

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA**



---

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA DE 4 ESPECIES DE PESCADO  
DE MAYOR CONSUMO, EXPENDIDOS EN EL MERCADO DE TINGO MARÍA**

---

**Tesis:**

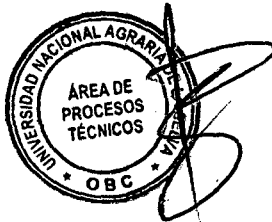
**Para optar el título de:**

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

**FRANCISCO GABANCHO LA TORRE**

**Tingo María - Perú**

**2014**



**T**  
**ZOO**

**Gabancho La Torre, Francisco**

Evaluación de la Calidad Higiénica de 4 Especies de Pescado de Mayor Consumo, Expendidos en el Mercado de Tingo María - 2014

95 páginas; 07 cuadros; 09 Figuras; 29 Anexos; 102 ref.; 30 cm.

Tesis (Ingeniero Zootecnista) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Zootecnia.

**1. CALIDAD HIGIÉNICA    2. PESCADO    3. FÍSICO QUÍMICO**  
**4. MERCADO    5. ANÁL/ORGANOLÉPTICO    6. MICROBIOLÓGICO**



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA  
FACULTAD DE ZOOTECNIA  
Av. Universitaria Km. 2 Teléfono: (062) 561280  
TINGO MARÍA

-----  
"Año de la Promoción de la Industria y del Compromiso Climático"

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

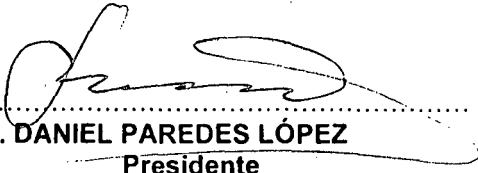
Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 24 de abril de 2014, a horas 7:25 pm. para calificar la tesis titulada:

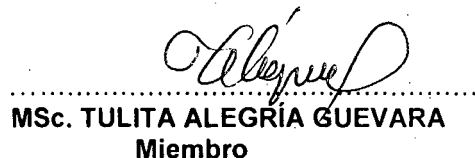
**"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA DE 4 ESPECIES DE PESCADO DE MAYOR CONSUMO, EXPENDIDOS EN EL MERCADO DE TINGO MARÍA".**

Presentada por el Bachiller **FRANCISCO GABANCHO LA TORRE**; después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobada con el calificativo de **"MUY BUENO"**.

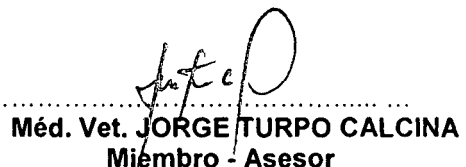
En consecuencia, el sustentante queda apto para optar el **TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del título, de conformidad con lo establecido en el Artículo 95, inciso "i" del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 29 de abril de 2014

  
-----  
**Dr. DANIEL PAREDES LÓPEZ**  
Presidente

  
-----  
**MSc. TULITA ALEGRIA GUEVARA**  
Miembro

  
-----  
**MSc. MARGARITA ALCEDO ROMERO**  
Miembro

  
-----  
**Méd. Vet. JORGE TURPO CALCINA**  
Miembro - Asesor

## DEDICATORIA

A Dios:

Por brindarme salud y vida, los que hicieron posible terminar una de mis metas trazadas.

A mis padres:

María Lucía La Torre Figueroa y Francisco Gabancho Cáceres, por su apoyo y esfuerzo incondicional, brindado para hacer realidad mi gran anhelo, terminar mi carrera y ser un hombre de bien para la sociedad.

A mis hermanos Pablo y Kristel, sobrinos Ariana, Mathias y Briana; mis abuelitos Eduardo y Lidia que en paz descansen; primos, tíos y demás familiares que de una u otra forma me apoyaron en el trayecto de mi formación profesional.

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, mi Alma Mater.

Al M.V. Jorge Suplicio Turpo Calcina, asesor del trabajo, por el apoyo, dedicación, consejos y conocimientos brindados.

A los docentes de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por su abnegada enseñanza y consejos brindados durante mi vida universitaria.

Al Dr. Sc. Cesar Samuel López López, e Ing. Richar Sías Rodríguez, por el apoyo incondicional, dedicación, consejos y conocimientos brindados.

A mis tíos y tías: Jim Salazar Hurtado, Irma La Torre Figueroa, Javier La Torre Figueroa, Benovite Cano Reyes, Miriam La Torre Figueroa, Bernardo Núñez Westreicher, por el apoyo brindado para culminar mi investigación.

A Silvia Raquel Mishari Astete por su apoyo, compañía y comprensión.

A mi primo Guillermo Gallo Alvarez, por su apoyo incondicional para la culminación de mi trabajo.

A mis amigos: Kelly Vargas Solórzano, Kenneth Colca Medina, Abel Faustino Pérez y demás amigos de la Universidad; también a mis amigos de Villa Rica.

# ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos biológicos de los peces .....	3
2.1.1. <i>Prochilodus nigricans</i> : Boquichico, chupadora.....	3
2.1.2. <i>Hemisorubim platyrhynchos</i> : Cunchi, Toa o mota.....	4
2.1.3. <i>Mugil cephalus</i> : Lisa.....	5
2.1.4. <i>Trachurus picturatus</i> Murphyi: Jurel .....	6
2.2. Anatomía, fisiología de la piel y músculo de los peces.....	7
2.2.1. Piel .....	7
2.2.2. Estructura muscular .....	8
2.3. Composición química del pescado .....	9
2.4. Microflora del pescado recién capturado .....	10
2.5. Calidad y cambios en la calidad de pescado.....	12
2.5.1. Cambios post mortem .....	13
2.5.2. Cambios sensoriales.....	15
2.5.3. Cambios autolíticos.....	18

2.5.4.	Cambios bacteriológicos .....	20
2.5.5.	Oxidación e hidrólisis de lípidos .....	22
2.6.	Evaluación de la calidad del pescado .....	24
2.6.1.	Métodos sensoriales .....	25
2.6.2.	Métodos físico – químico .....	26
2.6.3.	Métodos microbiológicos.....	31
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	52
3.1.	Lugar de ejecución.....	52
3.2.	Metodología de estudio.....	52
3.2.1.	Lugar de toma de muestras .....	52
3.2.2.	Unidades de estudio .....	52
3.2.3.	Tamaño de muestra .....	53
3.2.4.	Toma de muestras .....	53
3.2.5.	Análisis de muestras .....	54
3.3.	Variables Independientes .....	58
3.4.	Variables Dependientes.....	58
3.5.	Ajuste estadístico.....	59
IV.	RESULTADOS .....	60

4.1. Análisis sensoriales de 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María. ....	60
4.2. Análisis físico – químicos de 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María. ....	62
4.2.1. Prueba de pH.....	62
4.2.2. Prueba de Ebert.....	63
4.3. Análisis bacteriológicos de 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María. ....	64
4.3.1. Microorganismos indicadores de alteración.....	64
4.3.2. Microorganismos indicadores de higiene.....	65
4.3.3. Aislamiento y caracterización de bacterias patógenas.....	66
V. DISCUSIÓN .....	69
5.1. Análisis sensoriales de 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María. ....	69
5.2. Análisis físico – químico de 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María. ....	71
5.2.1. Prueba de pH.....	71
5.2.2. Prueba de Ebert.....	73
5.3. Análisis Bacteriológico 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María. ....	74



5.3.1. Microorganismos indicadores de alteración .....	74
5.3.2. Microorganismos indicadores de higiene .....	77
5.3.3. Aislamiento y caracterización de bacterias patógenas.....	81
VI. CONCLUSIONES.....	92
VII. RECOMENDACIONES .....	93
VIII. ABSTRACT .....	95
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de los pescados de acuerdo a las partes inspeccionadas en Tingo María. ....	60
2. Valores promedio de pH muscular en las especies de pescado estudiadas.....	62
3. Porcentaje de especies de pescado positivas a la prueba de Ebert. ....	63
4. Mesófilos aerobios de acuerdo a la especie y tipo de tejido del pescado.....	64
5. Número de <i>Escherichia coli</i> termotolerante de acuerdo a la especie y tipo de tejido de pescado.. ....	65
6. Porcentaje de piel y músculo con <i>Salmonella spp.</i> por 25 g en los pescados. ....	67
7. Porcentaje de piel y músculo con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> por 25 g.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Clasificación de los pescados según la apariencia de las partes inspeccionadas. ....	61
2. Clasificación de los pescados según la condición de las partes inspeccionadas. ....	61
3. Clasificación de los ejemplares según el olor de las partes inspeccionadas. ....	62
4. Valores promedio de pH muscular en las especies de pescado estudiadas. ....	63
5. Porcentaje de especies de pescado positivas a la prueba de Ebert. ....	64
6. Mesófilos aerobios de acuerdo a la especie y tipo de tejido del pescado. ....	65
7. Número de <i>Escherichia coli</i> termotolerante de acuerdo a la especie y tipo de tejido de pescado. ....	66
8. Porcentaje de piel y músculo con <i>Salmonella spp.</i> por 25 g en los pescados. ....	67
9. Porcentaje de piel y músculo con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> por 25 g. ....	68

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Anexo

1. Criterios de selección de especies según DE LA ROSA *et al.* (1995)
2. Partes inspeccionadas en el análisis sensorial, EEC (1976)
3. Determinación de pH según la AOAC (1995)
4. Fórmula para la preparación del reactivo de Ebert. SECRETARIA DE SALUD DE MÉXICO (1999)
5. Numeración de microorganismos aerobios viables, APHA (1992)
6. Enumeración de *Escherichia coli* termotolerante, FDA (2001).
7. Numeración de *Staphylococcus aureus*, APHA (2001)
8. Aislamiento e identificación de *Salmonella spp*, FDA (2001).
9. Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (KAYSNER y DE PAOLA, 1998).
10. Esquema UE para la clasificación de la frescura
11. Criterios microbiológicos para productos hidrobiológicos crudos para consumo humano (frescos, refrigerados, congelados, salpessos ó ahumados en frío) DHAZ (2008).
12. Microorganismos y apariencia de las colonias en Agar EMB
13. Microorganismos y apariencia de las colonias en Agar Baird Parker

14. Microorganismos y características de las colonias en Agar SS
15. Características de desarrollo de *Salmonella* en TSI y LIA
16. Características organolépticas de los pescados evaluados
17. Determinación de pH
18. Prueba de Ebert
19. Número de Microorganismos mesófilos aerobios viables/g
20. Número de *Escherichia coli* termotolerante/g de muestra
21. Número de *Staphylococcus aureus*
22. Aislamiento y caracterización de *Salmonella spp.* por 25 g
23. Aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* por 25 g
24. Aislamiento y caracterización de *Vibrio parahaemolyticus* por 25 g
25. Resultados de la prueba de Friedman para el análisis sensorial
26. Resultados del análisis estadístico de las variables estudiadas
27. Características bioquímicas de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*
28. Comercialización de pescado en la provincia de Leoncio Prado
29. Población de la provincia de Leoncio Prado

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó en la localidad de Tingo María, distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco - Perú. El objetivo fue determinar la calidad higiénica de cuatro especies de pescado de mayor consumo en la ciudad de Tingo María. Se utilizaron las siguientes especies: Boquichico (*Prochilodus nigricans*), mota (*Hemisorubim platyrhynchos*), lisa (*Mugil cephalus*), jurel (*Trachurus picturatus* Murphyi). Los resultados obtenidos de mesófilos aerobios, para boquichico, mota, lisa y jurel fueron RAM de ( $1,85 \times 10^6$  UFC/g), ( $3,0 \times 10^6$  UFC/g); ( $8,0 \times 10^5$  UFC/g) y ( $10,0 \times 10^5$ ) respectivamente. *Escherichia coli*, para boquichico fue (43 NMP/g), mota (12 NMP/g), lisa (57 NMP/g), jurel (46 NMP/g). *Salmonella spp* presentaron 30 % de las pieles y 25 % de los músculos de los pescados. *Vibrio parahaemolyticus*, se reportó el 40 % en carne de lisa y en la piel y carne en jurel. Asimismo, no se encontró *Staphylococcus aureus*, ni *Vibrio cholerae* en todas las muestras analizadas. Los análisis sensoriales, permitieron clasificar a lisa y jurel, como regular a malo. A diferencia de esto, boquichico y mota se clasificaron como regular. El pH muscular fue cercano a 7. La prueba de Ebert mostró que el jurel (20 %) y lisa (20%) estaban en un estado avanzado de deterioro. En conclusión el estudio evidenció, que la calidad del pescado crudo a la venta en el Mercado Modelo de Tingo María, es de baja calidad higiénica, no aptos para el consumo. En tal sentido se debe tomar medidas de inspección higiénico – sanitario más estrictas por parte de las autoridades locales.

**Palabras clave:** Calidad higiénica, pescado, mercado, análisis organoléptico, físico químico y microbiológico.

## I. INTRODUCCIÓN

En el Perú el consumo per cápita de proteínas de origen animal está muy por debajo de las cifras señaladas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En la actualidad se da mucho énfasis a la seguridad alimentaria en el país, y en ella el pescado puede satisfacer los requerimientos nutricionales de la población, además de su importancia económica como producto de exportación. Asimismo, el pescado debe encontrarse en óptimas condiciones de calidad y frescura, que permita mantener sus valores nutricionales. En consecuencia, conocer el grado de deterioro en que se pueda encontrar esta especie hidrobiológica en el momento que se requiera para su consumo fresco o refrigerado.

En la ciudad de Tingo María, el pescado es uno de los productos cárnicos más consumidos. Sin embargo, esta especie hidrobiológica es considerada como un alimento perecedero, muy sensible a la autólisis de los tejidos, por la hidrólisis de la grasa y a la alteración por microorganismos. Por lo tanto, se debe realizar una revisión completa de la calidad higiénica de los pescados expendidos en los mercados. En ese sentido, la inspección del pescado a nivel de expendio permite observar una manipulación inapropiada, un desconocimiento de tratamientos previos de conservación y malas normas de higiene y sanidad, que son los elementos de contaminación más comunes en los lugares de expendio.

En la localidad de Tingo María, donde la manipulación y expendio del pescado se realiza al aire libre, sin refrigeración y/o congelación, en condiciones sanitarias inadecuadas (falta de limpieza en lugares de expendio, en utensilios, mesas, personal, etc.), hace presumir que la calidad higiénica del pescado que allí se vende sea de dudosa calidad, existiendo una alta posibilidad de que el pescado presente niveles inadecuados de frescura y que además presente una gran cantidad de microorganismos que ocasionen grandes riesgos a la salud del consumidor. En tal sentido, en la investigación se ha planteado los siguientes objetivos:

### **1.1. Objetivo general**

Determinar la calidad higiénica de cuatro especies de pescados de mayor consumo en la ciudad de Tingo María a través del recuento de mesófilos aerobios, numeración de *Escherichia coli*, aislamiento de bacterias patógenas como: *Salmonella spp*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y recuento de *Staphylococcus aureus*.

### **1.2. Objetivo específico**

Clasificar los pescados de acuerdo a los atributos sensoriales empleando el método del esquema UE.

Valorar la carne de los pescados a través de pruebas fisicoquímicas (pH y prueba de Ebert).



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos biológicos de los peces

#### 2.1.1. *Prochilodus nigricans*: Boquichico, chupadora

*Prochilodus nigricans* es un pez fusiforme, cuerpo hidrodinámico que alcanza 40 cm de longitud y puede llegar a los 2,0 Kg de peso. Es detritívoro, se alimenta básicamente de detritos orgánicos y de perifiton (Diatomeas, Algas verde - azuladas, Euglenófitos, Algas verdes, Bacillarioficeas), zooplancton (Copépodos, rotíferos, cladóceros), succiona barro y alimentos pequeños, iliófago. Se encuentra en lagos, lagunas y hasta en arroyos y ríos, desde que el ambiente sea de aguas lentas con depósitos de detritus en el fondo. En el período de las lluvias, la desembocadura de las cañadas y arroyos pasa a ser uno de los hábitats más buscados por esta especie, donde encuentran gran cantidad de alimento (MELO *et al* 2005).

#### Clasificación taxonómica

Reino : Animalia  
Phylum : Chordata.  
Clase : Actinopterygii.  
Sub clase : Neopterygii

Infraclase : Teleostei  
Superorden : Ostariophysi  
Orden : Characiformes.  
Familia : *Prochilodontidae*  
Género : *Prochilodus*  
Especie : *P. nigricans* (CUVIER, 1818)

#### 2.1.2. *Hemisorubim platyrhynchos*: Cunchi, toa o mota

*Hemisorubim platyrhynchos*, presenta las siguientes características; longitud máxima: 52,5 cm de longitud estándar. Confinada a partes profundas y lentas de grandes ríos. La forma del cuerpo y el patrón de coloración están adaptados perfectamente al lecho lodoso donde permanecen (LE BAIL *et al.*, 2000). Se alimenta de organismos bénticos y peces. La posición de los ojos y la forma de la boca de este pez piscívoro se debe a su modo de caza por acecho. Vive en ríos, lagunas y canales, alimentándose de peces (GRAÇA y PAVANELLI, 2007).

#### Clasificación taxonómica

Reino : Animalia  
Phylum : Chordata.  
Clase : Actinopterygii.  
Sub clase : Neopterygii  
Infraclase : Teleostei

Superorden : Ostariophysi  
Orden : Siluriformes  
Familia : Pimelodidae  
Género : *Hemisorubim*  
Especie : *H. platyrhynchos* (VALENCIENNES, 1840).

### 2.1.3. *Mugil cephalus*: Lisa

*Mugil cephalus*, las tallas fluctúan entre 11 - 46 cm de longitud total. Se caracteriza por ser una especie costera que habita en fondos arenosos, arena fangosos, ríos, lagunas y estuarios. Forman cardúmenes. Nada siempre a poca profundidad, por lo que es presa fácil de la pesca. Se concentra en aguas contaminadas de los puertos. Presenta migraciones, remontando los ríos y retirándose hacia el mar a una distancia variable del litoral para desovar (IMARPE, sd).

#### Clasificación taxonómica

Reino : Animalia  
Phylum : Chordata.  
Clase : Actinopterygii.  
Orden : Mugiliformes  
Familia : Mugilidae  
Género : *Mugil*  
Especie : *M. cephalus* (LINNAEUS, 1758)

#### 2.1.4. *Trachurus picturatus* Murphyi: Jurel

*Trachurus picturatus* Murphyi, viven en ambientes relativamente cálidos, con rangos de temperatura del agua que oscilan entre 14 °C y 23 °C. Tiene hábitos gregarios formando cardúmenes. Se caracteriza por su alto grado de dispersión. Datos de embarcaciones científicas y pesqueras de la URSS han detectado concentraciones entre las 200 y 350 millas frente a nuestras costas al igual que la flota de la Comunidad de Estados Independientes que lo ha detectado entre las 200 y 500 millas (HUSS ,1999).

El jurel verticalmente se presenta sobre los 100 m de profundidad en años normales, sobrepasando los 200 m en años anormales. La distribución y concentración de los cardúmenes de jurel guardan cierta relación con la variación e interacción de las masas de agua frente a nuestro litoral. Se acerca a la costa durante el verano o en años cálidos (El Niño) y se aleja en los meses de invierno o en los años fríos (La Niña) (IMARPE, s.d.).

#### Clasificación taxonómica:

Reino	:	Animalia
Phylum	:	Chordata.
Clase	:	Actinopterygii.
Orden	:	Perciformes
Familia	:	Carangidae
Género	:	<i>Trachurus</i>
Especie	:	<i>T. picturatus</i> Murphyi (LINNEO, 1758)

## 2.2. Anatomía, fisiología de la piel y músculo de los peces

### 2.2.1. Piel

Las tres regiones corporales cabeza, tronco y cola, están cubiertas por la piel, barrera osmótica que actúa de protección primaria ante el ambiente y por tanto primera línea defensiva contra la enfermedad. Estructuralmente, la piel se compone de epidermis (revestida por una cutícula) y dermis (desde donde se originan las escamas). Esta última, descansa sobre la hipodermis (capa adiposa laxa que une la piel a las estructuras subyacentes) (HUSS, 1999).

La cutícula, de escaso grosor (en torno a un micrómetro), la integran mucopolisacáridos resultantes de una combinación de material celular, células descamadas y mucus secretado a la superficie por células epidérmicas. Puede contener inmunoglobulinas específicas, ácidos grasos libres, lisozimas y otras sustancias que podrían proteger frente a patógenos (MACKIE, 1982).

El mucus, presente en gran cantidad en ciertas especies, hace que la piel sea menos permeable (regulación osmótica), la protege contra la abrasión, disminuye la fuerza de rozamiento y reduce la posible acción de agentes irritantes o microorganismos, desempeñando un importante papel como fungicida y bactericida. La cantidad de mucus y, sobre todo, su grado de opacidad son indicadores habituales de pérdida de frescura (LOVE, 1988).

La epidermis se compone de un epitelio estratificado escamoso no queratinizado con células de Malpighi básicas, comunes a todos los vertebrados. Además, presenta células caliciformes secretoras del mucus. Su grosor es variable (capas de 3 a 20 células dependiendo de la especie), siendo mayor en las especies con menor número o total ausencia de escamas (peces cartilagosos) (DEVILLERS *et al.*, 1977).

La dermis se compone de dos estratos, uno superficial o esponjoso (red de tejido conjuntivo laxo y fibras de reticulina que contiene cromatóforos, responsables del color de la piel, y mastocitos) y otro profundo o estrato compacto (matriz densa de colágeno responsable de la fortaleza estructural de la piel) (BRANSON, 2000).

La hipodermis se conforma por tejido adiposo laxo que conecta la epidermis y dermis a las estructuras subyacentes. Es considerada como una variante del tejido conjuntivo, especializado en almacenar lípidos. Los principales papeles es almacenar las reservas energéticas del pez y regulador térmico. Los procesos infecciosos e inflamatorios que hayan superado la piel se propagan fácilmente por la hipodermis (KING y CUSTANCE, 1982).

### 2.2.2. Estructura muscular

En la mayoría de especies de peces el tejido muscular es blanco, aunque se presentan partes oscuras, hay otras especies de color marrón o rojizo. La proporción entre el músculo blanco y rojo varía con la actividad del pez; los peces que nadan continuamente (pelágicos), hasta el

48% de su peso puede ser de músculo oscuro. Las especies que viven en el fondo del mar (demersales), que se mueven muy poco, la proporción de músculo oscuro es muy pequeña. Las especies de músculo oscuro tienen un alto contenido de lípidos y hemoglobina lo que representa un problema tecnológico por la rápida descomposición y rancidez de la grasa (LOVE, 1988).

Músculo oscuro (rojo); desde el punto de vista tecnológico, el alto contenido de lípidos del músculo oscuro resulta importante debido a los problemas asociados con la rancidez. Cuando se hacen cortes, se observa claramente el músculo oscuro debajo de la piel. Aunque estructuralmente es similar al músculo blanco, el color es debido a la presencia de pigmentos hemo, principalmente hemoglobina, es aquí donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso cuando se requiere ejercicio continuado, mientras que el músculo blanco es usado intermitentemente para movimientos de poca duración o súbitos (CARRILLO y AUDISIO, 2007).

Tejido conectivo: El tejido conectivo está constituido principalmente por la piel, es de difícil masticación o deglutirlo y generalmente es convertido a gelatina soluble a nivel industrial. Se encuentra también ampliamente distribuido en toda la musculatura, como el material que mantiene unido a las fibras musculares. Su principal componente es la fibra o proteína colágena (LOVE, 1988).

### 2.3. Composición química del pescado

La composición química del pescado puede variar dependiendo de la especie, la edad del pescado, su ambiente, sexo y estación del año, se puede

decir que su composición química es la siguiente: 20% de proteína, 1 – 2% de contenidos no proteicos y un 78% de lípidos y agua. La concentración de lípidos y agua varían dramáticamente con la estación del año y la especie. Las variaciones en la composición química están estrechamente relacionadas con la alimentación, nado migratorio y cambios sexuales relacionados con el desove. El pez tiene períodos de inanición por razones naturales o fisiológicas (como desove o migración) o bien por factores externos como la escasez de alimento (CARRILLO y AUDISIO 2007).

Esta composición química que presenta lo hace uno de los nutrientes más completos para el crecimiento de microorganismos y por tanto es muy susceptible a la descomposición. Su alta humedad, riqueza en proteínas y contenido de enzimas proteolíticas que aumentan la liberación de péptidos, los cuales son más fácilmente asimilados por los microorganismos. Es también una fuente rica de vitaminas y minerales, todo esto hace que el pescado sea un hábitat muy adecuado para el crecimiento y la proliferación de microorganismos (ICMSF, 1982).

#### 2.4. Microflora del pescado recién capturado

Todos los peces tienen constantemente sobre su superficie externa poblaciones bacterianas más o menos grandes. La cantidad de microorganismos existentes en pescados recién capturados son: piel oscila entre  $10^2$  y  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, ó  $10^3$  -  $10^4$  UFC/g; en la branquias de  $10^{-3}$  a  $10^{-9}$  UFC/g y en el intestino  $10^{-3}$  a  $10^{-9}$  UFC/g (ICMSF, 1982).



La carga microbiana del pescado recién capturado de su habitat se encuentra por encima de  $10^3$  UFC/g, y el pescado descompuesto o alterado que puede ocasionar riesgos a la salud pública por su consumo, es muy superior a  $10^7$  UFC/g, y el aumento microbiano se da por pequeñas oscilaciones (BLIGH y MERRIT, 1988).

La flora microbiana del pez depende de la carga microbiana de las aguas donde vive. La flora microbiana en el limo y las agallas del pescado fresco están compuestas principalmente por los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Flavobacterim*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Sarcina*, *Serratia*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Brevibacterium*, *Streptococcus* y en el intestino además de los anteriores están *Clostridium* y *Escherichia* (FRAZIER y WESTHOFF, 1993).

Durante la vida del pez no existe una penetración declarada a los tejidos por las bacterias presentes en la superficie corporal y en el intestino. Existe una especie de equilibrio en virtud del cual las cantidades de estas bacterias que se encuentran en el mucus de la piel y el agua donde habitan, se conservan en un nivel estable (HURST y COLLINS THOMPSON, 1979). Existe gran similitud entre las bacterias encontradas en el pescado alterado y las encontradas en el medio en que fue capturado. Estas con frecuencia forman parte de la flora que se encuentra en la capa mucoide que recubre la superficie externa del mismo y las de su contenido intestinal (FRAZIER y WESTHOFF, 1993).

## 2.5. Calidad y cambios en la calidad de pescado.

La palabra calidad se refiere a la apariencia estética y frescura, o grado de deterioro, calidad implica algo diferente para cada persona y se define en asociación con un único tipo de producto. En la industria pesquera la calidad está relacionada con especies costosas o con el tamaño de la pieza, así un pescado de calidad inferior por un procesador puede referirse a un ejemplar demasiado pequeño. Un ejemplo claro es la idea generalizada de que la mejor calidad se encuentra en el pescado que se consume dentro de las primeras horas post mortem. Sin embargo, el pescado muy fresco que se encuentra en rigor mortis es difícil de filetear y desollar, y por lo tanto no es apropiado para ciertos derivados como los ahumados (MORALES *et al.*, 2004; HUSS, 1999)

El concepto de calidad no se interpreta generalmente como sinónimo de excelencia o requisito máximo que podría lograrse para un alimento, sino más bien como un nivel medio, aceptable desde el punto de vista económico, nutritivo, organoléptico y sanitario el cual se logra con una adecuada manipulación (NEAVE, 1983).

Las autoridades locales, regionales y nacionales, que están principalmente interesadas en posibles riesgos para la salud pública; la buena calidad del producto significa la ausencia de agentes nocivos tales como parásitos, compuestos químicos y organismos patógenos, además calidad es sinónimo de frescura y apariencia, refiriéndose al grado de deterioro que ha sufrido el pescado (PASCUAL ANDERSON , 2000).

El pescado se descompone más rápidamente comparado con las canales de animales de sangre caliente por factores extrínsecos e intrínsecos. Uno de los factores que influye es el transporte del producto hacia su destino, debido a que generalmente se transporta en exceso, esto sumado al fenómeno de movimiento vibratorio disminuyen su vida útil, ya que sufren lesiones por lo cual es necesario su inmediata refrigeración y congelación (HUSS, 1999).

Los requerimientos esenciales para la producción de pescado de calidad satisfactoria y segura son: a) minimizar la contaminación bacteriana de fuentes exógenas, b) manejar y procesar el pescado de manera que se minimice la multiplicación de bacterias endógenas y exógenas, c) Mantener a los pescados a una temperatura adecuada ya sea congelándolos o enfriándolos con hielo. La congelación es llevada a cabo en varias formas y ayudan a conservar la temperatura entre - 20 °C y - 30 °C. Estas formas de conservación son mejoradas si las vísceras son eliminadas antes de la reducción de temperatura (PASCUAL ANDERSON, 2000; CONNELL, 1995).

#### 2.5.1. Cambios post mortem

El pescado, después de la muerte el músculo está totalmente relajado. El pescado es blando, flexible, la textura es firme y elástica al tacto. A partir de este momento el pescado sufrirá una serie de modificaciones sensoriales, autolíticas y bacteriológicas, que conducirán finalmente al rechazo por parte del consumidor. Durante el transcurso de su deterioro las condiciones de almacenamiento del pescado serán claves para alargar o acortar el tiempo de vida comercial (MORALES *et al.*, 2004; AGÜERIA *et al.*, 2004).

Como consecuencia de su composición química y del pH poco ácido de su carne, el pescado se degrada con facilidad. Asimismo, el pescado se puede deteriorar por la acción de enzimas autolíticas endógenas y/o por el desarrollo de los microorganismos contaminantes los que se asientan básicamente sobre la piel y el intestino, se extienden y se multiplican a otros tejidos donde existen sustancias nutritivas adecuadas (sustratos de bajo peso molecular: aminoácidos, aminas volátiles) y un pH relativamente elevado hacia alcalino que favorece el desarrollo de dicha flora (RAA, 1980).

HUSS (1999), menciona que debido al crecimiento microbiano, aparecen compuestos volátiles (trimetilamina, dimetilamina, amoníaco, etc.) que confieren mal olor a pescado. Además, las proteasas del propio pescado y las bacterianas provocan un reblandecimiento rápido del músculo. Por su parte los lípidos se oxidan y las hemoproteínas modifican el color de la carne.

La refrigeración retarda la aparición de las transformaciones antes indicadas, pero no las elimina, ya que la flora contaminante suele ser psicrotrofica (*Pseudomonas* sp y *Shewanella putrefaciens*) y continúa desarrollándose incluso a -5 °C. Por otro lado, las lipasas que intervienen en la oxidación de los lípidos permanecen activas aún a temperaturas de congelación (PASCUAL ANDERSON, 2000).

MORALES *et al.* (2004) y HUSS (1999), mencionan que la alteración del pescado depende de distintos factores: Especie: los pescados planos se alteran más rápidamente que los peces redondos. Tamaño: en

general las piezas grandes se deterioran más lentamente. Condiciones del pescado en el momento de su captura: Una larga agonía provoca mayor consumo de glucógeno, cuya falta acelera la aparición de fenómenos de alteración. Tipo de flora contaminante: Si la contaminación corporal e intestinal de pescado es alta y la que se instaura después de su captura también es elevada, la alteración será mayor y más rápida.

### 2.5.2. Cambios sensoriales

El cambio más dramático es el *rigor mortis*. Después de la muerte, el músculo está totalmente relajado, la textura flexible y elástica persiste durante algunas horas y posteriormente el músculo se contrae. Cuando se torna duro y rígido, todo el cuerpo se vuelve rígido y esto indica que el pescado está en *rigor mortis*. Esta condición generalmente se mantiene durante uno o más días y luego se resuelve el *rigor*. La resolución del *rigor mortis* hace que el músculo se relaje nuevamente y recupere la flexibilidad, pero no la elasticidad previa al *rigor*. La proporción entre el comienzo y la resolución del *rigor* varía según la especie y es afectada por la temperatura, la manipulación, el tamaño y las condiciones físicas del pescado (HUSS, 1999).

Tras la captura y muerte del pescado, la interrupción de la circulación sanguínea priva al músculo del aporte de oxígeno y de toda una serie de nutrientes celulares. La actividad celular del pescado después de su muerte continúa aún activa durante poco tiempo impulsada por las reservas de energía, principalmente glucógeno y ATP, que quedan en las células

musculares después del forcejeo del pescado en el momento de su captura. Cuando se agota el ATP celular y con la finalidad de obtener más energía, se inicia una glucólisis anaerobia, degradando el glucógeno a glucosa y ácido láctico, de una manera similar a la que se produce en la carne de los mamíferos (PASCUAL ANDERSON, 2000; CONELL, 1995).

HUSS (1999) y ADAM y MOSS (1997) mencionan, la acumulación de ácido láctico provoca un descenso en el pH del músculo y, si lo hace hasta el punto isoelectrónico de las proteínas miofibrilares, éstas se desnaturalizan y pierden su capacidad de retener agua, lo que origina cambios en la textura del pescado. Otro efecto caracterizado por la ausencia del ATP miofibrilar necesario para permitir la separación de las proteínas contráctiles es la aparición del *rigor mortis*, la contracción del músculo debido a la unión irreversible de los filamentos de actina y miosina una vez se han acabado las reservas de ATP.

PASCUAL ANDERSON (2000), indican que con el tiempo la pérdida de las reservas de energía celular se traduce en un desequilibrio químico intracelular que activa ciertas enzimas endógenas proteolíticas, generando rupturas de los enlaces peptídicos que provocan el ablandamiento de la estructura muscular.

El tiempo desde el inicio y al final del *rigor mortis* depende de varios factores como la especie de pescado, talla, método de pesca, manipulación, temperatura y condiciones físicas del pescado. En pescado

fatigado (como las especies capturadas por arrastre) y en pescado almacenado a altas temperaturas, la fase de *rigor mortis* surgirá y pasará rápidamente. En los pescados pequeños, veloces y fatigados sucede lo mismo, mientras que en pescados grandes y pescados planos tarda, en general, más tiempo. El tiempo de la muerte hasta el final del *rigor mortis* en el caso de la sardina es aproximadamente de 18 horas (HUSS, 1999; PASCUAL ANDERSON, 2000).

A medida que se deteriora el pescado van apareciendo cambios en su olor y sabor debido a la presencia o ausencia de la inosina monofosfato (IMP) y otros 5'- nucleótidos. La inosina es más o menos insípida mientras que la hipoxantina imparte un sabor agrio o amargo al pescado en procesos de deterioro. Del mismo modo, La pérdida de sabor en la carne del pescado es, por lo tanto, atribuida a la degradación de la IMP (HUSS, 1999).

Otro factor que puede producir cambios en el sabor y olor del pescado se debe a los procesos de oxidación de la fracción lipídica. En el caso de pescados grasos como los bagres, estos cambios conducen a serios problemas de calidad, como la aparición de sabores y olores rancios. El elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados en el pescado lo hace muy susceptible a sufrir procesos de enranciamiento. Los enlaces insaturados captan fácilmente oxígeno, viéndose favorecida esta captación por la luz, las temperaturas elevadas y la presencia de trazas de metales (Cu, Fe) (AGÜERIA *et al.*, 2004; ADAM y MOSS, 1997).

### 2.5.3. Cambios autolíticos

Cambios autolíticos después de la instauración del *rigor mortis*, en el pescado se dan una serie de procesos autolíticos. Este tipo de reacciones se deben a enzimas endógenos de la carne del pescado y están caracterizadas por ser consecuencia del agotamiento de los recursos energéticos. Los cambios autolíticos son muy diversos. Los primeros procesos autolíticos que ocurren en el tejido muscular del pescado se relacionan con los hidratos de carbono y los nucleótidos (MONTEAGUDO *et al.*, 2002; CONELL, 1995).

Asimismo, dentro del pescado, el glucógeno se concentra más en el músculo oscuro que en el músculo blanco, por ello la actividad autolítica es mayor en este musculo. En consecuencia, concordando con la proteólisis que comienza la lipólisis de la grasa, lo que da lugar a la liberación de ácidos grasos, siendo muy importantes los fenómenos posteriores de autoxidación que se producen sobre ellos. Estas reacciones se suceden descomponiendo el ácido graso en pequeños fragmentos (cetonas, ácidos, etc.) que pueden reaccionar con otros compuestos del músculo y modificar sus características. Estas reacciones que se dan en el pescado, cobran más importancia cuanto mayor sea el contenido lipídico del mismo (MONTEAGUDO *et al.*, 2002).

La degradación de ATP tiene lugar por reacciones de defosforilación y desaminación dando lugar a adenosín difosfato (ADP), adenosín monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), inosina (HxR) e hipoxantina (Hx). Antes del comienzo del rigor mortis, el glucógeno y el ATP



casi han desaparecido mientras se acumula IMP y posteriormente HxR. Cuando los niveles de IMP y HxR empiezan a disminuir, el contenido de Hx aumenta. Los procesos autolíticos descritos se producen de la misma forma en todos los pescados pero la velocidad varía mucho entre especies. Esto hace que la determinación de nucleósidos como la hipoxantina se pueda utilizar para evaluar el grado de frescura (HUSS, 1999).

Los cambios autolíticos en las proteínas son mucho menos pronunciados que los cambios vistos en los nucleótidos. Se han aislado diversas proteasas del músculo de pescado, pero han sido las catepsinas las enzimas proteolíticas mayormente descritas. Las catepsinas normalmente se encuentran empacadas en los lisosomas y se encuentran inactivas dentro del tejido vivo. Son liberadas a los fluidos celulares en caso de abuso físico o congelación y descongelación post mortem del músculo. Aunque dichas enzimas presentan, en general, una baja actividad autolítica, se cree que las catepsinas D y L son las más activas en la degradación autolítica del tejido muscular de pescado (CONNELL, 1995; ADAM y MOSS, 1997).

Los péptidos de bajo peso molecular y los aminoácidos libres producidos por la autólisis de las proteínas aceleran el crecimiento de bacterias del deterioro. También puede ocurrir la descarboxilación de aminoácidos, produciendo aminas biógenas. Así como la degradación proteica no añade olores ni sabores significativos al pescado hasta estados muy avanzados de la alteración, la desnaturalización de las proteínas da lugar a un ablandamiento de la carne del pescado que dificulta o impide su procesamiento (HUSS, 1999).

En el caso de almacenamiento en congelación, el cambio autolítico predominante es la desmetilación del óxido de trimetilamina que da lugar a dimetilamina y formaldehído de forma equimolecular. El enzima responsable es el óxido de trimetilamina desmetilasa y se encuentra unido a la membrana, volviéndose más activo cuando el tejido de la membrana se rompe por congelación o artificialmente. El formaldehído producido induce el entrecruzamiento de las proteínas musculares ocasionando endurecimiento del músculo y pérdida de la capacidad de retener agua (PASCUAL ANDERSON, 2000).

Un ejemplo de cambio autolítico, que involucran enzimas proteolíticas, es la incidencia de vientre desangrado (estallido de vientre) en especies grasos, este aspecto puede producir la contaminación general del pescado por la proliferación de las enterobacterias que puedan estar en su tracto gastrointestinal (HUSS, 1999).

#### 2.5.4. Cambios bacteriológicos

La carne y los órganos internos del pescado sano recién capturado son generalmente estériles, pero existe flora contaminante en piel, agallas e intestino, que depende del ambiente en el que han vivido los peces y su alimentación. Por un lado, la piel hace de barrera para impedir la entrada de microorganismos y por otro lado, el peritoneo protege la zona intestinal (PASCUAL ANDERSON, 2000).

Durante la captura y manipulación del pescado tienen lugar desgarros y roturas de tejido que permiten la colonización bacteriana del músculo por parte de la flora característica del pescado. La entrada de microorganismos dependerá de lo robusta que sea la piel y de lo gruesa que sea la capa de mucus dérmico del pescado, ya que éste ejerce una actividad inhibitoria mediante mecanismos protectores como los lisozimas. A la vez, la invasión bacteriana del pescado se ve favorecida por los cambios debidos a la autólisis, los cuales convierten la carne de pescado en un medio rápidamente utilizado por las bacterias, ya que contiene compuestos de bajo peso molecular como dipéptidos y aminoácidos libres (HUSS, 1999; AGÜERIA *et al.*, 2004).

La flora bacteriana inicial en pescados de agua templada está dominada por bacterias Gram negativas, bacilos psicrófilos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* y *Vibrio*. Después de una fase de demora, cuya duración depende básicamente de la temperatura, las bacterias del pescado inician un crecimiento exponencial a lo largo del deterioro alcanzando valores de  $10^8$  -  $10^9$  UFC/g de carne o  $\text{cm}^2$  de piel, cuando el deterioro es manifiesto. Tendrán lugar cambios cualitativos en función de las condiciones de almacenamiento. Las *Pseudomonas* sp y *Aeromonas* sp pueden llegar a ser los géneros dominantes en pescados de mar mantenido a bajas temperaturas (HUSS, 1999).

El crecimiento inicialmente se da bajo condiciones aerobias utilizando como sustrato los hidratos de carbono y el lactato. En cierta manera,

el crecimiento de microorganismos aerobios (*Escherichia coli*, enterobacteria que ocasiona enfermedades diarreicas agudas en humanos y animales), da lugar a la formación de microclimas anaerobios en la superficie del pescado, que favorece entonces el crecimiento de las bacterias anaerobias facultativas (CONNELL, 1995).

#### 2.5.5. Oxidación e hidrólisis de lípidos

En los lípidos del pescado ocurren dos reacciones: la oxidación y la hidrólisis. Ellas dan como resultado la producción de una serie de sustancias, de las cuales algunas tienen sabores y olores desagradables (rancio). Algunas también contribuyen a los cambios de textura mediante uniones covalentes a las proteínas musculares. Las reacciones pueden ser no enzimáticas o catalizadas por enzimas: microbianas, intracelulares o digestivas del mismo pescado. Por lo tanto, el significado relativo de estas reacciones depende de la especie y la temperatura de almacenamiento (POULTER *et al.*, 1982).

Los pescados grasos son, por supuesto, particularmente susceptibles a la degradación lipídica, la cual puede ocasionar severos problemas en la calidad, incluso durante el almacenamiento a temperaturas bajo cero. El contenido de la grasa del pescado experimenta grandes variaciones aun en las mismas especies como consecuencias de diferentes razones. Por este motivo una especie de pescado en iguales condiciones de almacenamiento y recibiendo los mismos procesos de elaboración, posee distinta capacidad de conservación (HUSS, 1999).

La grasa del pescado difiere de los mamíferos en sus propiedades físicas y químicas. En las grasas de pescado tanto la proporción de ácidos grasos saturado como la de glicerina es más baja, 20% de ácidos grasos saturados de cadena larga y 80% de ácidos grasos mono y poliinsaturados. El alto contenido de enlaces insaturados causa en los aceites de pescado gran susceptibilidad de la oxidación (POULTER *et al.*, 1982).

La oxidación de las grasas es una reacción en cadena en la que aumenta la velocidad de la misma conforme avanza el proceso. La formación de peróxidos es la reacción principal de la fase inicial de la oxidación. Los primeros radicales formados se consideran tóxicos de tal manera que, ya en la fase inicial de la oxidación posee la grasa una elevada toxicidad. Como resultado de la degradación de peróxidos se originan distintos ácidos: cetonas, aldehídos, derivados carbonílicos y productos de polimerización. Algunos de los ácidos y carbonilos confieren olor y sabor desagradables al pescado (KIETZMANN, 1974).

De las reacciones químicas entre los aldehídos formados, los ácidos grasos insaturados y la trimetilamina resultan combinaciones de tinte pardo y rojo, causantes de los cambios de color que manifiesta la carne de los pescados grasos. La velocidad de la autooxidación depende de factores, especialmente del grado de insaturación de las sustancias grasas, de la temperatura, iluminación y humedad. Favorecen la oxidación, los metales raramente presentes de forma natural en el pescado (POULTER *et al.*, 1982).

Aparte de la degradación preferentemente oxidativa de las grasas ocurre también su desdoblamiento hidrolítico y merced a ello aumenta en gran medida la proporción de alcoholes y ácidos grasos libres en los tejidos grasos. Si bien el proceso parece ser preferentemente de naturaleza química, en ciertas circunstancias hay intervención de microorganismos con actividad lipásica (KIETZMANN, 1974).

## 2.6. Evaluación de la calidad del pescado

Un método de determinación de la frescura o de la calidad de un pescado, debe ser rápido, fiable, coincidente con la apreciación sensorial y, preferiblemente, aplicable a todos los alimentos hidrobiológicos (pescados). Debido a la gran variedad de especies y de modificaciones bioquímicas existentes, esto es difícil de lograr. En este sentido, se han propuesto numerosos métodos de evaluación de la frescura y calidad del pescado: los métodos sensoriales, métodos físico - químicos y métodos microbiológicos (HUSS, 1999).

Ningún método aislado suele ser suficiente, por lo que frecuentemente se aconseja realizar al menos dos pruebas o métodos: una para determinar la pérdida de frescura, si es que se produjo, y otra para detectar el deterioro microbiano. Los métodos químicos, bioquímicos y físicos deben ser correlacionados con la evaluación sensorial antes de ser empleados en el laboratorio para el análisis microbiológico que son más costosos de y de mayor tiempo (MORALES *et al.*, 2004).

### 2.6.1. Métodos sensoriales

Los métodos organolépticos o sensoriales utilizan los órganos de los sentidos para evaluar características del pescado como su aspecto, textura, olor, color, sabor, etc., valorando los cambios organolépticos desarrollados progresivamente en el pescado hasta su deterioro. Son los más utilizados en las inspecciones diarias de almacenes, puertos y mercados y en ellos se apoyan los consumidores y los inspectores de los alimentos para determinar la frescura, calidad e idoneidad de los diferentes lotes de pescado (INICIARTE y MORENO, 1991; MORRILLO *et al.*, 2004).

Los métodos sensoriales no requieren de equipos ni materiales especiales, son rápidos y permiten la valoración simultánea de más de un parámetro en diferentes muestras de pescado. Sin embargo, el resultado está sometido a las impresiones subjetivas del panel de catadores. Asimismo, se han desarrollado numerosos esquemas para el análisis sensorial de especies de pescado (SUÁREZ *et al.*, 2008).

Al evaluar el patrón de deterioro de la anchoveta Peruana (*Engraulis ringens*) en refrigeración, en el laboratorio del Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, Callao – Perú. Obtuvieron resultados entre regular y por debajo de los límites de aceptación sensorial. Así mismo estos autores sugieren la evisceración y enfriamiento mínimo, para utilizarlo en consumo humano (AYALA *et al.*, 2001).

En Caracas – Venezuela, la evaluación sensorial en tronquitos de sardina (*Sardinella aurita* V.) congeladas, indicó un buen grado de frescura desde el principio de la experiencia hasta los 3,5 meses de evaluación, este parámetro resultó ser el más idóneo para medir la estabilidad y frescura (GONZÁLES *et al.*, 2002).

Al evaluar el impacto de temperatura de almacenamiento sobre los atributos sensoriales en tilapia (*Oreochromis spp*), en la Universidad Central de Venezuela, Caracas; catalogaron a los ejemplares estudiados como de buena calidad, además indicaron que el almacenamiento a 0 °C es ideal para una vida útil de 21 días (TOMÉ *et al.*, 2000).

En la Universidad Nacional del Centro, Argentina, AGÜERIA *et al.* (2004), al valorar la calidad de carne de Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), previamente eviscerado y sin eviscerar, las condiciones lo calificaron dentro de los márgenes de aceptabilidad. Además indicaron que la mejor calidad se obtuvo al eviscerar y refrigerar los ejemplares.

**Método del esquema Unión Europea (UE)**, actualmente es el método más utilizado en Europa y algunos países de América para la evaluación de la calidad en el servicio de inspección y en la industria pesquera, introducido en la Decisión del Consejo N° 103/76 enero de 1976 (HUSS, 1999). Para la evaluación de la calidad de pescado existen tres niveles de calidad en el esquema UE: E (Extra), A (Buena), B (Regular), C (No apto), donde E corresponde a la mayor calidad y por debajo del nivel B, el producto no es apto para el consumo humano (EEC, 1976).



### 2.6.2 Métodos físico – químico

Los métodos físicos – químicos son no destructivos, sencillos y de fácil aplicación, por lo que resultan útiles en la análisis de rutina y pueden utilizarse fuera del laboratorio. Sin embargo, la información que ofrecen es limitada y son complemento de otro tipo de técnica de evaluación. Existen numerosos métodos para determinar la calidad del pescado pero el más usado es la determinación del pH y amoniaco de la carne (SUAREZ *et al.*, 2008).

**pH (Acidez iónica)**, la determinación de pH es sencilla y se puede realizar directamente con un pHímetro colocando los electrodos (vidrios calomel) dentro de la carne de pescado o dentro de una suspensión de la carne de pescado en agua destilada. Se puede aplicar *in situ* pero es destructivo para los ejemplares (PASCUAL ANDERSON, 2000).

HUSS (1999) indica que el pH de la carne del pescado proporciona cierta información acerca de su condición. El tejido de pescado tiene un pH mayor respecto a los tejidos animales de sangre caliente. El pH muscular cercano a la neutralidad es debido a la baja producción de ácido láctico, consecuencia de la escasa presencia de glucógeno en el músculo del pescado, menor al 0,5% (PAN Y JAMES 1985). El descenso de pH post mortem es debido a la acumulación de ácido láctico como producto final de la degradación de glucógeno. El nivel de glucógeno del pescado es menor que el de los animales de sangre caliente, por ello se acumula menor cantidad de ácido láctico.

En los animales de sangre caliente el pH llega a descender hasta 5,5; en cambio el pH del pescado después de su captura es neutro 7, luego desciende a 6,2 – 6,5 para luego subir a 6,6 – 6,7. Este parámetro contribuye a la inestabilidad del pescado luego de su muerte porque estos valores de pH favorecen el desarrollo microbiano. El pH del pescado alterado es mayor a 7 (HUSS, 1999).

Resulta difícil relacionar un determinado valor de pH con el grado de frescura, ya que el pH final que se alcanza tras la muerte depende de las reservas glucolíticas de ese momento, algo muy variable que depende del estado nutricional y del tipo de captura. (PASCUAL ANDERSON, 2000). Asimismo, RUIZ CAPILLAS y MORAL (2001) proponen, a pesar de encontrar un incremento significativo de pH durante el deterioro, que se utilice este parámetro más como una guía de calidad que como un índice propiamente dicho.

La medición de pH para determinar la frescura en carne de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), almacenados en refrigeración, encontraron valores de pH muscular desde 6,94 a 7,07; los que estuvieron por debajo del límite de referencia (pH 7,5), según su Código Alimentario Argentino (AGÜERIA *et al.*, 2004). Asimismo, IZQUIERDO *et al.* (2001), determinaron el pH muscular, en armadillo (*Hipostomus watwata*), bocachico (*Pochilodus reticulatus*) y lisa (*Mugil curema*) en Maracaibo, Venezuela. Mostrando valores promedios de pH muy similares entre las especies de pescado estudiadas (6,40 – 6,66). Además concluyen que el pH de los ejemplares estudiados es cercano a 7, lo que favorece el crecimiento bacteriano.

En un estudio realizaron mediciones de pH muscular en Tilapia (*Oreochromis spp*), en la Universidad Central de Venezuela, Caracas; reportaron valores de pH de 6,48 al momento de la captura y de 6,53 luego del almacenamiento. Concluyen que el incremento de pH es el resultado de la formación de amoniaco, aminos producidas por vía autolítica y, por la acción bacteriana de aminoácidos libres (TOMÉ *et al.*, 2000).

**Bases volátiles totales de nitrógeno (BVT-N)**, la actividad bacteriana y las modificaciones bioquímicas fruto de la actividad autolítica del pescado dan lugar a compuestos nitrogenados básicos como el amoniaco, la trimetilamina (expresado como nitrógeno de trimetilamina, N-TMA), la dimetilamina (expresado como nitrógeno de dimetilamina, N-DMA) y la monometilamina, conocidas en su conjunto como Nitrógeno Básico Volátil Total (N-BVT), considerados representativos de la alteración del pescado (ADAM y MOSS, 1997; HUSS, 1999).

La determinación de N-BVT presenta una elevada correlación con el grado organoléptico de aceptación y se aplica en ensayos de rutina debido a que puede ser un método sencillo de aplicar y barato. La presencia de N-BVT inciden en las características sensoriales de la carne que son fácilmente evidenciables (olores pútridos y ácidos; aspecto viscoso y pegajoso de la superficie de la carne, disminución de la consistencia, hinchazón, gelatinosa, blandura y cambio de coloración) (MEYER, 1978; CONELL, 1995).

El hecho de que con el N-BVT se determine más de una sustancia, se puede considerar como índice indicativo de descomposición. Sin embargo, a pesar de que su análisis es sencillo de realizar, ya que algunos de sus compuestos se originan en estados muy avanzados del proceso degradativo (BURGESS *et al.*, 1979), otros autores ponen en duda su validez como índice de frescura y lo proponen como medida o índice de deterioro. No existe una correlación proporcional entre el contenido de N-BVT y el tiempo de almacenamiento, ya que se mantiene constante durante los primeros días de almacenamiento, aumentando su concentración cuando el producto ya está en el límite de aceptabilidad organoléptica (PASTORIZA *et al.*, 1998).

Una de las limitaciones del uso del N-BVT como índice de frescura o deterioro, es el hecho de que presenta niveles variables en función de la especie, estación del año, hábitat, procesado, por lo que se tendrían que establecer los niveles de aceptabilidad individualizados para las diferentes familias o especies marinas (ANASTASIO *et al.*, 1999).

– **Amoniaco ( $\text{NH}_3$ )**, puede ser determinado por la prueba de Ebert, debido a que es apreciable para determinar el estado de conservación de la carne fresca, observando los humos blancos que se desprenden de (Cloruro de amonio)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al agregar unas gotas del reactivo sobre la carne, el humo desprendido indica la presencia de  $\text{NH}_3$ , representando la alteración de la carne (LEBLANC, 1987).

El más importante compuesto entre las bases nitrogenadas volátiles (N-BVT) es el  $\text{NH}_3$ , siendo particularmente útil en el pescado de agua dulce ya que éste no posee óxido de trimetilamina (OTMA) que se degrade para formar trimetilamina (TMA). El amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) presente en los músculos del pescado puede proceder de la desaminación de la creatina, de las proteínas, péptidos y aminoácidos o de sus compuestos por acción bacteriana. También es producido por la degradación autolítica del adenosina monofosfato en productos marinos enfriados (HUSS, 1999).

A pesar de que el amoníaco ha sido identificado como un componente volátil en una variedad de pescados en deterioro, unos pocos estudios han, de hecho, reportado la cuantificación de este compuesto desde que fue posible determinar su contribución relativa al incremento en las bases volátiles totales (ANASTASIO *et al.*, 1999). El amoníaco pareciera ser de mayor utilidad para predecir los cambios finales de la calidad, en lo que a peces de escama se refiere. De esta forma, el amoníaco se presenta como un indicador objetivo potencial de la calidad para pescados que se degradan primariamente por la vía autolítica en lugar de la vía microbiológica (LEBLANC, 1987).

### 2.6.3 Métodos microbiológicos

La finalidad de los métodos microbiológicos es ofrecer información sobre la calidad higiénica durante la manipulación, elaboración o almacenamiento del producto, así como de la posible presencia de microorganismos de importancia para la salud pública (HUSS 1999; MORALES *et al.*, 2004).

La actividad de los microorganismos es el principal factor que limita la durabilidad del pescado fresco. Para el análisis microbiológico del pescado se utilizan habitualmente dos tipos de métodos: los que hacen un recuento del número total de microorganismos presentes y los que se basan en el recuento de un grupo concreto (MEYER, 1978; CONELL, 1995).

**Microorganismos que contaminan el pescado y causan enfermedades (ETA)**, según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) para el caso de los pescados, surgen debido a una serie de factores tales como: la globalización en la exportación de alimentos, infecciones de viajeros que al regresar a sus países de origen diseminan la infección, estilos de alimentación, adaptación de los microorganismos, así como la susceptibilidad de cada población (CARRILLO y AUDISIO, 2007).

Así mismo, para la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos, Perú tiene normas oficiales que determinan las especificaciones sanitarias de una serie de alimentos, en específico de productos de la pesca, pescados frescos, refrigerados y congelados; en donde se establecen los límites de microorganismos, índices y patógenos presentes en estos productos. Los microorganismos establecidos por esta norma son: Mesófilos aerobios, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* (DHAZ, 2008).

– **Mesófilos aerobios**, gran parte del pescado que se compra en los mercados del Perú, es almacenado en refrigeración por el consumidor para de esta forma prolongar su tiempo de vida. La refrigeración del pescado va a restringir el crecimiento de microorganismos Mesófilos ya que estos tienen temperaturas máximas de crecimiento entre 10 °C y 40 °C (GRAM y HUSS, 1996).

La importancia del recuento en placa de Mesófilos como microorganismo indicador son: Si se encuentra un número alto de Mesófilos en el alimento, esto por lo general indica una contaminación desde el punto de vista sanitario, condiciones no adecuadas en la temperatura de almacenamiento, así como un periodo de almacenamiento; estableciéndose las condiciones necesarias para la multiplicación bacteriana. Algunas de las bacterias que crecen entre 30 °C y 37 °C, dependiendo de su concentración, podrán ser o no patógenas. Finalmente el recuento de Mesófilos se relaciona con la viabilidad del alimento para ser consumido (HUSS, 1999).

Por otro lado, es importante tomar en cuenta que en el caso de alimentos como embutidos fermentados, los quesos y productos derivados de la leche, es normal encontrar recuentos altos de Mesófilos, debido a la multiplicación bacteriana por fermentación; por el contrario, los alimentos que han sido sometidos al calor, a un proceso de deshidratación o han sido congelados, habrán de presentar un recuento muy bajo de Mesófilos. (NEYS *et al.*, 2000).

Cuando se determina bacterias Mesófilos Aerobias en pescado crudo, los resultados pueden ser variados; esto puede deberse a factores tales como: la frescura del pescado, la temperatura al expendio y almacenaje, higiene en la manipulación, y el tiempo de almacenamiento (MORALES *et al.*, 2004; HUSS 1999).

Para que el pescado fresco sea aceptado o rechazado debe encontrarse dentro de los límites microbiológicos de Mesófilos Aerobios para pescado crudo, establecidos por la Dirección de Higiene Alimentaria y Zoonosis es  $1 \times 10^6$  UFC/g (DHAZ, 2008), y por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) es 5 Log<sub>10</sub> UFC/g (APHA, 1992). Por otra parte, los límites microbiológicos establecidos por la Comisión Internacional para Alimento (ICMSF) es 6 – 7 Log<sub>10</sub> UFC/g (ICMSF, 1982) y la Norma Oficial Mexicana (NOM) es  $1 \times 10^7$  UFC/g (NOM, 1993), para pescado fresco son mayores.

En un estudio de valoración de la calidad de carne de Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), encontraron recuentos de Mesófilos aerobios de  $10^3$  hasta  $10^6$  UFC/g. Los recuentos de microorganismos Mesófilos alcanzados en los distintos grupos están por debajo del valor de referencia del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), Argentina. Los resultados encontrados confirman la importancia del mantenimiento de estas piezas a bajas temperaturas para inhibir el desarrollo microbiano y aumentar el período de conservación (AGÜERIA *et al.*, 2004).

En un estudio al analizar corvinas reportaron valores de Mesófilos aerobios superiores a 6,37 log UFC/g. Además concluyen que el



aumento de la carga bacteriana en el músculo de corvina se eleva al incrementar la temperatura y tiempo de conservación (TORRES *et al.*, 2000), asimismo, IZQUIERDO *et al.* (2001), en armadillo (*Hipostomus watwata*) y boquichico obtuvieron resultados para Mesófilos Aerobios de 6,62 Log UFC/g y 5,69 Log UFC/g respectivamente. Ambos trabajos fueron efectuados sobre ejemplares provenientes del Lago de Maracaibo – Venezuela.

– *Escherichia coli*, en cuanto a las características del *Escherichia coli*, se dice que es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, oxidasa negativa y móvil; su temperatura de crecimiento óptima es a 37 °C pero puede hacerlo desde 15 a 45 °C, es capaz de resistir temperaturas de calentamiento de 55 °C a 60 °C durante una hora (BELL, 1998).

En su morfología colonial se presenta como una colonia suave, circular de 2 – 3 mm de diámetro, medianamente convexa. Los casos de diarrea causados por *E. coli* se presentan mayormente en época de verano y de lluvias. Es habitualmente fermentador de la lactosa, urea y citrato negativo, indol positivo y móvil (JOKLIK *et al.*, 1994). Asimismo, a pesar de que la mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas y que son importantes para el desarrollo de la flora normal y síntesis de vitamina K y B; existen algunos que sí lo son; siendo capaces de producir enfermedades gastrointestinales (SALYERS y WHITT, 2001).

*Escherichia coli*, es un microorganismo considerado como indicador, pertenece a la familia de las enterobacterias, su hábitat natural es el

tracto entérico del hombre y otros mamíferos, por lo tanto, es la razón por la que se considera como un microorganismo indicador de contaminación fecal (JOKLIK *et al.*, 1994). Asimismo, en la práctica puede ser necesario diferenciar si la contaminación fecal es de origen humano o animal, por las implicancias sanitarias que tiene. La *Escherichia coli* de origen humano es idéntica a la de origen animal, sin embargo, la *Escherichia coli* animal se ha visto asociada a bacterias del género *Rhodococcus* (MURRAY *et al.*, 2003).

El cálculo de NMP de coliformes fecales en los alimentos se lleva a cabo con el fin de determinar si el alimento ha sido preparado y manejado, empleando buenas prácticas de higiene. Al encontrar *E. coli* en un alimento, no implica en definitiva la presencia de bacterias patógenas en el alimento, sino que solamente plantea la posibilidad de que estén presentes (MANDELL *et al.*, 2002; FRADE y FERNÁNDEZ, 2004).

Para aceptar o rechazar el pescado luego de su análisis en laboratorio, este debe de encontrarse dentro de los límites microbiológicos de *Escherichia coli* establecidos por la dirección de higiene alimentaria y zoonosis es  $10^2$  NMP/g (DHAZ, 2008), por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos es 0,60 – 2,60 Log<sub>10</sub> NMP/g (ICMSF, 1982) y la Norma Oficial Mexicana es 2,60 Log<sub>10</sub> NMP/g (NOM, 1993) para pescado fresco.

En un estudio realizado por CARBAJAL *et al.* (2003) en el Mercado Mayorista Pesquero de Ventanilla - Perú, el promedio de *E. coli* para el jurel fue de 6,8 NMP/g. Lo cual estuvo dentro de los límites establecidos, sin embargo demostraron su presencia en el jurel. Además confirmaron la inseguridad de consumir alimentos crudos frescos de origen marino expendidos en el segundo mercado mayorista más grande de la ciudad de Lima, Perú.

En un estudio determinaron la presencia o ausencia de *Escherichia coli* en lisa (*Mugil curema*) y corvina (*Cynoscion acoupa*), reportaron valores de (85,5%) para las lisas y (37,0%), para las corvinas como positivas a *E. coli*, catalogándose estas muestras como no aptas para el consumo humano. Así mismo, mencionan que la presencia de *E. coli* en las muestras analizadas es el resultado de una contaminación a partir del reservorio animal/humano (MORILLO *et al.*, 2004 – 2005).

Al evaluar la calidad bacteriológica de la tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*), en Costa Rica, encontraron que el 58% de las muestras evaluadas presentaron valores superiores a los límites permitidos, por lo tanto se consideraron inaceptables, haciendo evidente la falta de control higiénico, representando un problema de salud pública (MORALES *et al.*, 2004). La *E. coli* fue recomendado como un indicador de contaminación directa e indirecta por heces humanas o de animales y que ocasiona enfermedades diarreicas agudas a los humanos a nivel mundial en el Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (APHA, 1992).

ROJAS y CASTILLO (2003) evaluaron la supervivencia de un aislado de *Escherichia coli* O157:H7 en jugos de naranja no pasteurizados de expendio comercial. Las muestras fueron preparadas ajustándose sus pH a tres niveles: 3,0; 3,5 y 4,0. Se demostró la supervivencia del microorganismo frente a los distintos tratamientos de pH.

– ***Staphylococcus aureus***, es miembro de la familia Micrococcaceae, es un microorganismo Gram positivo que se agrupa en forma de racimo; en especial, *Staphylococcus aureus* que se distingue de los demás debido a su coloración dorada, es coagulasa positiva, capaz de fermentar manitol y es desoxirribonucleasa positivos. Tienen una forma esférica y un diámetro de alrededor de una micra (BELL, 1998).

Los requerimientos oxígeno del género *Staphylococcus* es aerobio - anaerobio facultativo, por tanto su crecimiento en caldo tioglicolato se hará en toda la extensión del tubo. Desde el punto de vista nutricional es no exigente, por lo tanto crece tanto en medios de cultivo pobres, como el Agar simple, como en medios ricos, como el agar sangre ovina. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, pero puede crecer dentro de un rango de 6 – 48 °C (HIRAMATSU, 1998).

La incidencia de la enfermedad que causa *Staphylococcus aureus* predomina en el verano. La forma en la que *Staphylococcus aureus* puede llegar a infectar a los alimentos es mediante el manejo de los mismo por

personas infectadas o por portadores sanos que contienen en sus fosas nasales y garganta a esta bacteria. Cuando *S. aureus* se presenta en los alimentos en concentraciones mayores a  $10^5$  UFC/g, es indicativo de la presencia de aproximadamente 1 microgramo de la toxina estafilocócica, lo que lleva al desarrollo de los síntomas de la intoxicación (CHAMBERS, 1997).

Las diferentes cepas de *S. aureus* son capaces de producir diversos tipos de enterotoxina termoestables, y para eliminarla, es necesario mantenerla a  $100^{\circ}\text{C}$  por al menos 30 minutos. La producción de enterotoxina estafilococia se puede prevenir manteniendo los alimentos en refrigeración, ya que la temperatura óptima para la producción de la toxina es de  $35$  a  $40^{\circ}\text{C}$ , sin embargo, también se puede producir en rangos de  $10 - 45^{\circ}\text{C}$ . Si la toxina ya fue producida, a diferencia de la bacteria, está ya no es eliminada por el proceso de cocción, lo que da origen a la intoxicación alimentaria (CARRILLO y AUDISIO, 2007).

La enterotoxina estafilocócica es producida por algunas cepas de *S. aureus*; actualmente se conocen 7 enterotoxina. La enterotoxina que se asocia regularmente con la intoxicación por alimentos es la enterotoxina A (HIRAMATSU, 1998). Por otro lado, cuando en los análisis de los alimentos, se detecta una sepa de *Staphylococcus aureus* productora de coagulasa y termonucleasa, se asume que se trata de una sepa enterotoxigénica. Sin embargo, en la Normas técnicas sanitarias de DHAZ (2008), se establece que la presencia de  $1000\text{UFC/g}$  es el límite máximo permitido de *Staphylococcus aureus* en pescados crudos.

MARADAN *et al.* (1997), mencionan que *Staphylococcus aureus* y otros tipos de microorganismos que causan intoxicación alimentaria no aparecen en peces marinos, sin embargo el pescado que se manipula a bordo, que se filetea después en tierra y se vende luego como fresco, está contaminado por tales microorganismos. Esto se debe a que gran parte del personal que trabaja en contacto con el pescado porta el *Staphylococcus aureus* en su piel, mucosas nasales, zonas húmedas, pliegues inguinales, axilas y ojos y lógicamente los elimina.

Se estima que el índice de portación nasal en los adultos es de alrededor del 20 - 30%. Longitudinalmente, cerca del 30% de la población puede ser portador permanente, el 50% portador intermitente y el 20% no es colonizado. Algunas poblaciones pueden tener una tasa de colonización mayor como el personal de salud, los pacientes en hemodiálisis, diabéticos, adictos a drogas intravenosas, etc, (HIRAMATSU, 1998).

A pesar que *S. aureus* posee numerosos factores de virulencia, puede convivir con el huésped humano formando parte de su flora normal sin causar ningún daño. Desde las narinas, los portadores pueden transferir bacterias a diferentes sectores de la piel, aunque habitualmente existe resistencia a la colonización de la piel intacta. Sin embargo, un traumatismo (muchas veces desapercibido) puede dar una puerta de entrada al microorganismo. En caso de infección, por tanto, *S. aureus* puede ser muchas veces de origen endógeno (CHAMBERS, 1997).

Es muy resistente a las condiciones ambientales normales. Es capaz de sobrevivir hasta tres meses en un cultivo a temperatura ambiente. Muere expuesto a temperaturas mayores de 60 °C por una hora. En cuanto a los agentes químicos, es sensible a la mayoría de los desinfectantes y antisépticos, que lo matan en pocos minutos. En el caso de procesos supurados, el examen directo de la muestra con tinción de Gram nos permitirá observar los cocos Gram positivos agrupados en racimos, junto a un gran número de leucocitos polimorfonucleares (MARADAN *et al.*, 1997).

En un estudio realizado por BORBOLLA *et al.* (2004), para conocer las bacterias más frecuentes que contaminan los alimentos callejeros en el estado de Tabasco México, encontraron que el 3% del pescado examinado estuvo contaminado con *Staphylococcus aureus*. Del mismo modo al realizar la vigilancia de *Staphylococcus aureus* en alimentos, en establecimientos de producción, expendio, encontraron que los más propensos a presentar concentraciones de esta bacteria, por encima de los 10<sup>3</sup> UFC/g y por lo tanto aquellos capaces de causar directamente la infección intestinal debido a la toxina que se produce, son los productos de repostería a base de crema y los quesos; es decir los productos lácteos (CARRERA *et al.*, 1998).

– ***Salmonella spp***, al igual que *E. coli* pertenece a la familia enterobacteriaceae, pero a diferencia de esta, la *Salmonella* no es parte de la flora normal del hombre. Sin embargo, lo es en algunos animales, los miembros de este género generalmente son móviles, son bacterias anaerobias facultativas, Gram negativas, oxidasa y catalasa negativa,

generalmente producen sulfuro de hidrogeno, también son capaces de descarboxilar lisina y ornitina, en Agar triple – hierro - azúcar, *Salmonella* es capaz de formar ácido y gas a partir de la glucosa; sin embargo mediante plásmidos, es capaz de emplear la lactosa o la sacarosa y formar ácido y gas. Es una bacteria resistente a la deshidratación (JOKLIK *et al.*, 1994).

Para el aislamiento e identificación de *Salmonella* se precisa de etapas sucesivas debido a que el microorganismo se encuentra por lo general presente en bajo número, algunas veces debilitado por los procesos tecnológicos a que son sometidos los alimentos o por la presencia de un número mayor de otros miembros de la familia enterobacteriaceae u otras familias (MURRAY *et al.*, 2003).

A pesar de que su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, puede adaptarse a condiciones extremas, es capaz de crecer de 2 - 4 °C, cuando los alimentos son congelados, o hasta de 54 °C. Por lo tanto las temperaturas de cocción por debajo de su temperatura subletal (menor o igual a 50 °C) durante 15 – 30 minutos o durante un menor periodo de tiempo a 70 °C, no será suficiente para eliminar la bacteria, debido a su capacidad de adaptación a cambios de temperatura. Gracias a las síntesis de proteína de choque térmico. Este proceso logra un cambio en la composición de los ácidos grasos saturados, logrando disminuir la fluidez; aumentando de esta manera, la resistencia al daño provocada por el calor (FORBES *et al.*, 2002).



*Salmonella* es capaz de producir un padecimiento conocido generalmente con el nombre de salmonelosis; el cual, a su vez se divide en fiebre entérica (tifoidea), gastroenteritis aguda, (diarrea no tífica), así un estado en el que la persona no desarrolla ningún síntoma; conocido con el nombre de portador asintomático (MURRAY *et al.*, 2003).

La *Salmonella* no existe originalmente en el pescado. Estas bacterias entran en contacto con el pescado durante el manejo y proliferan en él. También hay posibilidad que lo colonice cuando el pescado procede de aguas costeras y dulces contaminadas. Se ha demostrado que *Salmonella* no es capaz de vivir por mucho tiempo en el agua de mar y a los pocos días de haberse contaminado el agua se autopurifica en base principalmente a la dilución que sufre, a las corrientes marinas, a la sedimentación, oxidación y a efectos ejercidos por la temperatura, la luz y otros microorganismos (CARRILLO y AUDISIO, 2007).

Para aceptar o rechazar el pescado luego del análisis de *Salmonella spp.*, este debe estar ausente por 25 g de muestra, según lo establecido por la Dirección de Higiene alimentaria y Zoonosis (DHAZ, 2008), por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 1982) y la Norma Oficial Mexicana (NOM, 1993) para pescado fresco.

En Venezuela, MORILLO *et al.* (2004), aislaron *Salmonella spp.*, determinando la presencia o ausencia por 25 g de muestra, en lisa (*Mugil curema*) y corvina (*Cynoscion acoupa*), reportaron valores de (41,95%)

para las lisas y (45,37%), para las corvinas como positivas, catalogándose estas muestras como no aptas para el consumo humano. Asimismo, CARRERA *et al.* (1998), al realizar la vigilancia de *Salmonella spp* en alimentos, en establecimientos de producción, expendio en Cuba; Encontraron mayor contaminación por *Salmonella* (10%) en pescado que en otros alimentos, debido a las malas condiciones higiénicas por manipulación, y la falta de control sanitario, lo cual representa un riesgo de salud al consumidor.

En un estudio de prevalencia de *Salmonella spp.* HERREA y SANTOS (2005), en muestras de pescado fresco expendidos en la ciudad de Pamplona, Colombia; Encontraron una incidencia del 12%. Además concluyen que una de las formas de evitar la contaminación es una higiene adecuada durante el proceso. Del mismo modo, LATEEF *et al.* (2006). Al estudiar la calidad microbiológica del hielo para bebidas frías y alimentos en Metrópolis Ogbomoso, Southwest, Nigeria; Revelaron que el hielo puede representar una nueva ruta de propagación de bacterias como la *Salmonella spp*, especialmente en los países en desarrollo.

En India, se determinó la prevalencia de enteropatógenos, en pescado y productos pesqueros de Ludhiana. El examen bacteriológico, de 23 pescados de agua dulce, reveló una incidencia de *Salmonella* en 3,2% (SHARMA *et al.*, 2006). Asimismo, SINGH y KULSHRESTHA (1993) obtuvieron 7 muestras contaminadas con *Salmonella spp.*, de trece (13) muestras de pescado examinadas, las mismas que fueron obtenidas de un mercado en la India.

En el mercado mayorista pesquero de Ventanilla – Perú, CARBAJAL *et al.* (2003) identificaron *Salmonella spp* en *Trachurus picturatus* Murphyi (jurel), este estudio evidencio la inseguridad en la salud pública que representa el consumo de alimentos crudos frescos de origen marino expendidos en ese mercado.

ALMEIDA *et al.* (1996) en la ciudad de Lima, encontraron dos muestras positivas con *Salmonella* (*Salmonella Albani* y *Salmonella Thyphimurium* 05+). Las dos muestras fueron, de “cebiche”, plato típico elaborado a base de trozos de pescado crudo fresco marinados en limón y sal, al cual se le adicionan cebolla y especias. El pH de este plato es inferior a 4 y debería impedir el desarrollo de *Salmonella*; sugieren que el pH no es lo suficiente para garantizar su inocuidad.

– ***Vibrio cholerae***, bacteria Gram negativa uniflagelada, corta, curva, con gran movilidad. Crece en condiciones aeróbicas, a temperatura de 18 a 37 °C. Separado de la familia Enterobacteriaceae por reacción positiva a oxidasa. Se encuentra principalmente en el agua. Produce enfermedades gastrointestinales, son halofílicas (JOKLIK *et al.*, 1994). Así mismo este autor menciona que su diseminación es principalmente por el agua, en pobreza extrema y falta de abastos seguros de agua, Alimentos contaminados: mariscos, pescados, vegetales frescos. El adulto puede eliminar de 30 – 50 litros de heces en 2 a 3 días.

Para el diagnóstico se realiza coprocultivos en medios selectivos: Agar TCBS (tiosulfato – citrato – bilis –sacarosa). Colonias planas, opacas, amarillas después de 18 horas a 37 °C, se aíslan en Agar triptosa y soja (TSA) a una temperatura no mayor de 50 °C con NaCl al 1.5%, 2.5%, 5% y 9% para ver la tolerancia a sales (MANDELL *et al.*, 2002).

En enero de 1991 se notificaron los primeros casos de cólera en Perú. En unas semanas se diseminó rápidamente en el país. La enfermedad afectó todas las edades con una muy alta incidencia y al principio alta mortalidad. Esta fue disminuyendo a medida que se implementó la asistencia médica. Entre 1991 y 1992 el número acumulativo de casos en Perú, representó el 2,5% de la población. Dada la incidencia de la epidemia y que además muchas de las infecciones fueron asintomáticas, luego de 2 años, la mayoría de la población había estado infectada (CARVAJAL *et al.*, 1998).

*V. cholerae* es un bacilo Gram negativo, curvo, con forma de coma. Desarrolla bien en medios simples. Aunque su desarrollo está estimulado por la presencia de sodio, esta especie, a diferencia de las otras especies del género, desarrolla en medios sin el agregado de NaCl. *Vibrio cholerae* tolera condiciones de alcalinidad y es capaz de desarrollar a pH 10. Estas propiedades se utilizan para aislar el germen de las muestras clínicas, de alimentos o del agua (ELLIOT *et al.*, 1998).

Para aceptar o rechazar el pescado luego del análisis de *Vibrio cholerae*, debe estar ausente por 25 g de muestra, según lo establece la

Dirección de Higiene alimentaria y Zoonosis (DHAZ, 2008), para pescado fresco. Asimismo, KAPER *et al.* (1995) sustenta que, es importante tener en cuenta que factores climáticos como la humedad y temperatura, influyen en la estacionalidad de algunas enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) y de algunos microorganismos presentes en el medio marino como *V. cholerae*. CARVAJAL *et al.* (1998), reportan no haber detectado *V. cholerae* en las muestras marinas estudiadas, lo cual indica la probable ausencia del patógeno en el medio marino luego de la epidemia de cólera del año 1991.

– ***Vibrio parahaemolyticus***, a este microorganismo bacteriano se le conoce como el agente causal de la gastroenteritis aguda que sufre el hombre tras el consumo de pescado crudo y de productos marinos. Los *Vibrio parahaemolyticus* son bacilos Gram negativos, móviles, tolerantes a la sal y anaerobios facultativos. Es una bacteria perteneciente a la familia de las Vibrionaceae, psicrófila y altamente resistente a las condiciones de stress (LEYTON y RIQUELME, 2008; BEUCHAT, 1973).

Esta bacteria se encuentra presente en forma permanente en el mar de nuestro territorio, lo que no implica que exista riesgo permanente de infección. Éste existe sólo cuando condiciones especiales en el mar, como el aumento de su temperatura, especialmente en los meses estivales, favorecen su proliferación (ALIAGA, 2005).

El *V. parahaemolyticus* tiene un crecimiento en agua a una temperatura óptima de 37 °C, y puede crecer de 5 – 43 °C, en un pH óptimo de 7,8 – 8,6; aunque tolera un rango de 4,8 – 11 de pH, crece óptimamente en condiciones atmosféricas aerobias, y también en aeróbica o anaeróbica. Su crecimiento óptimo en concentración de NaCl en agua marina es de 3%, soportando rangos de 0,5 a 10% (ELLIOT *et al.*, 1998).

Los valores de crecimiento mínimos y máximos de temperatura son 5 °C y 37 °C, con pH mínimo de 4,8; actividad de agua de 0,93 y NaCl máximo de 8 a 10%. La resistencia al calor es 60 °C durante 5 minutos, muestran un descenso 7 log<sub>10</sub> en *V. parahaemolyticus* aproximadamente. En general los pescados no acumulan el vibrión en cantidad importante para causar infección, pero pueden alcanzar grandes cantidades de éste al dejarse sin adecuada refrigeración por unas pocas horas. La enfermedad se transmite por ingestión de cualquier alimento contaminado crudo o mal cocido (VILCAPOMA, 1992).

El transporte o almacenamiento de productos del mar sin condiciones adecuadas de refrigeración favorecen la proliferación de la bacteria y, por lo tanto, la posibilidad de infectar. Se considera que la enfermedad puede producirse con una ingesta de 1.000.000 Vibrones viables (LEYTON y RIQUELME, 2008). Así mismo, estos autores mencionan que se puede transmitir por contaminación cruzada al ingerir cualquier alimento que haya tenido contacto con mariscos, pescado o agua contaminada.

Para aceptar o rechazar la especie hidrobiológica (pescado) luego del análisis de *Vibrio parahaemolyticus*, las normas nacionales establecen, que esta bacteria debe estar ausente por 25 g de muestra de pescado, según lo establecido por la Dirección de Higiene alimentaria y Zoonosis (DHAZ, 2008).

Al estudiar pescados y moluscos bivalvos procedentes de un mercado pesquero de Lima, Perú. ALIAGA *et al.* (2010) reportaron *Vibrio parahaemolyticus* en pejerrey (15,0%), lisa (5,0%) y jurel (2,5%) demostrando que *Vibrio parahaemolyticus* se encuentra distribuido en los recursos hidrobiológicos estudiados, y con mayor frecuencia en pescados.

En Chile, se realizó una revisión actualizada de la literatura concerniente a la temática de las bacterias Vibrios y su interacción con el bacterioplancton, fitoplancton y organismos superiores. Los antecedentes proporcionados permiten concluir que los Vibrios son un grupo de bacterias con múltiples interacciones con los demás componentes del ecosistema marino, como el *Vibrio parahaemolyticus* que es una bacteria halofílica, autóctona del ambiente marino, considerada como la principal causa de gastroenteritis bacteriana asociada al consumo de alimentos marinos crudos (LEYTON y RIQUELME, 2008).

Así mismo, LEYTON y RIQUELME (2008); QUINTOIL *et al.* (2007) y KAGIKO (2001), mencionan que estudios realizados en otras áreas

geográficas reportan prevalencias desde 0,3% hasta 37,2%. Resultados que evidencian su heterogénea distribución, siendo la cantidad que se puede aislar dependiente de la región, y probablemente relacionada con algún cambio en la naturaleza de la bacteria por factores abióticos y bióticos de es de repercusión global.

En un estudio aislaron e identificaron *Vibrio cholerae* O1 y especies de Vibrios no epidémicos asociados a casos de enfermedad diarreica aguda (EDA) durante 1998, dentro del evento climatológico “El Niño” Oscilación del Sur (ENOS), en el hospital nacional dos, Lima. Concluyen que la asociación de *Vibrio cholerae* O1 con otras especies de Vibrios no epidémicos permitiría establecer una relación directa entre las infecciones diarreicas estudiadas y el ENOS (IBARRA *et al.*, 1999).

El fenómeno de “El Niño”; aunado a los cambios climáticos, son condiciones que alteran los parámetros hidrobiológicos normales del ecosistema marino produciendo la multiplicación excesiva de fitoplancton y zooplancton, cuya importancia en la diseminación y persistencia de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* fue demostrada (COLWELL, 1996).

En un estudio, determinaron si el *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6, clon de la pandemia global se extendido en el Perú. Concluyeron que la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* total; ha sido usado como indicador en el control de contaminación de alimentos para la prevención de infecciones. Sin embargo, la efectividad de esta acción es incierta por la falta de información de la frecuencia de las cepas virulentas en fuentes no humanas en muchos países, así como en el Perú (GIL *et al.*, 2007).



En Lima, ALIAGA (2005) estudió microbiológicamente 59 muestras de ceviche de pescado. Del total de muestras se aislaron 73 cepas del género *Vibrio*, las cuales correspondían a 7 especies: 19 (26,02%) correspondieron a *V. parahaemolyticus*. La predominación de *Vibrio parahaemolyticus*, en las muestras de “ceviche” significa un riesgo para la salud pública por tratarse de patógenos asociados a casos de gastroenteritis (). En Lima se encontró la frecuencia de *Vibrio parahaemolyticus* en pescado congelado y ceviches; se identificaron 5 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* en jurel congelado (8,8%), demostrando la presencia y gran resistencia de *V. parahaemolyticus* a las bajas temperaturas (VILCAPOMA, 1992).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Microbiología General de la Universidad Nacional Agraria de la Selva ubicado en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco – Perú, geográficamente está ubicado entre las coordenadas 09°, 56', 00" de Latitud Sur y 76°, 72', 30" de Latitud Oeste, a una altitud de 640 msnm. El promedio anual de la precipitación es 2800 mm, con temperatura media anual de 24 °C. La humedad relativa en promedio para la zona es de 86%. Ecológicamente está considerada como un bosque húmedo pre montano tropical. El estudio se realizó desde el 20 de Diciembre del 2010 hasta el 28 de marzo del 2011.

#### 3.2. Metodología de estudio

##### 3.2.1. Lugar de toma de muestras

Las muestras de pescados fueron tomados del Mercado Central de Abastos de la ciudad de Tingo María.

##### 3.2.2. Unidades de estudio

En el presente estudio se utilizó 4 especies de pescado de mayor consumo en Tingo María: Boquichico (*Prochilodus nigricans*), mota

(*Hemisorubim platyrhynchos*), lisa (*Mugil cephalus*), jurel (*Trachurus picturatus* Murphy). Las especies en estudio fueron separadas en 5 grupos, cada grupo estuvo conformado por 1 muestra de cada especie; dando en total 20 muestras en estudio. La selección de las especies se determinó tomando los criterios mencionados por DE LA ROSA *et al.* (1995). Ver anexo 1.

### 3.2.3. Tamaño de muestra

El tamaño de muestra para el presente estudio fue de 20 pescados con pesos promedio de 1,5 a 2 kg (AYALA *et al.*, 2001; LAM, 1968); como consecuencia de que el distrito de Rupa Rupa tiene una comercialización promedio mensual de 4320 kg de pescado fresco y congelado (De varias especies), siendo estos de agua dulce y de mar (PRODUCE – Tingo María – 2006).

El tamaño de muestra se determinó por conveniencia, tomando los criterios mencionados por GUERRERO y MEDINA (1986), y DE LA ROSA *et al.* (1995), debido a que en la selva Peruana se carece de información sobre calidad higiénica de pescado. Estos criterios fueron: tomar especies de menor costo, de menor tiempo para su estudio, especies disponibles y accesibles, poblaciones grandes donde sea difícil incluir a cada individuo.

### 3.2.4. Toma de muestras

Las muestras de pescado fueron tomados de los locales de expendio al azar, del estrato o nivel más superficial de expendio. Asimismo, las

muestras de pescado se recolectaron entre las 8 a 10 a.m. teniendo en cuenta la procedencia (Lima, Pucallpa). De igual manera, las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno estériles rotulados, y fueron depositados en una caja térmica con hielo a 4 – 8 °C. Luego, se trasladó al Laboratorio de Microbiología General de la Universidad Nacional Agraria de la Selva para su respectivo análisis. El tiempo de transporte fue de 5 a 10 minutos.

### 3.2.5. Análisis de muestras

En el laboratorio de Microbiología general, el análisis de muestras se realizó siguiendo el procedimiento realizado por TORRES *et al.* (2003) en el cual las muestras de pescado inicialmente fueron cuidadosamente lavados con agua destilada estéril para eliminar presencia de lodo en las zonas donde se apreció esto. Luego, se procedió a realizar el análisis sensorial según lo indicado en el COUNCIL REGULATION citado por NEAVE (1983). Ver Anexo 2.

Para realizar el análisis bacteriológico se extrajo muestras de piel 35 g y músculo 35 g desmenuzados, los cortes fueron de diferentes zonas: cabeza, lomo, cola y en condiciones estériles (APHA, 1976; FAO, 1992; TORRES *et al.*, 2000; IZQUIERDO *et al.*, 2001). Además, se extrajo otra muestra de músculo de cada especie para la prueba de Ebert y pH, para analizar según la técnica de SECRETARIA DE SALUD DE MÉXICO (1999); AOAC (1995) respectivamente. Ver Anexo 3 y 4.

## **Análisis sensoriales**

Para el análisis sensorial (organoléptico) de los pescados, se utilizó el esquema UE (Unión Europea) para la clasificación de la frescura según lo indicado en el COUNCIL REGULATION citado por NEAVE (1983). Según Anexo 10. En el Perú solo existen estándares someros en que los esquemas de determinación están basados en normas internacionales (ITINTEC, 1991).

**Análisis fisicoquímicos**, se consideró los siguientes:

– **Determinación de pH (Acidez iónica)**

Para la determinación del pH se siguió el método directo según la ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC, 1995). Ver Anexo 3.

– **Prueba de Ebert para NH<sub>3</sub> (Amoniac)**

La presencia de amoniac, se determinó según el método rutinario para la prueba de Ebert recomendado por la SECRETARIA DE SALUD DE MÉXICO (1999). Ver Anexo 4. Otras organizaciones recomiendan medir N-TMA, lo cual no es conveniente en nuestra investigación debido a que las especies de agua dulce carecen de esta amina.

Para determinar la reacción a la prueba de Ebert se realizó una incisión en el tejido muscular y se agregó de 1 – 3 gotas del reactivo,

observando el humo blanco que se desprende de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), el mismo que muestra la presencia de amoniaco ( $\text{NH}_3$ ), debido a la reacción del cloro con el hidróxido de amonio del metabolismo bacteriano y desanimación de proteínas, péptidos y aminoácidos. Por lo tanto, la reacción positiva indicó que la carne está en descomposición por el alto cloruro de amonio presente.

**Análisis bacteriológicos**, se realizó los siguientes:

**– Procesamiento de las muestras**

En el laboratorio se procedió a la descamación de 2 especies de los ejemplares que los presentaban (MORILLO *et al.*, 2004; TORRES *et al.*, 2003) y la separación de la piel del músculo de las 4 especies en estudio con la ayuda de bisturís estériles. Además, para la homogenización de la muestra, se pesaron 10 y 25 g de piel, así como 10 y 25 g de músculo por separado para cada especie. Las unidades analíticas se colocaron dentro de matraces vacíos estériles (FAO, 1992; FDA, 2001; APHA, 1976).

Se homogenizó los 10 g de piel y 10 g de músculo de cada especie de pescado, utilizando como diluyente 90 ml de agua peptonada al 0.1%, luego se agitó formando el homogeneizado o primera dilución  $10^{-1}$ , se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$  para el recuento de microorganismos mesófilos aerobios viables, *E. coli* y *S. aureus* (APHA, 1992; FDA 2001).

Del mismo modo, para los 25 g de piel y 25 g de músculo de cada especie de pescado se utilizó 225 ml de caldo lactosado en cada matraz estéril, estos fueron llevados a 37 °C por 24 horas, para el aislamiento de otros patógenos (FAO, 1992; FDA, 2001; FDA 1998). Solo se realizó el análisis microbiológico de los microorganismos bacterianos señalados por la Norma Técnica Sanitaria N° 071 (DHAZ, 2008). Ver Anexo 11.

– **Numeración de microorganismos aerobios viables**

El recuento de mesófilos aerobios viables se realizó siguiendo el método propuesto por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 1992). Ver anexo 5.

– **Numeración de *Escherichia coli* termotolerante**

El método empleado para la numeración de *Escherichia coli*, fue la descrita por la Federal Drug Administration (FDA, 2001). Ver anexo 6.

– **Numeración de *Staphylococcus aureus***

La numeración de *Staphylococcus aureus* se realizó siguiendo el método recomendado por AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA, 2001). Ver Anexo 7.

– **Aislamiento y caracterización de *Salmonella spp***

Para la detección de *Salmonella spp* se usó el método descrito por la Federal Drug Administration (FDA, 2001). Ver anexo 8.

– **Aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*.**

Para la detección de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* presentes en las muestras se siguieron las pautas señaladas por la FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (KAYSNER y DE PAOLA, 1998). Ver Anexo 9.

### 3.3. Variables independientes

- Especie de pescado: Boquichico, Mota, Lisa, Jurel
- Tejido: Piel y músculo.

### 3.4. Variables dependientes

- Análisis sensorial: Clasificación de la apariencia, condición y olor.
- Análisis físico – químico: Amoniac y pH.
- Análisis bacteriológico: Recuento de microorganismos aerobios viables, *Escherichia coli* termotolerante y *Staphylococcus aureus*, aislamiento y caracterización de *Samonella spp*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*.



### 3.5. Ajuste estadístico

Se realizó con un modelo aditivo lineal que incluía los efectos de la especie (boquichico, mota, lisa y jurel) y el tejido (piel y músculo). El modelo fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  =  $j$  - ésima observación bajo el  $i$  - ésimo tratamiento

( $i = 1, 2, 3, 4$ ); ( $j = 1, 2, 3, 4$ )

$\mu$  = Media general.

$T_i$  = Efecto del  $i$  - ésimo tratamiento ( $i = 1, 2, 3, 4$ ).

$E_{ij}$  = Error experimental.

El programa Statgraphics se usó para la estadística paramétrica. Para la estadística no paramétrica se usó el software InfoStat. El análisis de los datos fue realizado mediante el análisis de varianza, empleando el modelo lineal. Se estableció como nivel de significación una probabilidad de ( $P < 0,5$ ). Así mismo, se utilizó la prueba de Friedman para las variables de las características organolépticas con respecto a las especies (Boquichico, mota, lisa, jurel), se realizó una comparación múltiple de medias de Friedman. La prueba de Friedman es equivalente al diseño de bloques completamente al azar.

## IV. RESULTADOS

4.1 Análisis sensoriales de 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María.

En el Cuadro 1 y Figura 1, 2 y 3, se observan las características sensoriales de los pescados estudiados según el criterio: Apariencia, condición y olor.

Cuadro 1. Clasificación de los pescados de acuerdo a las partes inspeccionadas en Tingo María.

Criterio	Partes del pescado inspeccionadas	Especies			
		Boquichico	Mota	Lisa	Jurel
Apariencia	Piel	A	B	B	B
	Ojos	B	B	B	C
	Branquias	B	B	C	B
	Carne (corte del abdomen)	B	A	B	B
	Color (columna vertebral)	A	B	B	C
	Órganos	*	*	B	C
Condición	Carne	A	B	B	B
	Columna Vertebral	B	A	B	B
	Peritoneo	*	*	B	C
Olor	branquias, piel, cavidad abdominal	B	B	B	C

\*: Eviscerado, E: Extra, A: Buena, B: Regular, C: No apto.

Fuente: Elaboración propia.

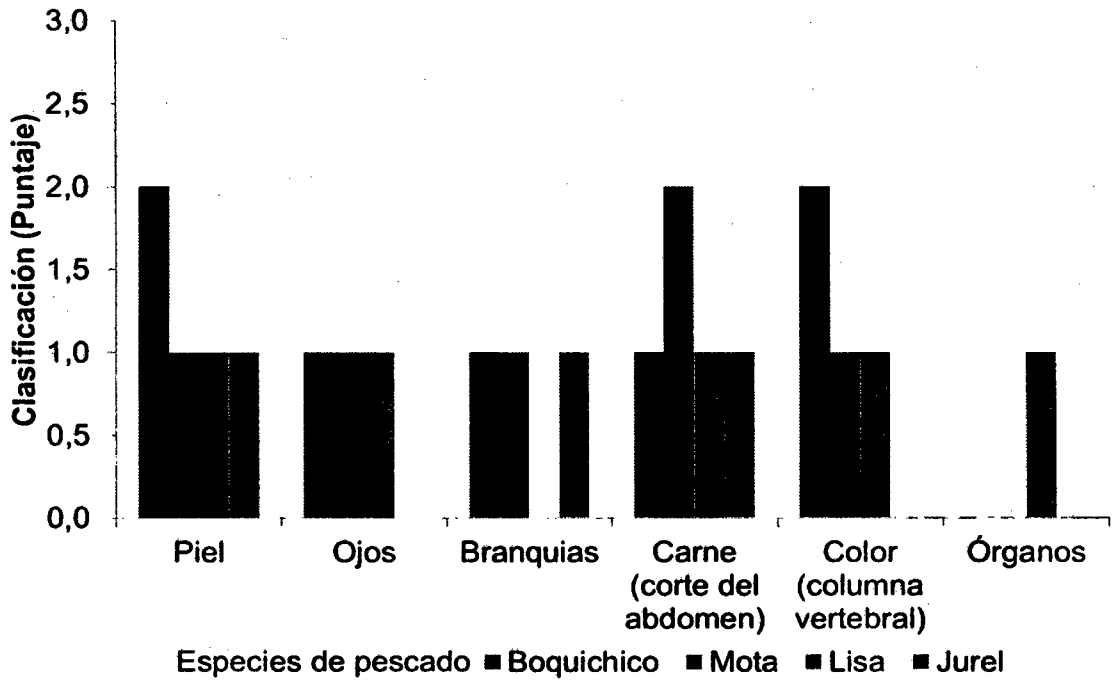


Figura 1. Clasificación de los pescados según la apariencia de las partes inspeccionadas; de acuerdo al anexo 16.

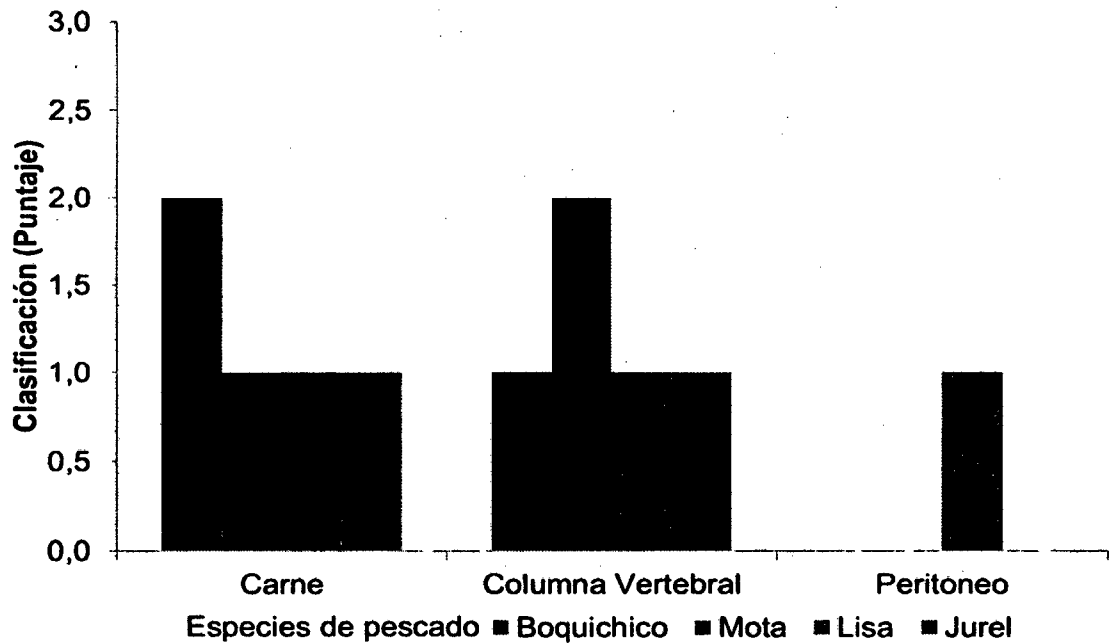


Figura 2. Clasificación de los pescados según la condición de las partes inspeccionadas; de acuerdo al anexo 16.

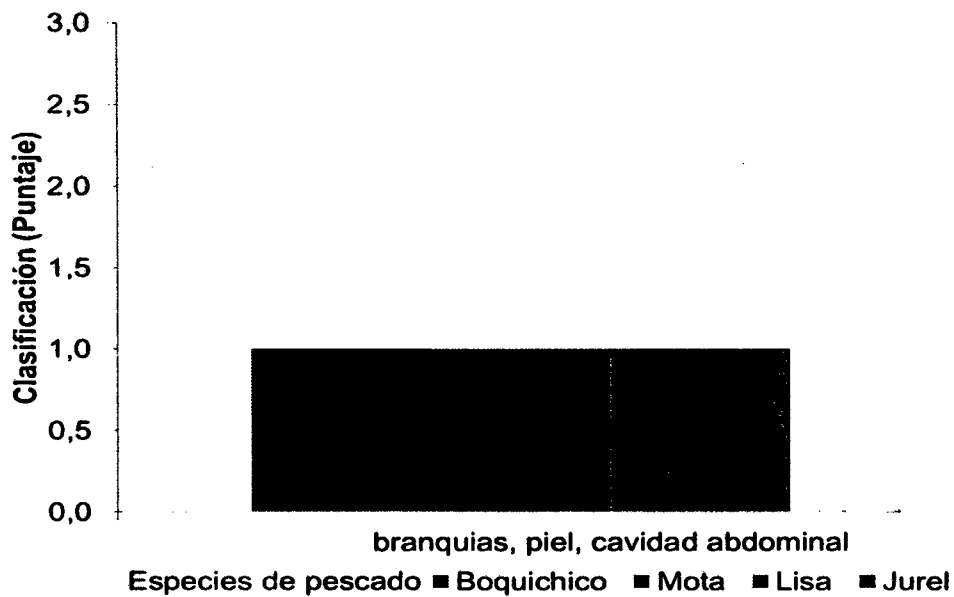


Figura 3. Clasificación de los ejemplares según el olor de las partes inspeccionadas; de acuerdo al anexo 16.

#### 4.2 Análisis físico – químicos de 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María.

##### 4.2.1 Prueba de pH

En el Cuadro 2 y Figura 4 se observa los valores promedio de pH muscular en las especies de pescado estudiadas.

Cuadro 2. Valores promedio de pH muscular en las especies de pescado estudiadas

Especie	pH muscular
Boquichico	6,83
Mota	6,78
Lisa	6,93
Jurel	7,02

Fuente: Elaboración propia.

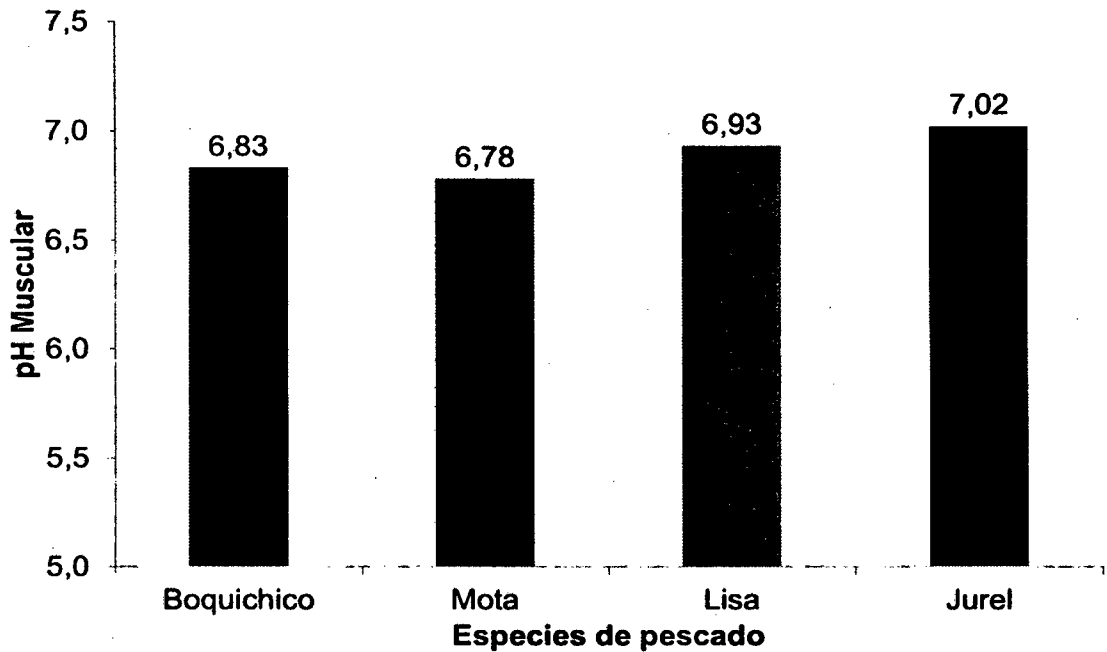


Figura 4. Valores promedio de pH muscular en las especies de pescado estudiadas.

#### 4.2.2 Prueba de Ebert

En el Cuadro 3 y Figura 5 se observa la reacción de Ebert para determinar la frescura de la carne del pescado en todas las especies estudiadas.

Cuadro 3. Porcentaje de especies de pescado positivas a la prueba de Ebert.

Procedencia	Especie	Prueba Ebert
Pucallpa	Boquichico	0%
	Mota	0%
Lima	Lisa	20%
	Jurel	20%

Fuente: Elaboración propia.

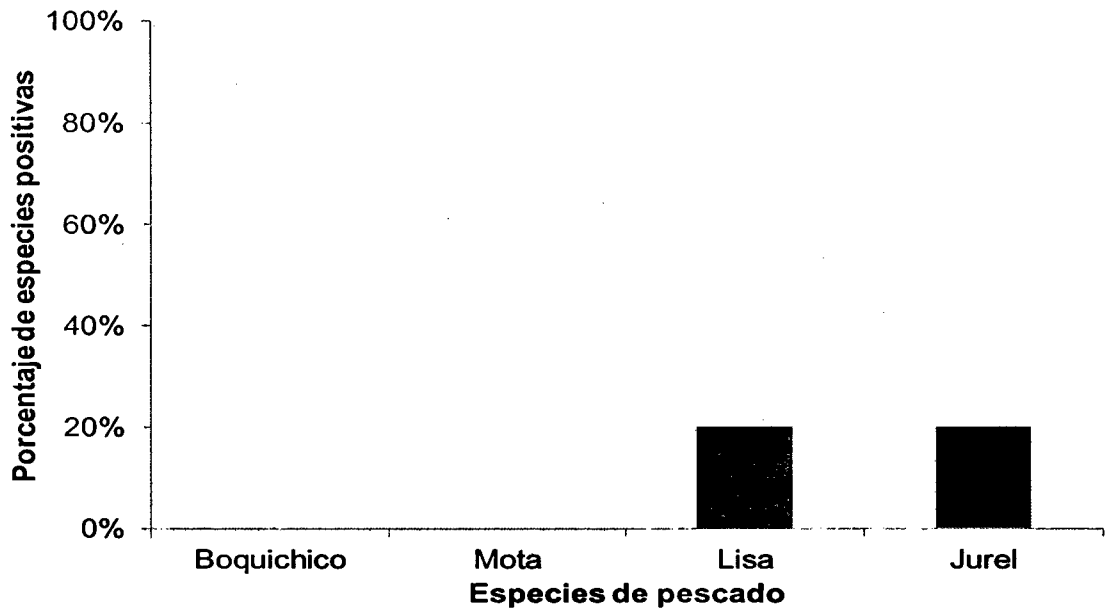


Figura 5. Porcentaje de especies de pescado positivas a la prueba de Ebert.

4.3. Análisis bacteriológicos de 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María.

4.3.1. Microorganismos indicadores de alteración

#### Número de microorganismos aerobios viables

Cuadro 4. Mesófilos aerobios de acuerdo a la especie y tipo de tejido del pescado. Según anexo 11 y 19.

Procedencia	Especie	Piel	Músculo
		NMA (UFC/g)	NMA (UFC/g)
Pucallpa	Boquichico	$2,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
	Mota	$4,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$
Lima	Lisa	$5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
	Jurel	$1,1 \times 10^6$	$9 \times 10^5$

Fuente: Elaboración propia.

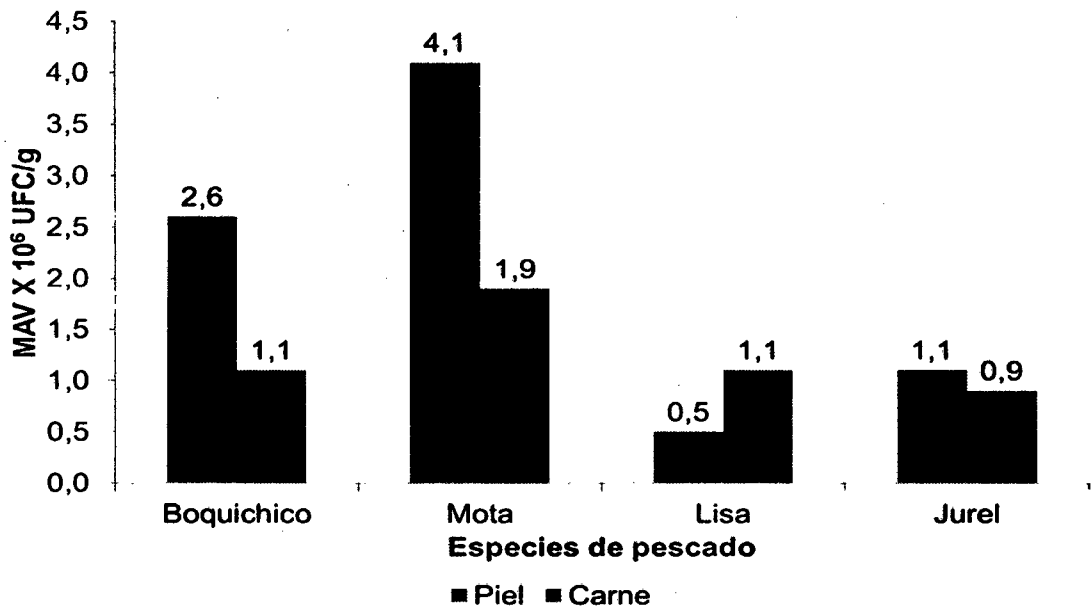


Figura 6. Mesófilos aerobios de acuerdo a la especie y tipo de tejido del pescado.

#### 4.3.2. Microorganismos indicadores de higiene

##### Número de *Escherichia coli* termotolerante

El Cuadro 5 y Figura 7 presenta los valores de *Escherichia coli*.

Cuadro 5. Número de *Escherichia coli* termotolerante de acuerdo a la especie y tipo de tejido de pescado. Según anexo 11 y 20.

Procedencia	Especie	Piel	Músculo
		NMP/g	NMP/g
Pucallpa	Boquichico	58	28
	Mota	24	< 3
Lima	Lisa	84	30
	Jurel	66	26

Fuente: Elaboración propia.

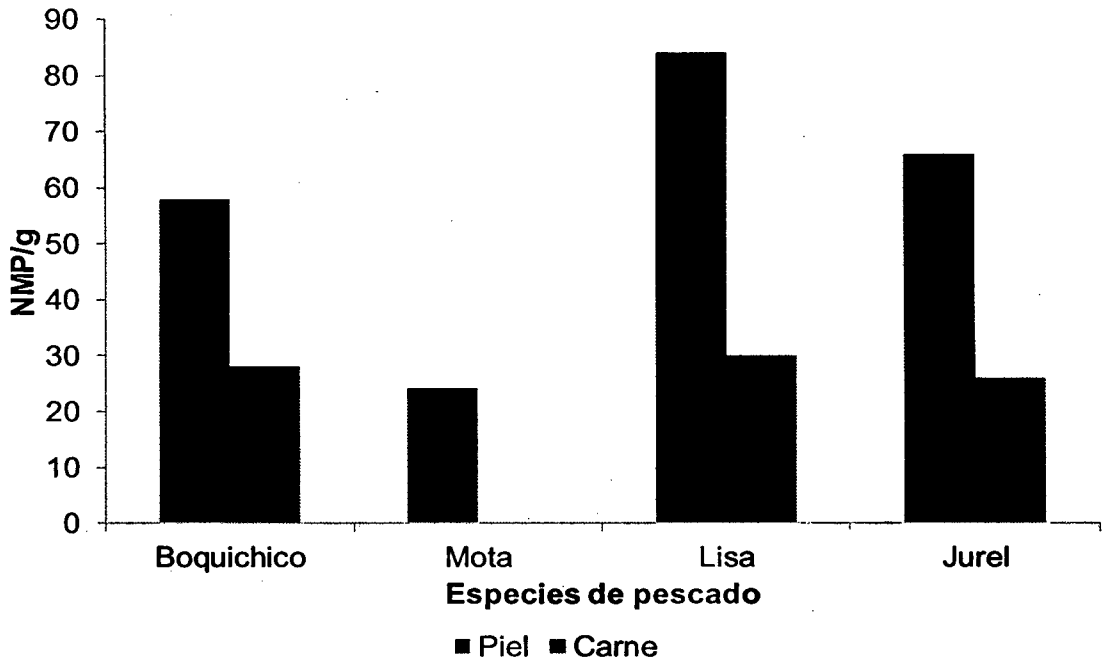


Figura 7. Número de *Escherichia coli* termotolerante de acuerdo a la especie y tipo de tejido de pescado.

#### 4.3.3. Aislamiento y caracterización de bacterias patógenas

##### Número de *Staphylococcus aureus*

No se encontró *Staphylococcus aureus* en ninguno de los muestreos realizados.

##### Aislamiento y caracterización de *Salmonella* spp.

La contaminación por *Salmonella* spp., en los pescados analizados se aprecia en el Cuadro 6 y Figura 8.



Cuadro 6. Porcentaje de piel y músculo con *Salmonella spp.* por 25 g en los pescados.

Procedencia	Especie	<i>Salmonella spp</i> /25g	
		Piel	Músculo
Pucallpa	Boquichico	20%	20%
	Mota	40%	40%
Lima	Lisa	40%	40%
	Jurel	20%	0%

Fuente: Elaboración propia.

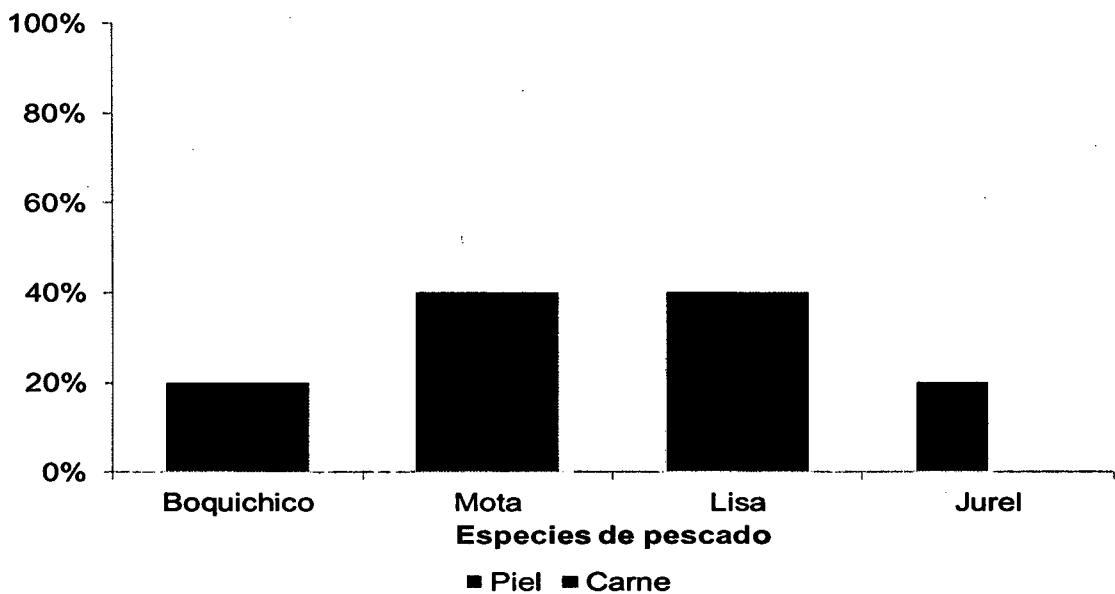


Figura 8. Porcentaje de piel y músculo con *Salmonella spp.* por 25 g en los pescados.

### Aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae*

No se identificó *Vibrio cholerae* en ninguno de los muestreos realizados.

### Aislamiento y caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*

En el Cuadro 7 y Figura 9 se muestra la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en algunas muestras de pescado provenientes de Lima al realizar las pruebas bioquímicas y tolerancia a sales. Ver Anexo 27.

Cuadro 7. Porcentaje de piel y músculo con *Vibrio parahaemolyticus* por 25 g.

Procedencia	Especie	<i>V. parahaemolyticus</i> /25g	
		Piel	Músculo
Pucallpa	Boquichico	0%	0%
	Mota	0%	0%
Lima	Lisa	0%	40%
	Jurel	40%	40%

Fuente: Elaboración propia.

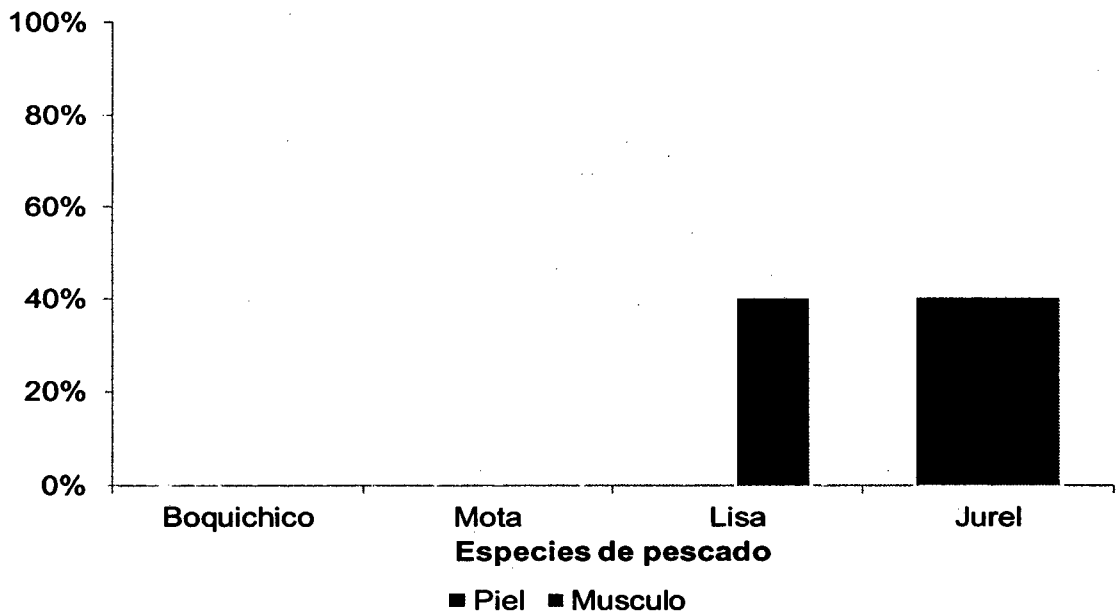


Figura 9. Porcentaje de piel y músculo con *Vibrio parahaemolyticus* por 25 g.

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Análisis sensoriales de 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María.

La prueba de Friedman mostró que existe suficiente evidencia estadística para determinar que en las pruebas sensoriales evaluadas hay diferencia entre las especies ( $P < 0,05$ ), a excepción de: Apariencia branquias, condición peritoneo<sup>1</sup> y olor de branquias, piel, cavidad abdominal, para quienes la prueba salió no significativa ( $P > 0,05$ ). Ver Anexo 25. Esta diferencia se debe a varios factores como la especie, método de pesca, manipulación, temperatura y transporte (HUSS, 1999; PASCUAL ANDERSON, 2000).

Según el Cuadro 1 y Figura 1, 2, 3, la clasificación global del análisis sensorial de los pescados estudiados es de B = Regular. Estos resultados obtenidos coincide con MORILLO *et al.* (2004), quienes catalogaron a las especies de pescado estudiadas a nivel de expendio, como pescados en procesos de deterioro. Estos resultados se deben a que las muestras analizadas mostraron una piel con pigmentación en vías de descolorarse y empañarse, mucus lechoso, ojos planos con pupila opaca, branquias descolorándose y mucus opaco, carne ligeramente blanda al tacto y un olor ligeramente ácido en branquias, piel y cavidad abdominal.

En este trabajo la clasificación sensorial para las especies procedentes de Lima, fue de regular y no apto para consumo humano, la misma que se plasma en el Cuadro 1 y Figura 1, 2, 3; estos resultados son similares a los reportados por AYALA *et al.* (2001), los cuales al trabajar con la Anchoveta Peruana (*Engraulis ringens*), obtuvieron resultados entre regular y por debajo de los límites de aceptación sensorial, a pesar de la cercanía de los puertos pesqueros. En este sentido, las calificaciones presentadas por el panel, se debe a que las especies se encontraban más susceptibles a la descomposición debido a su transporte, almacenaje y procedencia. Recalcándose, que no se realiza un manejo adecuado en la etapa de expendio en el mercado.

Los pescados estudiados procedentes de Pucallpa, obtuvieron una clasificación sensorial de Regular, la cual se muestran en el Cuadro 1 y Figura 1, 2, 3. Estos resultados son similares a los reportados por DELGADO *et al.* (2000); GONZÁLES *et al.* (2002) y TOMÉ *et al.* (2000), quienes al trabajar con diferentes especies de pescado, reportaron que todas las muestras analizadas mostraron una calidad buena y regular, para todas las partes de los ejemplares inspeccionados.

La escala descriptiva presentada por estos autores fueron diversos y difieren con nuestro trabajo, sin embargo las puntuaciones de sus resultados son similares a los que se obtuvo en nuestro estudio. Consecuentemente la atribución otorgada por el panel se debe a factores como la especie, evisceración, y procedencia, los cuales mejoran la clasificación para estas especies de pescado.

La clasificación de A, según el Cuadro 1 (en algunas partes inspeccionadas) para boquichico y mota se debe a que estos se encontraban eviscerados, lo cual coincide con los resultados de calidad de AGÜERIA *et al.* (2004), quienes al valorar la calidad de carne de Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), indicaron que la mejor calidad se obtuvo en pescados eviscerados. En resumen, esto es debido a que las vísceras se descomponen muy rápido, y al extraerlos se retrasa el tiempo de deterioro.

5.2. Análisis físico – químico 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María.

#### 5.2.1 Prueba de pH

El análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa ( $P > 0,05$ ), entre las especies estudiadas. En el Cuadro 2, Figura 4, se observa que los pescados boquichicos presentaron un pH de (6,83), motas (6,78), lisas (6,93), y jureles (7,02). Esta diferencia de pH se atribuye al efecto de la composición química de las especies. Por otra parte, nuestros resultados concuerdan con TOME *et al.* (2000), quien menciona que el pH puede ser atribuido al efecto de la temperatura ambiental. Además, podría guardar relación con el aumento de histaminas, bases volátiles, acumulación de compuestos nitrogenados no proteicos que son alcalinos y elevan el pH, además de la pérdida de frescura.

Los valores de pH para lisa (6,93) y jurel (7,02), son similares a los reportados por AGÜERIA *et al.* (2004), quienes encontraron valores de pH

desde 6,94 a 7,07 en carne de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Por ende los valores con pH de 7 a más son atribuidos a los pescados alterados. Este resultado se debe a la formación de compuestos volátiles como el amoníaco y ciertas aminas producidas por vía autolítica y, por la acción bacteriana sobre aminoácidos libres (pH vs NBV-T).

Por el contrario, los valores de pH encontrados en las muestras de boquichico (6,83) y motas (6,78) de nuestro estudio, son cercanos a los reportados por IZQUIERDO *et al.* (2001); en armadillo (*Hipostomus watwata*), bocachico (*Pochilodus reticulatus*) y lisa (*Mugil curema*), y por TOME *et al.* (2000); en tilapia (*Oreochromis spp.*), donde se reportaron en todos los casos valores de pH en un rango de 6,53 a 6,6.

En este sentido, los valores cercanos a la neutralidad es debido a la baja producción de ácido láctico, consecuencia de la escasa presencia de glucógeno en el músculo del pescado, menor al 0,5% (PAN y JAMES, 1985). El descenso de pH del pescado recién sacrificado, es a consecuencia de la formación de ácido láctico como resultado de la glucólisis *post-mortem*. Luego, el pH se incrementa según disminuye su vida útil. Los valores de pH por debajo de 7 significan que la carne tiene más glucógeno, esto refleja menor tiempo de captura, tipo de pesca y su menor sufrimiento a la captura, transporte no prolongado, por ende una mejor calidad. Por lo tanto, esto en nuestro trabajo represento que el pescado de agua dulce no se encontraba deteriorado.

### 5.2.2 Prueba de Ebert

El análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) entre las especies estudiadas. Según el Cuadro 3 y Figura 5, los pescados procedentes de Lima, lisa (20%) y jurel (20%), fueron positivos a esta reacción. Por el contrario los pescados procedentes de Pucallpa fueron negativos a la reacción.

Estos resultados obtenidos concuerdan con HUSS (1999), quien menciona que durante el transporte, los pescados sufren el fenómeno de movimiento vibratorio, acelerando la reacción química de la carne del pescado, además sufren laceraciones por aplastamiento y traumas. De igual manera las especies lisa y jurel provienen de la costa, las vías de comunicación terrestre de Lima a Tingo María (Huánuco - Tingo María) se encuentran en mal estado, los productos hidrobiológicos trasladados sufren el mismo fenómeno de masaje vibratorio. Por lo tanto, es necesario que al llegar a su destino se conserven o almacenen con una adecuada refrigeración o congelación. Sin embargo, esta labor no se aprecia en el mercado de abastos de la ciudad.

El tipo de reacción de la prueba de Ebert coincide con LEBLANC (1987), quien obtuvo reacciones positivas al observar desprendimiento de humo blanco debido a la presencia de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) por degradación de catabolitos de nucleótidos en los pescados en estudio. Por lo tanto la reacción positiva a la prueba de Ebert indica la alteración de la carne.

5.3 Análisis Bacteriológico 4 especies de pescados de mayor consumo, expendidos en el mercado de Tingo María.

5.3.1 Microorganismos indicadores de alteración

### **Número de microorganismos aerobios viables**

El análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) en el contenido de mesófilos aerobios (MA) para las variables estudiadas. En el Cuadro 4 y Figura 6 se muestra que a nivel de tejido los pescados de Pucallpa presentaron mayor recuento de mesófilos aerobios (RAM) en la piel  $3,35 \times 10^6$  UFC/g, este resultado concuerda con HUSS (1999), quien menciona que el mayor contenido de bacterias inicialmente se encuentra en la piel, incrementándose de manera exponencial si no se almacena y manipula de forma adecuada. Asimismo, los pescados de Pucallpa presentaron recuentos más altos, que están fuera de los límites permisibles según lo establecido por la Norma N°071. Ver Anexo 11.

Para boquichico y mota el RAM fueron mayor de  $5 \times 10^5 - 10^6$  UFC/g, estos valores fueron inaceptables al compararlos con DHAZ (2008) de  $1 \times 10^6$  UFC/g y APHA (1992) de 5 Log<sub>10</sub> UFC/g. Sin embargo, al compararlo con ICMF (1980) de 6 - 7 log UFC/g, las especies de Pucallpa se encontraron o no excedieron estos valores. Estos resultados concuerdan con HUSS (1999), el cual menciona que estos peces de río son tipos de pescado graso, los cuales se expenden eviscerados, lo que podría ocasionar un aumento de microorganismos al no tener higiene durante su manipulación.



El mayor RAM en los pescados procedentes de Pucallpa son similares a lo reportado por TORRES *et al.* (2000), quienes encontraron valores superiores a 6,37 log UFC/g para corvina. Igualmente IZQUIERDO *et al.* (2001), en armadillo (*Hipostomus watwata*) y boquichico obtuvieron resultados de 6,62 Log UFC/g y 5,69 Log UFC/g respectivamente. Ambos trabajos fueron efectuados sobre ejemplares provenientes del Lago de Maracaibo – Venezuela, donde la zona de vida es similar a Yarinacocha (laguna de Pucallpa). Por lo tanto, los resultados de ambos estudios concuerdan con los de nuestro trabajo, por ser pescados dulceacuícolas, y su relación con el alto contenido bacteriano debido a su habitat.

Por el contrario las muestras de Lima a nivel de tejido presentaron mayor RAM  $0,97 \times 10^6$  UFC/g en la carne. Estos resultados obtenidos concuerdan con HUSS (1999), quien menciona que las bacterias contenidas en el tracto gastrointestinal del pescado pasan las paredes intestinales llegando a la carne como punto inicial, al no eviscerarlo. Al comparar los valores obtenidos de mesófilos aerobios con los límites microbiológicos establecidos por la ICMF (1980) para pescado fresco y congelado, son de 6 - 7 log UFC/g, las especies estudiadas procedentes de Lima no excedieron o se encuentran dentro de estos valores.

Por el contrario, al comparar con los valores máximos establecidos por la Dirección de Higiene Alimentaria y Zoonosis, que establece  $1 \times 10^6$  UFC/g (DHAZ, 2008) y por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) de 5 Log<sub>10</sub> UFC/g (APHA, 1992) para pescado fresco, se observa que

de los pescados estudiados, todas las muestras de lisa y el jurel se ubican en límites microbiológicos cercanos al máximo permisible (de  $5 \times 10^5 - 10^6$ ), lo que podría interpretarse como un valor no aceptable. Estos resultados son similares a los obtenidos por AGÜERIA *et al.* (2004), quienes al valorar la calidad de la carne de *Odontesthes bonariensis*, encontraron recuentos con valores entre  $10^3$  y  $10^6$  UFC/g.

Pese a los resultados obtenidos con recuentos más bajos para lisa y jurel, rango que si se extrapola con los resultados del análisis sensorial y físico químico no es posible aceptar por cuanto sus parámetros de calidad se encontraban entre regular y no apto, indicando que no debe ser consumido. (Ver Cuadro 1, 2 y 3). Esta diferencia de resultados demuestra la utilidad de realizar dos o más análisis de frescura a fin de llegar al dictamen correcto.

Además los resultados con RAM fuera de los límites permisibles para los pescados de Lima está relacionado al deficiente enfriamiento o refrigeración del producto, ya que los comerciantes no cuentan con congeladoras, al guardar su producto solo cubren con hielo algunas partes del cuerpo. Asimismo los pescados permanecen en exhibición por periodos largos de temperatura ambiente, y no son cubiertos con hielo para mantener las temperaturas de refrigeración del pescado expuesto. En ese sentido al no realizar estas operaciones, los niveles microbiológicos se incrementan, ya que los pescados que provienen de Lima y Pucallpa solo son enfriados con hielo y no congelados antes y durante el transporte.

No obstante durante la determinación de los mesófilos aerobios, se observaron valores muy variados con respecto a la especie, lo cual coincide con MORALES *et al.* (2004) y HUSS (1999), quienes mencionan que esta variación puede deberse a factores tales como: la frescura del pescado, la temperatura, la manipulación y el tiempo de almacenamiento. Entonces, respecto a las variables anteriormente mencionadas, para el caso de los muestreos realizados a nivel de expendio en el mercado modelo, su pescado no es fresco, las condiciones de temperatura no son adecuadas para su conservación y el pescado permanece mucho tiempo en exposición.

El número de mesófilos aerobios fue mayor a nivel de piel, con RAM de  $(2,07 \times 10^6)$  UFC/g). Este resultado obtenido coincide con la INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD (1982), los cuales mencionan que el contenido microbiano en la piel generalmente se encuentra en un rango de  $10^2 - 10^7/\text{cm}^2$ , ó  $10^3 - 10^4$  UFC/g de microorganismos, debido al medio acuático donde se encuentran. Del mismo modo concuerda con HUSS (1999), quien menciona que las bacterias del pescado una vez capturado, entran en crecimiento exponencial y bajo ciertas condiciones de humedad, temperatura y manipulación inadecuada, alcanzan valores de  $10^8 - 10^9/\text{cm}^2$  de microorganismos en la piel.

### 5.3.2 Microorganismos indicadores de higiene

#### **Número de *Escherichia coli* termotolerante**

En el Cuadro 5 y Figura 7 se muestra como la variable *Escherichia coli* no presentó diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) para el efecto

especie y para cada tipo de tejido (piel y músculo). Según el Cuadro 5 y Figura 7 se observa que los pescados procedentes de Lima presentaron mayor índice de contaminación por *E. coli* que las obtenidas de Pucallpa. Del mismo modo, se encontró que la piel, en las cuatro especies analizadas, estuvo más contaminada por parte de estos microorganismos, contrariamente al ser comparado con el músculo.

Consecuentemente estos resultados obtenidos se deben a que los comerciantes colocan los pescados en el suelo, enjuagan a los pescados en un mismo envase sin sustituir el agua, además realizan la evisceración de los pescados que provienen de Lima contaminando toda el área de contacto con el producto, y los materiales usados.

Al comparar los valores obtenidos de *Escherichia coli*, con los límites microbiológicos establecidos por la Dirección de Higiene Alimentaria y Zoonosis de  $10^2$  NMP/g (DHAZ, 2008), por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (0,60 – 2,60 Log<sub>10</sub> NMP/g (ICMSF, 1982) y la Norma Oficial Mexicana de 2,60 Log<sub>10</sub> NMP/g (NOM, 1993) para pescado fresco, se pueden catalogar a todas las muestras de este trabajo, fuera del rango permisible (Ver Anexo 11). Por lo tanto, los pescados no son aptos para el consumo humano.

Por otra parte el mayor número de *E. coli* en las especies procedentes de Lima se relaciona al estallido ventral de algunas muestras, resultados que concuerdan con HUSS (1999), quien menciona que la falta de

evisceración y la temperatura inadecuada, ocasionan un estallido ventral, debido a las enzimas digestivas, proliferando así los *E. coli* que puedan estar presentes en su tracto intestinal. Además, los comerciantes para el descongelamiento no realizan una refrigeración previa, ocasionando que estos microorganismos se multipliquen por falta de bajas temperaturas. En consecuencia los valores se encontraron fuera de los rangos establecidos por la DHAZ (2008).

En este sentido, el incremento de *E. coli* en las muestras procedentes de Lima, coinciden con el INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ (sd), quienes mencionan que el hábitat de estas especies de pescados, es cercano a las aguas contaminadas de los puertos. Entonces, el estallido ventral (Proteólisis autolítica) aunado a la evisceración sin medidas de higiene necesarias contamina el producto hidrobiológico. Estas prácticas críticas se observan en el mercado de Tingo María. Sin embargo mis resultados no concuerdan con CARBAJAL *et al.* (2003), quienes reportan valores promedio de *E. coli* para jurel de 6,8 NMP/g, lo cual estuvo dentro de los límites establecidos.

La presencia de *E. coli* en los pescados analizados, concuerda con JOKLIK *et al.* (1994), quienes mencionan que el *E. coli* es el resultado de una contaminación a partir del reservorio humano/animal. En tal sentido, su hábitat natural es el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, su presencia se relaciona con la contaminación fecal de las aguas naturales o de los medios acuáticos donde este microorganismo puede sobrevivir durante mucho tiempo.

Por otra parte, la presencia de *E. coli* en las muestras de pescado analizados concuerda con MANDELL *et al.* (2002); FRADE y FERNÁNDEZ (2004), quienes indican que la presencia de *E. coli* en un alimento no constituye una connotación directa de la presencia de un patógeno, sino que implica únicamente cierto riesgo de que una bacteria patógena pudiera estar presente.

El índice de NMP/g de *E. coli* encontrados en los pescados de nuestro trabajo, concuerda con MORALES *et al.* (2004), quienes mencionan que el lograr identificarlo en productos de consumo humano, hace evidente la falta de control higiénico en la etapa de comercialización, por ende representa un problema de salud público. Además, el *E. coli* fue recomendado por la AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1992), como indicador de contaminación directa e indirecta por heces humanas o de animales en productos alimenticios proteicos frescos.

Por los resultados podemos considerar el riesgo que corre el consumidor final al adquirir un producto con deficiencias en su manipulación y conservación, más aun si el producto no se cocina a una temperatura adecuada, como su consumo crudo en forma de ceviche, ya que la *E. coli* O157:H7 puede crecer a un pH de 3,0 según lo reportado por ROJAS y CASTILLO (2003).

### 5.3.3 Aislamiento y caracterización de bacterias patógenas

#### **Número de *Staphylococcus aureus***

En el caso de *S. aureus*, de acuerdo a la norma de DHAZ (2008), su límite máximo permitido en pescado crudo es de  $10^3$  UFC/g, lo cual no representó un problema en cuanto a la calidad del pescado crudo analizado en este estudio, ya que no se encontró este microorganismo en las 20 pieles y 20 músculos analizados. (Ver Anexo 21).

Los valores encontrados en nuestro trabajo son muy parecidos a los reportados por BORBOLLA *et al.* (2004), quienes mencionan que el pescado no es el hábitat natural del patógeno, se ven afectados por el enfriamiento (0 – 4 °C), este patógeno puede multiplicarse a 6 °C. Además, cabe mencionar que a temperatura ambiente el producto hidrobiológico (Pescado), no es un medio de cultivo excelente para este germen; sin embargo sí lo son otros alimentos como la crema de pastel.

En este sentido, CARRERA *et al.* (1998), demostró que los alimentos más propensos a presentar concentraciones de *S. aureus* por encima de los  $10^3$  UFC/g y por lo tanto aquellos capaces de causar directamente la infección intestinal debido a la toxina que se produce, son los productos de repostería a base de crema y los quesos; es decir los productos lácteos.

### **Aislamiento y caracterización de *Salmonella spp.***

El análisis de varianza demostró que no existe diferencia significativa para esta variable ( $P > 0,05$ ), al comparar las especies y cada tipo de tejido (piel y músculo). En el Cuadro 6 y Figura 8, se presume que el 30% de las pieles y 25% de los músculos de los pescados estudiados, estaban contaminados con *Salmonella spp.*

Las muestras positivas al aislamiento de *Salmonella spp.*, se catalogan como no aptas para el consumo humano. Este porcentaje se debe al carácter altamente ubicuo de este patógeno, y demuestra la falta de higiene durante la manipulación del producto. Estos resultados obtenidos coinciden con HERREA y SANTOS (2005), que encontraron una presencia de 12% (seis muestras de las cincuenta analizadas), considerando además que el parámetro más importante a considerar es el lugar de procedencia y manipulación del pescado. Por lo tanto, la presencia de este patógeno dependerá de la especie, su hábitat y de su posterior manipulación para evitar su crecimiento y multiplicación.

Los resultados obtenidos en este estudio para *Salmonella spp* (Cuadro 6, Figura 8), con 40% de presunta presencia en las especies Mota y Lisa, concuerda a los reportados por MORILLO *et al.* (2004), donde el análisis a nivel de expendio dio como resultado el 41,95% de las lisas y el 45,37% de las corvinas como positivas al aislamiento de *Salmonella spp.*, catalogándose estas muestras como no aptas para el consumo humano.



Del mismo modo, en el mercado mayorista pesquero de ventanilla de Ventanilla – Perú, CARBAJAL *et al.* (2003), identificaron *Salmonella spp.* en *Trachurus picturatus* Murphyi (jurel), este estudio evidencio la inseguridad que representa el consumo de alimentos crudos frescos de origen marino expendidos en ese mercado. Adicionalmente los porcentajes encontrados en nuestro trabajo pueden atribuirse al habitat ecológico de las especies y el manejo inadecuado para el expendio (almacenamiento, evisceración, lavado, etc.), en consecuencia los patógenos se distribuyen en los pescados no contaminados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerda con CARRERA *et al.* (1998), que encontraron mayor contaminación por *Salmonella spp.* (10%) en pescado que en otros alimentos, debido a las malas condiciones higiénicas durante su manipulación, y la falta de acciones oportunas en su control sanitario, lo cual representa un alto riesgo para la salud de los consumidores. Igualmente, sucede en nuestro medio, debido a que las condiciones para el expendio no son adecuadas, además la falta de un control sanitario imposibilitan la ausencia de este microorganismo.

Por otro lado, según la Dirección de Higiene Alimentaria y Zoonosis, ausencia de *Salmonella* /25 g (DHAZ, 2008); ICMSF (1982) y NOM (1993) para pescado fresco, el género *Salmonella* no debe estar presente en los alimentos debido a que estos patógenos producen salmonelosis, sin embargo necesitan una dosis infectiva alta ( $10^6 - 10^8$ ) de este microorganismo

para producir una ETA. Por el contrario, es posible que *S. typhi* y *S. paratyphi* esté presente en el pescado manipulado y produzca una ETA, ya que estos patógenos necesitan una dosis infectiva mínima (DIM: 1 – 10) para producir la enfermedad, por lo tanto no se acepta *Salmonella spp.* en los alimentos (pescados).

Aunque los alimentos marinos no son los principales reservorios de este patógeno, en los últimos años se ha reportado su presencia. Las muestras de pescados contaminados con *Salmonella spp.*, concuerda con SINGH y KULSHRESTHA (1993), quienes obtuvieron 7 muestras contaminadas con *Salmonella spp.*, de 13 muestras de pescado examinadas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, concuerda con SHARMA *et al.* (2006), quienes revelaron una presencia de 3,2%, de 23 pescados analizados en total. Así pues, los pescados marinos analizados en nuestro trabajo que presentaron *Salmonella spp.* (Lisa y jurel), fueron capturados cerca a la costa peruana, donde el agua presenta mayor contaminación por la desembocadura de desagües. El jurel no se concentra en aguas contaminadas de los puertos como la lisa, sin embargo en estaciones de verano y/o años cálidos se acerca a la costa (IMARPE, s.d.).

De otro lado, la presencia de *Salmonella spp.*, encontrado en el presente trabajo, se relaciona a lo mencionado por CARRILLO y AUDISIO (2007), quienes mencionan que su presencia en el pescado es debido a la

existencia de material fecal en las aguas naturales o de los medios acuáticos donde habita o procede el pescado, por el aire interno concentrado en las zonas de expendio de los mercados, ratas, roedores, perros, gatos e insectos como las moscas, donde estos microorganismos pueden sobrevivir durante mucho tiempo.

Del mismo modo, mis resultados concuerdan con LATEEF *et al.* (2006), quienes mencionan que la presencia de *Salmonella spp.* en los pescados expendidos, puede deberse a la cantidad y calidad de hielo usado para la refrigeración de los productos pesqueros. Un factor importante que debería evaluarse ya que el hielo empleado por los comerciantes es preparado de forma empírica, el agua no es tratada, presenta impurezas, etc. Además, la cantidad y distribución es inadecuado, la temperatura no baja a 4 °C y *Salmonella spp* crece a 5°C – 5,3°C. Por ende, supone la mala calidad higiénica del mismo.

Adicionalmente, mis resultados concuerda con ALMEIDA *et al.* (1996), quienes mencionan que al estar presente *Salmonella spp.* en el pescado, puede haber algún riesgo asociado a su consumo crudo, presentándose enfermedades gastrointestinales, de moderada a grave condición. Por los resultados podemos considerar que el riesgo que corre el consumidor final al adquirir un pescado con deficiencias en su manipulación y condiciones de conservación es bastante elevado, debido en lo esencial a la costumbre de la población de Tingo María de consumir el cebiche, y por tratarse de un producto que no recibe ningún tipo de tratamiento térmico.

Por otro lado, la presencia de *Salmonella spp.* en los pescados analizados, no significa que al ingerirlo se transmita una ETA, debido a que no todas las *Salmonellas* son patógenas, este punto concuerda con HERRERA y SANTOS (2005) y VILCAPOMA *et al.* (1992), quienes mencionan que en el caso de la población latinoamericana, entre ella la peruana, para algunas enfermedades infecciosas se requiere una dosis infectiva de un microorganismo más alta ( $10^6 - 10^8$ ), comparada con poblaciones que nunca han estado expuestas a estos microorganismos.

En ese sentido, el contacto constante desde la infancia con estos microorganismos patógenos, principalmente al comer alimentos que se vende en la vía pública, mantienen una respuesta inmune suficiente para protegernos. Por lo tanto, requerimos de una dosis mucho más alta para que presentemos la enfermedad. Por el contrario, los turistas o poblaciones que no han estado en contacto con estos microorganismos, no cuentan con ningún mecanismo de respuesta inmune de memoria que les permita controlar el efecto dañino de estas cepas.

### **Aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae***

En el Anexo 23, se presume la ausencia de *V. cholerae* en todos los pescados analizados. Al realizar la tolerancia a sales no se encontró *V. cholerae*, debido a que las muestras que no presentaron *V. parahaemolyticus* solo alcanzaron a crecer en 2,5% de NaCl y *V. cholerae* crece a 0% de NaCl. Además, las pruebas bioquímicas confirmaron el mismo hecho. No se realizó el

test de anillo y pruebas serológicas para su identificación. Por lo tanto, estos resultados indican que todas las muestras analizadas de pescado crudo cumplen con la norma de la Dirección de Higiene Alimentaria y Zoonosis ausencia de *V. cholerae*/25g (DHAZ, 2008). Las características bioquímicas y tolerancia a NaCl para este patógeno se muestran en el Anexo 27.

Por otro lado, los resultados coinciden con KAPER *et al.* (1995), quienes mencionan la importancia de tener en cuenta que factores climáticos tales como humedad y temperatura, influyen en la estacionalidad de algunas enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) y de algunos microorganismos presentes en el medio marino como *Vibrio cholerae*.

Además, las muestras de pescado no contaminadas en nuestro trabajo, coinciden con CARVAJAL *et al.* (1998) y CARBAJAL *et al.* (2003), que no detectaron *Vibrio cholerae* en las muestras marinas analizadas, lo cual indica la probable ausencia del patógeno en el medio marino luego de la epidemia de cólera del año 1991. Sin embargo, no concuerda con trabajos anteriores realizados por el Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, quienes encontraron *Vibrio cholerae* en pescado.

### **Aislamiento y caracterización de *Vibrio parahaemolyticus***

En el Cuadro 7 y Figura 9 se muestra como la variable *Vibrio parahaemolyticus* no presentó diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) para el efecto especie y para cada tipo de tejido (piel y músculo). Del mismo modo, se

observa que solo los pescados procedentes de Lima presentaron *Vibrio parahaemolyticus*. En esta línea, se presume que el 40% de las lisas a nivel de carne estuvieron contaminados con *V. parahaemolyticus*. Por el contrario, se presume que el 40% de los jureles presentaron *Vibrio parahaemolyticus* tanto en piel como en músculo.

Estos resultados coinciden con ALIAGA (2005), LEYTON y RIQUELME (2008), quienes mencionan que *V. parahaemolyticus* es una bacteria halofílica, autóctona del ambiente marino, considerada como la principal causa de gastroenteritis bacteriana asociada al consumo de alimentos marinos crudos. Por tanto, el expendio de pescado de Lima debe realizarse en condiciones adecuadas de manipulación en el mercado de Tingo María. Las características bioquímicas y tolerancia a NaCl de *V. parahaemolyticus* se muestran en el anexo 27. No se realizó otras pruebas para su identificación.

La presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en este estudio coincide a los resultados obtenidos por VILCAPOMA (1992), quienes identificaron 5 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* en jurel congelado (8,8%). Por lo tanto la determinación de *Vibrio parahaemolyticus* en pescado enfriado y congelado indica la gran resistencia de esta bacteria a las bajas temperaturas, por su característica de ser psicrófila y altamente resistente a las condiciones de stress (LEYTON y RIQUELME, 2008; BEUCHAT, 1973).

Estos resultados obtenidos concuerdan con LEYTON y RIQUELME (2008); QUINTOIL *et al.* (2007) y KAGIKO (2001), quienes reportaron presencias desde 0,3% hasta 37,2%. Del mismo modo, nuestros resultados coinciden con ALIAGA *et al.* (2010), quienes reportaron la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en pejerrey (15%), lisa (5%) y jurel (2.5%). De igual manera, demostraron que *Vibrio parahaemolyticus* se encuentra distribuido en los recursos hidrobiológicos estudiados.

Si ocurre en los lugares de expendio como en el mercado de Tingo María se puede asumir a que la temperatura de refrigeración no es la adecuada, se recomienda temperaturas de 0 °C; sin embargo solo se emplea hielo mal distribuido que desciende a una temperatura mínima promedio de 4 – 6 °C. Por lo tanto, la presencia en nuestro estudio se debe a que las condiciones climáticas en la zona de consumo son muy diferentes, favoreciéndoles después de la congelación, una temperatura ambiental alta para su desarrollo, aunado a la temperatura inadecuada de conservación.

De igual manera, los resultados obtenidos para nuestro trabajo, se debe a que *Vibrio parahaemolyticus* se encuentra distribuido en ambientes marinos, costeros, estuarinos y en recursos hidrobiológicos (ALIAGA 2005). Por lo tanto, estos resultados evidencian su heterogénea distribución, siendo la cantidad que se puede aislar dependiente de la región, y probablemente relacionada con algún cambio en la naturaleza de la bacteria por factores abióticos y bióticos de repercusión global.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con HUSS (1999), quien menciona que la presencia de este microorganismo se debe a la falta de condiciones adecuadas de refrigeración o congelación para el transporte, almacenamiento y expendio de los pescados, que evitan el crecimiento de esta bacteria. Por lo tanto, se observa que el traslado de pescado de Lima a Tingo María, se realiza con camiones no acondicionados (carro frigorífico), en el cual se emplea hielo mal distribuido para el enfriamiento, el mismo que enfría solo el ambiente mas no el pescado como se recomienda. Además, existe la posibilidad de la proliferación de este patógeno y que cause infecciones a los consumidores.

Del mismo modo, los pescados de Lima contaminados con *V. parahaemolyticus*, concuerdan con IBARRA *et al.* (1999) y COLWELL (1996), quienes mencionan que el fenómeno de “El Niño”; aunado a los cambios climáticos, son condiciones que alteran los parámetros hidrobiológicos normales del ecosistema marino produciendo la multiplicación excesiva de fitoplancton y zooplancton, cuya importancia en la diseminación y persistencia de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* ya ha sido demostrada. Por lo tanto, estos factores aunados a las temperaturas altas en el expendio y conservación por el uso de hielo mal distribuido que no logra una temperatura de 4 ° C, tienen influencia en los resultados que se obtuvo en el presente trabajo.

Por otro lado, las muestras de pescado contaminadas con *Vibrio parahaemolyticus* no cumplen con la norma de la Dirección de Higiene Alimentaria y Zoonosis, Ausencia de *V. parahaemolyticus*/25g (DHAZ, 2008),



catalogando a estas muestras como no aptas para el consumo humano. De igual manera, en la actualidad la Norma nacional (DHAZ, 2008), considera la ausencia de *Vibrio parahaemolyticus* en los pescados, debido a que en estos últimos años se la ha considerado como una bacteria patógena emergente, sin la necesidad de aislar e identificar *Vibrio parahaemolyticus* serotipo O3: K6 altamente patógena que causó una pandemia global (GIL *et al.*, 2007).

## VI. CONCLUSIONES

1. Los pescados expendidos en el mercado modelo de Tingo María, en su mayoría son de baja calidad higiénica, no aptos para el consumo sin previos procesos térmicos adecuados y/o uso de sustancias químicas.
2. El recuento de microorganismos mesófilos aerobios y *Escherichia coli* para las especies de pescado no fueron aceptables, por el contrario, no se encontró *Staphylococcus aureus*, ni *Vibrio cholerae* en todas las muestras de pescados analizados. Se presume la presencia de *Salmonella spp* en todas las especies estudiadas y la presencia de *V. parahaemolyticus* en lisa y jurel. En consecuencia, la detección positiva de los microorganismos señalados en los pescados demuestra que no son aptos para el consumo humano.
3. Las especies lisa y jurel, en base a los análisis sensoriales se clasificaron de regular a malo. Sin embargo, las especies boquichico y mota se clasificaron como regular.
4. En los pescados el pH muscular es cercano a 7, lo cual favorece el crecimiento bacterias. Así mismo, la prueba de Ebert mostró que el jurel (20%) y lisa (20%), estaban en un estado avanzado de deterioro.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de calidad higiénica del pescado en diferentes épocas del año, en el mercado modelo de Tingo María.
2. Utilizar hielo de calidad para la presentación y expendio del pescado.
3. Almacenar los pescados a una temperatura de congelación controlada, que garantice su calidad higiénica; se recomienda  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
4. Realizar el eviscerado tomando las medidas de higiene necesarias.
5. Utilizar por lo menos dos formas de control de calidad, el análisis organoléptico y análisis fisicoquímico, debido a que no consumen mucho tiempo, son económicos y los resultados pueden ser correlacionados. Sin embargo los análisis microbiológicos determinaran la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación.
6. Cumplir con el reglamento sanitario de funcionamiento de mercados de abasto para el expendio de este tipo de producto en los puestos de venta.

## VIII. ABSTRACT

### HYGIENIC QUALITY EVALUATION OF FOUR MOST CONSUMED FISH SPECIES, EXPENDED IN TINGO MARIA MARKET

This work was done in Tingo Maria city, Rupa Rupa district, Leoncio Prado province, Huanuco region - Peru. The objective was to determine the hygienic quality of four most consumed fish species in Tingo Maria. The following species were used: Boquichico (*Prochilodus nigricans*), mota (*Hemisorubim platyrhynchos*), lisa (*Mugil cephalus*), jurel (*Trachurus picturatus* Murphy). The results of aerobic mesophilic to boquichico, mota, lisa and jurel were RAM ( $1.85 \times 10^6$  CFU/g), ( $3.0 \times 10^6$  CFU/g); ( $8.0 \times 10^5$  CFU/g) and ( $10.0 \times 10^5$  CFU/g) respectively. *Escherichia coli*, for boquichico was (43 MPN/g), mota (12 MPN/g), lisa (57 MPN/g), jurel (46 MPN/g). *Salmonella spp.* Showed 30% of skin and 25% of muscles of the fish. *Vibrio parahaemolyticus*, 40% in lisa skin and in skin and muscle in jurel were reported. In addition, *Staphylococcus aureus*, and *Vibrio cholerae* was not found in all samples tested. Sensorial analysis allowed to classify lisa and jurel, as fair to poor. In contrast, boquichico and mota were classified as normal. Muscle pH was close to 7. Ebert test showed that jurel (20%) and lisa (20%) were in advanced state of spoilage. In conclusion, the study showed that quality of raw fish for sale at Tingo Maria Market is poor hygienic quality, unfit for consumption. In this respect we must take hygienic– sanitary inspection actions stricter by local authorities.

**Keywords:** Hygienic quality, fish, market, organoleptic analysis, physical chemical and microbiological.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, M.R., MOSS, M.O. 1997. Microbiología de los alimentos. Zaragoza, España, Acribia, S.A. 465 p.
- AGÜERIA, D., GROSMAN, F., TABERA, A., SANZANO, P., PORTA, R. 2004. Valoración de la calidad de carne de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Rev. Aquatic. 20: 9-19.
- ALIAGA, R. 2005. Aislamiento y caracterización de especies de *Vibrio* a partir de ceviches expendidos en la vía pública durante el fenómeno El Niño 1998. Tesis de Bachiller. Lima, Perú. Universidad Peruana Cayetano Heredia- Ciencias y Fisiología.
- ALIAGA, R., MIRANDA, J., ZEVALLOS, J. 2010. Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 en pescados y moluscos bivalvos procedentes de un mercado pesquero de Lima, Perú. Rev Med Hered, 21: 139-145.
- ALMEIDA, C., SCHUCH, D., GELLI, D., CUELLAR, J., DIEZ, A., ESCAMILLA, J. 1996. Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública. Organización Panamericana de la Salud. 52 p.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1976. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. pp 107-108.

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Ed. Vanderzaut C. and Sphittstoesser. 3 ed. Washington, D.C., USA.
- ANASTASIO, A., VOLLANO, L., VISCIANO, P., MIRANDA, E., CORTES, M.L. 1999. Correlations between pH, total volatile basic nitrogen, trimethylamine and sensory evaluation in fresh fish slices. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 50: 63-66.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1995. Official Methods of analysis. 12 ed. The Association: Whashington D.C. 942 p.
- AYALA, M., SALAS, A., CARBAJAL, M., PLÁCIDO, ALBRECHT, R. 2001. Patrón de deterioro de anchoveta Peruana (*Engraulis ringens*) almacenada a temperatura de refrigeración. *Rev. de Ciencia y tecnología alimentaria*, 3(3): 161-168.
- BELL, C. 1998. *E. coli*, Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. España, ACRIBIA, S.A.
- BEUCHAT, L.R. 1973. Interacting effects of pH, temperature and sal concentration on growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Microbiol.*, 25: 844-846.
- BLIGH, E.G., MERRIT, J.H. 1988. Post harvest fishery losses. Ed. ICMRD, Kingston, RI. 250 p.

- BORBOLLA, M., VIDAL, M., PIÑA, G.O., RAMÍREZ, M.I., VIDAL, V.J. 2004. Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, coliformes fecales, *Salmonella*, hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante 2003. Revista de salud en Tabasco, 10(1-2): 221-232.
- BOTTONE, E., JANDA, J.M. 1994. *Vibrio*. In: Howars B, Kesiser J, Smith T *et al.* (eds). Clinical and Pathogenic Microbiology. St Louis: Mosby-Year Book, Inc., 269-375.
- BRANSON, E. 2000. Anatomía y fisiología básicas. En: Acuicultura para Veterinarios. Producción y clínica de peces. Acribia S.A: 1-32
- BURGESS, O., CUTTING, L., LOVERNAJA, J., WATERMAN, J. 1979. El pescado y las industrias derivadas de la pesca. Trad. López-Lorenzo, V., Barrado, M. Zaragoza, España, Acribia. 392p
- CARBAJAL, M., SALVA, P., GONZÁLEZ, C., AYALA, M. 2003. Evaluación microbiológica de productos adquiridos en el mercado de mayorista pesquero de Ventanilla - Perú. Revista Cubana Salud Pública, 29(2): 121-123.
- CARRERA, J., CABALLERO, A., LENGOMÍN, M. 1998. Vigilancia de *Staphylococcus* y *Salmonella* en alimentos. Revista Cubana Aliment Nutr, 12(1): 16-9.
- CARRILLO, L., AUDISIO, C. 2007. Manual de microbiología de los alimentos. San Salvador de Jujuy, Argentina. 194 p

- CARVAJAL, G., SÁNCHEZ, J., AYALA, M.E., ATUSHI, H. 1998. Differences among marine and hospital strains of *Vibrio cholerae* during Peruvian epidemic. J Gen Appl Microbiol, 44(3): 896-901.
- CHAMBERS, H. 1997. Methicilin Resistance in Sthaphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. Rev. Clin. Microbiol., 10(4): 781-791.
- COLWELL, R. 1996. Global climate and infectious diseases: The cholera paradigm. Science, 274(5295): 2025-31.
- COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1987. Método para recuento de microorganismos aerobios en placas de petri. Norma N° 0902 - 87. 1ra revisión. Caracas, Venezuela. 5 p.
- COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1988. Aislamiento e Identificación de *Salmonella spp.* Norma N° 1291 - 88. 1ra revisión. Caracas, Venezuela. 13 p.
- COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1989. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Norma N° 1126 - 89. 1ra revisión. Caracas, Venezuela. 7 p.
- COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1996. Determinación del número más probable de coliformes totales, coliformes fecales y de *Escherichia coli*. Norma N° 1104 - 96. 2da revisión. Caracas, Venezuela. 21 p.



- CONNELL, J.J. 1995. Control of fish quality. Ed Fishing News. Ltd, Surry, Reino Unido. 235p
- DE LA ROSA, R., NÚÑEZ, J., NICOLI, L. 1995. Aislamiento de *Vibrio* sp. en pescado fresco del mercado de La Viga en México, D. F. Revista veterinaria de México, 26(1):45-50
- DELGADO, A., VALLS, J., TÓME, E. 2000. Evaluación de aminas biogénicas, microbiológica y sensorial de sardina (*Sardinella aurita*) durante su almacenamiento en hielo. Rev. Científica. FCV-LUZ. Venezuela., 10(6): 494-502.
- DEVILLERS, C.H., CLAIRAMBAULT, P. 1977. Zoología. P.P. Grassé. Tomo 2. Vertebrados. Anatomía Comparada. Barcelona, España, Toray - Masson, S.A. 545 p.
- DIRECCION DE HIGIENE ALIMENTARIA Y ZONOSIS (DHAZ). 2003. Higiene Alimentaria. "Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto". Resolución Ministerial N° 0566-2033-RE. MINSA/DIGESA. Lima, Perú. 32 p.
- DIRECCION DE HIGIENE ALIMENTARIA Y ZONOSIS (DHAZ). 2008. Higiene Alimentaria. "Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de la calidad sanitaria e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo humano". Norma N° 071-MINSA/DIGESA - V.01. Lima, Perú. 23 p.

- DOWNES, F.P., ITO, K. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological examination of foods. Washington, DC. American Public Health Association. 1615-1627.
- EEC. 1976. Council Regulation N° 103/76 freshness ratings. Off. J. Eur. Communities N° L120.
- ELLIOT, E., KAYSNER, C., JACKSON, L., TAMPLIN, M. 1998. Determinación de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. Vulnificus* and other *Vibrio* spp. Manual Bacteriológico. Capítulo 9. Food and Drug Administration (FDA). 8va Edición. Estados Unidos. pp. 34 - 35.
- EXAMINATION OF FOODS. American Public Health Association, Washington. 4 ed. 483 p.
- FEDERAL DRUG ADMINISTRATION (FDA). 2001. Bacteriological Analytical Manual on Line. 8 ed. Food and Drug Administration. ADAC International.
- FISH DURING PRESERVATION AND PROCESSING. Session 6. Symposium on Harvest and Post Harvest Technology of Fish, Cochín.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION (FAO). 1992. Manual of Food Quality Control. 4. Rev 1. Microbiological Analysis. Food Alimentarius Organization.
- FORBES, B.A., SAHM, D.F., WEISSFELD, A.S. 2002. Editors. Bailey & Scott's. Diagnostic Microbiology. 11 ed. St. Louis, Missouri. Mosby. 202 p.

- FRADE, H., FERNÁNDEZ, M.C. 2004. Bacterias indicadoras de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos. In: Enfermedades transmitidas por alimentos. Buenos Aires, Argentina. pp. 63 - 64.
- FRAZIER, W.C., WESTHOFF, D.C. 1993. Microbiología de los Alimentos. 4 ed. Zaragoza, España, Acribia S.A. 698 p.
- GIL, A., MIRANDA, H., LANATA, C. 2007. O3:K6 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. Int J Infect Dis; 11: 324-328.
- GONZÁLEZ, S.D., VALLS, P.J., GONZÁLES, A. 2002. Evaluación física, química y sensorial de tronquitos de sardina (*Sardinella aurita* V.) durante su almacenamiento congelado a - 18 °C. Rev. Científica, FCV-LUZ. Venezuela, 12(4): 278-285.
- GRAÇA, J., PAVANELLI, S. 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: EDUEM. 308p.
- GRAM, L., HUSS, H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. Int J Food Microbiol., 33: 121-137.
- GUERREO, R.G.C., MEDINA, E. 1986. Epidemiología. 2 ed. Fondo Educativo Interamericano, México-D.F., 258 p.
- HERRERA, F., SANTOS, J. 2005. Prevalencia de *Salmonella spp* en pescado fresco expandido en Pamplona (Norte de Santander). Revista de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Pamplona, 3(2): 34-42.

- HIRAMATSU, K. 1998. The emergence of *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. *Am J Med*, 104: 5A, 7S-10S
- HURST, A., COLLINS-THOMPSON, D.L. 1979. Cap. 3: Food as a Bacterial Habitat. En: *Adv. in Microbial Ecology*. Editor M. Alexander. Plenum Press. pp. 9-134.
- HUSS, H.H. 1999. El pescado fresco su calidad y cambios de calidad. Documento técnico de pesca. Roma, Italia, FAO. 348 p
- IBARRA, J., DELGADO, A., ALVARADO, D. 1999. *Vibrios* no epidémicos y *Vibrio cholerae* O1 Asociados a enfermedad diarreica aguda. Evento Climatológico "El Niño" - 1998. Hospital Nacional Dos de Mayo. UMSM. *Anales de la Facultad de Medicina*, 60(4): 251-256.
- INICIARTE, F., MORENO, F. 1991. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la calidad de pescado consumido en Maracaibo. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia*, 1(2).
- INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ. (IMARPE). sd, "Lisa" *Mugil cephalus*. Lima, Perú. [En línea]: IMARPE, ([http://www.imarpe.pe/index.php?id\\_detalle=00000000000000000304](http://www.imarpe.pe/index.php?id_detalle=00000000000000000304), artículo, 12 Oct. 2013).
- INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ. (IMARPE). sd, Jurel. Lima, Perú. [En línea]: IMARPE, ([http://www.imarpe.pe/index.php?id\\_detalle=00000000000000000304](http://www.imarpe.pe/index.php?id_detalle=00000000000000000304), artículo, 12 Oct. 2013).

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD (ICMSF). 1982. Microorganisms in Food. The International Comition on Microbiological Specifications for Food of the International Association of Microbiological Societies.University of Toronto. 228 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD (ICMSF). 1980. Ecología microbiana de alimentos. 2 ed. Zaragoza, España, Acribia S.A. Vol 1. 422 p.

IZQUIERDO, P., ALLARA, M., TORRES, G., FERNÁNDEZ, A., PAULINKEVICIES, M., FUENMAYOR, J. 2001. Bacterias productoras de histamina en tres especies de pescado. Revista Científica La Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias,11(5):431-435.

JOKLIK, W.K., WILLETT, H.P., AMOS, D.B, WILGERT, C.M. 1994. Microbiología. 20 ed. Panamericana.

KAGIKO, M., DAMIANO, A., KAYIHURA, M. 2001. Characterisation of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish in Kenya East Afr Med J., 78 (3): 124-7.

KAPER, J., MORRIS, G., LEVINE, M. 1995. Cholera. Clinical Microbiology Reviews, 8(1): 48-86.

KAYSNER, A., DE PAOLA, A. 1998. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* spp. En FDA (Ed). Bacteriological Analytical Manual.Food and Drug Administration. 8 ed. Washington DC. pp. 1-27.

- KIETZMANN, U. 1974. Inspección veterinaria de pescados. Zaragoza, España, Acribia S.A. p. 151-170
- KING, G.M., CUSTANCE, D. 1982. Colour atlas of vertebrate anatomy; an integrated text and dissection guide. Blackwell Scientific Publications.
- LAM, R. 1968. Estudio sobre la variación del contenido de grasa, en la Anchoqueta Peruana (*Engraulis ringes*). Informe N°24. Instituto del Mar del Perú (IMARPE). Callao, Perú. 29 p.
- LATEEF, A., OLOKE, G, E., PACHECO, E. 2006. The Microbiological Quality of Ice Used to Cool Drinks and Foods in Ogbomoso Metropolis, Southwest, Nigeria. *Internet Journal of Food Safety*, 8: 39-43.
- LE BAIL, Y., KEITH, P., PLANQUETTE, P. 2000. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (tome 2, fascicule II). Publications scientifiques du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. 307 p.
- LEBLANC, J. 1987. Approaches to the study of nucleotide catabolism for fish freshness evaluation. M. Sc. Thesis, Technical University of Nova Scotia, Halifax.
- LEYTON, Y., RIQUELME, C. 2008. *Vibrios* en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43 (3): 441-456.
- LOVE, R. 1988. Cap 1: The Physical Structure of Fish Muscle and its Chemistry. En: *The Food Fishes, Their Intrinsic Variation and Practical Implications*. Farrand Press, Londres. pp 3 - 21.

- MACKIE, M. 1982. Nueva Approaches in the Use of Fish Proteins. En: Developments in Food Proteins-2. Applied Science Publishers.Londres. pp. 215-262.
- MANDELL, G., DOUGLAS, L., BENNETT, J.D. 2002. Enfermedades infecciosas; principios y práctica. 5 ed. Buenos Aires. Ed. Med. Panamericana. p 1397-1416
- MARADAN, C., MOREIRA, B., BOYLE-VAVRA, S. 1997. Antimicrobial resistance in Staphylococci. Infectious Diseases of North America, 1(4): 813-841.
- MELO, E., LIMA, D., MELO, L., PINTO- SILVA, V. 2005. Peixes do Rio das Mortes: Identificação e ecologia das espécies mais comuns. Cáceres: UNEMAT. 145 p.
- MEYER, V. 1978. El pescado y los productos de pesca. Zaragoza, España: Ed. Acribia. S.A 342 p.
- MINISTERIO DE LA PRODUCCION (PRODUCE). 2006. Anuario estadístico del sector producción. 236 p.
- MONTEAGUDO, S., DE LA MONTAÑA, J., MIGUÉZ, M. 2002. Comparación de métodos organolépticos y físico-químicos al evaluar la calidad y vida comercial de pescado magro (*Trisopterus luscus*) y graso (*Trachurus Trachurus*) comercializado en Pontevedra. Alimentaria, 334: 73-79.

- MORALES, G., BLANCO, L., ARIAS, L., CHAVES, C. 2004. Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 54(4): 433-437.
- MORILLO, M. N., FINOL, R. M., VALERO, L. K., SOTO, C. A. 2004 - 2005. Evaluación bacteriológica y organoléptica en dos especies de pescado del lago de Maracaibo, Venezuela. Veterinaria Trop., 29-30 (1 y 2): 61-82.
- MURRAY, P.R., BARON, E.J., JORGENSEN, J.H., PFALLER, M.A., YOLKEN, R.H. 2003. Manual of Clinical Microbiology. 8 ed. Washington, D.C. ASM Press. p. 33-422.
- NEAVE, V. 1983. Introducción a la tecnología de productos pesqueros. México, Continental. 400 p.
- NEYS, K., HUYS, G., UYTENDAELE, J., SWINGS, J., DEBEVERE, J. 2000. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp, from retail foods. Letters in Appl. Microbiol., 31: 359-363.
- NORMA OFICIAL MEXICANA (NOM-027-SSA1). 1993. Bienes y servicios productos de la pesca. Pescados frescos–refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias. 29 p.
- NORMA TECNICA PERUANA. 1991. Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas (ITINTEC. NTP-041.001) Pescado fresco. 2 ed. pp. 1-9



- PAN, B., JAMES, D. 1985. Histamine in marine products: production of bacteria, measurement and prediction of formation. FAO Fish. Tech. Pap. Vol. 252. 62 p.
- PASCUAL ANDERSON, M.R. 2000. Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2 ed. Madrid, España, Díaz de Santos, S. A. 441 p.
- PASTORIZA, L., SAMPEDRO, G., HERRERA, J.J., CABO, M. 1998. Influence of sodium chloride and modified atmosphere packaging on microbiological, chemical and sensory properties in ice storage of sliced of hake (*Merluccius merluccius*). Food Chem, 61: 23-28.
- POULTER, G., CURRAN, A., ROWLANDS, B., DISNEY, G. 1982. Comparison of the Biochemistry and Bacteriology of Tropical and Temperature Water fish during preservation and processing. Paper presented at the Symposium on Harvest and Post-Harvest Technology of Fish, Cochin, India, Trop. Dev. and Res. Inst., London. 744p: 407-413
- QUINTOIL, N., PORTEEN, K., PRAMANIK, A. 2007. Studies on occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in fin fishes and shellfishes from different ecosystem of West Bengal. Livestock Research for Rural Development. [En línea]: Cipav, (<http://lrrd.cipav.org.co/lrrd19/1/quin19001.htm>, documentos, 11 Set. 2011).

- RAA, J. 1980. Biochemistry of Microbial Fish Spoilage and Preservation by Lactic Acid Bacteria and Added Acid. Global. Impact of Applied Microbiology IV (GLAM IV).6th International Conference. Lagos, Nigeria. pp. 3 - 16.
- ROJAS, T., CASTILLO, Z. 2003. Supervivencia de un aislado de *E. coli* O157:h7 en jugos de naranja no pasteurizados de expendio comercial. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología., 23(1): 16-20.
- RÚÍZ-CAPILLAS, C., MORAL, A. 2001. Correlation between chemical and sensory quality indices in hake stored in ice. Food Res Int, 34: 441-447.
- SALYERS, A., WHITT, D.D. 2001. Bacterial Patogenesis, a molecular approach. 2 ed. Washington, D.C. ASM Press. 560 p.
- SECRETARÍA DE SALUD: Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. 1999. 98 p.
- SHARMA, C.S., BEDI, S.K., GILL, J.P.S., AULAKH, R.S., SHARMA, J.K. 2006. Prevalence of enteropathogens of zoonotic significance in fish and fish products from Ludhiana. Indian J. Fish., 53(3): 341-344.
- SINGH, B., KULSHRESTHA, S. 1993. Occurrence of enterotoxigenic *Salmonella* serotypes in seafood's. J. Food Tech., 30(6): 438-439.
- SUÁREZ, H., PARDO, S., CORTÉS, M. 2008. Calidad físico-química y atributos sensoriales de filetes sajados biopreservados de cachama, empacados al vacío bajo refrigeración. Revista Colombiana Ciencias Pecuarias, 21: 330-319.

- TOMÉ, E., IGLESIAS, M., KODAIRA, M., GONZÁLEZ, A. 2000. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el rigor mortis y en la estabilidad de la tilapia (*Oreochromis* spp.) cultivada. Rev. Científica, FCV-LUZ. 10(4): 339-345.
- TORRES, G., IZQUIERDO, P., ALLARA, M., GARCIA, A. 2003. Efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre el crecimiento de bacterias productoras de histamina en dos especies de pescado: Lisa (*Mugil curema*) y róbalo (*Centropomus undecimalis*). Revista Científica La Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias, 13(2): 263-268.
- TORRES, G., IZQUIERDO, P., MÁRQUEZ, E., SÁNCHEZ, E y. BARBOZA. 2000. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la carga bacteriana, concentración de histidina libre y la producción de histamina en el músculo de la corvina (*Cynoscion maracaiboensis*). Revista Científica La Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias, 10(2): 130-135.
- VILCAPOMA, A., FLORES, A., LEÓN, J., ALVARADO, D. 1992. Determinación de la frecuencia de *Vibrio parahamolyticus* y otros *Vibriones* halofílicos en alimentos preparados con productos marinos frescos y procesados. Rev. Per. Biol., 4(1-2): 17-20.

## **ANEXOS**

Anexo 1. Criterios de selección de especies según DE LA ROSA *et al.* (1995)

- a) Elegir las especies de pescados con mayor demanda en el mercado local.
- b) Considerar las especies procedentes de las zonas marítimas y de agua dulce con alto riesgo de contaminación con aguas negras.
- c) Tomar una especie de pescado de 4 especies diferentes en los lugares de expendio

$$\frac{20 \text{ pescados}}{4 \text{ especies}} = 5 \text{ muestras de cada especie, 4 pescados diferentes por evaluación}$$

Anexo 2. Partes inspeccionadas en el análisis sensorial. EEC (1976)

Piel (pigmentación), ojos (forma, color y pupila), branquias (color y mucus), carne (corte del abdomen), color (a lo largo de la columna), órganos, carne (elasticidad y textura), columna vertebral, peritoneo, branquias (olor), piel, cavidad abdominal. Asimismo, los criterios de clasificación fueron: E (Extra), A (Buena), B (Regular), C (No apto).

Anexo 3. Determinación de pH según la AOAC (1995)

Se realiza mediante la lectura directa del potencial eléctrico creado en la membrana de un electrodo de vidrio (Crison modelo Xerolyt), previamente calibrado a pH 4,0 y pH 7,02 con soluciones reguladoras de pH. Se insertó directamente el electrodo en la carne de pescado. El pH de un pescado fresco se encuentra en un rango de 6,3 a 6,9, por el contrario de un pescado alterado el pH de más de 7 (HUSS, 1999).

Anexo 4. Fórmula para la preparación del reactivo de Ebert. SECRETARIA DE SALUD DE MÉXICO (1999)

En esta prueba se preparó una solución llamado reactivo de Ebert, constituido por una mezcla con una parte de ácido clorhídrico (HCl), tres partes de etanol (alcohol) y una parte de éter etílico. Las reacciones positivas desprenden humo blanco, indicando la presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

- 1 cm de Ac. Clorhídrico
- 3 cm de etanol
- 1 cm de éter.

Anexo 5. Numeración de microorganismos aerobios viables. APHA (1992)

De la dilución  $10^{-4}$  de piel y músculo de cada especie de pescado, fueron sembrados por duplicado y profundidad en placas petri, luego se agregó rápidamente el medio Plate Count. Una vez que solidificaron los Agares se procedió a invertir las placas y se incubo a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas. La enumeración o recuento se realizó con la ayuda de un contador de colonias. Se contaron todas las colonias y se anotó la dilución correspondiente.

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{M.O/g de pescado} = \frac{\text{\#Colonias x Factor de dilución}}{\text{Inóculo de siembra}}$$

## Anexo 6. Enumeración de *Escherichia coli* termotolerante. FDA (2001).

### - Prueba presuntiva

De las homogenizaciones o diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  con 10 g piel y 10 g músculo respectivamente de cada especie de pescado, se inoculó volúmenes de 1 ml de las últimas tres diluciones en 3 tubos, cada uno con caldo lactosa bilis verde brillante (brilla) con tubitos de Durham invertidos. Esta misma operación se realizó en las 4 especies de pescado, tanto para piel como para músculo. Se llevó a incubar a 37 °C por 24 a 48 horas. Se verificó y agitó suavemente cada tubo y se observó la producción de gas y/o efervescencia en los tubos de Durham cada 24 horas. Fueron considerados como tubos positivos en la prueba presuntiva, aquellos que presentaron gas en el tubo de Durham después de la incubación.

### - Prueba confirmatoria

De todos los tubos con caldo Brilla positivos (con formación de gas) se tomaron alícuotas y fueron sembrados por estría en placas con medios sólidos de Agar Levine eosina azul de metileno (EMB), y llevados a incubación a 37 °C por 24 horas. Luego del tiempo transcurrido se observó las colonias lactosa positivas con brillo metálico. Los microorganismos y apariencia de las colonias que aparecieron en el Agar EMB se describen en el Anexo 12.

- Prueba complementaria

Se tomaron con una asada colonias aisladas de color brillo metálico y sembrados en Caldo *E. coli*. Se utilizaron tubos con 9ml de Caldo *E. coli* y tubos Durham invertidos, se llevó a incubación a 44,5 °C o 45,5 °C para ver si son termotolerantes, por 24 a 48 horas. Los tubos con formación de gas en el caldo *E. coli* fueron considerados positivos. Para la prueba de diferenciación bioquímica se tomaron alícuotas de los tubos positivos con formación de gas y se repicaron en medios del IMVIC y TSI. Los resultados con: Indol + ó -, RM +, VP -, Cit -, TSI A/A (gas+) (H<sub>2</sub>S -), fueron *Escherichia coli*. Luego se calculó el NMP por g con la fórmula:

$$\text{NMP/g}^* = \frac{\text{Índice NMP (Tabla)} \times \text{Dilución Intermedia}}{100}$$

\* = Todas las cifras bajo el título "NMP/g", pueden ser multiplicados por 100 para obtener NMP/100g

Anexo 7. Numeración de *Staphylococcus aureus*, APHA (2001)

De las homogenizaciones o diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, con 10 g de piel y 10g de músculo de cada especie de pescado, se sembró por duplicado en placas con Agar Baird Parker. Se llevó a incubación en posición invertida a 37 °C por 24 a 48 horas. Luego de la incubación se verifico la presencia de colonias. Ver Anexo 13.



Anexo 8. Aislamiento y caracterización de *Salmonella spp*, FDA (2001).

- Pre – enriquecimiento o enriquecimiento no selectivo.

Se pesó 25 g de piel y 25 g de músculo de cada especie, luego se añadió a 225 ml de caldo lactosado (medio líquido no selectivo) a cada matraz, se incubó las muestras a 37 °C por 24 horas.

- Enriquecimiento selectivo

Se inoculó 1 ml de cada pre – enriquecimiento en tubos con medios líquidos selectivos, con 9 ml de caldo tetrionato ya adicionados yodo (1ml/L), y 9ml de caldo selenito - cistina. Se incubo los tubos a 37 °C (Caldo tetrionato) por un periodo no superior a 48 horas. El caldo selenito – cistina se incubo entre 42 - 43 °C por 16 horas, no pasando las 24 horas.

- Aislamiento selectivo e identificación

De los caldos de enriquecimientos previamente homogeneizados se inoculo con un asa de siembra alícuotas de 3 a 5 mm, en medios sólidos de diagnóstico selectivo Agar SS (Agar *Salmonella – Shigella*). Los medios fueron incubados a 37 °C por 24 horas. Luego del tiempo de incubación se observó la presencia de colonias, que por sus características fueron consideradas presuntivas de *Salmonella*. Las placas positivas con *Salmonella* presentaron colonias no fermentadoras de lactosa incoloras con el centro oscuro, el cual se describe en el Anexo14.

- Confirmación presuntiva y pruebas bioquímicas

Se procedió a sembrar con una asada 2 o más colonias típicas o sospechosas de *Salmonella* en TSI, Indol, RM, VP, Urea, Citrato, LIA por un periodo de 24 horas a 37 °C. Las reacciones típicas de *Salmonella* en los medios son: TSI: K/A, gas (burbujas): positivo, H<sub>2</sub>S (color negro): positivo, Indol: -, RM: +, VP: -, urea: -, cit: +, LIA: descarboxilación positiva (color purpura). Las características de desarrollo de *Salmonella* en TSI y LIA se describen en el Anexo 15.

Anexo 9. Aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (KAYSNER y DE PAOLA, 1998).

Del homogeneizado con 25 g de piel y 25 g de músculo con 225ml caldo lactosado de cada especie de pescado, se obtuvo inóculos, con una asada a las 6 a 7 horas a 37 °C de incubación. Se sembró sobre Agar TCBS (Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa, Merck). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 a 48 h. Las colonias típicas y presuntivas de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* desarrolladas en los Agares TCBS se aislaron en Agar triptosa y soja (TSA) a una temperatura no mayor de 50 °C con NaCl al 1.5%, 2.5%, 5% y 9% para ver la tolerancia a sales. Se realizó la diferenciación bioquímica a partir de las colonias aisladas. Ver Anexo 27.

## Anexo 10. Esquema UE para la clasificación de la fresca.

		Criterio			
Partes del pescado inspeccionadas	Puntuación				
	3	2	1	0	
Apariencia					
Piel	Pigmentación brillante e iridiscente, decoloraciones ausentes, mucus transparente y acuoso	Pigmentación brillante pero no lustrosa Mucus ligeramente opalescente	Pigmentación en vías de descolorarse y empañarse. Mucus lechoso	Pigmentación mate <sup>1</sup> Mucus opaco	
	Ojos	Convexos (salientes) Córnea transparente	Convexos y ligeramente hundidos Córnea ligeramente opalescente	Planos Córnea opalescente	Cóncavo en el centro <sup>1</sup> Córnea lechosa
Branquias	Pupila negra y brillante	Pupila negra y apagada	Pupila opaca	Pupila gris	
	Color brillante Mucus ausente	Menos coloreadas Ligeros trazos de mucus	Descolorándose Mucus opaco	Amarillentas <sup>1</sup> Mucus lechoso	
Carne (corte del abdomen)	Azulada, translúcida, uniforme, brillante Sin cambios en el color original	Aterciopelada, cerosa, empañada Ligeros cambios en el color	Ligeramente opaca	Opaca <sup>1</sup>	
Color (a lo largo de la columna vertebral)	No coloreada	Ligeramente rosa	Rosa	Rojo <sup>1</sup>	
Órganos	Riñones y residuos de otros órganos deben ser de color rojo brillante, al igual que la sangre dentro de la aorta	Riñones y residuos de otros órganos deben ser de color rojo empañado; la sangre comienza a decolorarse	Riñones, residuos de otros órganos y sangre presentan un color rojo pálido	Riñones, residuos de otros órganos y sangre presentan un color pardusco	
Condición					
Carne	Firme y elástica	Menos elástica	Ligeramente blanda (flácida), menos elástica	Suave (flácida) <sup>1</sup> Las escamas se desprenden fácilmente de la piel, la superficie surcada tiende a desmenuzarse	
	Superficie uniforme		Cerosa (aterciopelada) y superficie empañada		
Columna vertebral	Se quiebra en lugar de separarse de la carne	Adherida	Ligeramente adherida	No está adherida <sup>1</sup>	
Peritoneo	Completamente adherido a la carne	Adherido	Ligeramente adherido	No está adherido <sup>1</sup>	
Olor					
Branquias, piel, cavidad abdominal	A algas marinas	No hay olor a algas marinas, ni olores desagradables	Ligeramente ácido	Acido <sup>1</sup>	

<sup>1</sup>O en un estado de deterioro más avanzado.

Fuente: COUNCIL REGULATION (EEC) N°103/76 OJ N° L20; citado por Neave (1983).

Anexo 11. Criterios microbiológicos para productos hidrobiológicos crudos para consumo humano (frescos, refrigerados, congelados, salpresos ó ahumados en frío) DHAZ (2008).

Agente Microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por gramo	
					m	M
Mesófilos Aerobios	2	3	5	2	5 x 10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
<i>Escherichia coli</i>	4	3	5	3	10	10 <sup>2</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
<i>Salmonella spp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g	
<i>Vibrio cholerae</i> (*)	10	2	5	0	Ausencia/25 g	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g	

(\*) Para productos hidrobiológicos crudos, frescos, refrigerados y congelados.

Fuente: DHAZ (Norma N° 071-MINSA/DIGESA -V.01).

Anexo 12. Microorganismos y apariencia de las colonias en Agar EMB.

Apariencia de las colonias	Microorganismos
Colonias de color violeta o azul oscuro	Fermentan la lactosa
Colonias incoloras a color fresa pálido, translúcida	No fermentan la lactosa
Colonias con brillo metálico verdoso, en luz reflejada, centro azul oscuro en luz transmitida	<i>Escherichia coli</i>
Colonias rosas más grandes que <i>E.coli</i> con el centro oscuro	<i>Enterobacter</i>
Colonias rosa con el centro oscuro, mucoides, centro en luz transmitida	<i>Klebsiella</i>

Fuente: CARRILLO y AUDISIO (2007). Manual de microbiología de los alimentos.

### Anexo 13. Microorganismos y apariencia de las colonias en Agar Baird Parker.

Apariencia de las colonias	Microorganismos
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Colonia negra brillante, convexa de 1-5 mm de diámetro, con borde blanco angosto, rodeado de una zona clara de 2-5mm de ancho que contrasta con el medio opaco</li> <li>– El anillo opaco dentro de la zona clara aparece únicamente después de las 48 horas de incubación</li> </ul>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Colonia negra brillante, de forma irregular, son zonas opacas desarrolladas alrededor de la colonia después de 24 horas</li> </ul>	<i>Staphylococcus epidemidis</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Algunas veces crecen: Colonias muy pequeñas de color marrón a negro, sin zonas claras</li> </ul>	<i>Micrococcus</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Colonias marrón oscuro opacas (mate) algunas veces con zonas claras que aparecen después de los 48 h</li> </ul>	Especies de <i>Bacillus</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Colonias blancas sin zonas claras</li> </ul>	Levaduras

Fuente: CARRILLO y AUDISIO (2007). Manual de microbiología de los alimentos.

### Anexo 14. Microorganismos y características de las colonias en Agar SS.

Medio de cultivo	Característica de la colonia	Microorganismo
Agar SS	Colonias incoloras	Lactosa negativos
	Colonias de color rosa hasta rojo	Lactosa positivos
	Colonias con centro negro	Formadoras de H <sub>2</sub> S
	Colonias incoloras, transparente	<i>Shigella</i> y la mayoría de las <i>Salmonellas</i>
	Colonias rosa hasta rojo	<i>Escherichia coli</i>
	Colonias mayores que <i>E.coli</i> de color rosa hasta crema blanquecino, opacas mucosas	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	Transparentes con centro negro	<i>Proteus</i> y algunas <i>Salmonellas</i>

Fuente: CARRILLO y AUDISIO (2007). Manual de microbiología de los alimentos.

## Anexo 15. Características de desarrollo de *Salmonella* en TSI y LIA.

Medio de cultivo	Característica de desarrollo	Especie
TSI	– Parte Inclínada: Roja (reacción alcalina)	Reacción típica de <i>Salmonella</i>
	– Columna del medio: amarillo(acidez por fermentación de la glucosa con o sin producción de hidrogeno sulfurado y de gas	
LIA	– Parte inclinada y columna ambas de color purpura claro (reacción alcalina) con producción de hidrogeno sulfurado y a veces de gas	Reacciones típicas de <i>Salmonella</i> y <i>Arizona</i>

Fuente: CARRILLO y AUDISIO (2007). Manual de microbiología de los alimentos.

## Anexo 16. Características organolépticas de los pescados evaluados.

Criterio	Partes del pescado inspeccionadas	Especies			
		Boquichico	Mota	Lisa	Jurel
Apariencia	Piel	1,75	1,25	1,13	0,88
	Ojos	1	1,25	0,63	0,5
	Branquias	1	1,25	0,5	0,75
	Carne (corte del abdomen)	1,38	1,63	0,88	0,75
	Color (columna vertebral)	1,63	1,25	0,75	0,5
	Órganos	*	*	0,88	0,38
Condición	Carne	1,63	1,38	1,13	1
	Columna Vertebral	1,5	1,63	0,88	0,63
	Peritoneo	*	*	0,75	0,5
Olor	branquias, piel,	1	1,13	0,63	0,5
	cavidad abdominal				

\*: Eviscerado.

Fuente: Elaboración propia.

### Anexo 17. Determinación de pH.

Especie	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
	pH	pH	pH	pH	pH
Boquichico	6,83	6,9	6,85	6,97	6,6
Mota	6,77	6,9	6,8	6,93	6,5
Lisa	6,92	6,93	6,91	7	6,89
Jurel	7,03	6,99	6,98	7,2	6,9

Fuente: Elaboración propia.

### Anexo 18. Prueba de Ebert.

Especie	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
	Reacción	Reacción	Reacción	Reacción	Reacción
Boquichico	-	-	-	-	-
Mota	-	-	-	-	-
Lisa	-	-	-	Positivo	-
Jurel	-	-	-	Positivo	-

Fuente: Elaboración propia.

### Anexo 19. Número de Microorganismos mesófilos aerobios viables/g.

Especie	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5	
	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne
Boquichico	2,5x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>6</sup>	8x10 <sup>5</sup>	2,6x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	5,6 x10 <sup>6</sup>	2,5 x10 <sup>6</sup>	8 x10 <sup>5</sup>	5 x10 <sup>5</sup>
Motta	4,1x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>6</sup>	4,3x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	2,6x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	8,4x10 <sup>6</sup>	1,4 x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>6</sup>	4,6x10 <sup>6</sup>
Lisa	5x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	8x10 <sup>5</sup>	8x10 <sup>5</sup>	2,7x10 <sup>6</sup>	3 x10 <sup>5</sup>	3 x10 <sup>5</sup>	4 x10 <sup>5</sup>	7 x10 <sup>5</sup>
Jurel	1,1x10 <sup>6</sup>	8x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>6</sup>	5 x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>6</sup>	4x10 <sup>5</sup>	4 x10 <sup>5</sup>	3 x10 <sup>5</sup>	2 x10 <sup>5</sup>	2,3x10 <sup>6</sup>

n= 5 (Numero de muestras analizadas)

c= 2 (numero de muestras que pueden estar entre m y M)

m= 5x10<sup>5</sup> (Limite microbiológico, separa la calidad aceptable de la rechazable)

M= 10<sup>6</sup> (Valores superiores son inaceptables, RIESGO para la salud)

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 20. Número de *Escherichia coli* termotolerante/g de muestra.

Especie	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5	
	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne
Boquichico	50	20	90	0	0	0	150	30	0	90
Mota	20	0	30	0	0	0	0	0	70	0
Lisa	80	20	0	30	40	0	150	70	150	30
Jurel	60	20	60	0	30	70	150	0	30	40

n= 5 (Numero de muestras analizadas)

c= 3 (numero de muestras que pueden estar entre m y M)

m= 10 (Limite microbiológico, separa la calidad aceptable de la rechazable)

M= 10<sup>2</sup> (Valores superiores son inaceptables, RIESGO para la salud)

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 21. Número de *Staphylococcus aureus*.

Especie	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5	
	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne
Boquichico	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Mota	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Lisa	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Jurel	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 22. Aislamiento e identificación de *Salmonella spp.* por 25 g.

Especie	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5	
	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne
Boquichico	A	A	P	P	A	A	A	A	A	A
Mota	P	A	A	P	A	P	A	A	P	A
Lisa	A	A	P	A	A	P	P	A	A	P
Jurel	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A

P = Presencia A = Ausencia.

Fuente: Elaboración propia.



### Anexo 23. Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* por 25 g.

Especie	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5	
	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne
Boquichico	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Mota	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Lisa	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Jurel	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

P = Presencia A = Ausencia.

Fuente: Elaboración propia.

### Anexo 24. Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* por 25 g.

Especie	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5	
	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne	Piel	Carne
Boquichico	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Mota	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Lisa	A	A	A	P	A	A	A	P	A	A
Jurel	A	A	P	P	A	P	P	A	A	A

P = Presencia A = Ausencia.

Fuente: Elaboración propia.

### Anexo 25. Resultados de la prueba de Friedman para el análisis sensorial.

Atributo	X <sup>2</sup>	P	Sig.
Apariencia piel	4,70	0,0307	*
Apariencia ojos	4,92	0,0271	*
Apariencia branquias	2,39	0,1362	N.S.
Apariencia carne corte abdomen	16,20	0,0006	**
Apariencia color a lo largo de la columna vertebral	37,36	<0,0001	**
Apariencia órganos <sup>1</sup>	1x10 <sup>30</sup>	<0,0001	**
Condición carne	8,23	0,0060	**
Condición columna vertebral	7,54	0,0079	**
Condición peritoneo <sup>1</sup>	3,00	0,1817	N.S.
Olor de Branquias, piel, cavidad abdominal	2,39	0,1362	N.S.

<sup>1</sup> Solo se evaluó dos especies: Lisa y Jurel, porque las otras especies no presentaron vísceras y peritoneo

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 26. Resultados del análisis estadístico de las variables estudiadas.

Evaluación	F	P	Sig.
pH	2,13	0,1498	N.S.
Ebert	0,64	0,5885	N.S.
MAV Piel	2,79	0,0858	N.S.
MAV Músculo	0,48	0,6998	N.S.
<i>E. coli</i> Piel	0,65	0,5979	N.S.
<i>E. coli</i> Músculo	0,97	0,4391	N.S.
<i>Salmonella</i> Piel	0,29	0,8348	N.S.
<i>Salmonella</i> Músculo	1,00	0,4262	N.S.
<i>V. parahaemolyticus</i> Piel	3,00	0,0728	N.S.
<i>V. parahaemolyticus</i> Músculo	2,00	0,1678	N.S.

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 27. Características bioquímicas de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*.

Prueba/Sustratos	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
TSI	A/A (gas -) ( H <sub>2</sub> S -)	K/A (gas -) ( H <sub>2</sub> S -)
Voges – Proskauer	Variable (+ ó -)	-
Indol	+	+
LIA	K/K (gas -) ( H <sub>2</sub> S -)	K/K (gas -) ( H <sub>2</sub> S -)
SIM	+	(+,+,+) ó (+,-,+)
Crecimiento en:		
0% NaCl	+	-
1% NaCl	+	+
2.5% NaCl	+	+
5% NaCl	+	+
9% NaCl	+	-

Las reacciones son consideradas hasta 2 días de 35 a 37 °C.

+: Entre 90 y 100% de posibilidad.

- : Entre 0 y 10% de posibilidad.

Fuente: BOTTONE E, JANDA JM. Ob. Cit. pp. 269-375.

Anexo 28. Comercialización de pescado en la provincia de Leoncio Prado.

Estado	Anual	Mensual
	Cantidad (Kg)	Cantidad (kg)
Fresco	84360	7030
Congelado	25200	2100
Total	109560	9130

Fuente: PRODUCE Tingo María 2006.

Anexo 29. Población de la provincia de Leoncio Prado.

Distrito	Habitantes 2006
Rupa – Rupa	53407
D. A. Robles	6498
H. Valdizan	3809
J.C. Castillo	30547
P.F. Luyando	8675
M.D. Beraun	9916
Total	112853

Fuente: INEI. 1,8 Huánuco. Tasa de crecimiento poblacional.