.2) ya que estos últimos provenían de capturas realizadas en el mar, mientras que los otros fueron cultivados en cautiverio. El efecto del Kilol varía dependiendo del origen de captura del camarón. Para los camarones provenientes de cautiverio la reducción inicial en la población de microorganismos no fue tan alta como en aquellos provenientes de la captura en mar abierto. Este fenómeno probablemente se deba a las diferencias en la flora natural que prevalecen en cada uno de los dos sitios de captura y a la manipulación que se les da.

En la Figura 4.6 se observa, el crecimiento de la población microbiana a través del tiempo, la misma es más acelerada en los camarones no tratados ($m = 0.51$) que en aquellos tratados con Kilol en concentraciones de $1 / 100$ y $1 / 20$ ($m = 0.485$ y $m = 0.489$ respectivamente).

Los camarones tratados con Kilol $1 / 20$ presentan un crecimiento de microorganismos constante entre los días 1 y 6. Esto confirma que el aumento en la producción de las bases volátiles hasta el día 4 (Figura 4.5) no se debe a la formación de bases por acción microbiana, sino más bien al efecto de la melanosis observada.

La tendencia que se presenta entre 1 a 6 días es muy clara para el tratamiento a una concentración de Kilol $1 / 20$, sin embargo, no ocurre lo mismo para una concentración de Kilol de $1 / 100$, ya que, esta última concentración es inapropiada para la inhibición de *Pseudomonas*, tal como se obtuvo al determinar la concentración mínima inhibitoria (Cuadro 4.5).

Es de esperar que la mayoría de los microorganismos que se encuentran presentes en los camarones sean *Pseudomonas* ya que es un microorganismo que como menciona Frazier (1993) presenta muchas características que favorecen su crecimiento: es psicrófilo, aerobio y tiene la capacidad de utilizar alimentos nitrogenados sencillos, entre otras. Además, Vanderzant (1992) menciona que las *Pseudomonas* son parte de la flora normal del camarón.

Para el caso de la concentración de Kilol 1 / 100 es probable que los microorganismos Gram positivos como el *Staphylococcus* se inhibieron desde el inicio pues a esa concentración se da inhibición de este tipo de microorganismos, de esta forma, se eliminó toda la competencia para la *Pseudomonas* cuya acción no se ve inhibida a dicha concentración.

El análisis del efecto de los tratamientos entre los días 8 y 11 indican, que si bien es cierto pareciera que hay un aumento en las poblaciones de microorganismos, es claro que aún al final del experimento en el día 13, se observan diferencias en cuanto a las poblaciones de microorganismos en donde la concentración 1 / 20 es más efectiva que la 1 / 100 y que estas dos difieren del tratamiento control (Figura 4.6).

Al cabo de los 13 días de tratamiento con Kilol se obtuvo una disminución en 2 logaritmos de la carga microbiana final en comparación con la carga microbiológica del control (Figura 4.6). Estos resultados son concordantes con las pruebas realizadas para la determinación del tiempo de contacto camarón-Kilol (Figura 4.2) en el que se obtuvo una reducción en la carga microbiológica en 2 logaritmos.

Si bien es cierto, los camarones que presentan melanosis (mancha negra) no necesariamente son inadecuados para el consumo humano como menciona Morais (1984), su apariencia se torna menos aceptable para los consumidores y sugiere que estos camarones han sido manipulados y almacenados en forma inadecuada.

Según Nishina (1991), uno de los dos compuestos responsables del efecto antimicrobiano del Kilol es el metil parabeno, el cual, es un antimicrobiano utilizado en la industria alimenticia. Este antimicrobiano presenta dos características que concuerdan con los resultados obtenidos (1) actúa principalmente contra bacterias Gram positivas y (2) su efecto antimicrobiano no se ve afectado por el pH en el que se encuentre (Taylor, 1992). El otro compuesto aislado del Kilol es el 2,4,4' tricloro-2' hidroxidifenil éter el cual no es un compuesto natural (Nishina, 1991).

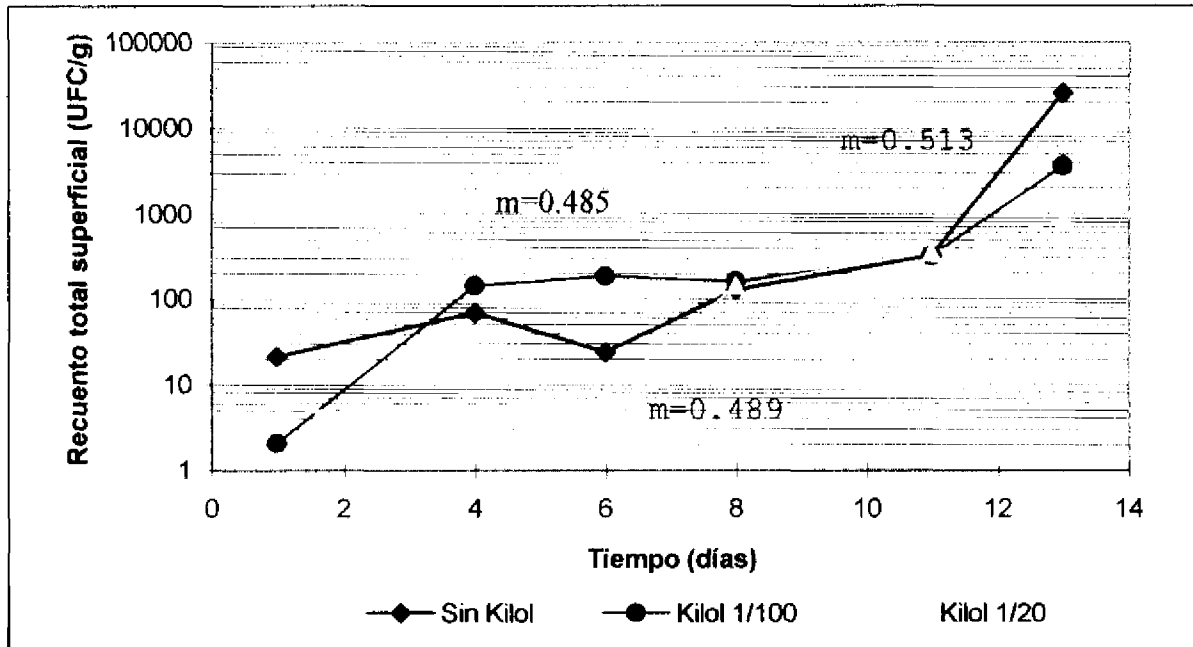


Figura 4.6. Recuentos totales superficiales en el tejido del músculo de camarones tratados con Kilol en función del tiempo.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación se concluye:

No se encontró efecto antimicrobiano sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* cuando, mediante la técnica de difusión en agar, estos microorganismos se pusieron en contacto con semillas molidas de naranja, grapefruit y limón.

Los extractos etéreos, acetónicos, ácidos y metanólicos de semillas de naranja no presentaron efecto antimicrobiano alguno sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium sp.*, *Saccharomyces sp.* y *Escherichia coli*.

El producto comercial a base de extractos de semillas de cítricos, Azutrex, presenta acción antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium sp.*, *Saccharomyces sp.* y *Escherichia coli*.

- La actividad antimicrobiana del Kilol no se ve afectada al variar el pH del mismo. Sin embargo, al variar la concentración, sí existe diferencia significativa ($p=0.0001$) sobre la actividad antimicrobiana .
- La concentración mínima inhibitoria de Kilol para *Staphylococcus aureus* es de 1 / 8000 y para *Pseudomonas aeruginosa* es de 1 / 20, bajo las condiciones utilizadas .
- El tiempo de contacto del Kilol con el músculo de camarón es significativo ($p=0.0001$). Se determinó que el tiempo de contacto óptimo es de 30 minutos.
- Del estudio de vida útil realizado para camarones tratados con Kilol en las concentraciones de 1 / 20 y 1 / 100 y con un tiempo de contacto de 30 minutos se concluye que:
 - a) El pH de camarones tratados con Kilol es significativamente diferente ($p=0.0001$) a través del tiempo y para cada concentración de Kilol que se utilice.
 - b) Las bases volátiles nitrogenadas totales (BVNT) en camarones tratados con Kilol son significativamente diferentes ($p=0.0001$), a través del tiempo y para cada concentración de Kilol que se utilice.

c) Los recuentos microbiológicos de los camarones tratados con Kilol son significativamente diferentes ($p=0.0001$), a través del tiempo y para cada concentración de Kilol que se utilice.

d) El Kilol en la concentración de 1 / 20 reduce la población de microorganismos en 2 logaritmos, para una concentración de 1 / 100 es de 1 logaritmo. Sin embargo, el efecto antimicrobiano del Kilol pareciera deberse a la presencia de metilparabeno en su formulación.

e) El fenómeno de la melanosis para camarones tratados con Kilol se presenta en menos de 3 días sin importar la concentración del producto.

f) La melanosis que se presenta en camarones tratados con Kilol no es causada por efecto de los microorganismos sino, por una reacción que se ve favorecida con la adición de Kilol.

CAPITULO 6

RECOMENDACIONES

Investigar otros métodos de extracción de semillas de cítricos para evaluar su efecto antimicrobiano.

Dar seguimiento a los camarones tratados con Kilol inmediatamente después de que este haya sido agregado. De manera que se determine el momento exacto en el cual se inicia el oscurecimiento e investigar las causas por las que este se presenta.

Hacer un estudio mas detallado para determinar si el Kilol, Azutrex y Citrex contienen agentes preservantes de origen no natural.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1990. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. Asociation of official analytical chemists. Washington. 46.038.
- AOMAYA, M. et al. 1994. **Effect of extracts from sesame seeds on the stability of fish oil**. Journal of the Japan Oil Chemists Society 43 (2):154-157.
- BANWART, G. 1979. **Basic Food Microbiology**. AVI. Westport Connecticut.
- BARROSO, M. et al. 1972. **Grapefruit seed oil sterols**. Journal of the American Oil Chemists Society 49 (1):85-86.
- BASKER, H. et al. 1973. **Gas chromatographic detection of limonin**. Lebensmittel-Wissenschaft-Technologie 6 (1):34-35.
- BELTZ, H. 1988. **Química de los Alimentos**. 2 ed. Zaragoza. Acribia.
- BENNER et al. 1994. **Lactic acid/melanosis inhibitors to improve shelf life of brown shrimp (*Penaeus aztecus*)**. Journal of Food Science 59 (2):242-245.

- BENNET, R. 1971. **Acidic limonoids of grapefruit seeds.** *Phytochemistry* 10 (12):3065-3068.
- BLOCK. 1983. **Desinfection and Preservatives.** México. Mc Graw Hill.
- BRADDOCK, R. & KETERSON, J. 1972. **Amino acids of citrus seed meal.** *Journal of the American Oil Chemists Society* 49 (11):671-672.
- BRADDOCK, R. 1995. **By-products of citrus fruit.** *Food Technology* 49 (9):74-77.
- CENPRO. 1993. **Costarican Export Directory.** San José.
- CHACON, A. et al. 1994. **Plan Nacional de Ordenación y Desarrollo Pesquero de Costa Rica.** Puntarenas. INCOPESCA.
- CHO, S et al. 1991. **Efficacy of grapefruit seeds extract in the preservation of satsumas.** *Korean Journal of Food Science and Technology*, 23 (5):614-618.
- COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS. 1992. **Informe de la 20ava reunión del comité del Codex sobre pescado y productos pesqueros.** Roma, FAO-OMS.
- CORDOBA, I. 1995. **Estudio sobre el efecto del empaque y la inmersión en la conservación del palmito fresco.** Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. San José. Universidad de Costa Rica. Escuela de Teconología de Alimentos.

- DESROSIER, N. 1984. **Elements of food technology**. AVI. Westport Connecticut.
- DIRECCIÓN GENERAL DE ESTADÍSTICA Y CENSOS HASTA 2-02-95.
Informe Ministerio de economía y comercio.
- FLORIDA DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 1995. **Citrus summary, 1993-94**. Florida Agricultural Statistics Service. Orlando Florida.
- FRAZIER, W. 1993. **Microbiología de Alimentos**. 4 edición. Zaragoza. Acribia.
- GARRIDO, F. et al. 1992. **Utilización de residuos, desechos y desperdicios de la industria cítrica**. Alimentos 17 (1):56-63.
- GNAN, S. & RANA, M. 1982. **Antimicrobial activity of limonene**. Libyan Journal of Agriculture 11:99-102.
- GONZALEZ, A. et al. 1994. **Screening of antimicrobial and cytotoxic activities of Panamanian plants**. Phytomedicine 1:149-153.
- HABIB, M. 1986. **Chemical evaluation of Egyptian citrus seeds as potential sources of vegetable oils**. Journal of the American Oil Chemists Society; 63 (9):1192-1197.
- HERRERA, C. 1989. **Evaluación de la calidad de pescado, mariscos y productos pesqueros**. Universidad Nacional. Departamento de Química. Heredia.

- HERRERA, C. 1994. **Manual de prácticas de laboratorio: Química de Alimentos**. Universidad de Costa Rica. Escuela de Química. San José.
- HOWELL N. 1995. **Evaluación de la Calidad Bacteriológica de Ensaladas de Barras de Hoteles de Primera Clase del Area Metropolitana**. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. San José. Universidad de Costa Rica. Escuela de Tecnología de Alimentos.
- JUNQUERA, B et al. 1992. **El pardecamiento enzimático en uva y vino**. Revista Española de Ciencia y Tecnología Alimentaria 32 (5):481-489.
- LIMA DOS SANTOS et al. 1981. **Guidelines for chilled fish storage experiments**. Roma, FAO Fish Technical Paper n.210.
- LUNA, G. 1987. **Cambios químicos y microbiológicos en la descomposición de camarones**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 21 (3):381-399.
- MATA, L. 1992. **El cólera, prevención y control**. EUNED.
- MAYER, V. et al. 1969. **Limonin D-ring-lactone hydrolase. A new enzyme from citrus seeds**. Phytochemistry; 8 (2):405-407.
- MAZA, S. 1986. **Manual de procesamiento y control de calidad de camarón congelado**. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Lima.
- Mc EVILY A. et al. 1991. **Sulfite Alternative prevents shrimp melanosis**. Food Technology 7 (9):80-86.

- MIYAKE, M. et al. 1993. **Recovery of seeds from processing waste of natsudaidai (Citrus natsudaidai Hayata).** Journal of Japanese Society of Food Science and Technology 40 (11):807-813.
- MONGE, R. 1995. **Información sobre el registro de Kilol, Citrex y Azutrex.** San José. Ministerio de Salud, Departamento de Control de Alimentos. Comunicacion Personal.
- MONTERO, M. & BORDERÍAS, J. 1988. **Alteraciones de las proteínas en pescado.** Alimentos 13 (3):43-53.
- MORAIS, C. 1984. **Causa e prevencao da mancha negra en camaroes.** ITAL 21 (2):121-135.
- NISHINA, A. et al. 1991. **Antimicrobial substances in DF-100 extract of grapefruit seeds.** Journal of Antibacterial and Antifungal Agents, Japan 19 (8):401- 404.
- OZAKI, Y. et al. 1995. **Limonoid glucosides in fruit, juice and processing by-products of Satsuma Mandarin (Citrus unshiu Marcov.)** Journal of Food Science 60 (1):186 -189.
- PHARMACOPEIA. 1990. **The Unites States Pharmacopeia.** United States Pharmacopeial convention, Inc. Rockville, MD. Volumen 22.
- PROVEQUI S.A. 1991. **El Kilol DF-100 en la desinfección de plantas y afines alimentarias.** San José. Boletín Técnico.

PROVEQUI S.A. 1994. **Azutrex**. San José. Boletín Técnico.

PROVEQUI S.A. 1995. **Kilol: Nueva tecnología en desinfección al alcance de la industria**. San José. Boletín técnico.

REX, O et al. 1976. **Aspectos microbiológicos del procesamiento de langostinos congelados**. Alimentos 1 (1):13-14.

RIVERA et al. 1994. **Suceptibility of the bacterium *V cholerae* to acid pH in salad vegetables: An ultrastructural view**. Biología Tropical 42:97-102.

SANCHEZ, M. 1995. **Efecto inhibitorio de extractos de cítricos sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus***. Tesis Lic. en Microbiología. San José. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología.

SKINNER, F. & CARR, J. 1976. **Microbiology in agriculture, fisheries and food**. New York. Academic Press.

SRIVASTAVA S. 1986. **Limonoids from the seeds of *Melia azedarach***. Journal of Natural Products 49 (1):56-61.

SUNG et al. 1993. **Prevention of microbial post-harvest injury of fruits and vegetables using grapefruit seed extract, a natural antimicrobial agent**. Journal of the Korean Agricultural Chemical Society 36 (4):277-283.

TAYLOR, S. 1992. **Aditivos e ingredientes alimentarios usos y aplicaciones.**
CINDE-Division Industrial.

VANDERZANT, C & SPLITTSTOESSER, F. 1992. **Compendium of methods
for the microbiological examination of foods.** 3era edición. American
Public Health Association. Washington.

ZAVALA, W. 1995. **Diagnóstico del cultivo de camarón en Costa Rica.**
Puntarenas. INCOPESCA.

APENDICE A

ENCUESTA TELEFONICA REALIZADA SOBRE EL USO DE KILOL

EN EMPRESAS COMERCIALIZADORAS DE MARISCOS

Cuadro A.1.1. Encuesta telefónica realizada sobre el uso de Kilol en empresas comercializadoras de mariscos (*)

Empresa	Usa Kilol en su empresa ?		
	Sí	No	Lo ha usado alguna vez
Alimentos Congelados Oro S.A	X		
Pesca Palmares S.A.	X		
Acuacorporación S.A.			X
Azores Marítima	X		
Inversiones y Proyectos del Lago		X	
Compañía Exportadora de Mariscos			X
Coopemontecillos	X		
Exportadora Pargo	X		
Exportadora Frumar S.A.	X		
Expun	X		
Fedepesca			X
Industrias Martec S.A.	X		
Inversiones Delka S.A.			X
Luna de Oro S.A.	X		
Carnes y Fibras del Mar S.A.		X	
Criadero de Camarones Chomes S.A.		X	
La Popa S.A.	X		
Mariscos Wang S.A.		X	
Talmana S.A.		X	
Central de Exportaciones Agroindustriales		X	
Cosechas Marinas	X		
Empacadora El Bosque	X		
Exportadora PMT S.A.			X
Intertec S.A.		X	
Inversiones Centenario S.A.	X		
Océano F & C Costa Rica	X		
Langostinos del Pacifico		X	
TOTALES	14	8	5
PORCENTAJE	52%	30%	18%

(*) La entrevista se efectuó el 19 de abril de 1995

APENDICE B

**PROMEDIOS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL ESTUDIO DE
VIDA UTIL DE CAMARONES TRATADOS CON KILOL**

Cuadro A.2.1. Recuentos totales superficiales obtenidos según tiempo de contacto camarón-Kilol para 48 y 72 horas de incubación

Tiempo contacto (min)	Recuento total (UFC/g)	
	48 h de incubación	72 h de incubación
0	1.56×10^5	1.25×10^5
10	3.87×10^4	3.52×10^4
20	1.86×10^4	2.13×10^4
30	4.18×10^3	3.10×10^3

Cuadro A.2.2. Recuentos totales superficiales obtenidos según tiempo de contacto camarón-Kilol para 48 y 72 horas de incubación

Tiempo contacto (min)	Recuento total (UFC/g)	
	48 h de incubación	72 h de incubación
0	1.56×10^5	1.25×10^5
10	3.87×10^4	3.52×10^4
20	1.86×10^4	2.13×10^4
30	4.18×10^3	3.10×10^3

Cuadro A.2.3 Efecto del Kilol sobre el pH del músculo de camarón en función del tiempo

Tiempo (días)	Valores de pH		
	Sin Kilol	Kilol 1/100	Kilol 1/20
1	6,36	6,43	6,43
4	6,96	6,88	6,79
6	7,18	7,09	7,05
8	7,08	7,19	7,17
11	7,35	7,35	7,43
13	7,45	7,75	7,67

Cuadro A.2.4. Efecto del Kilol sobre el oscurecimiento del músculo de camarón en función del tiempo

Tiempo (días)	Parámetro "L"		
	Sin Kilol	Kilol 1/100	Kilol 1/20
1	34,47	33,66	34,68
4	34,03	32,03	30,70
6	33,90	26,31	27,66
8	34,77	27,25	26,19
11	32,93	23,37	22,12
13	32,66	22,39	19,59

Cuadro A.2.5. Efecto del Kilol sobre la producción de bases volátiles nitrogenadas totales en el músculo de camarón en función del tiempo

Tiempo (días)	Bases Volátiles Totales (mg %)		
	Sin Kilol	Kilol 1/100	Kilol 1/20
1	21,5	18,5	21,5
4	22,5	39,0	43,0
6	30,5	45,0	46,0
8	37,5	48,0	49,5
11	39,5	50,5	53,5
13	41,5	51,0	56,0

Cuadro A.2.6 Recuentos totales superficiales en tejido de músculo de camarones tratados con Kilol

Tiempo (días)	Recuento de microorganismos (UFC/g)		
	Sin Kilol	Kilol 1/100	Kilol 1/20
1	2.16×10	0.21×10	0.44×10
4	6.97×10	1.47×10^2	-
6	2.41×10	1.90×10^2	0.82×10
8	1.30×10^2	1.64×10^2	1.47×10^2
11	3.22×10^2	3.27×10^2	3.62×10^2
13	2.57×10^4	3.64×10^3	8.32×10^2