



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la  
Producción**

**“Efecto de la aplicación de soluciones antimicrobianas a la  
harina de pollo para controlar el desarrollo de microorganismos  
patógenos (*Salmonella* y *E. coli*) durante su almacenamiento”**

**PROYECTO DE TITULACIÓN**

**Previo a la obtención del Título de:**

**MAGÍSTER EN GESTIÓN DE PROCESOS Y SEGURIDAD DE  
LOS ALIMENTOS**

**Presentada por:**

**Sergio Dennis Cotto Morales**

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**Año: 2023**

# **TRIBUNAL DE TITULACIÓN**

---

**Carmen Llerena R., Ph.D.  
DIRECTORA DE PROYECTO**

---

**Patricio Cáceres C., Ph.D.  
VOCAL**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

“La responsabilidad del contenido de este proyecto de titulación, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

---

Sergio Dennis Cotto Morales

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a mi familia, amigos y a mi tutora por su apoyo inquebrantable a lo largo de mi tesis. Su respaldo emocional, financiero y académico ha sido fundamental en este logro.

# DEDICATORIA

A mis seres queridos: familia y amigos.

Esta tesis es el resultado de nuestro esfuerzo colectivo y dedicación. Cada página escrita lleva un pedazo de mi corazón y de su influencia.

Gracias por ser la razón detrás de este logro.

## RESUMEN

Los ingredientes para la producción de alimentos balanceados para animales están altamente contaminados con microorganismos perjudiciales y patógenos transmitidos por los alimentos que afectan la calidad y el aspecto sensorial, especialmente en la harina de vísceras de pollo, un ingrediente importante en la fabricación de piensos.

La contaminación de patógenos en la harina de vísceras de pollo sigue siendo un problema de seguridad importante donde estos microorganismos pueden propagarse a los animales destinados al consumo y luego causar enfermedades en los seres humanos. Por lo tanto, se suelen aplicar tratamientos químicos para prolongar la calidad y vida útil de la harina. Los ácidos orgánicos son un tratamiento químico alternativo a los productos a base de formaldehído que pueden reducir la contaminación existente y prevenir que la recurrencia de la contaminación de *Salmonella* en la cadena de suministro de alimentos balanceados.

En el presente estudio se evaluó el efecto de una solución antimicrobiana a base de ácidos orgánicos, como lo son el ácido fórmico, ácido propiónico y ácido fumárico en distintas dosis (0,5%; 0,75% y 1%) a 1, 5, 15 y 20 días de incubación en la harina de vísceras de pollo previamente contaminada con sepas de las bacterias *Salmonella* y *E. coli*

Los resultados de este proyecto proporcionan una alternativa viable para su uso en la harina de vísceras de pollo en la inhibición microbiana para lograr cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la normativa nacional vigente.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	II
ÍNDICE GENERAL .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Problema a resolver.....	1
1.2 Objetivos .....	2
1.2.1 Objetivo general .....	2
1.2.2 Objetivos específicos .....	2
1.3 Justificación del estudio.....	2
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>4</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
2.1 Antecedentes de la investigación.....	4
2.2 Producción de balanceados en el Ecuador .....	5
2.3 Materias primas para la elaboración de alimentos balanceados .....	5
2.4 Materias primas de origen animal .....	6
2.5 Harina de carne y huesos.....	6
2.6 Harina Hidrolizada de Plumas.....	6
2.7 Harina de vísceras de pollo .....	7
2.7.1 Composición bromatológica .....	7
2.7.2 Composición nutricional.....	8
2.7.3 Descripción del proceso .....	9
2.7.4 Información microbiológica .....	12
2.7.5 Criterios para evaluar la calidad de la harina de pollo .....	12
2.8 Agentes antimicrobianos en alimentos .....	12
2.8.1 Ácidos orgánicos.....	13
2.8.2 Clasificación .....	14
2.9 Aplicación de ácidos orgánicos en la industria de producción animal .....	14
2.9.1 Principales ácidos orgánicos.....	15
2.9.2 Ácido fórmico .....	16
2.9.3 Ácido propiónico .....	17
2.9.4 Ácido fumárico .....	17
2.9.5 Mecanismo de acción .....	17
2.9.6 Efectividad de los ácidos orgánicos .....	18

2.10	Microorganismos patógenos .....	19
2.10.1	<i>Salmonella</i> .....	20
2.10.2	<i>Escherichia Coli</i> .....	21
2.11	Cinética de la muerte microbiana por acción de sustancias bactericidas.....	21
2.12	Eficiencia bactericida.....	24
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>		<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>25</b>
3.1	Muestreo .....	25
3.2	Preparación de la muestra .....	25
3.3	Preparación de los ácidos orgánicos .....	26
3.4	Preparación de las cepas .....	26
3.5	Preparación del inóculo a 0,5 Mc Farland .....	26
3.6	Microbiología.....	26
3.6.1	Método para la detección de <i>Salmonella</i> – BAM /FDA Capitulo 5 .....	27
3.6.2	Método para la detección de <i>E. coli</i> (BAM/ FDA) método del número más probable .....	28
3.7	Método para la identificación de <i>E. coli</i> .....	29
3.8	Recursos.....	29
3.9	Medios de cultivo y reactivos .....	30
3.10	Diseño experimental.....	30
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>		<b>32</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y ANÁLISIS .....</b>	<b>32</b>
4.1	Evaluación de resultados microbiológicos y bromatológicos de 6 lotes de harina de vísceras de pollo.....	32
4.2	Resultados microbiológicos del estudio .....	34
4.3	Análisis de resultados.....	37
4.3.1	Análisis de los resultados de <i>Salmonella</i> .....	37
4.3.2	Análisis de los resultados de <i>E. coli</i> .....	37
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>		<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>40</b>
5.1	Conclusiones .....	40
5.2	Recomendaciones.....	40
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción estimada en Ecuador (2016) .....	5
Figura 2. Diagrama de flujo para la obtención de harina de vísceras de pollo.....	9
Figura 3. Diferencia entre biocida y el efecto biostático .....	22
Figura 4. log $N_s$ vs tiempo; tiempo de contacto .....	23
Figura 5. Decrecimiento microbiano de <i>E. coli</i> (Número Más Probable vs Tiempo) ..	38

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición bromatológica de la harina de vísceras blancas del pollo. ....	7
Tabla 2. Perfil de aminoácidos de la harina de vísceras de pollo. ....	8
Tabla 3. Composición nutricional de la harina de vísceras. ....	8
Tabla 4. Requisitos microbiológicos de la harina de pescado para consumo animal	12
Tabla 5. Principales ácidos orgánicos en alimentación animal. ....	15
Tabla 6. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de diferentes ácidos orgánicos.....	16
Tabla 7. Microorganismos más relevantes en términos de enfermedades transmitidas por alimentos, clasificados según la gravedad de la enfermedad que causan o la cantidad de casos que generan. ....	19
Tabla 8. Condiciones que limitan el crecimiento de <i>Salmonella</i> .....	20
Tabla 9. Condiciones de crecimiento de <i>E. coli</i> .....	21
Tabla 10. Especificaciones bromatológicas requeridas para la harina de vísceras de pollo .....	25
Tabla 11. Combinaciones de los tratamientos.....	30
Tabla 12. Resultados microbiológicos de varios lotes de harina de vísceras de pollo	32
Tabla 13. Resultados bromatológicos de 6 lotes de harina de vísceras de pollo .....	33
Tabla 14. Resultados de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> para cada tratamiento .....	35
Tabla 15. Resultados microbiológicos de las muestras control positivo para <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> .....	36
Tabla 16. Resumen estadístico para <i>E. coli</i> .....	38
Tabla 17. Tabla ANOVA para Resultados por Tiempo.....	39

# CAPÍTULO 1

## 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1 Problema a resolver

Las bacterias patógenas son un problema mundial que representan los principales casos de enfermedades de transmisión alimentaria, las materias primas contaminadas afectan el proceso de elaboración de alimentos tanto de consumo humano como animal. La harina de origen aviar, es empleada en el proceso de elaboración de balanceados, al estar contaminada con *Salmonella* o *E. coli* puede infectar a las especies que la consumen (PAHO, s/f). A pesar de las altas temperaturas a las que son sometidas las vísceras de pollo durante su procesamiento para obtener la harina, el proceso puede presentar como riesgo biológico la sobrevivencia de microorganismos patógenos, debido a que las vísceras al ser un subproducto, carecen de controles ambientales, condiciones de manipulación a granel, el almacenamiento es muchas veces inadecuado y si se le suma a esto que las bacterias patógenas están presente en el tracto gastrointestinal del ave provoca una combinación capaz de permitir el crecimiento de los patógenos en el producto final (Jaramillo, 2013).

La causa principal causa del deterioro de los alimentos balanceados y de las materias primas que lo componen es el ataque por diversos microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y mohos, representa un desafío significativo. La cuestión del deterioro causado por estos microorganismos en este tipo de alimentos conlleva consecuencias económicas indiscutibles. Estas afectan tanto a los fabricantes, que enfrentan problemas como el deterioro de materias primas y productos antes de su comercialización, así como la pérdida de la reputación de su marca, entre otros; como a los distribuidores y consumidores, que se ven perjudicados por el deterioro de los productos después de su adquisición y antes de su consumo (E. Rodríguez, 2011). Algunos de los microorganismos más frecuentes son *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia Coli*, los cuales son responsables de enfermedades e inclusive la muerte de las especies que consumen alimentos balanceados (Mesones, 2022).

Los productos de naturaleza proteica como las harinas de carne-hueso y vísceras de pollo, se asocian con una mayor tasa de contaminación de *Salmonella* (Creus, 2005). La contaminación por *Salmonella* en el producto final, ya sea huevos o pollos se puede ver reflejado si estas especies consumen alimento balanceado contaminado, transmitiéndose inclusive a los huevos durante su formación. Estos huevos pueden contaminarse tanto en su exterior como en su interior, debido a la posible presencia de heces fecales. Como resultado, se obtienen pollos con órganos internos infectados, los cuales pueden mantenerse infectados durante todo el proceso de la harina. Además, existe el riesgo de contaminación cruzada en la planta de procesamiento a través de equipos y utensilios contaminados, lo que contribuye a la presencia de *Salmonella* en el producto final (Pinto, 2018).

La bacteria *E. coli*, se encuentra frecuentemente asociada a la harina de pollo debido a diversos factores. Principalmente, puede estar presente en la materia prima utilizada

en la fabricación de la harina o surgir debido a una manipulación inadecuada durante el proceso por parte de los operadores, donde al ser almacenada a temperatura ambiente puede existir crecimiento de patógenos (Constantine, 2016).

Por lo que el uso de los agentes antibacterianos de amplio efecto, que actúan sobre *Salmonella* y *E. coli* se vuelven indispensables para impedir la contaminación durante el almacenamiento y contacto por las operaciones de empaque de la materia prima. Estos agentes antimicrobianos deben ser capaces de eliminar a los microorganismos a baja concentración, además debe tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Presentar una buena estabilidad durante el almacenamiento, los cambios en sus propiedades deben ser mínimos y no deben causar una pérdida significativa de su acción germicida. No debe ser tóxico para el hombre ni los animales y debe ser uniforme en su preparación, de manera que los ingredientes activos estén presentes en cada aplicación (Pedrique et al., 2008).

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de soluciones antimicrobianas para controlar el desarrollo de microorganismos patógenos (*Salmonella* y *E. coli*) en la harina de pollo durante su almacenamiento.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar mediante pruebas microbiológicas la presencia de *Salmonella* y *E. coli* en varios lotes de 400 sacos de 50 kg de harina de pollo envasados en su presentación comercial.
- Diseñar el experimento factorial donde se va a estandarizar la mezcla de los ácidos orgánicos que participan en las mismas proporciones (propiónico, fórmico, fumárico) y se los va a aplicar en 3 concentraciones (0,5%; 0,75% y 1%) para analizar durante 20 días el efecto antimicrobiano residual sobre *Salmonella spp.* y *E. coli* simulando condiciones normales de almacenamiento (temperatura ambiente).
- Analizar los resultados obtenidos del efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos en 3 concentraciones (0,5%; 0,75% y 1%) las muestras fueron inoculadas en escala Mc Farland de 0,5 con *Salmonella* ATTC 14028 y *E. coli* ATTC 25922 para la evaluación de la sobrevivencia de los microorganismos patógenos durante 1, 5, 15 y 20 días.

## 1.3 Justificación del estudio

Los productos proteicos de origen animal como la harina de pollo, por lo general son susceptibles a la contaminación con microorganismos patógenos siendo uno de los más importantes la *Salmonella spp.* Debido a la carga microbiana que se origina en los ovarios y oviductos de las gallinas.

El género *Salmonella* puede servir como un modelo indicador de los agentes productores de enfermedad que pueden ser transmitidas a través de los subproductos de origen animal, tales como harina de pollo y de hueso y otras materias primas que

generalmente son procesadas para ser usadas en la preparación de concentrados para animales (Manrique et al., 1970).

La aparición de bacterias patógenas como *E. coli* en harina de pollo, son resultado de la contaminación cruzada de la materia prima proveniente del faenamiento de pollos, o en algunos casos por la manipulación incorrecta durante su empaque, almacenamiento y distribución, es decir en una incorrecta higiene del transportista o manipulador (Chica & Salazar, 2022).

La harina de pollo suele almacenarse por considerables periodos de tiempo previo a su utilización en la elaboración de alimentos balanceados, debido a que tienen niveles de humedad por debajo del 5%, sin embargo, el alto contenido proteico la vuelve susceptible a la contaminación con microorganismos patógenos. A fin de preservar la calidad de la harina se requiere la aplicación de soluciones antimicrobianas que realicen un efecto protector en condiciones de almacenamiento controlado, lo cual permite alargar la vida útil de este tipo de materia prima, estas sustancias antimicrobianas principalmente son ácidos orgánicos, sales entre otros. El proceso actual incluye el propionato de calcio, formol y ácido fórmico.

En esta investigación se propone el cambio de los conservantes actuales por una mezcla de ácidos orgánicos en las mismas proporciones estos son: el ácido fórmico por su acción bactericida, ácido propiónico por ser un fuerte antifúngico y el ácido fumárico por su función acidificante, de acuerdo con los autores (Susá & Vásquez, 2011).

# CAPÍTULO 2

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes de la investigación

Existe mundialmente una tendencia a demandar un mejoramiento de calidad en todos los productos veterinarios (harina pollo) motivado por el concepto de "mejoramiento de la calidad de vida". Es así como en el caso de las harinas de vísceras de pollo, los mercados compradores demandan nuevos requerimientos en aspectos tales como frescura de la materia prima, grado de digestibilidad de las proteínas, estabilidad de los aminoácidos, ausencia de sustancias tóxicas, entre otras (Schlicht, 1997).

Desde hace algunos años las autoridades sanitarias han exigido a los países productores y exportadores de harinas de vísceras de pollo la entrega de certificados donde se compruebe la ausencia de contaminación con *Salmonella spp.*, *E. coli*, mohos y levaduras, cantidad de aflatoxinas y un mínimo de enterobacterias, puesto que las harinas de pollo son uno de los productos más afectados por este agente patógeno (FEDNA, 2006).

La harina de pollo es el producto extraído en seco de una combinación de carne y piel limpias con o sin hueso acompañante, derivado de partes de canales enteras de aves de corral o una combinación de estas, excepto plumas, cabezas, patas y entrañas (Watson, 2006).

Las bacterias patógenas presentan un problema mundial especialmente en las harinas de origen aviar. El alimento contaminado puede infectar a las especies que la consumen y además esta contaminación es fácilmente transferida a las personas a través de los productos animales (PAHO, s/f).

Los productos de naturaleza proteica como las harinas de carne-hueso y vísceras de pollo, se asocian con una mayor tasa de contaminación de *Salmonella* (Creus, 2005).

Los agentes bactericidas son usados para el control y la prevención efectiva de bacterias, hongos y levaduras en materias primas de origen animal y vegetal (Susá & Vásquez, 2011). Entre estos compuestos están incluidos los ácidos orgánicos, el formol, el formaldehído y sales como propionato de calcio. Los ácidos orgánicos han demostrado ser efectivos con o sin formaldehído para contrarrestar la presencia de salmonella en muestras inoculadas, por esto motivo se planteó usar una mezcla en partes iguales de ácido propiónico, ácido fórmico y ácido fumárico, los cuales ya han sido utilizados como preservantes de materias primas (harina de pollo) ya que poseen propiedades antifúngicas y bactericidas, por actuar como acidificantes en piensos. Su acción conservante se fundamenta en que el ácido fórmico es un potente bactericida y el ácido propiónico que es un fuerte antifúngico, el ácido cítrico y ácido fumárico son usados como acidificantes (Coello, 2006).

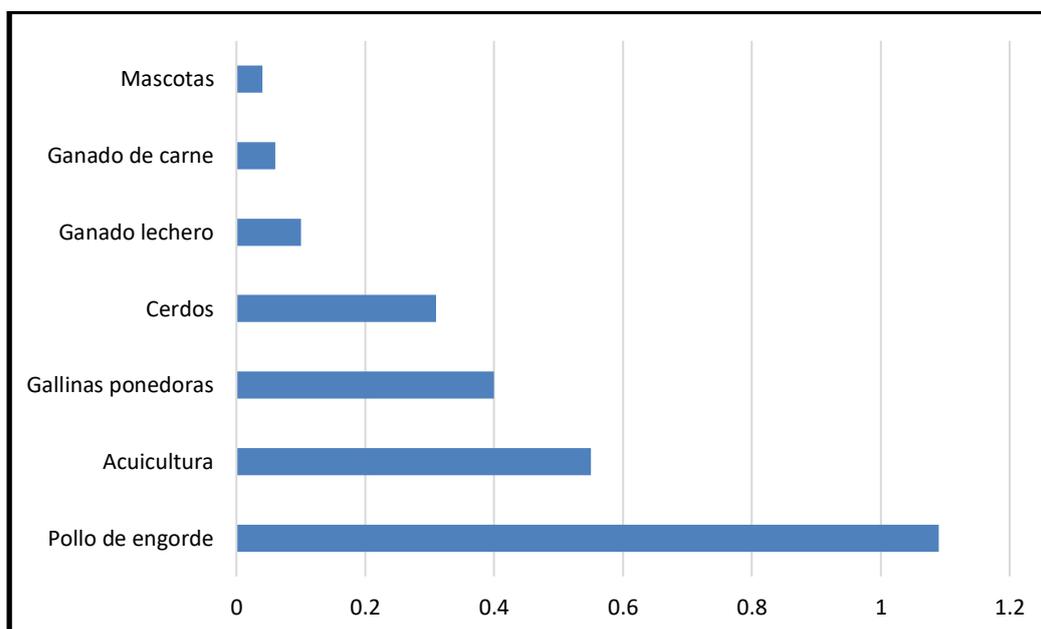
En el estudio realizado por (Jaramillo, 2013) se utilizaron ácidos orgánicos en dosis desde de 11% para ácido propiónico, ácido fórmico con (6%), ácido acético (0,5%) y acetato de sodio (2,5%) mezclados con 80% formol. Para la dosis más alta se utilizaron ácido orgánico libre (35,5%) y sales a partir de estos ácidos orgánicos (24,5%): ácido propiónico, propionato amónico, ácido fórmico, formiato de amonio. Conforme al estudio de (Iba & Berchieri, 1995) se usó la fórmula de Bioadd que consiste en 85% ácido

fórmico en agua, para los otros tratamientos se utilizó una mezcla con 20% de ácido propiónico. En otras investigaciones para validar el efecto antimicrobiano se han colocado 50 ml del inóculo obteniendo conteos de con  $10^5$  de UFC/ml de bacteria *Salmonella spp* (Crispín et al., 2019).

## 2.2 Producción de balanceados en el Ecuador

De acuerdo con los datos de la encuesta global sobre alimento balanceado en cuando a la cantidad de empresas, es necesario tener en cuenta a las asociaciones de fabricantes que actúan como representantes de múltiples productores, incluyendo tanto empresas como individuos. Un ejemplo de esto es la Asociación de Fabricantes de Alimento Balanceado (AFABA), que agrupa a 351 miembros, y la Asociación de Productores de Alimento Balanceado (APROBAL), que cuenta con 12 afiliados (Crespo, 2018).

Según el mapa de Industrias del Agro elaborado por el sistema de información del agro (Sinagap) del Ministerio de Agricultura y Ganadería, estas empresas se concentran principalmente en las provincias de Guayas, Pichincha y El Oro. Ecuador generó aproximadamente 2,5 millones de toneladas de alimento destinado a la alimentación animal, y dentro de esta cifra, se destacó la producción de alimentos específicamente diseñados para pollos en etapa de engorde, la acuicultura y las gallinas ponedoras. Estos sectores representaron el 80% de la producción total en el país (PRO ECUADOR, 2017).



**Figura 1. Producción estimada en Ecuador (2016)**

Fuente: (PRO ECUADOR, 2017)

## 2.3 Materias primas para la elaboración de alimentos balanceados

Los fabricantes de alimentos balanceados deben conseguir materias primas de calidad directamente del productor para obtener un buen producto final. Estos ingredientes

serán parte de la dieta de las especies que la consuman y se revisan previo al ingreso al proceso productivo, tomando en consideración factores como el olor, color, textura, humedad, homogeneidad, composición bromatológica y presencia de agentes extraños contaminantes (Chachapoya, 2014).

La fabricación de alimentos equilibrados requiere materias primas de alta calidad con las cantidades adecuadas de nutrientes, asegurando de esta manera que el producto final satisfaga los niveles nutricionales esenciales para el desarrollo y bienestar de los animales que luego serán incluidos en la alimentación de las personas (Muñoz, 2017).

## **2.4 Materias primas de origen animal**

Las proteínas animales que se encuentran en las harinas provienen de la transformación de materiales de mataderos que de otra manera serían desechados y no aptos para la venta como alimentos para las personas (BRF Ingredients, 2022).

Las harinas derivadas de subproductos animales presentan un nivel significativo de proteínas que oscila entre el 55% y el 65%. Son una destacada fuente de lisina, metionina y triptófano, y contienen aproximadamente un 5% de contenido graso. Además, estas harinas exhiben una alta concentración de minerales y mantienen una proporción beneficiosa de calcio a fósforo. Asimismo, poseen un alto contenido de vitaminas pertenecientes al grupo B (Montenegro, 2017).

## **2.5 Harina de carne y huesos**

Este tipo de harina se fabrica en instalaciones separadas especializadas en el procesamiento de grasas o en plantas de procesamiento de carne, y está principalmente constituida por huesos y tejidos de animales resultantes de la matanza de ganado vacuno, porcino y ovino. Constituye un componente valioso en términos de proteínas y minerales esenciales, como el calcio y el fósforo (BRF Ingredients, 2022).

El subproducto animal en cuestión contiene un 55% de proteína cruda (PC), un 7 a 10% de calcio (Ca) y un 3,8 a 5% de fósforo (P) (valores que pueden variar según la cantidad de hueso presente en las harinas). Para que la harina de carne y hueso sea adecuada, debe tener al menos un 50% de proteína, un mínimo del 4% de fósforo y un 8% de calcio, ya que los minerales se derivan de los huesos. Es esencial mantener una relación de calcio a fósforo de 2:1, ya que cualquier desviación en esta proporción señala cambios en la materia prima con otras fuentes minerales (Alfaro, 2010).

## **2.6 Harina Hidrolizada de Plumas**

La harina de plumas hidrolizada es un subproducto atractivo debido a su alto contenido de proteínas y su aumento en disponibilidad, impulsado por el crecimiento de la industria avícola. Se puede emplear como una fuente proteica en la dieta del ganado porcino. Independientemente de si se agrega sangre o de su origen, la harina de plumas contiene una cantidad mayor de energía que la inicialmente estimada, tanto en términos de digestibilidad como de metabolización (Pastor et al., 2018).

El proceso de desplume de aves en las instalaciones de procesamiento de carne genera un subproducto con un contenido significativo de proteínas. La harina hidrolizada de plumas contiene aproximadamente entre un 78% y un 92% de proteína cruda, que en su mayoría está compuesta por queratina en un rango del 85% al 95% (BRF Ingredients,

2022).

De acuerdo con (Nascimento et al., 2002), esta materia prima exhibe una digestibilidad insatisfactoria, lo cual se atribuye a los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas internas presentes en la estructura de la queratina. Para aumentar su digestibilidad y elevar su calidad, este componente puede someterse a procesos enzimáticos que liberan péptidos en su interior.

## 2.7 Harina de vísceras de pollo

Las vísceras de pollo provienen de los desechos de los mataderos (Alcívar, 2014), son un valioso recurso en la manipulación de los sistemas de producción, debido a su abundante contenido de proteínas, un componente esencial en las diversas fases de la cría de animales. La harina resultante tiene una digestibilidad de proteínas que varía entre el 75% y el 90%, y puede combinarse con otras harinas ricas en proteínas (Sepúlveda et al., 2005).

La harina de vísceras de aves es el resultado de cocinar, prensar y moler las partes internas de las aves, permitiendo la inclusión de cabezas y pies. No debe contener plumas, excepto las que puedan estar presentes de manera involuntaria, y no debe contener residuos de incubadoras u otras sustancias ajenas a su composición. Además, se debe evitar la contaminación con cáscaras de huevo (Yauri, 2013).

Las harinas derivadas de subproductos avícolas exhiben una tonalidad amarillo-marrón, una textura granulosa y ligeramente pastosa, con un pH de 6,03 y un aroma característico debido a la presencia de ácidos grasos libres. Debido a estas características, la harina de subproductos avícolas se destaca como una fuente excelente de proteínas y aminoácidos, además de contribuir a mejorar el aroma y sabor de los alimentos (Cumpa & Hereña, 2009).

### 2.7.1 Composición bromatológica

En la siguiente tabla se presenta la composición bromatológica de la harina de vísceras de pollo:

**Tabla 1**

#### **Composición bromatológica de la harina de vísceras blancas del pollo.**

<b>Parámetros</b>	<b>Porcentaje %</b>
<b>Proteína</b>	65-68 %
<b>Humedad</b>	9-12
<b>Grasa</b>	12-14 %
<b>Cenizas</b>	5-6 %
<b>Acidez (expresada como ácido láctico)</b>	1-2 %
<b>pH</b>	5,6–5,9 %
<b>Sólidos no solubles</b>	78,8 %
<b>Sólidos solubles</b>	21,2 %
<b>Calcio</b>	220 mg/kg
<b>Hierro</b>	56 mg/kg
<b>Fósforo (en forma de fosfato)</b>	5,732 g/kg
<b>Vitamina C</b>	200 ppm

**Fuente:** (Sepúlveda et al., 2005)

En la Tabla 2 se detalla el perfil de aminoácidos presente en la harina de vísceras de

pollo.

**Tabla 2**  
**Perfil de aminoácidos de la harina de vísceras de pollo.**

<b>Materia seca</b>	<b>92.4</b>	<b>%</b>
Arginina	4,21	mg/dl
Histidina	1,17	mg/dl
Isoleucina	3,43	mg/dl
Leucina	4,68	mg/dl
Lisina	3,04	mg/dl
Metionina	1,16	mg/dl
Fenilalanina	2,46	mg/dl
Treonina	2,23	mg/dl
Triptófano	0,55	mg/dl
Valina	2,81	mg/dl
Ácidos grasos saturados	32,6	%
Ácidos grasos insaturados	63,1	%
Ácidos grasos poli-insaturados	17,6	%
Ácido linoleico	16,5	%
Ácido linolénico	1,1	%
Energía metabolizante (EM)	2670	Kcal/kg

**Fuente:** (Alcívar, 2014)

### 2.7.2 Composición nutricional

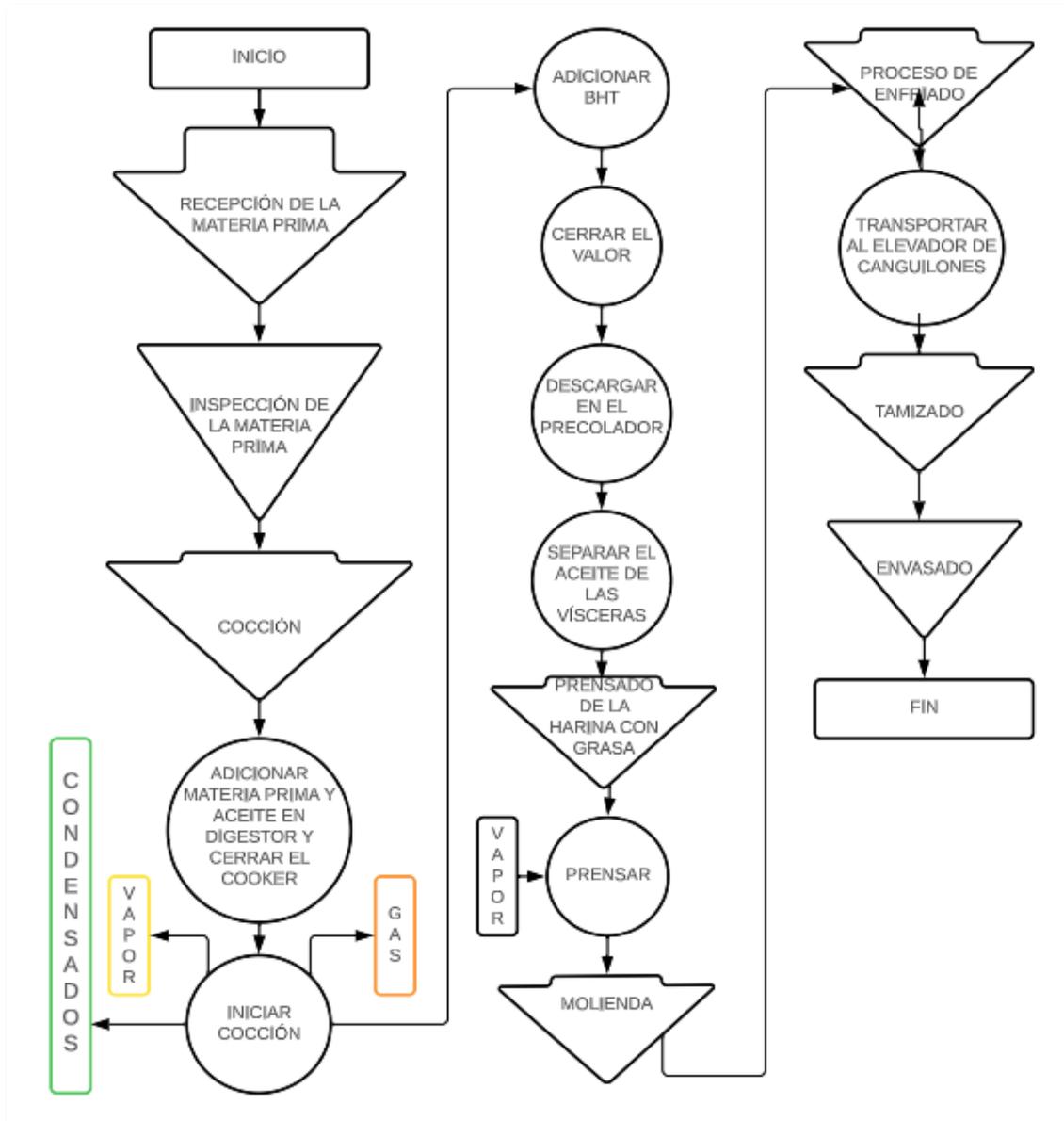
La harina de vísceras de aves es empleada como componente en la producción de alimentos balanceados destinados a animales no rumiantes. Se encuentra disponible en presentaciones de 50 kg o en forma a granel para su comercialización (Yauri, 2013). Las características de la harina de vísceras se presentan a continuación:

**Tabla 3**  
**Composición nutricional de la harina de vísceras.**

<b>Composición</b>	<b>%</b>
Humedad (máx.)	80,00
Extracto etéreo (mín.)	10,00
Materia mineral (máx.)	13,00
Acidez Exp en mEq de Na OH 0,1 N/100g (máx.)	6,00
Digestibilidad en pepsina 1:10000 al 0,7% en HCl 0,075 N(mín.)	75,00

**Fuente:** (Chambi, 2017)

En el diagrama de flujo del proceso de harina de vísceras de pollo se puede ver las etapas de proceso desde el inicio hasta el envasado



**Figura 2. Diagrama de flujo para la obtención de harina de vísceras de pollo.**

**Fuente:** (Castellón, 2019)

### 2.7.3 Descripción del proceso

En la línea de producción se utilizan no solo las vísceras de pollo obtenidas durante el proceso de sacrificio, sino también se procesan los pollos que no cumplen con los estándares de calidad, como aquellos que sufrieron ahogamiento o traumatismos. Además, se aprovecha la grasa, piel y huesos de estos animales sacrificados. Esta materia prima se almacena en una tolva y luego se pasa a un cooker, donde comienza el proceso de fritura para obtener harina de víscera y aceite de pollo. El aceite se filtra y se somete a una prensa. La harina resultante se despacha a granel a través de los silos de almacenamiento o se empaqueta en sacos para su transporte a la planta de alimentos balanceados (D. Rodríguez, 2023).

Los pasos del proceso para la obtención de harina de vísceras de pollo se describen a

continuación:

- **Recepción de la materia prima:**  
Después de completar el proceso de sacrificio de las aves, se recogen plumas, vísceras, sangre y otros componentes que se emplearán más adelante en la fabricación de la harina. Es fundamental eliminar el exceso de agua que proviene de la limpieza y el procesamiento previos. Se sugiere procesar los ingredientes de la harina lo más rápidamente posible para evitar que disminuya su calidad o aumente la cantidad de microorganismos presentes (Pauta et al., 2022).
- **Inspección de la materia prima**  
Conforme a lo planteado por los autores (Moquillaza & Ramírez, 2018) la primera etapa de inspección se realiza de forma organoléptica, mediante la observación de forma visual y olfativa. En esta etapa, se busca descartar la presencia de signos evidentes de descomposición o la presencia de agentes extraños, como solventes, pesticidas u otros materiales que puedan haber causado la muerte anormal de los animales.

A continuación, se lleva a cabo una inspección de la calidad de la materia prima, mediante la toma de muestras. Estas muestras deben estar libres de cualquier tipo de sustancia extraña, como metales, maderas, plásticos u otros utensilios utilizados en la cría o sacrificio de los animales (Moquillaza & Ramírez, 2018).

La evaluación sensorial es fundamental, ya que la presencia de un color que va del verde al negro indica un nivel significativo de descomposición. Estos productos no deben utilizarse, ya que afectarán negativamente el nivel de acidez y oxidación de los productos, especialmente el aceite (Ávalos, 2012).

Además, se verifica que no haya grandes cantidades de agua presente, ya que esto puede influir en el cálculo del rendimiento de producción. El peso del agua se considera como parte del peso del producto, lo que podría afectar la ratio de producción (Moquillaza & Ramírez, 2018).

- **Cocción de la materia prima**  
El término "cocimiento" se refiere al proceso de eliminar el agua de la materia prima mediante la aplicación de calor indirecto (Ávalos, 2012).

El digestor (cooker) es una máquina utilizada para procesar estas harinas, donde cocina los residuos empleando una fuente de calor. Su funcionamiento se asemeja al de una olla a presión, pero con la particularidad de contar con paletas internas que giran en una dirección durante el proceso y en otra dirección para extraer el (Chano, 2013).

En relación a los parámetros del proceso rendering, se requiere llevar a cabo la cocción a una temperatura mínima de 133 °C, con una presión superior a 0,3 bares y durante al menos 20 minutos continuos una vez que se alcanza la temperatura de 133 °C. Este proceso tiene como objetivo esterilizar el producto para detener la actividad enzimática y microbiana. Además, durante este proceso, se produce la coagulación de las proteínas y se libera la grasa de las células adiposas, junto con el agua (Moquillaza & Ramírez, 2018).

- **Prensado de la harina con grasa**  
De acuerdo con (Castellón, 2019) la prensa cuenta con un dispositivo mezclador que suministra gradualmente el material suelto a la máquina de prensado. Al mismo tiempo, se introduce vapor proveniente de la caldera para mantener caliente la

masa de víscera y facilitar la extracción del aceite.

En cuanto al proceso de separación, la prensa está diseñada con unos componentes internos en forma de tornillos que se encargan de comprimir el material y separar el aceite, el cual se dirige hacia un tanque con agitación. Mientras tanto, la masa prensada de vísceras se transporta desde la prensa hasta el molino utilizando un mecanismo de tornillo transportador (Castellón, 2019).

- Molienda

La harina de pollo es sometida a un proceso de molienda en un molino de martillos, lo que resulta en su pulverización y permite determinar el tamaño de las partículas (Pastor et al., 2018).

Después del prensado, se obtiene un bloque compacto que requiere ser molido en molinos de martillos para alcanzar el tamaño de partícula adecuado para su uso en la industria de alimentos balanceados (Ávalos, 2012).

- Proceso de enfriado

En esta fase, la enfriadora es responsable de reducir la temperatura de la harina a temperatura ambiente (35 °C) utilizando aire extraído del entorno. A continuación, el aire caliente atraviesa un dispositivo llamado ciclón, el cual se encarga de filtrar las partículas de harina suspendidas en el aire. Estas partículas son succionadas y recirculadas en el sistema para evitar su liberación al ambiente (Castellón, 2019).

Después, la harina llega a un elevador de cangilones desde la enfriadora, que la transporta hasta el mezclador de harina de vísceras. Este mezclador tiene la función de homogeneizar la harina con una sustancia química añadida, la cual controla el crecimiento biológico de microorganismos que podrían afectar la conservación del producto (Castellón, 2019).

- Tamizado

Después de ser molida, la harina de pollo se somete a un tamizado para eliminar las partículas más grandes, asegurando así la uniformidad del producto. Las partículas de mayor tamaño son recicladas y reintroducidas en el proceso (Pastor et al., 2018).

Algunas compañías que fabrican alimentos para mascotas y emplean harina de vísceras tienen preferencia por una harina de baja granulometría (con un máximo del 2% en el tamiz No. 10 Tyler). Sin embargo, algunos clientes o plantas de alimentos concentrados o balanceados no consideran este factor o no tienen parámetros específicos establecidos. Para lograr estos resultados (un máximo del 2% en el tamiz No. 10 Tyler), se utilizan mallas de 4 mm en los molinos de martillo (Ávalos, 2012).

- Envasado

Luego de procesar y separar la harina, es necesario que se enfríe antes de ser empacada en los sacos de polipropileno. Un aumento en la temperatura puede acelerar el proceso de oxidación de la harina debido a su contenido residual de grasas (Ávalos, 2012).

La harina de vísceras de pollo se empaca en sacos de 50 kg, destinados a la alimentación animal. Estos sacos se etiquetan y se guardan en un área especialmente acondicionada para su almacenamiento (Pastor et al., 2018).

### 2.7.4 Información microbiológica

La calidad microbiológica se refiere a un criterio de evaluación de riesgos que determina si un alimento es seguro o si un proceso o sistema de control de seguridad alimentaria es efectivo. Esto se determina mediante el muestreo y análisis de microorganismos, toxinas, metabolitos o marcadores relacionados con su capacidad patogénica, u otras características, en un punto específico de la cadena alimentaria (Chica & Salazar, 2022).

La cantidad de microorganismos presentes en este tipo de alimentos indica el nivel de contaminación durante su fabricación y almacenamiento, lo cual afecta directamente la calidad de la harina. Los recuentos de bacterias, levaduras, coliformes totales y coliformes fecales cumplen con los estándares microbiológicos internacionales establecidos para este tipo de productos, lo que demuestra un adecuado manejo e higiene durante la elaboración de la harina (REVITECA, 1996). Al existir el reglamento EC 183/2005 en higiene de piensos, el artículo 5 (3) indican que se deben cumplir criterios y objetivos microbiológicos específicos se ha considerado la norma INEN de harina de pescado como base para establecer los parámetros microbiológicos de la harina de pollo.

**Tabla 4**

#### Requisitos microbiológicos de la harina de pescado para consumo animal

Requisitos	Máximo ger/gramos
REP (recuento estándar en placa)	10 <sup>6</sup>
Coliformes	10 <sup>4</sup>
* Colifecales ( <i>E.coli</i> )	negativo
Hongos	10 <sup>4</sup>
<i>Salmonella</i>	neg/25
<i>Shigella</i>	neg/25

Fuente: (NTE INEN 472, 1988)

### 2.7.5 Criterios para evaluar la calidad de la harina de pollo

La calidad de la harina de pollo se determina mediante la evaluación de varios aspectos, como el contenido de proteínas, grasa, humedad, cenizas, parámetros oxidativos y la presencia de microorganismos, con el fin de garantizar su calidad (Meza & López, s/f).

Otro criterio que debe ser considerado son los conteos microbiológicos recomendados durante el proceso, almacenamiento y distribución, los cuales incluyen la ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* y *E. coli* (Susá & Vásquez, 2011).

## 2.8 Agentes antimicrobianos en alimentos

La ciencia de alimentos ha dado lugar a la aparición de numerosos compuestos químicos con propiedades antimicrobianas, entre los cuales destaca la sal de mesa como el agente más antiguo registrado y aún empleado en la conservación de productos cárnicos. Durante el siglo XX se originaron importantes avances en la conservación de alimentos mediante agentes químicos, lo que llevó a la revisión de los posibles efectos perjudiciales para la salud. En la actualidad, la industria alimentaria a nivel mundial utiliza una amplia gama de antimicrobianos, aunque su uso varía según las leyes alimentarias de cada país. La producción de estos compuestos genera una importante

fuerza de ingresos a nivel global, habiéndose observado un incremento anual del 4.1% en el consumo de antimicrobianos, siendo los sorbatos, propionatos y benzoatos los más utilizados. En los Estados Unidos, por ejemplo, se consumieron 37,5 millones de kilogramos de agentes conservadores en 1991, y esta cifra ha aumentado de manera constante desde entonces (E. Rodríguez, 2011).

La rapidez de la descomposición microbiológica no solo está determinada por los microorganismos presentes, sino también por la composición química del producto y el tipo de carga microbiana inicial. Los antimicrobianos son sustancias químicas que se añaden o se encuentran naturalmente en los alimentos, y su función es retrasar el crecimiento de los microorganismos o desactivarlos, lo que ayuda a prevenir el deterioro de la calidad y garantiza la seguridad del alimento (E. Rodríguez, 2011).

Muchos expertos coinciden en que la evaluación de aditivos alimentarios debe considerar un equilibrio entre los riesgos y beneficios asociados. En el futuro, se considerará beneficioso el uso de aditivos que cumplan varias funciones en los alimentos a los que se añaden. La actividad antimicrobiana de estos aditivos se debe a su capacidad para atacar diferentes componentes de los microorganismos, como la pared celular, la membrana celular, las enzimas metabólicas, la síntesis de proteínas y el sistema genético. Estos puntos son esenciales para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, por lo tanto, al ser atacados o inactivados, se reduce la velocidad de crecimiento de los mismos (E. Rodríguez, 2011).

De acuerdo con (E. Rodríguez, 2011) la mayoría de los agentes antimicrobianos utilizados en alimentos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos, pero no logran eliminar completamente su desarrollo. Esto limita la vida útil del producto en el estante, por lo que es necesario recurrir a otros factores de conservación que prolonguen su duración. Algunos antimicrobianos sintetizados químicamente que son reconocidos como seguros (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) son los siguientes:

- Ácido propiónico y propionatos: Utilizados para inhibir el crecimiento de mohos.
- Ácido sórbico y sorbatos: Empleados para controlar el desarrollo de mohos.
- Ácido benzoico y benzoatos: Utilizados contra mohos y levaduras.
- Parabenos: Utilizados para controlar el crecimiento de mohos y levaduras.
- Dióxido de azufre y sulfitos: Empleados para inhibir mohos, levaduras y bacterias.
- Óxido de etileno y de propileno: Utilizados para controlar mohos y levaduras.
- Diacetato de sodio: Utilizado para inhibir mohos y levaduras.
- Nisina: Utilizada contra bacterias ácido lácticas y clostridios.
- Nitrito de sodio: Empleado para controlar clostridios.

### **2.8.1 Ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos son frecuentes en el entorno natural y se hallan ampliamente dispersos como elementos constitutivos de vegetales y tejidos animales (Roth, 2000).

Se emplean ácidos orgánicos como conservantes de materias primas debido a sus propiedades antifúngicas y antibacterianas, lo que ayuda a disminuir la contaminación. Además, estos ácidos también pueden favorecer el crecimiento de microflora beneficiosa en el tracto digestivo (Lituma, s/f).

Los ácidos orgánicos son empleados como aditivos, principalmente como agentes acidificantes, a menudo en forma de sales de sodio, potasio o calcio, lo cual aumenta

su solubilidad en agua y mejora su aroma. Estos ácidos pueden ser añadidos tanto a los alimentos como al agua (Ardoino et al., 2017).

Es posible utilizar los ácidos orgánicos de manera individual o combinados en mezclas que contengan diferentes tipos de ácidos (Ardoino et al., 2017).

El pH es uno de los factores determinantes para el crecimiento de los microorganismos en los alimentos, incluyendo los ácidos orgánicos y los ésteres. Por lo general, las bacterias tienden a crecer en un pH cercano a la neutralidad (pH 6,5 a 7,5), aunque son capaces de soportar un rango de pH entre 4 y 9. Por otro lado, los mohos y las levaduras pueden crecer en un rango más amplio de pH, incluso por debajo de 3,5 (E. Rodríguez, 2011).

### 2.8.2 Clasificación

De acuerdo con (Santapaola, 2013) los ácidos orgánicos se clasifican en:

- Monocarboxílicos, también conocidos como monobásicos, están compuestos por un grupo carboxilo y son los más fuertes en términos de capacidad oxidante. Algunos ejemplos de estos ácidos son el ácido fórmico, propiónico, acético y butírico.
- Dicarboxílicos o bibásicos, contienen dos grupos carboxilo en su estructura. Ejemplos de este tipo de ácidos son el ácido fumárico, oxálico, malónico y glutárico.
- Polibásicos, son aquellos que tienen más de dos grupos carboxilo. Un ejemplo de este tipo de ácido es el ácido sulfúrico.
- Mixtos, los cuales poseen grupos adicionales como el alcohol o enlaces dobles.
- Grasos, son aquellos que contienen una gran cantidad de átomos de carbono en su estructura y se obtienen de las grasas y aceites vegetales.

### 2.9 Aplicación de ácidos orgánicos en la industria de producción animal

Los ácidos orgánicos son extensamente empleados en la industria alimentaria como suplementos. Se utilizan como elementos de ajuste para regular la alcalinidad en varios productos, pudiendo cumplir roles de amortiguadores o simplemente actuar como neutralizantes. Asimismo, en su capacidad de conservantes, pueden ejercer funciones antimicrobianas en lugar de antioxidantes (Juárez, 2020).

Los ácidos orgánicos ofrecen ventajas significativas para mejorar el desempeño en la producción animal, principalmente debido a sus propiedades antibacterianas. Esto se debe a que, en su forma no disociada, el hidrogenión ( $H^+$ ), disminuye el pH en el citoplasma, lo que obliga a la célula a gastar más energía para conservar su equilibrio osmótico, y el anión (A) interfiere con la síntesis de DNA, impidiendo la replicación de las bacterias. Por lo tanto, es más beneficioso agregar ácidos orgánicos de cadena corta con un pKa superior al pH fisiológico, ya que esto permite que una mayor cantidad de ácido en su forma no disociada pueda penetrar dentro del microorganismo (Shiva, 2007).

En contraste, la forma disociada de los ácidos es un anión que no puede atravesar la membrana plasmática de los microorganismos. Sin embargo, la forma no disociada de los ácidos puede ingresar al interior del microorganismo y, una vez allí, puede disociarse, impactando directamente en el pH intracelular de la bacteria y alterando su metabolismo. Como resultado, la bacteria aumenta sus niveles de  $Na^+$  y/o glutamato para contrarrestar el incremento de aniones de los ácidos, lo que conlleva a un aumento

en la fuerza iónica intracelular y en la turgencia. Este proceso ejerce una presión mecánica sobre la pared del microorganismo, que finalmente podría causar su ruptura. Tanto estudios de laboratorio (in vitro) como investigaciones en animales vivos (in vivo) han demostrado la efectividad de los ácidos orgánicos al inhibir bacterias Gram negativas, aunque su efectividad es menor en el caso de las Gram positivas. También se ha observado que estos ácidos pueden tener un efecto inhibitorio sobre hongos (Shiva, 2007).

### 2.9.1 Principales ácidos orgánicos.

Los ácidos orgánicos más ampliamente utilizados son el ácido fórmico, propiónico, butírico, láctico, acético, fumárico, cítrico, sórbico, HMTBa y benzoico. Estos ácidos pueden emplearse en su forma libre o como sales, que se asocian con amonio, calcio, sodio o potasio. Los ácidos orgánicos se consideran ácidos de naturaleza débil, lo que implica que presentan una fracción que se disocia en iones y otra que no lo hace, dependiendo del pH del entorno. El pKa (constante de disociación) representa el pH en el cual la reacción de disociación del ácido alcanza un equilibrio completo. El pH del medio influye en la proporción de disociación. A pH bajo, los ácidos orgánicos predominan en su forma no disociada, mientras que, en pH cercanos a la neutralidad, se inclinan hacia la disociación (López & Valverde, 2007).

A pesar de que los ácidos orgánicos tienen una capacidad limitada para acidificar tanto los piensos como el estómago, las cantidades requeridas para lograr esta acidificación se encuentran fuera de los niveles de uso convencionales de estos ingredientes. Por lo tanto, el papel principal de los ácidos orgánicos reside en su función como agentes antimicrobianos. Estos ácidos poseen propiedades bactericidas contra bacterias, hongos y levaduras (López & Valverde, 2007).

**Tabla 5**  
**Principales ácidos orgánicos en alimentación animal.**

Ácido		Fórmula	PM	pKa
Fórmico	L	H COOH	46	3,75
Acético	L	CH <sub>3</sub> COOH	60	4,76
Propiónico	L	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH	74	4,88
Butírico	L	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	88	4,82
Láctico	L	CH <sub>3</sub> CH(OH) COOH	90	3,83
Sórbico	P	CH <sub>3</sub> CH:CH CH:CH COOH	112	4,76
Fumárico	P	COOH CH:CH COOH	116	3,02
Málico	P	COOH CH <sub>2</sub> CH(OH) COOH	134	3,40
Tartárico	P	COOH CH(OH) CH(OH) COOH	150	2,93
HMTa	L	CH <sub>3</sub> S CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH(OH) COOH	150	3,53
Cítrico	P	COOH CH <sub>2</sub> C(OH)(COOH) CH <sub>2</sub> COOH	192	3,13

L/P: Fórmula líquida/polvo  
PM: Peso molecular  
pKa: Constante de disociación

**Fuente:** (López & Valverde, 2007)

La gran mayoría de los ácidos orgánicos empleados en la alimentación de animales, como el ácido fórmico, acético, sórbico, cítrico y propiónico, muestran una estructura alifática y desempeñan un papel como fuente de energía para las células. Cuando se añaden con precisión a la dieta equilibrada de los animales, pueden dar lugar a un aumento en el peso corporal, una mejora en la eficiencia de la conversión de alimentos

y una reducción en la proliferación de patógenos en el intestino (DSM, 2018).

La capacidad de los ácidos orgánicos para frenar el crecimiento de microorganismos depende de su valor de pKa, que indica el pH en el cual el ácido existe en un 50% en su forma disociada y no disociada. El poder antimicrobiano de los ácidos orgánicos radica únicamente en su forma no disociada, lo que les permite atravesar las barreras de bacterias y hongos sin perturbar su metabolismo. Esto implica que la efectividad antimicrobiana de un ácido orgánico es más alta en un entorno ácido. Por lo tanto, los ácidos con un alto valor de pKa son menos ácidos y, en consecuencia, actúan como conservantes más efectivos en alimentos equilibrados, ya que, al permanecer en su forma no disociada, pueden combatir las infecciones fúngicas y bacterianas. En contraste, en medios alcalinos, su efectividad disminuye debido a la conversión a su forma disociada Haga clic o pulse aquí para escribir texto.

La tabla que se presenta a continuación muestra la concentración mínima inhibitoria requerida de varios ácidos orgánicos frente a diversos microorganismos patógenos. De acuerdo con la información, el ácido propiónico, que presenta un alto valor de pKa, se emplea como agente conservante, mientras que el ácido fórmico se utiliza principalmente para mejorar la digestión (DSM, 2018).

**Tabla 6**  
**Concentración inhibitoria mínima (CIM) de diferentes ácidos orgánicos**

Microorganismo	Ácido fórmico (%)	Ácido propiónico (%)	Ácido láctico/ fumárico (%)
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,1	0,15	0,3
<i>Escherichia coli</i>	0,15	0,2	0,4
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,1	0,2	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,15	0,25	0,4
<i>Clostridium botulinum</i>	0,15	0,25	0,3
<i>Clostridium perfringens</i>	0,1	0,25	0,3

Fuente: (DSM, 2018)

Estos valores muestran la acción de los ácidos orgánicos contra las bacterias Gram negativas y Gram positivas, esta determinación es in vitro.

### 2.9.2 Ácido fórmico

El ácido fórmico, también denominado ácido metanoico (HCOOH), el ácido orgánico más elemental, presenta dos estructuras conformacionales, cis y trans, las cuales difieren en la disposición relativa del átomo de hidrógeno. En condiciones normales, se observa que la forma trans es la más estable, lo que la convierte en la variante predominante tanto en nuestro planeta como en el espacio (San Frutos, 2019).

El ácido fórmico se presenta como un líquido incoloro altamente corrosivo, con un intenso olor acre. Es un ácido orgánico compuesto por un solo átomo de carbono en su estructura molecular, cuya fórmula química es CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pertenece al grupo de los ácidos carboxílicos, los cuales se caracterizan por tener en común un grupo funcional denominado grupo carboxílico (-COOH). Este grupo funcional se caracteriza por la presencia simultánea de un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo carbonilo (-C=O) unidos al

mismo átomo de carbono (González et al., 2016).

El uso del ácido fórmico está prohibido en la Unión Europea para tratar granos con alta humedad y almacenamiento aerobio, ya que el conservante contiene más del 40% de ácido (DSM, 2018).

### 2.9.3 Ácido propiónico

El ácido propiónico tiene propiedades antimicóticas y también es efectivo contra ciertas bacterias que no pueden descomponer un ácido graso de tres carbonos, lo que lleva a su acumulación en las células de estos microorganismos y compite con los sustratos de las enzimas (UAM, 2012).

En la industria, el ácido propiónico se obtiene mediante la reacción de oxidación al aire del propanal. Asimismo, se genera de forma natural mediante la descomposición metabólica de ácidos grasos con carbonos impares y ciertos aminoácidos. Las bacterias pertenecientes al género *Propionibacterium* lo producen como un producto final en su metabolismo anaeróbico. Estas bacterias son comúnmente encontradas en el rumen. El ácido propiónico se utiliza como agente conservante en alimentos, ya que inhibe el crecimiento de moho y algunas bacterias. En la alimentación de animales, se emplea directamente o en forma de sal de amonio (Chilón, 2017).

De acuerdo con (UAM, 2012) la regulación de la Unión Europea ha asignado los siguientes códigos de aditivos alimentarios al ácido propiónico y sus sales:

- Ácido propiónico: E 280
- Propionato sódico: E 281
- Propionato cálcico: E 282
- Propionato potásico: E 283

### 2.9.4 Ácido fumárico

El ácido fumárico es un compuesto orgánico insaturado con dos grupos carboxilo, que tiene múltiples aplicaciones en la industria de alimentos debido a su composición molecular. Entre sus usos se encuentran como agente reductor, mejorador de consistencia, regulador de acidez y levadura. En ciertas ocasiones, este ácido se encuentra de forma natural en la fumaria, una planta conocida como *Fumaria officinalis* L., de donde obtiene su denominación (Novillo, 2020).

El ácido fumárico, en forma de prismas monoclinicos incoloros, presenta propiedades específicas. Tiene un punto de fusión de 287 °C y al alcanzar el estado líquido, hierve a 290 °C. Aunque es prácticamente insoluble en agua fría, muestra una notable solubilidad en agua caliente. En concreto, a 25 °C y 100 °C, su solubilidad en 100 ml de agua es de 0,7 gramos y 9,8 g respectivamente. Además, se disuelve fácilmente en alcohol (Giraldo, 2013).

### 2.9.5 Mecanismo de acción

La capacidad de los ácidos orgánicos para combatir los microorganismos está vinculada al pH, y la forma no disociada del ácido desempeña un papel principal en la inhibición de dichos microorganismos (Santapaola, 2013).

La actividad antimicrobiana se origina en la capacidad de los ácidos orgánicos para disociarse. En su forma no disociada, las moléculas de ácido pueden atravesar las paredes celulares de las bacterias Gram negativas con facilidad. Dentro de la célula, el pH es más alto que el valor de pKa del ácido, lo que resulta en una disociación significativa del ácido y la liberación de iones de hidrógeno ( $H^+$ ). Para expulsar estos iones de hidrógeno ( $H^+$ ), la célula microbiana debe consumir una cantidad sustancial de energía, lo que eventualmente conduce a la muerte celular. Para lograr un efecto óptimo de los ácidos orgánicos contra los patógenos, es esencial que la molécula de ácido y el agente patógeno entren en contacto directo. Esto implica que el ingrediente activo de los ácidos orgánicos debe llegar al lugar donde se encuentran los patógenos, que puede ser en el alimento balanceado u otro medio (DSM, 2018).

Los ácidos orgánicos ejercen dos tipos de efectos sobre los microorganismos. En primer lugar, su acidez inherente provoca una disminución del pH en el entorno extracelular, lo que resulta en un efecto antimicrobiano. El segundo tipo de efecto, más relevante en la práctica, se debe a su forma no disociada, lo que les permite atravesar las membranas celulares y generar una reducción en el pH dentro de las células. Las bacterias entéricas, como *E. coli* y *Salmonella*, solo pueden crecer en entornos con un pH cercano a la neutralidad (neutrófilos), y dado que la escala de pH es logarítmica, incluso una disminución de una o dos unidades (equivalente a un aumento de 10 a 100 veces en la concentración de protones) tiene un impacto significativo en la proliferación de los microorganismos (Anangonó, 2014).

Los protones ( $H^+$ ) disminuyen el pH interno y, dado que las bacterias sensibles al pH no toleran grandes diferencias entre el pH interno y externo, se activa un mecanismo específico llamado bomba de  $H^+$  - ATPasa, que restablece el pH interno a su nivel normal. Este proceso requiere energía y, con el tiempo, puede detener el crecimiento e incluso provocar la muerte de la bacteria (González et al., 2013).

### 2.9.6 Efectividad de los ácidos orgánicos

De acuerdo con los autores (Meza & López, s/f) la efectividad de los antibacterianos es medida de las siguientes formas:

Mediante la medición de microorganismos indicadores, como:

- Bacterias mesófilas aerobias
- Coliformes totales
- *Salmonella*
- *Clostridium*
- Coliformes fecales
- *E. coli*

Usando la detección residual de ácidos orgánicos en las harinas, como:

- Ácido propiónico
- Ácido fórmico
- Ácido fumárico

## 2.10 Microorganismos patógenos

Se tiene conocimiento de que alrededor de 40 patógenos distintos transmitidos por alimentos son responsables de enfermedades en seres humanos. La mayoría de los casos confirmados y las muertes asociadas a estos patógenos se atribuyen a bacterias, superando el 90%. Entre las bacterias más comunes se encuentran *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus* y *Campylobacter jejuni*. Sin embargo, es importante destacar que aproximadamente el 98% de los microorganismos presentes en los alimentos no son patógenos. Por esta razón, es necesario desarrollar pruebas de diagnóstico que puedan identificar específicamente el microorganismo de interés (Palomino & González, 2014).

**Tabla 7**

**Microorganismos más relevantes en términos de enfermedades transmitidas por alimentos, clasificados según la gravedad de la enfermedad que causan o la cantidad de casos que generan.**

Microorganismo	Efecto	Origen
<i>Campylobacter jejuni</i>	Causa más común de diarrea.	Carnes y pollos crudos o mal cocinados, leche cruda, agua sin tratamiento.
<i>Clostridium botulinum</i>	Produce botulismo, parálisis muscular.	Alimentos preparados en el hogar, aceite de hierbas.
<i>Escherichia coli</i>	Los síntomas incluyen calambres en el abdomen y diarrea, conocida como colitis hemorrágica. Además, pueden presentarse fiebre y vómitos.	Alimentos que consisten en carne molida cruda o insuficientemente cocida, leche no pasteurizada y vegetales que han sido contaminados por materia fecal.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Causa listeriosis, enfermedad grave.	Suelo, agua, productos lácteos, carne cruda o mal cocida, pollos y productos del mar frescos o en conserva.
<i>Salmonella</i>	Segunda causa más común de enfermedades transmitidas.	Huevos crudos y mal cocidos, carnes y pollos mal cocidos, productos lácteos, mariscos, frutas y vegetales.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Produce vómitos después de la ingestión.	Alimentos cocinados con alto contenido de proteínas como jamón cocido, ensaladas, pasteles, lácteos.

<b><i>Shigella</i></b>	Causa enfermedades diarreicas.	Cerdo, productos lácteos, alimentos mal cocidos.
<b><i>Vibrio vulnificus</i></b>	Causa gastroenteritis y septicemia primaria.	Mariscos crudos o mal cocidos.
<b><i>Yersinia enterocolitica</i></b>	Causa yersiniosis, diarrea y/o vómitos.	Cerdo, productos lácteos, alimentos agrícolas.
<b><i>Toxoplasma gondii</i></b>	Parásito que causa toxoplasmosis.	Carnes, principalmente de cerdo.

Fuente: (Fuente & Barboza, 2010)

### 2.10.1 *Salmonella*

Las bacterias *Salmonella*, miembros de la familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos que pueden funcionar como anaerobios facultativos. No forman esporas y generalmente son móviles gracias a flagelos peritricos. Estas bacterias son mesófilas, lo que significa que pueden crecer en un rango de temperatura de 5 a 46 °C, con una temperatura óptima de crecimiento de 35 °C a 37 °C. Sin embargo, son sensibles al proceso de pasteurización, el cual las destruye. Presentan una alta sensibilidad a pH igual o menor a 4,5 y pueden resistir durante varios días en condiciones de congelación y deshidratación. Son capaces de multiplicarse en diversos tipos de alimentos (Correa, 2018).

Es una enterobacteria de gran relevancia en términos de salud pública, ya que puede provocar trastornos en el tracto gastrointestinal y septicemia tanto en humanos como en diversas especies animales. Es un microorganismo de alta importancia debido a su amplia capacidad patógena (Pinto, 2018).

#### 2.10.1.1 Características de crecimiento y supervivencia de *Salmonella*

El género *Salmonella* comprende microorganismos robustos que pueden adaptarse con facilidad a condiciones extremas del entorno (A. Dos Santos, 2007).

En la siguiente tabla se muestran las condiciones límites de pH, temperatura y actividad del agua ( $A_w$ ) para el crecimiento de este microorganismo.

**Tabla 8**

**Condiciones que limitan el crecimiento de *Salmonella***

Condiciones	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura °C	5,2	35 a 43	46,2
pH	3,8	7 a 7,5	9,5
$A_w$	0,94	0,99	>0,99

Fuente: (ICMSF, 1980)

## 2.10.2 *Escherichia Coli*

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, esta bacteria es un bacilo gram negativo no esporulado. Puede ser móvil, gracias a flagelos peritricos, o inmóvil. Es un organismo aerobio facultativo que puede crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin adición de NaCl. Es capaz de fermentar y oxidar glucosa u otros carbohidratos en medios de cultivo. También es positiva para la catalasa y negativa para la oxidasa, reduce los nitratos a nitritos y presenta una proporción de G+C en su ADN que varía entre el 39% y el 59% (Nagua, 2016).

Se han identificado seis grupos patógenos de *Escherichia Coli* (*E. coli*) basados en sus características fenotípicas y factores de virulencia específicos, incluyendo *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* de adhesión difusa (DAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Soto et al., 2016).

Estos grupos patógenos de *E. coli* han sido detectados en diversos alimentos, como carnes, productos lácteos, pescados, mariscos, bebidas, hielo, leguminosas y sus derivados (Soto et al., 2016).

### 2.10.2.1 Características de crecimiento y supervivencia de *E. coli*

Las bacterias STEC tienen la capacidad de desarrollarse en un rango de temperaturas que va desde los 7 °C hasta los 50 °C, siendo su temperatura ideal de crecimiento de 37 °C. Además, pueden multiplicarse en alimentos con acidez y salinidad, llegando hasta un 6% de concentración de sal (NaCl), así como en alimentos con una actividad de agua mínima de 0,95. Estas bacterias pueden mantenerse viables durante meses en el estiércol, lo que puede llevar a la contaminación de fuentes de agua superficial, como el agua de bebida y riego, así como a la contaminación de verduras, frutas y la superficie de tierras de cultivo (ELIKA Fundazioa, 2022).

**Tabla 9**

**Condiciones de crecimiento de *E. coli***

Condiciones	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura °C	7	37	50
pH	4,4	6 a 7	10
$A_w$	0,95	0,995	--

Fuente: (OMS, 2018)

## 2.11 Cinética de la muerte microbiana por acción de sustancias bactericidas

La cinética de la muerte microbiana es un campo de estudio importante en la microbiología y la industria alimentaria. Se refiere al estudio de cómo los microorganismos, como las bacterias, mueren o son inactivados con el tiempo en respuesta a diferentes factores y condiciones ambientales. Esto es esencial para comprender cómo los procesos de conservación de alimentos funcionan y cómo se pueden mejorar (CSA, 2021).

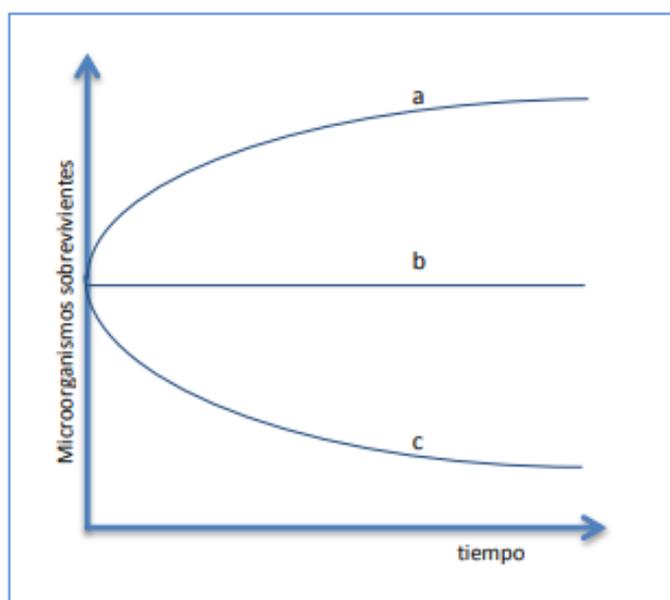
De acuerdo con los autores (Cerra et al., 2013) entre estos factores se encuentran:

### Efecto final deseado

Cuando se trabaja con agentes antimicrobianos de uso externo, se tienen dos tipos de respuestas:

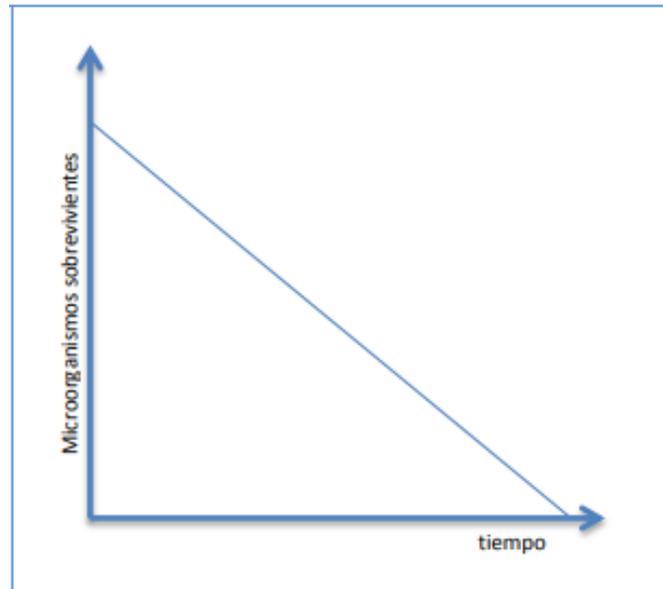
- a) Cuando los microorganismos entran en contacto con un agente, dejan de replicarse (su cantidad permanece constante) sin morir. Este fenómeno se conoce como efecto biostático (ya sea bacteriostático, fungistático o biostático).
- b) Cuando los microorganismos se exponen al agente durante cierto periodo de tiempo, experimentan una disminución significativa en su capacidad de sobrevivir, lo que resulta en una reducción en su cantidad, es decir, ocurre la muerte de los microorganismos. A esto se le denomina efecto biocida (ya sea bactericida, fungicida o viricida).

El objetivo de la desinfección es disminuir la cantidad de microorganismos presentes, lo que implica el empleo de agentes biocidas. En la siguiente figura se representan: a) el incremento en la población, b) la acción biostática que inhibe el crecimiento de los microorganismos, y c) la eliminación de los microorganismos o el efecto biocida.



**Figura 3. Diferencia entre biocida y el efecto biostático**

Fuente: (Cerra et al., 2013)



**Figura 4.  $\log N_s$  vs tiempo; tiempo de contacto**

Fuente: (Cerra et al., 2013)

### Tiempo de contacto

Para abordar el estudio de la cinética de la destrucción de microorganismos por biocidas se representa como una reacción de primer orden. De acuerdo con los autores (Cerra et al., 2013) la velocidad de la reacción en cada punto de la curva de muerte está directamente relacionada con la concentración de uno de los reactivos. Conforme con (Herrera, 2016) se puede expresar con la siguiente ecuación:

$$\text{Log} \left( \frac{N_f}{N_0} \right) = -kt$$

Dónde:

- $N_0$  = número de microorganismos iniciales
- $N_f$  = número microorganismos supervivientes al tiempo  $t$
- $t$  = tiempo de contacto entre la sustancia bactericida y el microorganismo
- $k$  = velocidad específica de muerte ( $\text{min}^{-1}$ )

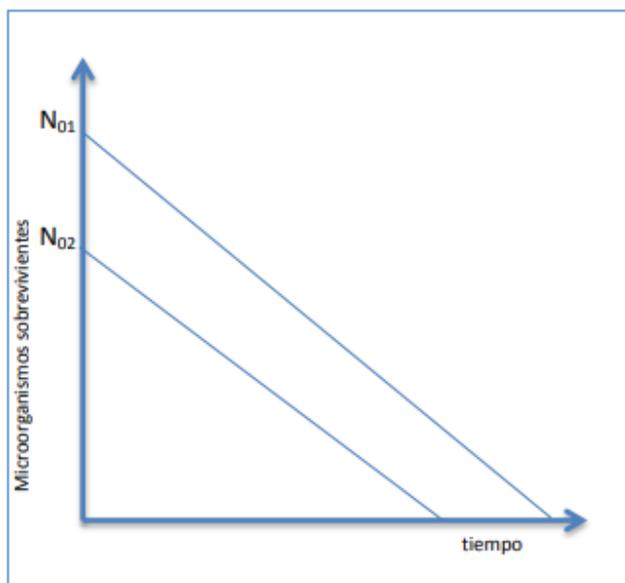
Cuando representamos gráficamente  $\text{Log } N_f$  en función del tiempo, idealmente obtenemos una línea recta, como se ilustra en la Figura 4. En esta cinética, es esencial tener presente que la desinfección no se produce de manera instantánea; requiere un tiempo mínimo para lograr una efectividad completa (Cerra et al., 2013).

### Carga microbiana

La duración del proceso no es inmediata y está influenciada por la cantidad de microorganismos presentes, que se corresponde con el valor  $N_0$  en la ecuación previa. Esto permite visualizar cómo se distingue el comportamiento entre dos poblaciones

iniciales.

En la Figura 5, se puede notar que ambas poblaciones exhiben un comportamiento idéntico, ya que comparten la misma pendiente o velocidad de disminución. Sin embargo, es necesario un período de tiempo más prolongado para eliminar una población más grande.



**Figura 5. log  $N_s$  vs tiempo**

Fuente: (Cerra et al., 2013)

## 2.12 Eficiencia bactericida

Según lo dispuesto por (Herrera, 2016) la cantidad de bacterias que son destruidas por la acción de la solución desinfectante y se expresa mediante la siguiente expresión:

$$Eficiencia \% = \left( \frac{N_o - N_f}{N_f} \right) \times 100$$

Dónde:

$N_o$  = número inicial de microorganismos

$N_f$  = número final de microorganismos supervivientes al tiempo  $t$

# CAPÍTULO 3

## 3. METODOLOGÍA

La metodología propuesta para el presente proyecto se efectuó como se muestra a continuación:

### 3.1 Muestreo

El muestreo se lo realizó de forma aleatoria simple, tomando en consideración que el tamaño de los lotes fue de 400 sacos de 50 kg. de harina de pollo de acuerdo con lo dispuesto por la normativa técnica ecuatoriana (NTE INEN 463, 1980) a una temperatura ambiental media de 29 °C, este muestreo forma una muestra compuesta, previo a la aplicación del agente antimicrobiano en un lote de harina de pollo envasada como ingrediente para el desarrollo de alimentos balanceados (Casal & Mateu, 2003).

De la misma forma se toma la muestra para la investigación propuesta a la cual se le va a inocular las bacterias patógenas (*Salmonella* y *E. coli*) y los ácidos orgánicos, la muestra compuesta es separada en sacos nuevos simulando el material de envase donde estaría almacenada antes de las pruebas.

Los 6 lotes de harina de vísceras de pollo también se les analizó sus características bromatológicas, mediante métodos normalizados. La proteína se efectuó con el método AOAC 984.13, humedad método REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (A), grasa método REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (H), ceniza por el método AOAC 942.05, estas pruebas permiten evaluar las características bromatológicas de la materia prima, los resultados se muestran en la tabla 10.

Los requisitos bromatológicos de la harina de vísceras de pollo se muestran a continuación:

**Tabla 10**  
**Especificaciones bromatológicas requeridas para la harina de vísceras de pollo**

<b>Características</b>	<b>Especificación</b>	<b>Unidad</b>	<b>Método</b>
<b>Proteína</b>	Mín. 65% (+1,-1)	g/100g	AOAC 984.13
<b>Grasa</b>	Mín. 12% - Máx. 15%	g/100g	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (H)
<b>Humedad</b>	Máx. 8	g/100g	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (A)
<b>Ceniza</b>	Máx. 15%	g/100g	AOAC 942.05

Fuente: (Agromat, 2014)

### 3.2 Preparación de la muestra

De la muestra compuesta homogénea se pesaron 250 gramos de harina de víscera de pollo en fundas con sus respectivas replicas, la harina fue esterilizada a 121 °C por 20

minutos, se realizó el control microbiológico de la misma antes y después de este proceso para evidenciar que no existe competencia microbiana al inocular las cepas patrón (Correa, 2018).

### **3.3 Preparación de los ácidos orgánicos**

En la elaboración de la solución a base de ácidos orgánicos de acuerdo con lo indicado por los autores (Hernández et al., 2017) se determinó la concentración del 5% de cada ácido en agua destilada estéril. Posteriormente se mezclaron las 3 soluciones en proporciones iguales para obtener 150 ml.

En la harina de vísceras de pollo se agregó la solución antimicrobiana al 0,5; 0,75 y 1% de la mezcla de los tres ácidos, para procurar que homogéneamente se disperse esta solución se extendió la harina y sobre ella se colocó la mezcla de ácidos orgánicos y luego se mezcló en forma manual por un periodo de 6 minutos.

### **3.4 Preparación de las cepas**

Se utilizaron las cepas ATCC 25922 de *E. coli* y ATCC 14028 de *Salmonella* cuyo proveedor es la empresa Microbiologics. Las cepas liofilizadas fueron reactivadas en caldo infusión cerebro corazón por 3 horas antes de su uso y luego para mantenerlas se sembraron en TSA (Trypticase soy agar), el agar se colocó en tubos en forma inclinada para su posterior uso en la harina de pollo, la temperatura de incubación es de 35 °C por 24 horas.

### **3.5 Preparación del inóculo a 0,5 Mc Farland**

Para la preparación del inóculo se debió colocar en un tubo de dilución de agua de peptona o buffer fosfato una asada de la bacteria que ha crecido en el TSA a 35 °C por 24 horas, esta mezcla debe contrastarse con un patrón 0,5 Mc Farland, el mismo que tiene un determinado grado de turbidez. Mediante este método se pudo considerar que la carga bacteriana a inocular se encontraba en un rango de  $1,5 \times 10^8$  (Gayathiri et al., 2018).

### **3.6 Microbiología**

Las pruebas fueron realizadas en el laboratorio Daster Consultores, ubicado en la ciudad de Guayaquil, utilizando la metodología establecida en el Bacteriological Analytical Manual, capítulo 5 de la (FDA, 2023). Método standard ISO 6579 para *Salmonella* donde se va a evaluar la presencia o ausencia en 25 gramos y la metodología descrita por el Bacteriological Analytical Manual (BAM), capítulo 4 de la (FDA, 2020) para *E. coli* mediante el método del Número Más probable (NMP).

Se ejecutaron los controles microbiológicos respectivos posterior a la aplicación de la solución antimicrobiana luego de 1 día, a los 5 días, a los 10 días y a los 20 días tomando como referencia los requisitos de la normativa nacional vigente para harinas de pescado (NTE INEN 472, 1988).

### 3.6.1 Método para la detección de *Salmonella* – BAM /FDA Capitulo 5

#### Pre-enriquecimiento

Se pesó asépticamente con ayuda de un mechero bunsen, 25 gramos de muestra en un recipiente de mezcla estéril. Se adicionó 225 ml de caldo de lactosa estéril a temperatura ambiente con el frasco bien tapado. Se llevó a la incubadora a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas (ISO 6579, 2020).

#### Enriquecimiento

Después de la incubación se tomó 1 ml de la mezcla de la etapa de pre-enriquecimiento y se llevó a un tubo con 10 ml de Caldo Tetrathionato, el mismo que se preparó con agua estéril y no autoclavada, como lo indica se colocó una solución de Yodo y yoduro de potasio para inhibir el crecimiento de las bacterias gram positivas. Se llevó a una incubadora durante 24 horas a  $35 \pm 2$  °C (ISO 6579, 2020).

#### Aislamiento en agar selectivo

Del tubo de tetrathionato después del tiempo de incubación se siembro por estría y agotamiento con un asa redonda llena (alrededor de 3 µl) sobre Agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato). Se lleva la placa sembrada e invertida a la incubadora por 24 h a 37 °C.

Para el reconocimiento de colonias típicas se observa el color de éstas sobre el agar XLD, distintivamente negras o rojas oscuras con o sin centro negro (ISO 6579, 2020).

#### Pruebas bioquímicas de confirmación

Tras el hallazgo de colonias típicas de *Salmonella*, se seleccionaron dos para realizar las pruebas bioquímicas en TSI (Hierro triple azúcar) y LIA (Lisina hierro agar) empleando tubos con el agar inclinado, donde se va a sembrar en superficie y por picadura, provocando que el crecimiento sea aerobio y anaerobio (ISO 6579, 2020).

De la caja Petri donde se encuentra la colonia sospechosa se toma cuidadosamente desde la superficie el centro de esta con un asa en punta y se la siembro en el TSI en profundidad y estría en superficie, sin flamear el asa se inóculo el tubo de agar LIA, en profundidad y por estría en la superficie. La prueba de los agares diferencias TSI y LIA indico la presencia de alcalinidad en la superficie y acidez en la parte inferior provocando que el tubo cambie de naranja a un color rojo en la superficie y amarillo en el fondo por acción del indicador de cambio de pH, la salmonella es capaz de producir CO<sub>2</sub> y gas sulfhídrico por este motivo el tubo puede verse ennegrecido. En el caso del agar Lisina la reacción es acido en la superficie y acido en el fondo, así mismo puede existir presencia de CO<sub>2</sub> y gas sulfhídrico (ISO 6579, 2020).

#### Prueba de urea

La colonia sospechosa también fue sembrada en el caldo urea que se preparó con agua estéril sin autoclavar, mediante esta prueba bioquímica se descarta la presencia de *Salmonella* si la prueba es positiva es decir cambia el color del medio a fucia. Por este motivo el tubo con 5 ml de caldo urea no debe cambiar de color (FDA, 2023).

#### Prueba de la oxidasa

Esta prueba bioquímica es un método diagnóstico que evidencia la presencia del complejo enzimático denominado citocromo c oxidasa. Este sistema induce la transformación del citocromo reducido a oxidado, ya que capta el oxígeno, y este, a su

vez, actúa como último aceptor de electrones ( $H^+$ ) en la cadena respiratoria. La *Salmonella* es oxidasa negativa (FDA, 2023).

### **Prueba del ONPG**

$\beta$ -galactosidasa (ONPG). Esta prueba demuestra la presencia de la enzima  $\beta$ galactosidasa. Hay bacterias que a pesar de poseer enzimas que hidrolizan la lactosa ( $\beta$  - galactosidasas), no pueden actuar sobre ella porque les faltan las enzimas extracelulares apropiadas (permeasas). Para conocer si un microorganismo es productor de  $\beta$ -galactosidasa, basta añadir el compuesto orgánico O-nitrofenil  $\beta$ -galactosidasa (ONPG) que es incoloro. Si la bacteria posee las enzimas hidrolizantes ( $\beta$ -galactosidasa), el compuesto se transforma en O-Nitrofenol, un derivado cromogénico de color amarillo. Todas las bacterias fermentadoras lentas de la lactosa son  $\beta$  -galactosidasa positivas (FDA, 2023).

### **3.6.2 Método para la detección de *E. coli* (BAM/ FDA) método del número más probable**

#### **Prueba de coliformes totales**

Se pesaron 25 gramos de harina de víscera a la que se añade 225 ml de agua de Peptona para efectuar una dilución. La mezcla se logró manejar más fácilmente en una funda estéril y se agitó bien durante un par de minutos empleando el stomacher en una dilución de  $10^{-1}$  (FDA, 2020).

Se preparó diluciones consecutivas en tubos diferentes con 1 ml de esta mezcla en tubos con 9 ml de agua de peptona, así se obtiene diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ . Se usó al menos 3 diluciones consecutivas para inocular 1 ml de cada dilución en 3 tubos Lauril Sulfato Triptosa para un análisis de NMP de 3 tubos con tubos de Durham invertidos para observar la presencia o ausencia de gas. No debieron transcurrir más de 15 minutos desde que se mezcla la muestra hasta que se inoculan todas las diluciones en el medio apropiado (FDA, 2020).

Se lleva estos tubos LST a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  a la incubadora por  $24 \pm 2$  horas para detectar gas y turbidez, es decir, Movimiento del líquido en el recipiente de fermentación o producción de burbujas cuando se agitan los tubos con delicadeza. A las 24 h se anota las reacciones, de turbidez, efervescencia y presencia de gas, los tubos positivos deben ser separados para hacer una prueba confirmatoria ya que son presuntamente positivos (FDA, 2020).

Para detección de *E. coli*, también se puede usar Petrifilm, donde se reporta presencia o ausencia de la bacteria en la muestra, no de manera cuantificada.

#### **Prueba confirmada para coliformes fecales**

De cada tubo de gasificación de LST se transfirió un asa llena de suspensión a un tubo de caldo EC, Se efectuaron los cálculos de acuerdo con una tabla estadística, reportándose como NMP de coliformes totales. En función de la proporción de tubos LST gaseados confirmados durante 3 diluciones consecutivas. Se llevó a incubadora a los tubos EC durante  $24 \pm 2$  horas a  $44,5 \text{ }^\circ\text{C}$  y se examinó la producción de gas y turbidez (FDA, 2020).

### Prueba confirmada para *E. coli*

Se retiró un asa llena de caldo EC y se sembró para aislar la bacteria de interés en una placa de agar Eosina azul de metileno (EMB) y se llevó a incubar durante 18 a 24 horas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al término se observaron las placas en busca de colonias sospechosas de *E. coli*, es decir, de centro oscuro y planas, con o sin brillo metálico. Estas colonias se pasaron a una prueba bioquímica para identificación de *E. coli* (FDA - BAM, 2023).

### 3.7 Método para la identificación de *E. coli*

La identificación de la *E. coli* se realizó mediante la prueba IMVC, mediante la cual se realizó la prueba de Indol, rojo de metilo, Voges Proskahuer y Citrato. La *E. coli* biotipo I es Indol positivo, rojo de metilo positivo, Voges Proskahuer y Citrato negativo, el biotipo II es indol negativo, rojo de metilo positivo, Voges Proskahuer y Citrato negativo (FDA, 2020).

### 3.8 Recursos

- Mandil.
- Guantes de Nitrilo.
- Mascarilla.
- Conservantes (ácido propiónico, ácido fórmico y ácido fumárico).
- Harina de pollo
- Cepas Mc Farland (*Salmonella* y *E. coli*).
- Contador de colonias J&G Scientific
- Matraces Erlenmeyer estériles de 500 ml
- Vasos de precipitación estériles de 250 ml
- Embudos de vidrio estériles.
- Varillas esparcidoras de vidrio estériles
- Balanza digital
- Incubadora Drawell  $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Stomacher
- Cabina de flujo laminar Drawell
- Fundas estériles
- Fundas ziploc slider
- Refrigerador
- Cucharas estériles
- Placas Petri estériles 15 x 100 mm desechables
- Pipetas estériles 1, 5 y 10 ml
- Micropipetas y puntas
- Aguja de inoculación y asa de inoculación de platino
- Tubos de ensayo estériles 16 x 150 mm y 20 x 150 mm
- Gradillas para tubos de ensayo
- Botellas de pirex estériles de 250 ml y 1000 ml
- Probeta graduada estéril
- Autoclave Biobase
- Tubos de Durham
- Mechero de Bunzen

### 3.9 Medios de cultivo y reactivos

- Agua destilada estéril
- Agua de Peptona TM Media
- Lauryl Sulfato TM Media
- EC Broth TM Media
- Petrifilm *E. coli* coliformes 3M
- EMB Agar TM Media
- XLD Agar NEOGEN
- TSI Agar TM Media
- LIA Agar TM Media
- Lactosa Caldo TM Media
- Tetrathionato Caldo
- Verde brillante
- Mc Farland 0,5 Standard
- TSA (Trypticase soy agar)

### 3.10 Diseño experimental

Durante esta investigación el diseño factorial propuesto permite observar el efecto conservador de los ácidos propuestos. Se realizó un diseño experimental factorial 4x3 con 2 repeticiones mediante el uso del software Minitab. Se utilizaron además 4 muestras control con presencia de por cada microorganismo (*Salmonella* y *E. coli*) para este estudio. Los resultados obtenidos del conteo de las bacterias se analizaron por medio del software estadístico Statgraphics y además se realizaron gráficos de líneas para observar la tendencia de decrecimiento microbiano.

**Tabla 11.**  
**Combinaciones de los tratamientos**

No.	Microorganismo	Tiempo	Dosis
1	<i>Salmonella</i>	1	0,5
2	<i>Salmonella</i>	1	0,75
3	<i>Salmonella</i>	1	1
4	<i>Salmonella</i>	5	0,5
5	<i>Salmonella</i>	5	0,75
6	<i>Salmonella</i>	5	1
7	<i>Salmonella</i>	15	0,5
8	<i>Salmonella</i>	15	0,75
9	<i>Salmonella</i>	15	1
10	<i>Salmonella</i>	20	0,5
11	<i>Salmonella</i>	20	0,75
12	<i>Salmonella</i>	20	1
13	<i>E. coli</i>	1	0,5
14	<i>E. coli</i>	1	0,75
15	<i>E. coli</i>	1	1
16	<i>E. coli</i>	5	0,5
17	<i>E. coli</i>	5	0,75

<b>18</b>	<i>E. coli</i>	5	1
<b>19</b>	<i>E. coli</i>	15	0,5
<b>20</b>	<i>E. coli</i>	15	0,75
<b>21</b>	<i>E. coli</i>	15	1
<b>22</b>	<i>E. coli</i>	20	0,5
<b>23</b>	<i>E. coli</i>	20	0,75
<b>24</b>	<i>E. coli</i>	20	1

Fuente: Elaboración propia

Se obtuvieron un total de 24 tratamientos por cada repetición más las 8 muestras control presentadas en la siguiente tabla.

## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Conforme a los análisis microbiológicos realizados, se logró evaluar la efectividad de la solución antimicrobiana aplicada en la harina de pollo, logrando los siguientes resultados:

#### 4.1 Evaluación de resultados microbiológicos y bromatológicos de 6 lotes de harina de vísceras de pollo

Durante tres meses se ha evaluado diferentes lotes de producción de la harina de vísceras de pollo, considerando como lotes la producción de 400 sacos de 50 kg. Los resultados microbiológicos y bromatológicos de muestran a continuación:

**Tabla 12**  
**Resultados microbiológicos de varios lotes de harina de vísceras de pollo**

No.	Parámetro de control	Método	Resultado	Unidad	Requisito de la norma (NTE INEN 472, 1988)
1	<i>Salmonella</i>		Ausencia	/25g	Ausencia/25g
2	<i>Salmonella</i>		Presencia	/25 g	Ausencia/25g
3	<i>Salmonella</i>	P-LM-24 (AOAC 2016.01:2019)	Ausencia	/25g	Ausencia/25g
4	<i>Salmonella</i>		Ausencia	/25g	Ausencia/25g
5	<i>Salmonella</i>		Presencia	/25g	Ausencia/25g
6	<i>Salmonella</i>		Ausencia	/25g	Ausencia/25g
1	<i>E. coli</i>		< 3	NMP/ml	< 3
2	<i>E. coli</i>		< 3	NMP/ml	< 3
3	<i>E. coli</i>	P-LM-19 (AOAC 991.14:2019)	< 3	NMP/ml	< 3
4	<i>E. coli</i>		< 3	NMP/ml	< 3
5	<i>E. coli</i>		3	NMP/ml	< 3
6	<i>E. coli</i>		< 3	NMP/ml	< 3

Fuente: Elaboración propia

Durante este periodo de tiempo se puede observar que las harinas desde el punto de vista microbiológico cumplen con lo establecido por la norma (NTE INEN 472, 1988), excepto para las muestras número 2 y 5 las cuales muestran presencia de *Salmonella* encontrándose fuera de parámetro para esta especificación. Por este se considera importante dosificar la harina de vísceras de pollo con ácidos orgánicos en el producto final a comercializar ya que son idóneos de inhibir e interrumpir el desarrollo bacteriano.

Para la aplicación de una solución antimicrobiana se consideró el uso de ácidos orgánicos, ya que entre las otras opciones disponibles se encuentran someter la harina de vísceras de pollo a un proceso de calor, lo cual puede reducir la calidad de la harina. Otra alternativa es el uso de formaldehído, que es altamente efectivo contra las bacterias, pero al mismo tiempo representa un riesgo significativo para la salud pública (Crispín et al., 2019).

Según los autores (Susá & Vásquez, 2011) los ácidos orgánicos y sus derivados son productos de alta energía, desprovistos de proteínas. Se emplean en la nutrición animal

debido a su alta capacidad de ser digeridos, sus características particulares y su capacidad para reducir el pH (ácidos orgánicos). El objetivo principal de los ácidos orgánicos es controlar el crecimiento de bacterias perjudiciales y reducir el nivel de acidez en el sistema digestivo. Su efecto antibacteriano se origina principalmente por la disminución que tiene el pH en la harina, ya que afecta el metabolismo bacteriano.

La actividad inhibitoria de los microorganismos es influenciada por el valor de pKa de un ácido orgánico. La eficacia de los ácidos orgánicos está relacionada con la cantidad administrada; a mayor cantidad de ingredientes activos que lleguen al lugar de acción, se obtendrán efectos deseados más pronunciados (DSM, 2018).

Conforme a lo establecido por (Susá & Vásquez, 2011) para su uso en materias primas de origen animal para la fabricación de alimentos balanceados. Los conservantes más comúnmente empleados incluyen el ácido fórmico, reconocido por su fuerte acción bactericida, y el ácido propiónico, destacado por su eficacia como antifúngico. Además, como acidificantes se utilizan el ácido el ácido fumárico que corresponden a los utilizados en este proyecto.

La combinación de los ácidos fue diseñada para incorporar diversas características de cada ácido (fórmico, propiónico y fumárico). Los cuales se desempeñan como atrayentes de alimentos (propiónico), promueven la acción antibacteriana (ácido propiónico y fórmico) y como impulsores de crecimiento en el caso del ácido fumárico. Todos estos roles están en consonancia con los requerimientos para la fabricación de alimentos balanceados (Aquafeed, 2021).

Los resultados bromatológicos de varios lotes de harina de vísceras de pollo se presentan en la Tabla 13

**Tabla 13**  
**Resultados bromatológicos de 6 lotes de harina de vísceras de pollo**

No.	Parámetro de control	Método	Res.	Und.	Requisito
1	Proteína	AOAC 984.13 REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (H)	65,00	g/100g	Mín. 65% (+1,-1)
	Grasa	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (A)	14,61	g/100g	Mín. 12% Máx. 15%
	Humedad	AOAC 942.05	2,88	g/100g	Máx. 8
	Ceniza Proteína	AOAC 984.13	10,08 65,80	g/100g g/100g	Máx. 15% Mín. 65% (+1,-1)
2	Grasa	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (H)	12,23	g/100g	Mín. 12% Máx. 15%
	Humedad	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (A)	5,89	g/100g	Máx. 8
	Ceniza Proteína	AOAC 942.05 AOAC 984.13	14,68 65,96	g/100g g/100g	Máx. 15% Mín. 65% (+1,-1)
3	Grasa	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (H)	13,16	g/100g	Mín. 12% Máx. 15%
	Humedad	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (A)	2,68	g/100g	Máx. 8
4	Ceniza Proteína	AOAC 942.05 AOAC 984.13	12,46 65,10	g/100g g/100g	Máx. 15% Mín. 65% (+1,-1)

	Grasa	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (H)	14,22	g/100g	Mín. 12% Máx. 15%
	Humedad	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (A)	2,41	g/100g	Máx. 8
	Ceniza	AOAC 942.05	13,26	g/100g	Máx. 15%
	Proteína	AOAC 984.13	68,02	g/100g	Mín. 65% (+1,-1)
5	Grasa	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (H)	13,04	g/100g	Mín. 12% Máx. 15%
	Humedad	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (A)	2,51	g/100g	Máx. 8
	Ceniza	AOAC 942.05	12,09	g/100g	Máx. 15%
	Proteína	AOAC 984.13	68,21	g/100g	Mín. 65% (+1,-1)
6	Grasa	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (H)	12,85	g/100g	Mín. 12% Máx. 15%
	Humedad	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (A)	3,11	g/100g	Máx. 8
	Ceniza	AOAC 942.05	13,45	g/100g	Máx. 15%

Fuente: Elaboración propia

Como se puede determinar, los resultados de los 6 lotes de harina de vísceras de pollo que fueron muestreadas cumplen con los requisitos establecidos para este tipo de producto (Agromat, 2014).

En la Tabla 14 se muestran los resultados bromatológicos de la muestra compuesta de harina de vísceras de pollo, sobre la cual se va a realizar el estudio.

**Tabla 14**

**Especificaciones requeridas para la harina de vísceras de pollo**

Características	Especificación	Resultado	Unidad	Método
Proteína	Mín. 65% (+1,-1)	66,67	g/100g	AOAC 984.13
Grasa	Mín. 12% Máx. 15%	14,59	g/100g	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (H)
Humedad	Máx. 7	3,67	g/100g	REG. EUR (CE) no 152/2009 anexo III (A)
Ceniza	Máx. 14%	12,59	g/100g	AOAC 942.05

Fuente: Elaboración propia

Como se logra observar, En el caso de los análisis bromatológicos cumplen con los parámetros establecidos por (Agromat, 2014).

## 4.2 Resultados microbiológicos del estudio

Durante esta investigación el diseño factorial propuesto permite observar el efecto

conservador de los ácidos propuestos. Además, se utilizaron 4 muestras control para cada microorganismo patógeno (*Salmonella* y *E. coli*) previamente inoculadas para este estudio.

**Tabla 14**  
**Resultados de *Salmonella* y *E. coli* para cada tratamiento**

No.	Réplicas	Microorganismo	Tiempo	Dosis	Resultados
1	1	<i>Salmonella</i>	1	0,5	Presencia
2	1	<i>Salmonella</i>	1	0,75	Presencia
3	1	<i>Salmonella</i>	1	1	Presencia
4	1	<i>Salmonella</i>	5	0,5	Presencia
5	1	<i>Salmonella</i>	5	0,75	Presencia
6	1	<i>Salmonella</i>	5	1	Presencia
7	1	<i>Salmonella</i>	15	0,5	Presencia
8	1	<i>Salmonella</i>	15	0,75	Presencia
9	1	<i>Salmonella</i>	15	1	Ausencia
10	1	<i>Salmonella</i>	20	0,5	Presencia
11	1	<i>Salmonella</i>	20	0,75	Presencia
12	1	<i>Salmonella</i>	20	1	Ausencia
13	2	<i>Salmonella</i>	1	0,5	Presencia
14	2	<i>Salmonella</i>	1	0,75	Presencia
15	2	<i>Salmonella</i>	1	1	Presencia
16	2	<i>Salmonella</i>	5	0,5	Presencia
17	2	<i>Salmonella</i>	5	0,75	Presencia
18	2	<i>Salmonella</i>	5	1	Presencia
19	2	<i>Salmonella</i>	15	0,5	Presencia
20	2	<i>Salmonella</i>	15	0,75	Presencia
21	2	<i>Salmonella</i>	15	1	Ausencia
22	2	<i>Salmonella</i>	20	0,5	Presencia
23	2	<i>Salmonella</i>	20	0,75	Presencia
24	2	<i>Salmonella</i>	20	1	Ausencia
25	1	<i>E. coli</i>	1	0,5	>1100
26	1	<i>E. coli</i>	1	0,75	>1100
27	1	<i>E. coli</i>	1	1	>1100
28	1	<i>E. coli</i>	5	0,5	>1100
29	1	<i>E. coli</i>	5	0,75	>1100
30	1	<i>E. coli</i>	5	1	1100
31	1	<i>E. coli</i>	15	0,5	240
32	1	<i>E. coli</i>	15	0,75	240
33	1	<i>E. coli</i>	15	1	93
34	1	<i>E. coli</i>	20	0,5	9,1
35	1	<i>E. coli</i>	20	0,75	< 3
36	1	<i>E. coli</i>	20	1	< 3
37	2	<i>E. coli</i>	1	0,5	>1100
38	2	<i>E. coli</i>	1	0,75	>1100

39	2	<i>E. coli</i>	1	1	>1100
40	2	<i>E. coli</i>	5	0,5	>1100
41	2	<i>E. coli</i>	5	0,75	>1100
42	2	<i>E. coli</i>	5	1	1100
43	2	<i>E. coli</i>	15	0,5	240
44	2	<i>E. coli</i>	15	0,75	240
45	2	<i>E. coli</i>	15	1	93
46	2	<i>E. coli</i>	20	0,5	9,1
47	2	<i>E. coli</i>	20	0,75	< 3
48	2	<i>E. coli</i>	20	1	< 3

Fuente: Elaboración propia

Los resultados fueron reportados por el Laboratorio Daster Consultores, para el caso de *Salmonella* como ausencia o presencia y para *E. coli* utilizando como unidad NMP (Número Más Probable). Una de las dificultades que se tiene con el número más probable es que en la dilución más alta reporta mayor a 1100 y en la concentración más baja menor a 3,6 NMP/g.

Es importante aclarar que al estar las muestras estériles presentaron *Salmonella* ausencia y *E. coli* menor a 3,6 que para este estudio será considerado como ausencia.

**Tabla 15**

**Resultados microbiológicos de las muestras control positivo para *Salmonella* y *E. coli***

No.	Microorganismo	Tiempo	Dosis	Resultados
1	<i>Salmonella</i>	1	0	Presencia
2	<i>Salmonella</i>	5	0	Presencia
3	<i>Salmonella</i>	15	0	Presencia
4	<i>Salmonella</i>	20	0	Presencia
5	<i>E. coli</i>	1	0	>1100
6	<i>E. coli</i>	5	0	>1100
7	<i>E. coli</i>	15	0	>1100
8	<i>E. coli</i>	20	0	>1100

Fuente: Elaboración propia

Los resultados obtenidos para las muestras control positivo en todos los casos reportaron presencia en el caso *Salmonella* y >1100 NMP para la bacteria *E. coli*. Se puede observar que si la harina se contamina con estas bacterias al tener un alto contenido proteico se vuelven un buen sustrato para estas bacterias patógenas.

### 4.3 Análisis de resultados

#### 4.3.1 Análisis de los resultados de *Salmonella*

Los resultados para el día 1 indican que para todas las concentraciones de la solución antibacteriana existe presencia del patógeno *Salmonella*.

En el día 5 se observó presencia de *Salmonella* en todas las dosis de aplicación de la solución de ácidos orgánicos.

A los 15 días posterior a la aplicación de la solución de ácidos orgánicos, se obtuvo un efecto inhibitorio del microorganismo *Salmonella* en la dosis de 1 % cumpliendo con la norma (NTE INEN 472, 1988).

En concordancia a los resultados obtenidos por los autores (Crispín et al., 2019) quienes indican que el formaldehído posee mayor efectividad que el ácido fórmico y el ácido propiónico para la inhibición de *Salmonella*. Siendo la dosis de la solución utilizada de 0,6% y un tiempo de efectividad inmediato posterior a su aplicación. Por lo tanto, el tiempo de efectividad para este estudio fue mayor al igual que la dosis de aplicación en la harina de pollo para obtener ausencia del microorganismo. Dado que los resultados de ausencia se dieron a los 15 y 20 días de exposición de la solución bactericida en la concentración de 1% los autores también ultimaron que el tiempo de exposición y la dosis influyen en los resultados de inhibición microbiana para *Salmonella*.

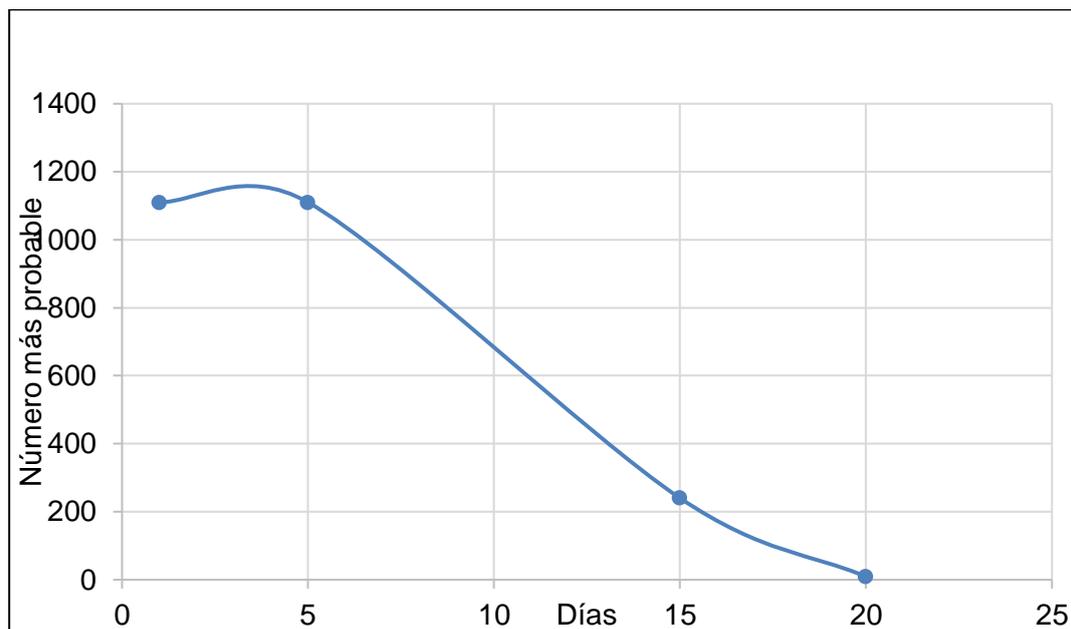
Los resultados a los 20 días mantuvieron la ausencia de *Salmonella* en la concentración del 1% de la solución antibacteriana, encontrándose dentro de los requisitos microbiológicos de acuerdo con la norma (NTE INEN 472, 1988).

Dentro de este periodo de tiempo, los autores (Susá & Vásquez, 2011) presenta resultados inhibitorios de este patógeno en su ensayo realizado en harina de pescado con las concentraciones de 0,5%; 0,75% y 1% a los 20 días difiriendo con los resultados obtenidos para este estudio, que muestran la ausencia del microorganismo solo en la dosis de 1% a los 15 y 20 días de permanencia de la solución de ácidos orgánicos.

#### 4.3.2 Análisis de los resultados de *E. coli*

De acuerdo con los resultados obtenidos para el caso de *E. coli* se observó que existe una disminución del microorganismo a lo largo del tiempo, logrando encontrarse dentro de la norma (NTE INEN 472, 1988) para el día 20 a la concentración del 1% de la solución de ácidos orgánicos donde los resultados son menores a 3 NMP, por lo que se puede declarar como ausencia.

**Figura 5**  
**Decrecimiento microbiano de *E. coli* (Número Más Probable vs Tiempo)**



Fuente: Elaboración propia

El efecto de los ácidos orgánicos se pudo ver que se mantiene durante el tiempo de almacenamiento por lo cual en caso de contaminación con patógenos es recomendable la presencia de esta mezcla de ácidos para el control de crecimiento y la sobrevivencia.

A continuación, se presentan las tablas ANOVA para evaluar la significancia de los resultados para este parámetro.

**Tabla 16**  
**Resumen estadístico para *E. coli***

Tiempo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
1	6	>1100,0	0	0%	>1100,0	>1100,0	0
5	6	1106,67	5,16398	0,466624%	1100,0	>1100,0	10,0
15	6	191,0	75,9105	39,7437%	93,0	240,0	147,0
20	6	4,36667	3,66642	83,9639%	2,0	9,1	7,1
<b>Total</b>	24	603,008	521,787	86,5307%	2,0	>1100,0	1108,0

Fuente: Elaboración propia

Existe una diferencia de más de 3 a 1 entre la desviación estándar más pequeña y la más grande.

**Tabla 17**  
**Tabla ANOVA para Resultados por Tiempo**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Entre grupos</b>	6,23301E6	3	2,07767E6	1432,26	0,0000
<b>Intra grupos</b>	29012,5	20	1450,63		
<b>Total (Corr.)</b>	6,26202E6	23			

Fuente: Elaboración propia

La tabla ANOVA descompone la varianza de Resultados en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. La ratio F, que en este caso equivale a 1432,26, es una ratio entre la estimación entre grupos y la estimación dentro del grupo. Dado que el valor P de la prueba F es inferior a 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados medios de un nivel de Tiempo a otro al nivel de significancia del 5%.

La hipótesis nula establece que los valores de concentración de la solución bactericida a los distintos días de incubación son iguales. Se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) y se establece que existe disminución del conteo bacteriano entre los distintos días de incubación de la solución de ácidos orgánicos.

Por esta razón se elige la mayor concentración de la solución bactericida, es decir, la dosis de 1% al día 15 de incubación en la harina de vísceras de pollo cumpliendo con el parámetro de la norma (NTE INEN 472, 1988).

En los ensayos realizados por (Malicki et al., 2004) en harina de pescado se determinó que la tasa de reducción de *E. coli* aumentó con la concentración de la solución de ácidos orgánicos añadida, coincidiendo con los resultados obtenidos en este experimento, donde se observa mayor disminución del conteo total de *E. coli* en la concentración más alta (1%).

De acuerdo con los autores (Rastari et al., 2009) en su experimentación los resultados para *E. coli* mostraron que, además del tipo de ácido, la concentración también juega un papel importante en la reducción del número de bacterias. Mostrando una diferencia significativa entre las concentraciones de 2%, 1,5% y 1 % de cada ácido orgánico. Logrando el mayor efecto inhibitor en la mayor dosis en concordancia con lo obtenido en este ensayo.

El efecto de la reducción de *E. coli* podría deberse a diferentes acciones inhibitoras de los ácidos: efecto reductor del pH intracelular, alteración de la permeabilidad de la membrana celular, disminución del nivel de agentes reductores disponibles para los sistemas de transporte de electrones y valores de pKa, especialmente el nivel del compuesto que permanece en la forma no disociada. Los ácidos orgánicos que tienen valores de pKa más altos son más eficaces para inhibir las bacterias en los alimentos bajos en acidez (Podolak et al., 1996). Por lo que el ácido propiónico, que es el de mayor pKa desempeñó un papel importante en la reducción de microorganismos para este experimento.

# CAPÍTULO 5

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Se realizaron ensayos microbiológicos a la harina de vísceras de pollo almacenada durante un periodo de 3 meses en seis lotes de 400 de polipropileno de sacos de 50 kg, presentando dos casos positivos de *Salmonella* y un caso correspondiente a 3 NMP de *E. coli*, encontrándose fuera de parámetro de acuerdo con lo dispuesto la normativa nacional vigente (NTE INEN 472, 1988) para este tipo de producto.

Se aplicó un diseño factorial 4x3x2 correspondiente a los días de permanencia de la solución, de 1, 5, 15 y 20 días y a las dosis de 0,5%, 0,75% y 1% de la solución de ácidos orgánicos (propiónico, fórmico y fumárico) mezclados de forma sinérgica para su aplicación en la harina de vísceras de pollo almacenada a una temperatura ambiente media de 29 °C. Además, se usaron muestras patronos únicamente inoculadas con los patógenos *Salmonella* y *E. coli* para constatar el efecto de la solución bactericida en los distintos días. Se consideraron dos réplicas de los tratamientos, permitiendo analizar el efecto individual y de interacción entre los diferentes factores.

La harina de vísceras de pollo contaminada con *Salmonella*, en la dosis de la solución antimicrobiana en los tratamientos al 1% para los días 15 y 20, los resultados fueron de ausencia. Para la bacteria *E. coli* hizo la solución causó un efecto reductor en todas las muestras en los distintos días, en el día 20 con la concentración de 0,5% logra disminuir a 9,1 NMP/g, mientras que en las concentraciones de 0,75% y 1% se registró < 3 NMP/g logrando encontrarse dentro de lo dispuesto por la normativa nacional.

La población total de microorganismos de *Salmonella* y *E. coli* disminuyó a medida del tiempo luego de estar expuesta a las concentraciones de ácidos orgánicos. Entre los tratamientos, el mejor efecto antibacteriano sobre ambas bacterias fue en la dosis del 1%. Además, estos resultados indicaron que *Salmonella* es más sensible a los ácidos orgánicos que *E. coli*, ya que esta logró encontrarse dentro de parámetros en menor tiempo. La combinación de los ácidos orgánicos es factible para la descontaminación de la harina de vísceras de pollo.

Existe una relación proporcional respecto a la dosis de la solución de ácidos orgánicos y al tiempo de permanencia en la harina de vísceras de pollo, logrando una superior efectividad en concentraciones más altas y en un mayor tiempo de exposición. Lo cual va a depender de las condiciones de almacenamiento y el tiempo de conservación deseado.

### 5.2 Recomendaciones

- La harina de pollo debe ser sometida a análisis microbiológico al ingreso, para verificar la carga de microorganismos (enterobacterias) inicial en su contenido y proceder a esterilizarla.

- Se utilizó una muestra control inoculada con las bacterias de interés, para mostrar la efectividad del tratamiento antibacteriano, la calidad de los reactivos usados y del método aplicado.
- Desarrollar nuevas dosis de soluciones antimicrobianas en base a otro tipo de compuestos inhibidores de microorganismos y tiempo de permanencia en la harina.
- Realizar estudios sobre las concentraciones inhibitorias mínimas de cada ácido orgánico frente a diferentes tipos de microorganismos patógenos.
- Utilizar otros métodos de conservación e inhibición bacteriana y evaluar su efectividad frente al uso de ácidos orgánicos en las materias primas para consumo animal y humano con la finalidad de determinar el método más seguro y efectivo para cada organismo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agromat. (2014). *Harina de vísceras de pollo 60% N0009*. Obtenido de. <https://www.agromat.com.co/productos-de-origen-animal/harina-de-visceras-de-pollo-60-n0009/>
- Alcívar, J. (2014). *Utilización de dos niveles de harina de vísceras de pollos en reemplazo de proteína tradicionales en dietas de crecimiento y acabado de cerdos*. <https://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/30558/D-79851.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Alfaro, E. (2010). *Evaluación del efecto de dietas formuladas con o sin harinas de origen animal en el rendimiento de pollo de engorde*. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/2756/Evaluaci>
- Anangonó, C. (2014). *Eficiencia del uso de ácidos orgánicos en camarón*. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25104/1/D-76274%20An%20c3%a1ngono%20Lara.pdf>
- Aquafeed. (2021). *Elegir la Mezcla de Ácidos Orgánicos Correcta para los Alimentos Acuícolas*. Obtenido de. <https://aquafeed.co/entrada/elegir-la-mezcla-de-acidos-organicos-correcta-para-los-alimentos-acuicolas-24981>
- Ardoino, S., Toso, R., Toribio, M., Álvarez, H., Mariani, E., Cachau, P., Mancilla, M., & Oriani, D. (2017). *Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo*. <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwigyqjPqpr9AhURjbAFHb-jCTgQFnoECA0QAQ&url=https%3A%2F%2Fcerac.unlpam.edu.ar%2Findex.php%2Fveterinaria%2Farticle%2Fdownload%2F2733%2F2626&usg=AOvVaw1n3VrvqgSNtlZa4hngvngLC>
- Ávalos, V. (2012). *Obtención de aceite de aceite y harina proteica de alta calidad a partir de pollos de descarte y vísceras*. [http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/2037/Avalos\\_Informefinal\\_2012.pdf](http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/2037/Avalos_Informefinal_2012.pdf)
- BRF Ingredients. (2022). *Fuentes de proteína en la Nutrición Animal: usos y tendencias*. Obtenido de. <https://www.brfindredients.com/es/blog/posts/fuentes-proteina-nutricion-animal-usos-tendencias/>
- Casal, J., & Mateu, E. (2003). Tipos de muestreo. *Rev. Epidem. Med. Prev*, 1(1), 3–7. [http://mat.uson.mx/~ftapia/Lecturas%20Adicionales%20\(C%20C3%B3mo%20dise%C3%B1ar%20una%20encuesta\)/TiposMuestreo1.pdf](http://mat.uson.mx/~ftapia/Lecturas%20Adicionales%20(C%20C3%B3mo%20dise%C3%B1ar%20una%20encuesta)/TiposMuestreo1.pdf)
- Castellón, L. (2019). *Evaluación de la eficiencia energética y productiva de una planta productora de harina de subproductos del pollo mediante la aplicación de un análisis exergético avanzado y termoeconómico*. <https://biblioteca.utb.edu.co/notas/tesis/0074949.pdf>
- Cerra, H., Fernández, M., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., & Zarankin, E. (2013). *Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéuticas, cosmética y de productos médicos*. 1–514. <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>
- Chachapoya, D. (2014). *Producción de alimentos balanceados en una planta procesadora en el cantón Cevallos*. <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwj6IKWfxZ6BAxVHSTABHfiTD6M4FBAWegQIBBAB&url=https%3A%2F%2Fbibdigital.epn.edu.ec%2Fbitstream%2F15000%2F8927%2F3%2FCD-5974.pdf&usg=AOvVaw0x2Qa9AANHX4Sld6l4zf0e&opi=89978449>
- Chambi, R. (2017). *Efecto de cuatro niveles de harina de vísceras provenientes de pollos en la alimentación de pollos parrilleros en las fases de crecimiento y acabado*. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/13309/T->

- 2422.pdf?sequence=1
- Chano, M. (2013). *Diseño y simulación de un digestor cooker para procesar residuos generados en el faenamiento de pollos*.  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5183/6/UPS-KT00064.pdf>
- Chica, S., & Salazar, V. (2022). *Estudio microbiológico de Escherichia coli Y Staphylococcus aureus en encurtidos de pinchagua (Opisthonema spp.) comercializados en la ciudad de Crucita*.  
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/58430/1/BCIEQ-T-%200658%20Chica%20Alc>
- Chilón, W. (2017). *Efecto de la adición de butirato, ácido propionico y butirato más ácido propionico en la dieta de cuyes (Cavia porcellus) en crecimiento sobre los parámetros productivos*.  
<http://190.116.36.86/bitstream/handle/20.500.14074/1927/Efecto%20de%20la%20adici>
- Coello, P. (2006). *Efecto de tres tipos de Conservantes (Ácido Propiónico, Ácido Fórmico y Propionato de Calcio) en la Vida de Anaquel de la Harina de Sangre*.  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/865/1/27T0101.pdf>
- Constantine, L. (2016). *Diseño de un plan para la implementación del sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) en una fábrica de harina de pescado ubicada en la parroquia de Posorja*.  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13377/1/UPS-GT001740.pdf>
- Correa, V. (2018). *Validación del Método de Ensayo Rápido (MERs) para la detección e identificación de la especie Salmonella enterica en la matriz harina de pescado*.  
[https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14138/1416/Correa\\_vr.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14138/1416/Correa_vr.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Crespo, Á. (2018). *Diagnóstico de la cadena de valor: División Alimentos Balanceados en la Provincia del Guayas*.  
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/34107/1/CRESPO%20CHOEZ.pdf>
- Creus, E. (2005). *Salmonella en la alimentación animal (I): Contaminación en materias primas y piensos*. [https://www.porcat.org/download/050501\\_article\\_albeitar.pdf](https://www.porcat.org/download/050501_article_albeitar.pdf)
- Crispín, F., Porturas, R., & Vásquez, W. (2019). *Efecto de los ácidos orgánicos sobre la presencia de Salmonellaspp. en harina de pescado*.  
<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/2704/3229>
- CSA. (2021). *¿Qué es la cinética microbiana?* Obtenido de.  
<https://csaconsultores.com/que-es-la-cinetica-microbiana/>
- Cumpa, M., & Hereña, R. (2009). *Evaluación de la harina de vísceras de pollo en reemplazo de la harina de pescado en el engorde de machos de codorniz japonesa*.  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6171200>
- Dos Santos, A. (2007). *Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos*.  
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5691/ajse1de1.pdf>
- DSM. (2018). *Principios del uso de ácidos orgánicos en la nutrición animal*.  
[https://www.dsm.com/anh/es\\_ES/feedtalks/principles-organic-acids-animal-nutrition.html#](https://www.dsm.com/anh/es_ES/feedtalks/principles-organic-acids-animal-nutrition.html#)
- ELIKA Fundazioa. (2022). *Escherichia coli*. Obtenido de.  
<https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/escherichia-coli/>
- FDA. (2020). *BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*.  
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>
- FDA. (2023). *Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella*.  
<https://www.fda.gov/media/166699/download?attachment>
- FEDNA. (2006). *Harina carne de aves*.  
[http://www.fundacionfedna.org/ingredientes\\_para\\_piensos/harina-carne-de-aves](http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/harina-carne-de-aves)
- Fuente, N., & Barboza, J. (2010). *Inocuidad y bioconservación de alimentos*.  
<https://www.redalyc.org/pdf/416/41613084005.pdf>

- Gayathiri, E., Bharathi, B., & Prika, K. (2018). Study of the Enumeration of Twelve Clinical Important Bacterial Populations at 0.5 McFarland Standard. *International Journal of Creative Research Thoughts*, 882. <https://www.ijcrt.org/papers/IJCRT1807341.pdf>
- Giraldo, S. (2013). *Ensayos para la producción biotecnológica de ácido fumárico empleando residuos agrícolas*. <https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/3063/ENSAYOS%20PARA%20LA%20PRODUCCI>
- González, S., Icochea, E., Reyna, P., Guzmán, J., Cazorla, F., Lúcar, J., Carcelén, F., & San Martín, V. (2013). *Efecto de la suplementación de ácidos orgánicos sobre los parámetros productivos en pollos de engorde*. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172013000100004&script=sci\\_arttext&lng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172013000100004&script=sci_arttext&lng=en)
- González, P., Pastor, O., Peña, S., Smirnov, I., & Zafra, A. (2016). *Planta de producción de ácido fórmico*. [https://ddd.uab.cat/pub/tfg/2016/168385/TFG\\_Capsule\\_cap01.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tfg/2016/168385/TFG_Capsule_cap01.pdf)
- Hernández, V., Ramírez, M., Martínez, G., & García, A. (2017). *Comportamiento de solubilidad de compuestos orgánicos*. <https://www.rua.unam.mx/portal/Descargas/index/71897>
- Herrera, J. (2016). *Efecto bactericida de desinfectantes sobre cepas de Escherichia coli y Listeria innocua en superficies de uso en la Industria Alimentaria*. <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/142693/Efecto-bactericida-de-desinfectantes-sobre-cepas-de-Escherichia-coli-y-Listeria-innocua.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- ICMSF. (1980). *Microorganismos de los alimentos 5. Características de los patógenos microbianos: Vol. I*. <https://biblioteca.esepoch.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=3813>
- ISO 6579. (2020). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp. — Amendment 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC*.
- Jaramillo, M. (2013). Evaluación de la acción de bactericidas frente a Salmonella choleraesuis, E. coli, Shigella sonnei y Proteus hauseri. <https://repositorio.itp.gob.pe/bitstream/ITP/52/1/publicacion%2011.9.pdf>
- Juárez, C. (2020). *Ácidos orgánicos presentes en la vida cotidiana*. <https://thefoodtech.com/ingredientes-y-aditivos-alimentarios/acidos-organicos-presentes-en-la-vida-cotidiana/>
- Lituma, W. (s/f). *Evaluación de la conversión alimenticia utilizando ácidos orgánicos al agua en pollos de engorde*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14670/1/UPS-CT007206.pdf>
- López, S., & Valverde, C. (2007). *Ácidos Orgánicos tamponados y libres: uso como sanitizantes de materias primas, piensos y tracto gastro intestinal*. [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_MG/MG\\_2007\\_1\\_96\\_98\\_102.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_MG/MG_2007_1_96_98_102.pdf)
- Malicki, A., Zawadzki, W., Bruzewicz, S., Graczyk, S., & Czerski, A. (2004). *Effect of Formic and Propionic Acid Mixture on Escherichia Coli in Fish Meal Stored at 12 °C*. [https://www.researchgate.net/profile/Albert-Czerski/publication/26563415\\_Effect\\_of\\_Formic\\_and\\_Propionic\\_Acid\\_Mixture\\_on\\_Escherichia\\_Coli\\_in\\_Fish\\_Meal\\_Stored\\_at\\_12AAC/links/0912f5114bc6037253000000/Effect-of-Formic-and-Propionic-Acid-Mixture-on-Escherichia](https://www.researchgate.net/profile/Albert-Czerski/publication/26563415_Effect_of_Formic_and_Propionic_Acid_Mixture_on_Escherichia_Coli_in_Fish_Meal_Stored_at_12AAC/links/0912f5114bc6037253000000/Effect-of-Formic-and-Propionic-Acid-Mixture-on-Escherichia)
- Manrique, G., Morales, H., & Jiménez, J. (1970). *Estudio de la contaminación con enterobacteriaceas en concentrados para animales*. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/94259/78709>
- Mesones, E. (2022). *Gestión de Calidad en el Proceso de Elaboración de Harina de Pescado Anchoqueta*. [https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/10111/Mesones%](https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/10111/Mesones%20)

- 20Mujica%20Edwin%20Obed.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Meza, J., & López, C. (s/f). *Estrategias integrales para controlar la calidad de harinas de origen animal*.  
[http://www.alapre.org/Downloads/Congresos/Sexto/Control\\_integral\\_de\\_calidad\\_de\\_harinas.pdf](http://www.alapre.org/Downloads/Congresos/Sexto/Control_integral_de_calidad_de_harinas.pdf)
- Montenegro, S. (2017). *19 de Diciembre de 2017). Diseño de una nueva planta de alimento balanceado para la empresa Alba Mix Nutrición S.A.C. para mejorar su productividad*.  
[https://tesis.usat.edu.pe/bitstream/20.500.12423/1310/1/TL\\_MontenegroReyesSara.pdf.pdf](https://tesis.usat.edu.pe/bitstream/20.500.12423/1310/1/TL_MontenegroReyesSara.pdf.pdf)
- Moquillaza, G., & Ramírez, Y. (2018). *Diseño de un proceso para la producción de carne, vísceras y hueso a partir de aves de descarte*.  
[http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/4234/MOQUILLAZA%20ESPINOZA\\_PREGRADO\\_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/4234/MOQUILLAZA%20ESPINOZA_PREGRADO_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Muñoz, D. (2017). *Estudio de la cadena de valor de alimentos balanceados en el Ecuador*. <https://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/5999/1/T2492-MAE-Mu>
- Nascimento, A., Gomes, P., Teixeira, L., Rostagno, H., & Almeida, R. (2002). *Composição Química e Valores de Energia Metabolizável das Farinhas de Penas e Vísceras Determinados por Diferentes Metodologias para Aves*.  
<https://www.scielo.br/rbz/a/8595XkC3nfgsYZcDdr3wBNr/?lang=pt>
- Novillo, D. (2020). *Evaluación de la producción de ácido fumárico mediante fermentación sumergida de bagazo de caña (Saccharum officinarum L.) utilizando Rhizopus sp. como biocatalizador*.  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18691/4/UPS-CT008745.pdf>
- NTE INEN 463. (1980). *NTE INEN 0463: Harina de pescado. Muestreo*.  
[https://archive.org/stream/ec.nte.0463.1980/ec.nte.0463.1980\\_djvu.txt](https://archive.org/stream/ec.nte.0463.1980/ec.nte.0463.1980_djvu.txt)
- NTE INEN 472. (1988). *Harina de pescado para consumo animal. 472*.  
<https://es.scribd.com/doc/293181623/Nte-Inen-472-Consumo-Animal-Requisitos#>
- OMS. (2018). *E. coli*. Obtenido de. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli#:~:text=coli%20productora%20de%20toxina%20Shiga%20puede%20crecer%20a%20temperaturas%20que,\)%20m](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli#:~:text=coli%20productora%20de%20toxina%20Shiga%20puede%20crecer%20a%20temperaturas%20que,)%20m)
- PAHO. (s/f). *ANEXO G: Factores determinantes de las enfermedades transmitidas por alimentos. factores de contaminación, supervivencia y multiplicación*. Obtenido de. [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10808:2015-anexo-g-factores-determinantes-alimentos&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10808:2015-anexo-g-factores-determinantes-alimentos&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0)
- Palomino, C., & González, Y. (2014). *Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones*.  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342014000300020](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020)
- Pastor, F., Alzamora, A., Mendoza, G., Monteza, D., & Rosales, R. (2018). *Diseño del proceso productivo de harina a base de plumas en la empresa distribuidora avícola El Galpón E.I.R.L.*  
[https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/3616/PYT\\_Informe\\_Final\\_Proyecto\\_Harina\\_de\\_plumas\\_de\\_pollo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/3616/PYT_Informe_Final_Proyecto_Harina_de_plumas_de_pollo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Pauta, J., Zambrano, J., & Proaño, J. (2022). *22 de Agosto de 2022). Efecto de la utilización de harina de vísceras de pollo en los parámetros productivos de lechones destetados*. 1–36.  
<https://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/6912/3766>
- Pedrique, M., Vizcarrondo, M., & Gutiérrez, S. (2008). *Limpieza, desinfección, esterilización y asepsia*.  
[http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/08\\_Tema\\_14\\_Limpieza\\_desinfecci%C3%B3n.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_14_Limpieza_desinfecci%C3%B3n.pdf)
- Pinto, J. (2018). *Evaluación del control de productos antisalmonélicos en aislados de Salmonella spp provenientes de una planta de alimento terminado para pollo de*

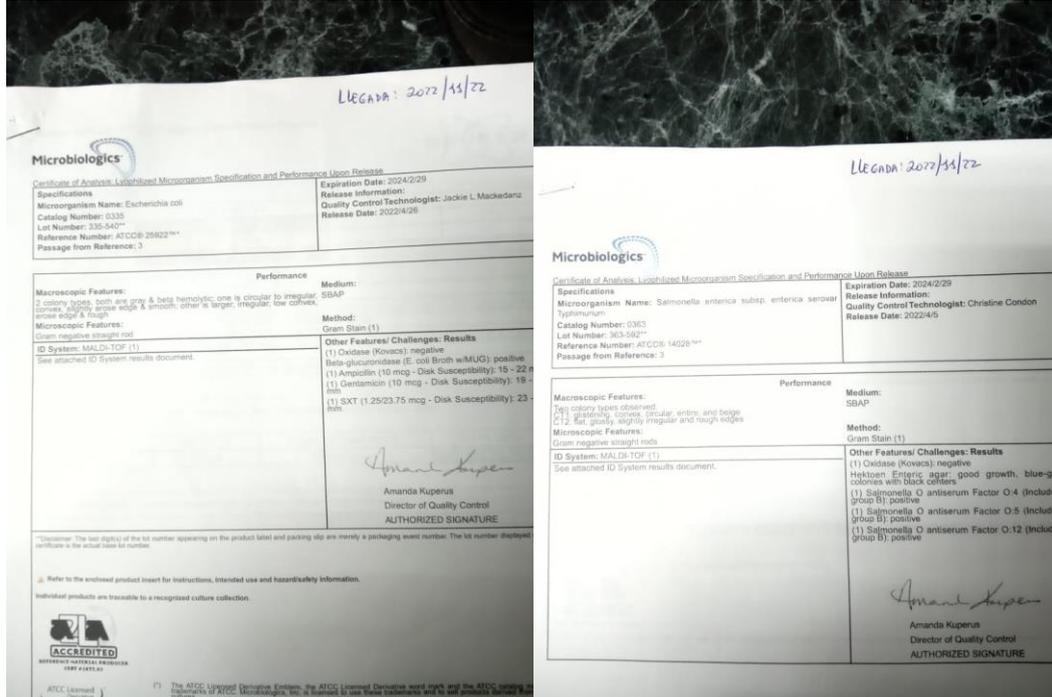
- engorde. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15035/1/T-UCE-0014-063-2018.pdf>
- Podolak, R., Zayas, F., Kastner, C., & Fung, D. (1996). *Inhibition of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 on Beef by Application of Organic Acidst*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X2204282X>
- PRO ECUADOR. (2017). *Alimento para animales*. Obtenido de. <https://www.proecuador.gob.ec/alimentos-para-animales/>
- Rastari, M., Azizi, F., Abdulmir, A., Son, R., Sekawi, Z., & Fatimah, A. (2009). *Effect of Organic Acids on Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus Contaminated Meat*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2729390/>
- REVITECA. (1996). Caracterización y evaluación biológica de harina de pescado elaborada a partir de la fauna acompañante del camarón en Costa Rica. *Volúmen 5*, 1–15. <https://kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/29092/Reviteca%205%201996%208-15.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodríguez, D. (2023). *Evaluación de Impactos Ambientales Potenciales asociados a los procesos industrializados de la Planta de Harinas Avidesa Mac Pollo S. A.* <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/49895/2023RodriguezDiana.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Rodríguez, E. (2011). *Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas*. [http://www.uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-19articulosPDF/14-USO%20DE%20AGENTES%20ANTIMICROBIANOS%20%20NATURALES%20EN%20LA%20%20CONSERVACION\\_Elvia%20Rguez.pdf](http://www.uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-19articulosPDF/14-USO%20DE%20AGENTES%20ANTIMICROBIANOS%20%20NATURALES%20EN%20LA%20%20CONSERVACION_Elvia%20Rguez.pdf)
- Roth, F. (2000). *Ácidos orgánicos en nutrición porcina: eficacia y modo de acción*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2375307>
- San Frutos, R. (2019). *Estudio teórico de la estructura y propiedades espectroscópicas de los ácidos fórmico y acético*. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/36026/TFG-G3543.pdf;jsessionid=EED5D6FC891DE4DEFFFF2234DEDD2527?sequence=1>
- Santapaola, M. (2013). *Ácidos orgánicos como método de intervención. Efecto sobre agentes patógenos y alteradores relevantes en la industria frigorífica. Empleo en carne equina*. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/61033/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/61033/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Santos, R. (s/f). *Tabla No 1 NMP Cuando Se Usa 1 G de Muestra y 3 Tubos*. Recuperado el 13 de septiembre de 2023, de <https://es.scribd.com/doc/128757871/Tabla-No-1-NMP-Cuando-Se-Usa-1-g-de-Muestra-y-3-Tubos-Texto-doc>
- Schlicht, A. (1997). *Comparación de dos técnicas de diagnósticos de Salmonella spp. en harina de pescado*. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/1997/fvs344c/doc/fvs344c.pdf>
- Sepúlveda, L., Cabeza, J., & Olmos, L. (2005). *Estandarización en la aplicación de la harina de vísceras blancas del pollo como suplemento proteico en compotas controlando las variables organolépticas*. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/20115/jpcabezash.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Shiva, C. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento*. <https://www.tdx.cat/handle/10803/5606#page=2>
- Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). *Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia*. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-55522016000100010](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522016000100010)
- Susá, J., & Vásquez, G. (2011). *Aplicación de agentes antimicrobianos orgánicos en la inhibición de salmonella spp en harinas de pescado exportación*. <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/14798?mode=full>

- UAM. (2012). *Los agentes conservantes en los alimentos*.  
[http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/CONSERVANTES\\_EN\\_LOS\\_ALIMENTOS.pdf](http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/CONSERVANTES_EN_LOS_ALIMENTOS.pdf)
- Watson, H. (2006). *Obtenido de Poultry meal vs poultry byproduct meal*.  
<http://www.hilarywatson.com/chicken.pdf>
- Yauri, M. (2013). *Evaluación de tres niveles de harina de vísceras de ave como fuente de proteína en la alimentación de pollos parrilleros*.  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5104/1/UPS-CT002698.pdf>

## **ANEXOS**

## ANEXO A

# CERTIFICADOS DE LAS CEPAS DE LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS



Fuente: Elaboración propia

## ANEXO B

# FUNDAS CON LAS MUESTRAS DE HARINA DE POLLO



Fuente: Elaboración propia

## ANEXO C

### ELABORACIÓN DE LA SOLUCIÓN BACTERICIDA



Fuente: Elaboración propia

## ANEXO D

### 0,5 MAC FARLAND STANDARD

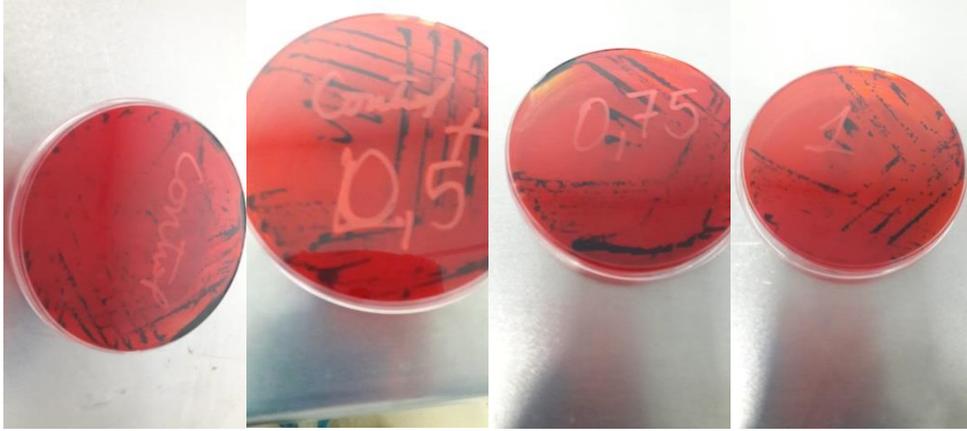
MFU	Approximate cell density
0.5 MFU	$1.5 \times 10^8$ Cells/ ml
1 MFU	$3.0 \times 10^8$ Cells/ ml
2 MFU	$6.0 \times 10^8$ Cells/ ml
3 MFU	$9.0 \times 10^8$ Cells/ ml
4 MFU	$12 \times 10^8$ Cells/ ml
5 MFU	$15 \times 10^8$ Cells/ ml
6 MFU	$18 \times 10^8$ Cells/ ml
7 MFU	$21 \times 10^8$ Cells/ ml
8 MFU	$24 \times 10^8$ Cells/ ml
9 MFU	$27 \times 10^8$ Cells/ ml
10 MFU	$30 \times 10^8$ Cells/ ml

\*MFU- McFarland Standard

Fuente: (Gayathiri et al., 2018)

## ANEXO E

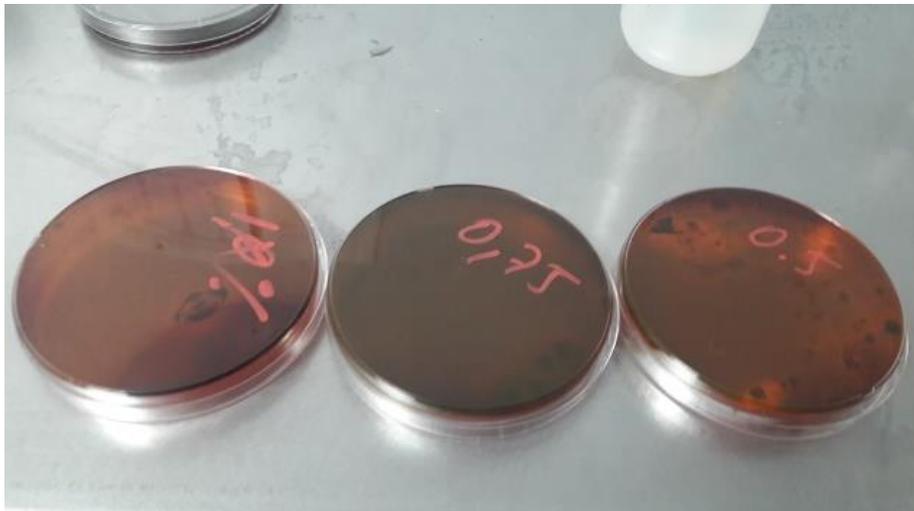
### PRESENCIA DE SALMONELLA EN AGAR XLD EN TODAS LAS CONCENTRACIONES



Fuente: Elaboración propia

## ANEXO F

### SIEMBRA DE E. COLI EN AGAR EMB



Fuente: Elaboración propia

## ANEXO G

### TABLA DE NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP), EN SERIES DE 3 TUBOS

Tabla No. 1 Numero Más Probable (NMP) para 1 g de muestra cuando se usan 3 tubos con porciones de 0.1, 0.01 y 0.001.															
TUBOS POSITIVOS				TUBOS POSITIVOS				TUBOS POSITIVOS				TUBOS POSITIVOS			
0.1	0.01	0.001	NMP	0.1	0.01	0.001	NMP	0.1	0.01	0.001	NMP	0.1	0.01	0.001	NMP
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Reference: Official Methods of Analisis AOAC international, 18 ed 2005. Chapter 12.3, pag 5

Fuente: (R. Santos, s/f)