

Efecto del uso de aceite esencial de orégano o benzoato de sodio a 37° C en la carga bacteriana en los pescados tilapia y trucha

Jerimy Arias Rojas¹; Karla Espeleta García¹; Alison Lobo Salas¹
jerimy.arias@ucr.ac.cr, karla.espeleta@ucr.ac.cr, alison.lobo@ucr.ac.cr

RESUMEN

El motivo de este estudio fue analizar cuál es el mejor tipo de preservante en los pescados tilapia y trucha. Se utilizaron dos tipos de preservantes y un control: 1) Aceite esencial de orégano (natural), benzoato de sodio (artificial), control (no aplicar nada). De la combinación de estos dos factores se obtuvieron tres tratamientos en cada tipo de pescado que se analizaron en busca de aquel que incubara menos bacterias. Se encontró que no hubo interacción entre los factores. Los resultados arrojaron que, al comparar el Benzoato contra Orégano, así como el Control contra el Orégano se encontraron diferencias significativas, dando como conclusión que el preservante natural tuvo mayor impacto sobre la carga bacteriana. El experimento fue llevado a cabo bajo un modelo mixto de parcelas divididas sin interacción entre los factores.

PALABRAS CLAVE: Preservantes, modelo sin interacción, parcelas divididas.

ABSTRACT

The reason of this study was to analyze which is the best type of preservative in tilapia and trout fish. Two types of preservatives and a control were used: 1) oregano essential oil (natural), sodium benzoate (artificial), control (no application). From the combination of these two factors, six treatments were obtained and analyzed in search of the one that harbored the least bacteria. It was found that there was no interaction between the factors. The results showed that Benzoate-Oregano and Control-Oregano were significant, leading to the conclusion that the natural preservative had a greater impact on the experiment. On the other hand, no differences considered relevant were found in the other factor, type of fish, since the fish was the block and these were very similar to each other, so there was very little variability from one block to another. The experiment was conducted under a mixed split-plot model with no interaction between factors.

KEY WORDS: Preservatives, non-interaction model, split plots.

INTRODUCCIÓN

En este artículo se plantea la evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano y del benzoato de sodio en los pescados tilapia y trucha. El aceite esencial de orégano es uno de los más potentes y efectivos antimicrobianos naturales (Mera, 2015), y el benzoato de sodio tiene propiedades antibacterianas y antifúngicas, y se utiliza como conservante en formulaciones farmacéuticas y cosméticas (Acofarma, s. f.).

¹ Estudiantes de Estadística de la Universidad de Costa Rica.

Actualmente, por el alto aporte en proteínas y vitaminas, se ha otorgado gran importancia al consumo del pescado. En Costa Rica la demanda del pescado fresco ocupa el primer lugar en cuanto a volumen y valor, específicamente las especies tilapia y trucha, con grandes producciones de tilapia tanto para consumo interno, así como para el mercado internacional, en filete fresco. La producción de trucha es muy modesta y está totalmente destinada al mercado interno (Incopesca, s. f.).

Es importante conocer la procedencia y la manipulación del pescado, ya que este es un producto altamente perecedero y puede tornarse nocivo para el consumidor debido a la presencia de cualquier sustancia o agente. Los microorganismos, principalmente las bacterias, son responsables de ciertas características de los productos y pueden producir efectos microbianos u originar sabores extraños y defectos físicos no deseables (Guerrero, 2000).

En el estudio realizado por Amadio, Medina, Dediol, Zimmermann & Miralles (2011) se menciona que muchas hierbas, en particular de la familia Lamiaceae, a la que pertenece el orégano, han sido evaluadas como antioxidantes y conservantes en alimentos, aumentando así su importancia en la industria alimentaria por ser una alternativa a los aditivos sintéticos. Además, demostró que el aceite esencial de orégano tiene una buena fuente de compuestos fenólicos capaces de proteger contra la oxidación, secuestrando radicales libres y con acción antibacteriana que se podrían incorporar a alimentos para prolongar su vida útil. Con respecto al benzoato de sodio según un estudio del Ministerio de Economía Familiar Comunitaria Cooperativa y Asociativa (s. f.) es uno de los inhibidores más efectivos para la conservación de alimentos y bebidas, inhibe el desarrollo de levadura y bacterias, sin embargo, es considerado perjudicial para la salud.

Dado lo anterior, el objetivo principal del presente estudio es evaluar el efecto antioxidante de los preservantes aceite esencial de orégano y el benzoato de sodio en los pescados tilapia y trucha a una temperatura de 37° C, y como objetivo específico, contrastar los efectos del tipo de preservante en la actividad antibacteriana en los pescados tilapia y trucha en una temperatura de 37° C.

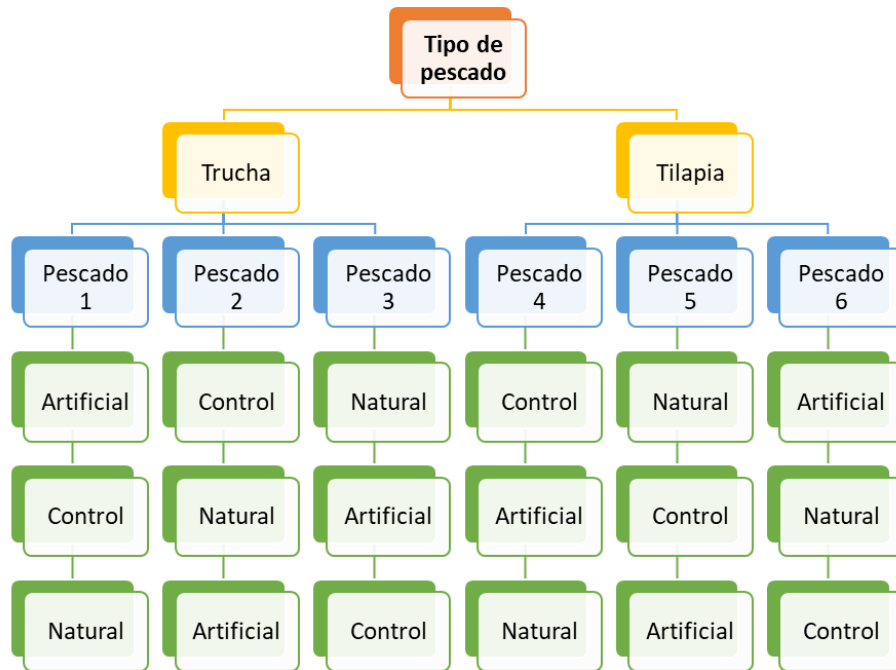
METODOLOGÍA

La unidad experimental fue el pescado. En el experimento se usó un diseño de parcelas divididas, donde cada pescado fue una parcela. Estas parcelas se clasificaron dependiendo del tipo de pescado (factor de parcela) y de cada pescado se tomaron tres trozos a los que se le aplicó los preservantes y se dejó un trozo como control al cual no se le aplicó nada (factor de subparcela).

Se utilizó como factor de diseño el tipo de preservante que tuvo 3 niveles: aceite esencial de orégano, benzoato de sodio y control. Para el factor de parcela se tenía un tipo de pescado planteado en dos niveles: trucha y tilapia. Así, en total 6 tratamientos: tilapia-aceite esencial de orégano, tilapia-benzoato de sodio, tilapia-control, trucha-aceite esencial de orégano, trucha-benzoato de sodio y trucha-control. Se hicieron 3 réplicas por cada tipo de preservante y control, en cada tipo de pescado (*Ver Figura 1*).

Figura 1

Diseño del experimento



En total se prepararon 18 trozos de pescado que pesaban en promedio 100 gramos, a partir de 6 pescados, 3 truchas y 3 tilapias. Para la aplicación de los preservantes se tenía una mezcla de $\frac{1}{4}$ cucharadita de aceite de orégano con 50 mL de agua y $\frac{1}{4}$ cucharadita de benzoato de sodio con 50 mL de agua, las cantidades fueron recomendadas por la experta Natalia Chaves Jiménez.²

La variable respuesta fue la carga bacteriana después de aplicar los preservantes en el pescado, la cual se midió de la siguiente manera; una vez aplicado el preservante a los trozos de pescado se mantuvieron a una temperatura de 37° C por 2 días. Pasados esos días, se agregó cada trozo en un recipiente con 10 mL de solución salina estéril al 0.9% y se mezcló para que las bacterias se diluyeran en todo el líquido, a partir de ahí, se colocaron 4 tubos preparados previamente con 900 microlitros (μl) de solución salina. Posteriormente, se tomó una muestra de 100 μl del recipiente de 10 mL con una micropipeta que se agregaron al tubo uno, después, de ese primer tubo se extrajeron 100 μl y se agregaron al siguiente tubo, y así sucesivamente hasta el tubo cuatro, con el fin de poder obtener mediciones de bacterias desde $1/10^1$ hasta $1/10^4$. Lo anterior se realizó de esta manera debido a que la carga bacteriana en la primera solución puede ser tan alta que no se puede contar con exactitud, por lo cual, para efectos de este experimento se utilizó la placa Petri³ de agar estándar más TTC con la carga bacteriana de la dilución $1/10^4$. Del tubo cuatro se sacó 100 μl para diluirlo en la placa Petri y se dejó en incubación a 37° C de temperatura por un día para que las colonias

² Estudiante de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Costa Rica.

³ Placa Petri es un recipiente redondo de cristal con una tapa de la misma forma, para que se pueda colocar encima y cerrar el recipiente, aunque no de forma hermética.

bacterianas crecieran (en total se obtuvieron 18 placas Petri, una por cada trozo de pescado, y de esta manera al pasar las 24 horas se procedió a contar las Unidades Formadoras de Colonias [UFC]).

El equipo utilizado para medir la carga bacteriana de las muestras de pescado fue proporcionado por la Escuela de Microbiología de la Universidad de Costa Rica y se contó con el apoyo de Jimena Murillo Montero⁴. Para conocer la diferencia de carga bacteriana relevante entre las medias de los tratamientos se le realizó la consulta al experto en Ingeniería de Alimentos Eric Wong González⁵ y estableció, que la diferencia en la carga bacteriana debe ser de al menos 1 logaritmo (UFC/g) para considerarla importante, lo que equivale a 10 bacterias por gramo, entonces, se obtuvo un delta de 1000 UFC/g porque se tenían muestras de 100 gramos.

El modelo para el experimento fue un modelo mixto:

$$\mu_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k;$$

donde:

μ : media general de la carga bacteriana

α_i : efecto de los distintos tipos de preservantes

β_j : efecto de los distintos tipos de pescado

$(\alpha\beta)_{ij}$: efecto de la interacción entre los distintos tipos de pescado y tipo de preservante

γ_k : efecto del bloque

Se realizó un análisis descriptivo acerca de la variabilidad de los bloques con un gráfico en el que se mostró la media general de cada preservante y las medias de los 6 tratamientos. Luego, se procedió a comprobar si había interacción entre los factores, además, se verificó si los supuestos de normalidad y homocedasticidad se estaban cumpliendo y para las pruebas se utilizó un gráfico cuantil-cuantil, la prueba de Bartlett y boxplot, respectivamente y se usó un nivel de significancia del 5%.

Para el modelo resultante, se observaron los contrastes respecto a cada tratamiento, posteriormente, se realizaron las comparaciones entre los tratamientos que presentaron el factor preservante mediante sus contrastes. En los casos en los que se encontraron diferencias, se procedió a calcular el límite inferior de los intervalos de confianza (cota inferior), esto para establecer si las diferencias eran verdaderamente relevantes en términos del experimento, comparándolo con la diferencia importante que estableció el experto (delta=1000). Para finalizar el

⁴ Bachillerato en Estadística y estudiante de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

⁵ Doctorado en Ciencias de la Universidad de Costa Rica.

análisis, se procedió a calcular la potencia de la prueba, esto indica la probabilidad de encontrar una reducción de 1000 o más bacterias en caso de que estas existan.

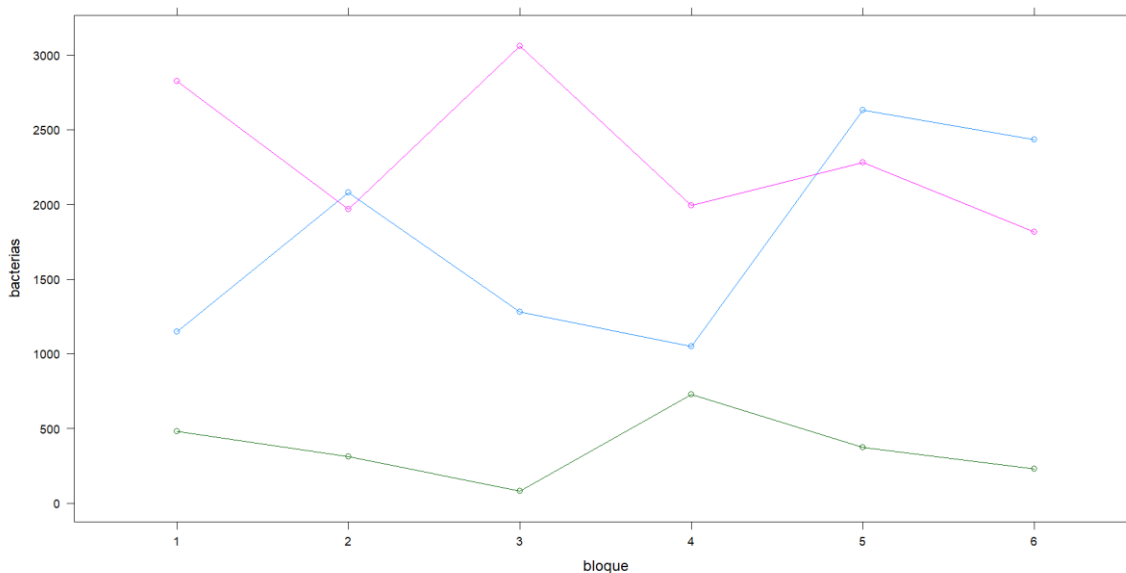
El análisis de los datos y las pruebas se realizaron con la ayuda del Software estadístico R versión 4.2.3 (R Core Team, 2023) y las librerías readxl (Wickham & Bryan, 2019), lme4 (Bates, Maechler, Bolker & Walker, 2015), ggplot2 (Wickham, 2016), car (Fox & Weisberg, 2009) y lsmeans (Sankar, 2011).

RESULTADOS

En primera instancia se realizó un análisis descriptivo para visualizar la variabilidad de los bloques, que correspondían a los pescados. Como se muestra en la *Figura 2*, la variabilidad de un bloque a otro es pequeña, por lo que nos da indicios de que los bloques son muy similares entre sí, esto quiere decir que los bloques no tuvieron impacto en el experimento, ya que no logró hacer diferencia respecto a si se hubiera realizado un diseño sin bloques.

Figura 2

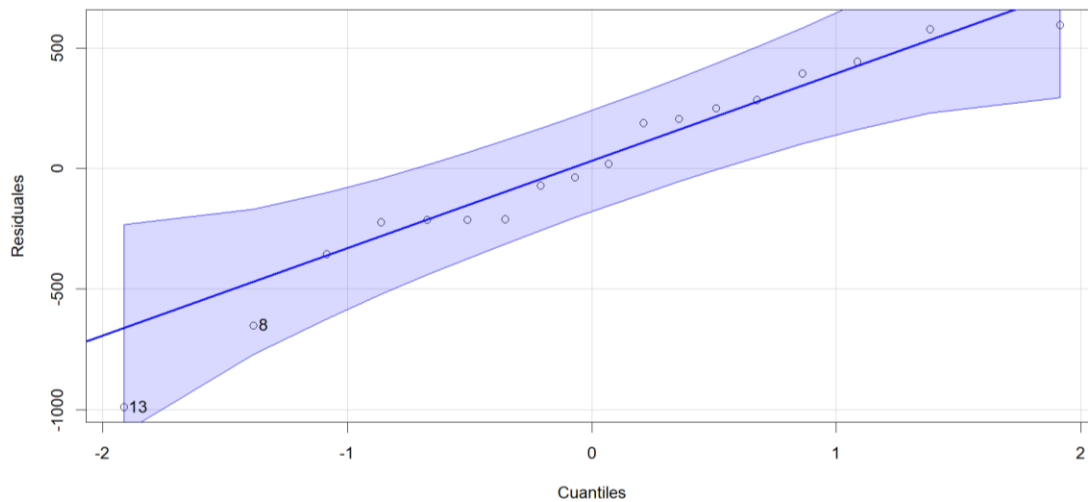
Gráfico de variabilidad entre cada bloque



Seguidamente, en la *Figura 3* se evaluó el cumplimiento del supuesto de normalidad, para esto se realizó un gráfico cuantil - cuantil con los residuales que permitiera dar una visualización general de si se cumplía el supuesto. Se puede observar que los residuales del modelo se encuentran dentro de las bandas de confianza, por lo cual, se asume que se cumple la normalidad de los datos.

Figura 3.

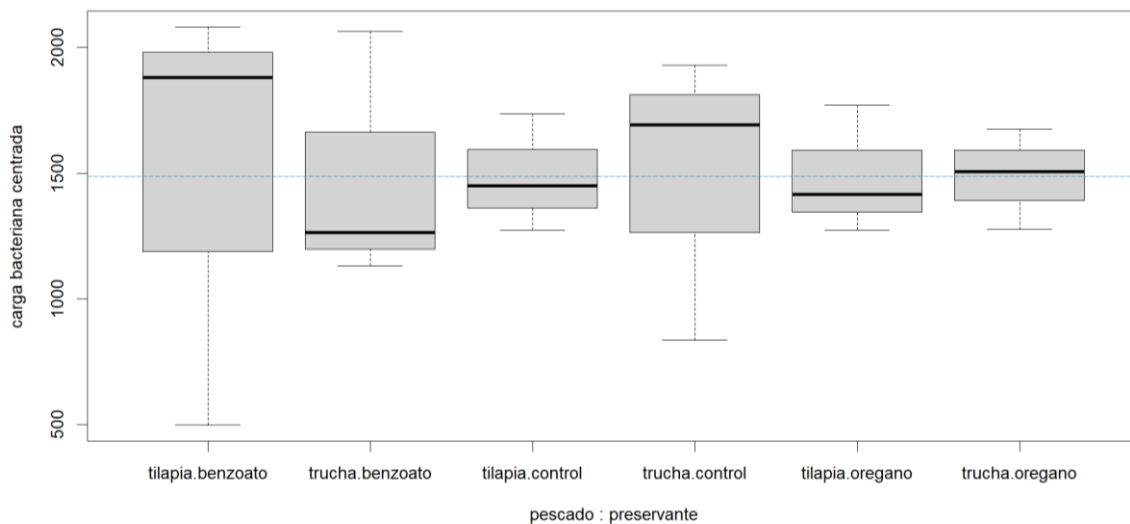
Gráfico cuantil-cuantil de los residuales de los datos



Por otra parte, para el supuesto de homocedasticidad, en la *Figura 4* se hizo un gráfico de cajas (boxplot) con los datos centrados para todos los tratamientos. Además, se utilizó la prueba Bartlett para la visualización de la variabilidad en los tratamientos y ver si esta era similar. Se obtuvo que existe homocedasticidad entre las varianzas a partir de ambos métodos.

Figura 4.

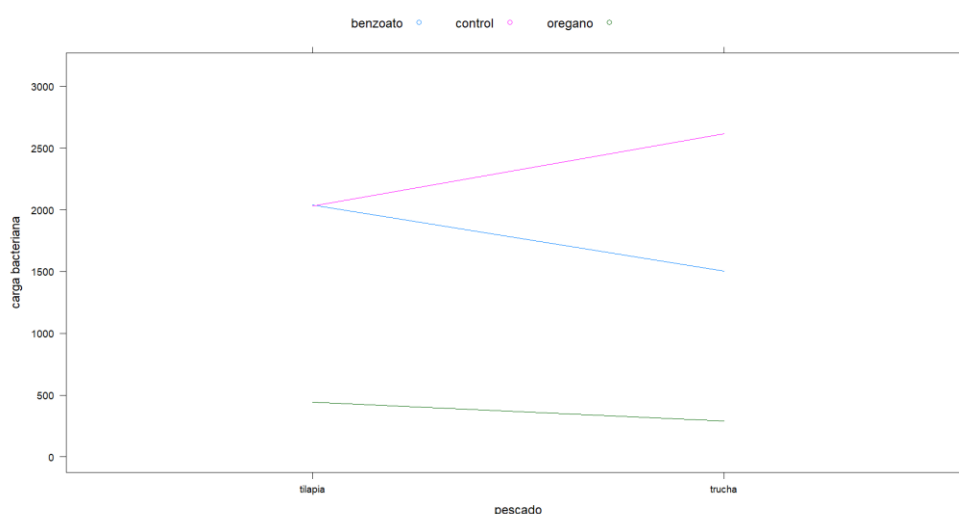
Gráfico de cajas con datos centrados, por cada tratamiento



Luego, se analizó la existencia de interacción entre los factores tipo de pescado y tipo de preservante. De manera gráfica en la *Figura 5* donde se observa claramente que hay fuerte interacción entre los factores y luego se comparó el modelo con interacción y el modelo sin interacción. A partir del modelo de parcelas divididas con interacción, se determinó que no había suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula de que el efecto de interacción entre tipo de pescado y tipo de preservante es igual a cero, dado que la probabilidad asociada fue de 0.07, por lo que se utilizó un modelo sin interacción y se realizaron comparaciones marginales por cada tipo de preservante.

Figura 5.

Gráfico de interacción para los factores tipo de pescado y tipo de preservante



Luego de haber realizado el análisis del modelo correspondiente, se observaron diferencias significativas solamente en el factor tipo de preservante, por lo que se aplicó comparaciones de Tukey solo en este factor, donde se lograron encontrar diferencias significativas entre Control-Orégano, Benzoato-Orégano, con probabilidades asociadas de 0.0002 y 0.0026 respectivamente. Solamente el primer contraste resultó no significativo correspondiente a Benzoato-Control (0.2180). Para los contrastes que resultaron significativos se calculó el límite inferior y con base a eso poder decidir si las diferencias son además relevantes en términos del experimento.

En este caso, como se muestra en el *Cuadro 1*, para el contraste Control-Orégano se pudo observar que la cota inferior incluye al valor delta (1000), por lo cual, este fue el único contraste relevante en términos del experimento.

Cuadro 1.*Intervalos de confianza de los contrastes significativos*

Contrastes	Intervalos de Confianza	
	Inferior	Superior
Benzoato - Orégano	720.61	2087.39
Control - Orégano	1273.44	2640.23

Fuente: Elaboración propia.

Se obtuvo como recuento con respecto a la unidad de medida del estudio que la trucha-control tenía 7.4 log UFC/g, la trucha-benzoato 7.18 log UFC/g, trucha-natural 6.46 log UFC/g, tilapia-control 7.3 log UFC/g, tilapia-benzoato 7.28 log UFC/g y tilapia-natural 6.64 log UFC/g. En el Cuadro 1 se evaluó la reducción bacteriana del orégano en comparación con benzoato de sodio y control, ya que estuvo cerca de los valores recomendados por el experto para considerarla importante.

Cuadro 2.*Comparación de la reducción log UFC/g de Orégano con respecto a Benzoato de Sodio y Control*

Comparación de tratamientos	Reducción UFC/g según tipo de pescado	
	Trucha	Tilapia
Orégano-Benzoato	0.95	0.66
Orégano-Control	0.72	0.64

Fuente: Elaboración propia.

Por último, existe la posibilidad de que se llegue a ver una diferencia relevante entre tratamientos, ya que los 2 intervalos de confianza si incluyen al 1000 UFC/g, lo cual implica que puede llegar a darse el caso en que un par de promedios disten en la diferencia señalada. Debido a este resultado se calculó la potencia del experimento, dando como resultado una potencia mayor a 0.80, al ser alta indica que se contaba con una cantidad adecuada de observaciones para ver diferencias si las había.

CONCLUSIONES

En general, con el análisis realizado se encontró que el hacer bloques en este caso no fue relevante porque los pescados son muy similares entre sí, además, no se encontró interacción entre los factores tipo de pescado y preservante.

Por el contrario, se encontró que el tipo de preservante sí causó diferencias en la carga bacteriana, ya que considerando la opinión del experto y la información de la Tabla 1 se detectó que en el caso de la trucha-orégano contrastándolo con respecto a trucha-control se tuvo una reducción bacteriana de 0.95 log UFC/g y contra trucha-benzoato una reducción de 0.72 log UFC/g. Para el caso de tilapia-orégano con respecto a tilapia-control una reducción de 0.66 log UFC/g y contra tilapia-benzoato 0.64 log UFC/g, mientras que en el caso del benzoato de sodio comparado con control y orégano en ningún caso superó una reducción de 0.23 log UFC/g.

Por lo cual, aunque el orégano no logró una reducción de 1 log UFC/g, sí es claro que estuvo cerca de la reducción deseada comparándolo con respecto a los otros 2 preservantes, corroborando lo dicho por Amadio *et al* (2011) y dando una posibilidad a que el orégano sea efectivamente una alternativa a los aditivos sintéticos, que como menciona el Ministerio de Economía Familiar Comunitaria Cooperativa y Asociativa (s. f.) son perjudiciales para la salud.

Con respecto a la potencia de la prueba, los resultados arrojaron que con tan solo una réplica más por cada tipo de pescado, en este caso, haber utilizado 4 truchas y 4 tilapias, se hubiera pasado de tener 0.85 a 0.95 de potencia, lo cual, en términos prácticos sí hubiera sido posible aumentar esta réplica para obtener mayor precisión en términos de diferencias, pero por limitación de tiempo no se logró.

Por otro lado, como hipótesis del estudio, se esperaba que el aceite esencial de orégano con respecto a los otros dos preservantes produjera una reducción en la carga bacteriana importante, y según los resultados anteriores, aunque no se puede afirmar que un preservante es más relevante que el otro, el aceite esencial de orégano sí marcó una diferencia en la reducción de bacterias que al aplicar benzoato de sodio o no aplicar nada para preservar el pescado.

Para finalizar, este diseño experimental se realizó con solo especies de pescado de agua dulce y solo un tipo de preservante de cada uno (artificial y natural), se recomienda estudiar una mayor diversidad de tipos de carnes, para tener un mayor alcance de los análisis, así como incluir otros preservantes artificiales para contrastarlos con el aceite esencial de orégano.

BIBLIOGRAFÍA

- Acofarma (s. f.). Fichas de información técnica: Sodio Benzoato. <https://formulasmagistrales.acofarma.com/idb/descarga/3/f963b2f9d94fc183.pdf>
- Guerrero, P. (2000). Programas estratégicos para el desarrollo de la biología. Microorganismos de uso industrial. *Manual XX Aniversario de la licenciatura en biología*. Universidad de Costa Rica, San José. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442009000100005
- Incopesca (s. f.). *La acuicultura en Costa Rica*. Acuicultura. <https://www.incopesca.go.cr/acuicultura/#:~:text=La%20acuicultura%20en%20Costa%20Rica%2C%20est%C3%A1%20casi%20totalmente%20dominada%20por,mercados%20internacionales%2C%20en%20filete%20fresco.>
- Mera, C. (2015). Efecto del aceite esencial de orégano (*Oreganum Vulgare* L.) como agente antimicrobiano en la conservación de la carne de dos especies de tilapia: negra (*Oreochromis Mossambicus*) y roja (*Oreochromis Niloticus*). Quevedo. *UTEQ*. (132). <https://repositorio.uteq.edu.ec/server/api/core/bitstreams/5d6857cb-5710-44d9-9905-3bfc7e65aef3/content>
- Ministerio de Economía Familiar Comunitaria Cooperativa y Asociativa (s. f.) Uso y manejo de preservantes y aditivos en los procesos de producción de alimentos. <https://www.economiafamiliar.gob.ni/backend/vistas/doc/cartilla/documento2229328.pdf>

ANEXOS

Código del experimento

```
#SIMULACION DE LA POTENCIA-----#
summary(modbloque)

r = 4
p = 3
t = 2
b = 2*r
n = b * p
B = factor(rep(1:b, each = p))
P = factor(rep(1:p, b))
d = 1000
pez = factor(rep(1:t, each=r*p))
vb = 20
ve = 282214
alfa = rep(c(-d/2, d/2, 0), b)
prob=c()

for (i in 1:20) {
  eb = rnorm(b, 0, sqrt(vb))
  eb1 = rep(eb, each=p)
  error = rnorm(n, 0, sqrt(ve))
  Y = 1487 + alfa + eb1 + error
  mod = lmer(Y~P+pez+(1|B))
  prob[i] = drop1(mod, test = "Chisq")[2,4]
}

prob

mean(prob<0.05)
#con un pescado más de cada uno de los tipos se llegaría a una potencia alta.
```