



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE
GUAYABA (*Psidium guajava L*) EN COMBINACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO
EN SALCHICHAS DE POLLO.

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniero Agroindustrial y Alimentos

Profesora Guía

Dra. Janeth Fabiola Proaño Bastidas

Autor

María Paula Urresta Valencia

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Janeth Fabiola Proaño Bastidas.

Magister en Gerencia y Liderazgo Educacional

CI: 1706515564

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

María Paula Urresta Valencia

Ingeniera Agroindustrial y Alimentos

CI: 0401329297

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por ser mi ejemplo a seguir y por enseñarme que con Dios todo se puede lograr.

A mis hermanos, a mi familia y a Pedro porque son mi apoyo y mi motivo para superarme cada día.

A mi tutora Janeth Proaño por creer en mí y apoyarme en cada etapa de esta tesis.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, porque me han dado un ejemplo de vida y cada día agradezco a Dios por mantenerlos junto a mí. Su amor, su paciencia y apoyo han permitido que cumpla un sueño.

RESUMEN

En la actualidad, los alimentos contienen alta cantidad de aditivos que pueden tener efectos adversos o acumula una cantidad residual en el organismo del consumidor, por lo cual, este estudio propone la aplicación de antioxidantes naturales en los alimentos. La investigación comprobó el efecto antioxidante de las soluciones de aceite esencial de guayaba y ácido ascórbico como preservante natural en salchichas de pollo; se realizaron dosificaciones con el fin de estudiar el crecimiento microbiológico y los cambios fisicoquímicos en este embutido. De acuerdo, a la información obtenida, los tratamientos con mayor efectividad son aquellos tratamientos con altas concentraciones de soluciones antioxidantes. El estudio de vida útil se realizó en tiempo real durante un período de 30 días, en los cuales se determinó que las soluciones antioxidantes permitieron la estabilidad de la salchicha de pollo mediante la disminución de unidades formadoras de colonias y el control de los cambios fisicoquímicos. Las soluciones antioxidantes actuaron efectivamente sobre *Staphylococcus aureus* reduciendo notablemente la presencia de unidades formadoras de colonias, así como en aeróbios mesófilos en menor cantidad. El tratamiento con la solución antioxidante de 1000 ppm de aceite esencial de guayaba en combinación con 700 ppm de ácido ascórbico, así también el tratamiento con la solución antioxidante de 1000ppm de aceite esencial de guayaba fueron efectivos para las salchichas de pollo. Para verificar que el estudio *in vivo* fue efectivo, se realizó la evaluación del efecto antioxidante a las soluciones óptimas mediante el método de decoloración DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Este método determinó la capacidad de captación de radicales libres de la solución, de manera que la capacidad antioxidante del tratamiento 6 fue de 73% y el tratamiento 7 que fue de 92%.

ABSTRACT

Currently, food contains high amount of additives that gradually can develop side effects and let residual toxins into the body system of consumers, therefore this study proposes the application of natural antioxidants in food. This research found the antioxidant effect of the solutions with guayaba essential oil and ascorbic acid as a natural preservative in chicken sausages; dosages were performed in order to study microbial growth and physicochemical changes in this food. According to the information that was obtained in this research, the most effective treatments are those treatments with high concentrations of antioxidants solutions. The study of shelf life was performed in real time during a period of 30 days, during which it was determined that the antioxidant solutions allowed the stability of the chicken sausage by reducing colony forming units and control of physical and chemical changes. The antioxidant solutions effectively acted on *Staphylococcus aureus* reducing significantly the presence of cfu, as well as aerobic mesophilic bacteria in smaller amounts. As a result, the treatment of antioxidant solution with 1000 ppm of guayaba essential oil combined with 700 ppm of ascorbic acid and the treatment with 1000pmm essential oil was effective in chicken sausages. In order to verify that the *in vivo* study was effective, the evaluation of the antioxidant effect optimal solutions in vitro was performed by the method of DPPH discoloration (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). This method determines the ability of free radical scavenging of the solution. Finally, the antioxidant capacity in treatment 6 was 73% and in treatment 7 was 92%.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ALCANCE.....	3
JUSTIFICACIÓN	4
OBJETIVOS.....	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos.....	6
1. MARCO TEÓRICO.....	7
1.1 Aditivos alimentarios.....	7
1.1.1 Preservantes y antioxidantes.....	9
1.1.1.1 Preservantes.....	9
1.1.1.1.1 Preservantes inorgánicos.....	9
1.1.1.2 Antioxidantes.....	11
1.1.1.2.1 Antioxidantes naturales.....	12
1.1.1.2.2 Antioxidantes sintéticos.....	14
1.1.1.2.3 Bioantioxidantes.....	15
1.2 Embutidos.....	18
1.2.1 Noma INEN para productos cárnicos precocido.....	19
1.2.1.1 Análisis microbiológico.....	20
1.2.1.1.1 Aerobios mesófilos.....	22
1.2.1.1.2 <i>Escherichia coli</i>	22
1.2.1.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
1.2.1.2 Análisis físico- químico.....	24
1.2.1.2.1 pH.....	24
1.2.1.2.2 Análisis de lípidos.....	25
1.2.1.2.3 Capacidad antioxidante (Método DPPH).....	27
1.3 Estudio de vida útil.....	28

2. METODOLOGÍA.....	30
2.1 Obtención de aceite esencial.....	31
2.2 Elaboración de las salchichas de pollo.....	34
2.2.1 Procedimiento para elaboración de salchichas de pollo.....	34
2.3 Variables de estudio.....	38
2.3.1 Análisis microbiológico.....	38
2.3.1.1 Materiales de laboratorio.....	39
2.3.1.2 Equipos de laboratorio.....	39
2.3.1.3 Procedimiento para siembra de muestras.....	39
2.3.1.1.1 Aerobios mesófilos.....	46
2.3.1.1.2 <i>Escherichia Coli</i>	46
2.3.1.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	47
2.3.2 Análisis físico-químico	48
2.3.2.1 pH.....	48
2.3.2.2 Determinación de peróxidos	49
2.3.2.2.1 Procedimiento.....	49
2.3.2.3 Acidez titulable.....	51
2.3.2.3.1 Materiales	52
2.3.2.3.2 Reactivos	52
2.3.2.3.3 Procedimiento.....	53
2.3.3 Medición del Efecto Antioxidante.....	56
2.3.3.1 Materiales y equipos	56
2.3.3.2 Reactivos	56
2.3.3.3 Procedimiento	57
2.3.3.3.1 Recta de calibración	57
2.3.3.3.2 Capacidad antioxidante de soluciones.....	59
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
3.1 Variables de estudio.....	60
3.1.1 Análisis microbiológico.....	60

3.1.1.1 Aeróbios mesófilos	60
3.1.1.2 <i>Escherichia coli</i>	67
3.1.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	68
3.1.2 Análisis físico- químico.....	75
3.1.2.1 pH.....	75
3.1.2.2 Peróxidos.....	81
3.1.2.3 Acidez Titulable	86
3.1.2.4 Efecto Antioxidante... ..	91
3.1.2.4.1 Recta de calibración	91
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	97
4.1 Conclusiones.....	97
4.2 Recomendaciones.....	98
REFERENCIAS.....	99
ANEXOS.....	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación general de los preservantes	9
Tabla 2. Clasificación general de los antioxidante.....	11
Tabla 3. Compuestos presentes en la hoja de guayaba	17
Tabla 4. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos	21
Tabla 5. Descripción de tratamientos aplicados en las muestras.....	30
Tabla 6. Procedimiento establecido para análisis de las muestras	31
Tabla 7. Formulación para salchichas de pollo.....	34
Tabla 8. Análisis de varianza aerobios mesófilos en el día 0.....	62
Tabla 9. Ponderación de tratamientos aerobios mesófilos en el día 0....	62
Tabla 10. Análisis de varianza aerobios mesófilos en el día 5.....	62
Tabla 11. Ponderación de tratamientos aerobios mesófilos en el día 5	63
Tabla 12. Análisis de varianza aerobios mesófilos en el día 10	63
Tabla 13. Ponderación de tratamientos aerobios mesófilos en el día 10	63
Tabla 14. Análisis de varianza aerobios mesófilos en el día 15.....	63
Tabla 15. Ponderación de tratamientos aerobios mesófilos en el día 15... ..	64
Tabla 16. Análisis de varianza aerobios mesófilos en el día 20... ..	64
Tabla 17. Ponderación de tratamientos aerobios mesófilos en el día 20.. ..	64
Tabla 18. Análisis de varianza aerobios mesófilos en el día 25... ..	64
Tabla 19. Ponderación de tratamientos aerobios mesófilos en el día 25.....	65
Tabla 20. Análisis de varianza para aerobios mesófilos en el día 30	65
Tabla 21. Ponderación de tratamientos aerobios mesófilos en el día 30.....	65

Tabla 22. Análisis de varianza <i>Staphylococcus.aureus</i> en el día 0.....	70
Tabla 23. Análisis de varianza <i>Staphylococcus.aureus</i> en el día 5.....	70
Tabla 24. Ponderación de tratamientos <i>Staphylococcus.aureus</i> en el día 5....	70
Tabla 25. Análisis de varianza para <i>Staphylococcus.aureus</i> en el día 10.....	71
Tabla 26. Ponderación de tratamientos <i>Staphylococcus.aureus</i> en día 10	71
Tabla 27. Análisis de varianza para <i>Staphylococcus.aureus</i> en el día 15... ..	71
Tabla 28. Ponderación de tratamientos <i>Staphylococcus.aureus</i> en día 15	71
Tabla 29. Análisis de varianza para <i>Staphylococcus.aureus</i> en el día 20.	72
Tabla 30. Ponderación de tratamientos <i>Staphylococcus.aureus</i> en día 20.	72
Tabla 31. Análisis de varianza para <i>Staphylococcus.aureus</i> en el día 25... ..	72
Tabla 32. Ponderación de tratamientos <i>Staphylococcus.aureus</i> en día 25.	72
Tabla 33. Análisis de varianza para <i>Staphylococcus.aureus</i> en el día 30.....	73
Tabla 34. Ponderación de tratamientos <i>Staphylococcus.aureus</i> en día 30... ..	73
Tabla 35. Análisis de varianza para pH en el día 0.....	76
Tabla 36. Ponderación de tratamientos para pH en el día 0	76
Tabla 37. Análisis de varianza para pH en el día 5.....	76
Tabla 38. Ponderación de tratamientos para pH en el día 5	77
Tabla 39. Análisis de varianza para pH en el día 10.....	77
Tabla 40. Ponderación de tratamientos para pH en el día 10.....	77
Tabla 41. Análisis de varianza para pH en el día 15.....	77
Tabla 42. Ponderación de tratamientos para pH en el día 15	78
Tabla 43. Análisis de varianza para pH en el día 20	78

Tabla 44. Ponderación de tratamientos para pH en el día 20	78
Tabla 45. Análisis de varianza para pH en el día 25	78
Tabla 46. Ponderación de tratamientos para pH en el día 25 ..	79
Tabla 47. Análisis de varianza para pH en el día 30...	79
Tabla 48. Ponderación de tratamientos para pH en el día 30	79
Tabla 49. Análisis de varianza para peróxidos en el día 0	81
Tabla 50. Análisis de varianza para peróxidos en el día 5...	82
Tabla 51. Ponderación de tratamientos para peróxidos en día 5...	82
Tabla 52. Análisis de varianza para peróxidos en el día 10...	82
Tabla 53. Ponderación de tratamientos para peróxidos en día 10...	82
Tabla 54. Análisis de varianza para peróxidos en el día 15...	83
Tabla 55. Ponderación de tratamientos para peróxidos en día 15.....	83
Tabla 56. Análisis de varianza para peróxidos en el día 20	83
Tabla 57. Ponderación de tratamiento para peróxidos en el día 20	83
Tabla 58. Análisis de varianza para peróxidos en el día 25	84
Tabla 59. Ponderación de tratamientos para peróxidos en el día 25	84
Tabla 60. Análisis de varianza para peróxidos en el día 30	84
Tabla 61. Ponderación de tratamientos para peróxidos en el día 30	84
Tabla 62. Análisis de varianza para acidez titulable en el día 0	87
Tabla 63. Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 0	87
Tabla 64. Análisis de varianza para acidez titulable en el día 5	87
Tabla 65. Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 5	87

Tabla 66. Análisis de varianza para acidez titulable en el día 10	88
Tabla 67. Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 15.....	88
Tabla 68. Análisis de varianza para acidez titulable en el día 15	88
Tabla 69. Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 15 ...	88
Tabla 70. Análisis de varianza para acidez titulable en el día 20.....	89
Tabla 71. Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 20	89
Tabla 72. Análisis de varianza para acidez titulable en el día 25.....	89
Tabla 73. Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 25	89
Tabla 74. Análisis de varianza para acidez titulable en el día 30... ..	90
Tabla 75. Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 30 ...	90
Tabla 76. Concentraciones de DPPH, determinación de absorbancia	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de ácido L-ascórbico... ..	13
Figura 2. Principales formas moleculares del ácido ascórbico	13
Figura 3. Estructura molecular de butilhidroxitolueno.....	14
Figura 4. Métodos de obtención de aceite esencial.....	16
Figura 5. Diagrama de flujo de elaboración de salchichas de pollo	20
Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de obtención de aceite esencial de <i>Psidium guajava L.</i>	32
Figura 7. Obtención de aceite esencial de <i>Psidium guajava L.</i> a través del método de hidrodestilación.....	33
Figura 8. Proceso de deshuese de carne de pollo.....	35
Figura 9. Proceso de pesaje de ingredientes.....	35
Figura 10. Proceso de reducción de tamaño de carne de pollo a 3 mm.....	36
Figura 11. Proceso de mezclado y amasado de la emulsión de pollo.....	36
Figura 12. Proceso de embutido manual de salchichas de pollo ...	37
Figura 13. Proceso de escaldado de salchichas de pollo... ..	37
Figura 14. Proceso de enfriado de producto final y empaque a vacío de salchichas individuales.....	38
Figura 15. Almacenamiento y refrigeración de salchichas de pollo... ..	38
Figura 16. Desinfección de empaques individuales de muestras	40
Figura 17. Cámara de flujo laminar Thermo Scientific 1300	40
Figura 18. Cajas tripetri agar EMB, manitol salado y PCA.....	41
Figura 19. Agitación de los tubos de ensayo con muestras ...	41
Figura 20. Extracción de 33 µl de muestra de dilución de salchicha	42

Figura 21. Inoculación de muestra en cajas tripetri con medios sólidos.....	42
Figura 22. Esparcimiento de la muestra con asa Drigalski .riangular	43
Figura 23. Secado de los medios sólidos con muestra de salchicha	43
Figura 24. Cajas tripetri sembradas en Incubadora a 37·C.....	44
Figura 25. Contabilización de bacterias en caja tripetri.....	44
Figura 26. Diagrama de flujo de procesamiento de muestras....	45
Figura 27. Cajas tripetri con agar Plate Count para aerobios mesófilos....	46
Figura 28. Cajas tripetri con agar EMB para <i>Escherichia Coli</i>	47
Figura 29. Cajas tripetri agar Manitol Salado <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Figura 30. Determinación de pH en muestras de salchichas de pollo	49
Figura 31. Test de peróxido y dilución de la muestra de salchicha... ..	50
Figura 32. Tira de peróxidos sumergida en muestra acuosa.....	50
Figura 33. Determinación de peróxidos.....	51
Figura 34. Materiales y reactivos para determinación de acidez titulable ...	52
Figura 35. Adición de agua destilada a 40·C en muestra	53
Figura 36. Probeta con 25 ml de la muestra de salchicha de pollo... ..	54
Figura 37. Adición de fenoftaleína en la muestra.....	54
Figura 38. Determinación de acidez titulable en la muestra	55
Figura 39. Preparación de solución 0.1 mM de DPPH en metanol	57
Figura 40. Soluciones de 10 ml con DPPH. concentraciones .01, 0.02, 0.04, 0.05 y 0.1 mM	58
Figura 41. Cubetas en espectrofotómetro UV- Visible génesis	58
Figura 42. Lectura de absorbancia espectrofotómetro.....	59

Figura 43. Crecimiento de aerobios mesófilos durante 30 días.....	66
Figura 44. Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> durante 30 días.....	74
Figura 45. Medición de pH en salchichas de pollo durante 30 días... ..	80
Figura 46. Determinación de peróxidos en salchichas de pollo... ..	85
Figura 47. Medición de acidez titulable en salchichas de pollo	91
Figura 48. Recta de Calibración DPPH, absorbancia de 517 nm.....	92
Figura 49. Concentración vs Absorbancia de las soluciones antioxidantes	93
Figura 50. Concentración vs Absorbancia de las soluciones antioxidantes... ..	94
Figura 51. Absorbancia de solución antioxidante del tratamiento 6.....	95
Figura 52. Absorbancia de solución antioxidante del tratamiento 7	95

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el ser humano se ha enfocado en buscar métodos de conservación para los alimentos que se ven afectados por factores intrínsecos y extrínsecos (López, 2007). La industria alimentaria produce alimentos con antioxidantes sintéticos para alargar el tiempo de vida útil e inhibir el crecimiento de microorganismos (Cardona y Mejía, 2009). Estudios relacionados con el consumo de alimentos que contienen antioxidantes sintéticos revelan que los individuos presentan problemas de salud, como algunos tipos de cáncer, envejecimiento, enfermedades vasculares entre otras, debido a la acumulación de radicales libres en el organismo (Cardona y Mejía, 2009). La inocuidad de un alimento se encuentra estrechamente relacionada con las sustancias antimicrobianas que son añadidas para su conservación; sin embargo, el consumidor en la actualidad demanda productos más naturales con menos conservantes de síntesis química (Davidson, 1997). Las tendencias del mercado hacia productos sanos, seguros y de buena calidad, han dado paso a las investigaciones de antioxidantes naturales provenientes de plantas (Inouye, Takisawa, y Yamaguchi, 2001). Algunas plantas presentan una fracción de aceite esencial con actividad antimicrobiana, como es el caso de *Psidium guajava* L. Esta especie, mejor conocida como guayaba es una especie frutal perenne tropical y se encuentra distribuida en el continente Americano; se adapta a diferentes tipos de suelos y crece a temperaturas de 15 a 30°C (Morton, 1987). *Psidium guajava* L. ha sido usada en la medicina tradicional por su actividad biológica (Oh *et al*, 2005). Los aceites esenciales son extractos líquidos aromáticos y volátiles provenientes de material vegetal; las diferentes industrias han utilizado estos compuestos debido a sus propiedades biológicas. En las plantas, los aceites esenciales son considerados metabolitos secundarios debido sus propiedades antimicrobianas, antiparásitos, insecticida, antiviral, antifúngica y antioxidante (Deans y Ritchie , 1987). Las hojas de la guayaba contienen aceites esenciales con una gran cantidad de componentes entre los más conocidos se puede mencionar el 1,8 cineol y el transcariofileno (Li, Chen y Luo, 1999); la proporción de estos componentes está regida estrictamente a factores

genéticos y condiciones ambientales. Los aceites esenciales de la guayaba que han sido investigados por la industria farmacológica, han revelado una actividad de anti proliferación, antioxidante y antimicrobiana (Sacchetti *et al*, 2005). La industria alimentaria usaba estos aceites esenciales como saborizantes, en la actualidad, estos aceites son utilizados como conservante natural antimicrobiano en alimentos. Para la aplicación de aceites esenciales como conservantes de alimentos se debe conocer la concentración mínima de inhibición, el tipo de microorganismos que combate, el modo de acción y el efecto en los componentes del alimento con respecto a las propiedades antimicrobianas (Mygind, Lou, y Hyltdgaard, 2012). Generalmente, el efecto antioxidante del aceite esencial es menor que el del ácido ascórbico (Kulisica *et al*, 2004). El ácido ascórbico junto con otras vitaminas posee una gran capacidad antioxidante (Sangha y Stucki, 1998). La medición de esta capacidad antioxidante permite conocer el efecto antioxidante total en un fluido biológico por los efectos sinérgicos. Para determinar la capacidad antioxidante en un fluido, se utilizan diversos métodos de evaluación (Lazaro y Salagucci, 1998). Los microorganismos como bacterias, mohos y levaduras, deterioran los alimentos (García, 2006). Debido a la naturaleza de los microorganismos, estos se multiplican de forma homogénea hasta el momento en que los microorganismos patógenos predominan y colonizan el alimento excluyendo a otros (García, 2006). Para inhibir la actividad microbiológica, se ha evidenciado que los compuestos naturales tienen la capacidad de frenar su multiplicación y el deterioro en alimentos (Deans y Ritchie, 1987). En este contexto, se comprobó el efecto antioxidante del aceite esencial de guayaba en combinación con el ácido ascórbico en salchichas de pollo. Debido a sus propiedades y características, las soluciones antioxidantes determinaron el retardo del crecimiento de microorganismos, reemplazando los conservantes sintéticos y ofreciendo al consumidor un producto cárnico estable con antioxidantes naturales.

ALCANCE

La presente investigación se realizó en los laboratorios de química y el laboratorio de alimentos de la Universidad de las Américas. Con el fin de evaluar la capacidad antioxidante de la combinación de aceite esencial de guayaba con ácido ascórbico en salchichas de pollo, se realizaron los siguientes procesos: en primer lugar, la formulación de soluciones antioxidantes a partir de la combinación de aceite esencial de guayaba y ácido ascórbico; en segundo lugar, la evaluación de microorganismos como *Aeróbios Mesófilos*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, así como la evaluación físico química de pH, peróxidos y acidez titulable en la muestra, y en tercer lugar, la evaluación del efecto antioxidante de las soluciones antioxidantes óptimas.

La extracción del aceite esencial se realizó a partir de la hoja, debido a que estas estructuras contienen aceites esenciales (Li, Chen y Luo, 1999). Las soluciones antioxidantes se prepararon en rangos de 100 ppm hasta 1000 ppm, realizando diferentes combinaciones entre ácido ascórbico y aceite esencial de guayaba. A estas soluciones se midió la capacidad antioxidante y antimicrobiana para determinar la de mayor eficiencia a menor costo (Cardona y Mejía, 2009). La optimización del antioxidante natural se determinó a través del crecimiento de microorganismos en el alimento procesado y los cambios físicoquímicos en comparación con la acción de un antioxidante sintético en el mismo alimento procesado.

Finalmente, se identificó las soluciones antioxidantes óptimas en un alimento procesado en función de las variables de estudio, el tipo de solución antioxidante aplicada, tiempo de aparición de los microorganismos en el alimento procesado y capacidad antioxidante de las soluciones.

JUSTIFICACIÓN

Considerando que el tipo de alimentación, está relacionada directamente con la salud, el ser humano ha tomado la iniciativa de seleccionar los alimentos para una dieta balanceada y saludable. Es por esta razón, que la industria de alimentos y el consumidor, buscan alimentos con bajo contenido de aditivos sintéticos y libres de microorganismos (EUFIC, 2006).

Estudios epidemiológicos realizados, han establecido una asociación entre una dieta rica en antioxidantes y la prevención de enfermedades cardiovasculares, reumatológicas, cáncer y en el proceso de envejecimiento, entre otras (Sangha y Stucki, 1998). El deterioro de los alimentos por la acción de los microorganismos afecta a la salud pública a pesar de la diversidad de técnicas de conservación aplicadas. Las estadísticas sobre enfermedades transmitidas por alimentos en Ecuador según el Ministerio de Salud Pública, reflejan que en 2013, los casos contabilizados por intoxicación alimentaria son 1209 y en el año 2014 se han incrementado a 3418 casos; en Ecuador, el impacto de la intoxicación alimentaria evidencia que en provincias como Guayas han existido 920 casos, Pichincha 713 casos, El Oro 405 casos, entre otras (El telegráfo, 2014). Adicionalmente en la población, 1300 de esos casos, pertenecían a adultos de entre 20 y 49 años (El telegráfo, 2014).

La tendencia de la alimentación del consumidor, está enfocada en alimentos elaborados con conservantes naturales que eviten la contaminación con microorganismos patógenos y el tiempo de vida útil del producto sea mayor; de esta manera, el consumidor evita los productos con conservantes sintéticos (Rauha et al, 2000). Las industrias buscan alternativas para mejorar la calidad de los alimentos, sin elevar los costos de producción. Una alternativa es la sustitución de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturales, sin que estos alteren las características físicas, químicas y organolépticas de los productos (Yausín, 2007).

Los antioxidantes sintéticos como BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) y nitrito sódico son los más utilizados en la industria

(Cardona y Mejía, 2009), sin embargo, el reemplazo por aceite esencial de guayaba y ácido ascórbico para determinar la capacidad antioxidante y reducir la presencia de microorganismos, podría ser una opción para producir alimentos procesados más sanos, inocuos y de buena calidad.

En la actualidad, el beneficio de utilizar alternativas a los nitritos y nitratos radica en que el consumidor demanda productos más naturales con menos conservantes sintéticos. De manera que, se encuentran dispuestos a adquirir productos que no afecten su salud. Las enfermedades por acumulación de radicales libres presentan un alto índice de incidencia en la población; la presencia de microorganismos en el alimento deriva en brotes epidémicos debido a patologías asociadas; las estadísticas reflejan que anualmente, entre 900 y 1000 brotes son detectados (Andino y Castillo, 2010). Los aceites esenciales contienen compuestos que a menudo no son lo suficientemente potentes individualmente, pero con la adición de ácido ascórbico se producirá una sinergia entre los componentes con el fin de producir un efecto antioxidante de mayor alcance (Cardona y Mejía, 2009).

En esta investigación, se evaluó el efecto antioxidante del aceite esencial de guayaba en combinación con ácido ascórbico en salchichas de pollo. Para llegar a cumplir con la investigación, se evaluaron las variables de estudio tanto microbiológicas como físico- químicas y se realizó pruebas de la capacidad antioxidante de las soluciones antioxidantes óptimas en las muestras de salchichas de pollo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antioxidante del aceite esencial de guayaba en combinación del ácido ascórbico en salchichas de pollo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Formular soluciones antioxidantes a partir de la combinación del aceite esencial de guayaba y ácido ascórbico determinando la vida útil de salchichas de pollo.
2. Evaluar las muestras de salchichas de pollo elaboradas con soluciones antioxidantes mediante métodos microbiológicos y físico químicos.
3. Identificar la solución antioxidante óptima de la combinación de aceite esencial de guayaba y ácido ascórbico en salchichas de pollo.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Aditivos alimentarios

El Codex Alimentarius establece que los aditivos alimentarios se definen como sustancias o mezcla de sustancias que son adicionadas premeditadamente a productos alimenticios, con la finalidad de modificar los alimentos en procesos tecnológicos, en características organolépticas y de conservación (Gil y Ruiz, 2010), (Fernández *et al*, 2012). Desde la antigüedad, se ha registrado el uso casero de sustancias con funciones específicas que no han sido ingredientes característicos del alimento, para otorgar cualidades como estabilidad, conservación, aroma, sabor, color entre otras. (Fernández *et al*, 2012). Sin embargo, en los últimos 50 años la industria alimentaria ha incorporado el uso de aditivos en sus procesamientos; lo cual ha sido parte de avances tecnológicos, que han permitido el desarrollo de diversos aditivos y el incremento de su consumo (Branen, Davidson y Salminen, 2005).

Las investigaciones han revelado que el uso de aditivos en alimentos presenta beneficios como el suministro de alimentos nutritivos, mayor variedad de productos alimenticios de calidad y suministros alimentarios con precios accesibles (Branen, Davidson y Salminen, 2005). A pesar de los beneficios atribuidos a estas sustancias, por algunos años han existido dudas sobre las repercusiones en la salud debido al consumo de aditivos; investigadores han realizados exhaustivos estudios en animales para determinar la toxicidad de estas sustancias y la evolución de enfermedades como cáncer, Parkinson, enfermedades reproductivas y cardíacas (Branen, Davidson y Salminen, 2005).

Debido al uso generalizado de estos compuestos la legislación mundial y nacional de cada país determina mecanismos de control, controles toxicológicos y ventajas tecnológicas (Gil y Ruiz, 2010). El organismo encargado de la regulación internacional de aditivo es el comité mixto de la FAO/OMS; este establece a través del Codex Alimentarius que el aditivo tiene funciones como conservar las características nutritivas del alimento, extender la vida útil del alimento o producto, favorecer a un grupo de la población con

necesidades dietéticas, estabilizar productos alimenticios, resaltar cualidades organolépticas y favorecer procesos de producción (Gil y Ruiz, 2010), (Fernández *et al*, 2012).

En Ecuador, la entidad encargada de la regulación nacional de aditivos es el Instituto Ecuatoriano de Regularización; que a través de la norma general del Codex para Aditivos alimentarios establece los parámetros para la aplicación y consumo de aditivos. La norma INEN CODEX 192:2013 especifica los aditivos permitidos para cada alimento, de acuerdo a la ingesta diaria admisible (IDA), la inocuidad y el uso tecnológico justificado (INEN, 2013). La IDA es la dosis diaria máxima estimada del aditivo sin efecto negativo en la salud del consumidor; es decir, se obtiene a través del nivel máximo de compuesto que presenta algún efecto en el consumidor sobre un factor de seguridad de 100 (Gil y Ruiz, 2010). La ingestión diaria admisible no especificada (NE) aplica a sustancias que debido a su bajo nivel de toxicidad al ser añadidas a alimentos, no figuran como un riesgo eminente en el organismo humano a pesar de la proporción adicionada (INEN, 2013). Para los aditivos alimentarios la clasificación otorgada por el Código Alimentario Español, especifica que se pueden agrupar a 4 categorías de aditivos que abarcan de manera general la clasificación propuesta por la Unión Europea; es decir, que los aditivos se clasifican en (Gil y Ruiz, 2010):

- a) **Preservantes y antioxidantes:** sustancias que evitan modificaciones biológicas y químicas.
- b) **Potenciadores de sabor, colorantes y edulcorantes:** sustancias que transforman las cualidades organolépticas de los alimentos.
- c) **Espesantes, reguladores de pH, gelificantes:** sustancias que estabilizan características físicas.
- d) **Reguladores de maduración, correctores de vinificación y panificación:** sustancias encargadas de modificar alimentos.

1.1.1 Preservantes y antioxidantes

1.1.1.1 Preservantes

Los preservantes son sustancias naturales o sintéticas que tienen la capacidad de inhibir, retardar e interrumpir alteraciones biológicas producidas por la acción de los microorganismos en los alimentos (Gavilán, 2012). En la industria alimentaria, los preservantes permiten alargar la vida útil de los alimentos y evitar su deterioro; dependiendo de la cantidad y tipo de sustancias que se aplique (Gould, 2001). Sin embargo, la cantidad y tipo de preservantes están regulados para ciertos alimentos previniendo el exceso de estas sustancias (Masagati, 2013). En la tabla 1, se puede observar la clasificación completa de los aditivos preservantes, en dos grupos por su naturaleza que son: orgánicos e inorgánicos. Los preservantes orgánicos e inorgánicos actúan en un amplio espectro de alimentos debido a su configuración molecular (Gavilán, 2012).

Tabla 1. Clasificación general de los preservantes utilizados en la industria alimentaria.

Preservantes Orgánicos	Preservantes Inorgánicos
Boratos	Sulfitos
Sorbatos	Nitritos y Nitratos
Benzoatos	Propianatos
p-Hidroxi-Benzoatos	

Adaptado de Gavilán, 2012.

1.1.1.1.1 Preservantes inorgánicos

- **Nitritos y nitratos**

Los nitritos y nitratos son preservantes inorgánicos delimitados para cárnicos o productos derivados, así como para frutos del mar y algunos quesos (Gavilán, 2012). Desde la época romana, estas sustancias especialmente el nitrato potásico han sido ingredientes fundamentales para el proceso de curado de estos alimentos (Gould, 2001). La Unión Europea ha establecido códigos para aditivos; los códigos pertenecientes al grupo de nitratos y nitritos son:

- E-249 Nitrito potásico
- E-250 Nitrito sódico

- E-251 Nitrato sódico
- E-252 Nitrato potásico

En estos aditivos, el nitrito es el componente activo. Debido a la reacción de reducción del nitrato (NO^3^-), que es catalizada por enzimas bacterianas producto de la maduración se obtiene el nitrito (NO^2^-); el nitrito es una sustancia inestable, por lo cual, para controlar su efecto durante un período de tiempo se debe realizar concentraciones compuestas con nitratos (Gould, 2001). El nitrito permite la conservación de los productos cárnicos, evita alteraciones y produce un efecto de coloración en el curado; en el proceso de curado la coloración se produce por reacciones químicas entre la pigmentación natural de la carne, la mioglobina y el ión nitrito (Masagati, 2013).

La dosis máxima de uso de nitratos y nitritos en productos cárnicos se encuentra entre 150ppm y 300ppm; la toxicidad de este preservante inorgánico es aguda, debido a que si la cantidad sobrepasa 2 gramos puede causar la muerte ya que los nitritos actúan en la sangre junto con la mioglobina, de igual manera que en los productos cárnicos y se produce un compuesto (metahemoglobina) incapaz de convertir el oxígeno (Gavilán, 2012). También se producen sustancias cancerígenas como las nitrosaminas, que se forman por el uso de nitratos y nitritos; estas se pueden formar en los productos o dentro del organismo (Gavilán, 2012). La legislación nacional e internacional permiten el uso de nitratos y nitritos con el fin de garantizar la seguridad alimentaria, en especial, en productos cárnicos ya que debido a su composición puede generar crecimiento de microorganismos patógenos (Masagati, 2013).

1.1.1.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de detener procesos oxidativos en los alimentos; estas sustancias pueden ser naturales o sintéticas (Gavilán, 2012). La adición de estas sustancias permite que los componentes de los alimentos se estabilicen y no se vean afectados por la presencia del oxígeno (Vieira, 2003). La calidad de los alimentos se pueden ver afectados por

la oxidación endógena o exógena, presentando las siguientes características: desarrollo de rancidez por la oxidación de grasas insaturadas, decoloración de pigmentos y otros componentes (Vieira, 2003). Los tipos de oxidación en los alimentos son (Gavilán, 2012):

- a) Auto oxidativa por formación de radicales libres.
- b) Oxidativa metálica o quelatación
- c) Foto oxidativa o radiación
- d) Oxidativa biológica por inhibición de enzimas.

En los antioxidantes se encuentra un gran número de sustancias que previenen, retrasan o minimizan los procesos oxidativos; por lo cual la acción de cada aditivo varía de acuerdo a su composición (Branen, Davidson y Salminen, 2005). Los antioxidantes se encuentran en tres grupos generales, que están representados en la tabla 2. La acción de los antioxidantes naturales es menos efectiva y precisa que los antioxidantes sintéticos, la mayoría de estos se utilizan en alimentos naturales (Vieira, 2003).

Tabla 2. Clasificación general de los antioxidantes utilizados en la industria alimentaria

Antioxidantes Naturales	Antioxidantes Sintéticos	Antioxidantes Misceláneos
Ascorbatos	Galatos	BHA
Tocoferoles	BHT	4- hexilresorcinol
		Cloruro estanoso

Adaptado de Gavilán, 2012.

Dentro de los aditivos antioxidantes también se encuentran los aditivos bio antioxidantes; estas son sustancias con efecto o capacidad antioxidante debido a su estructura química y los compuestos bio activos que la conforman (Gavilán, 2012). El efecto antioxidante de los bio antioxidantes está basado en la facultad de los compuestos bioactivos para impedir las reacciones químicas de oxidación en lípidos, carbohidratos y proteínas que forman compuestos como los óxidos y peróxidos, que provocan en el alimento características organolépticas no deseadas (Cadenas y Packer, 2005).

Los bio antioxidantes se encuentran de forma natural o pueden ser adicionados a los alimentos, aportan propiedades nutritivas que contribuyen con las funciones metabólicas del organismo; los componentes bioactivos son carnosina, carnosol, carotenos, licopenos, fitoenos, fitofluenos, ubiquinona, entre otros.

1.1.1.2.1 Antioxidantes naturales

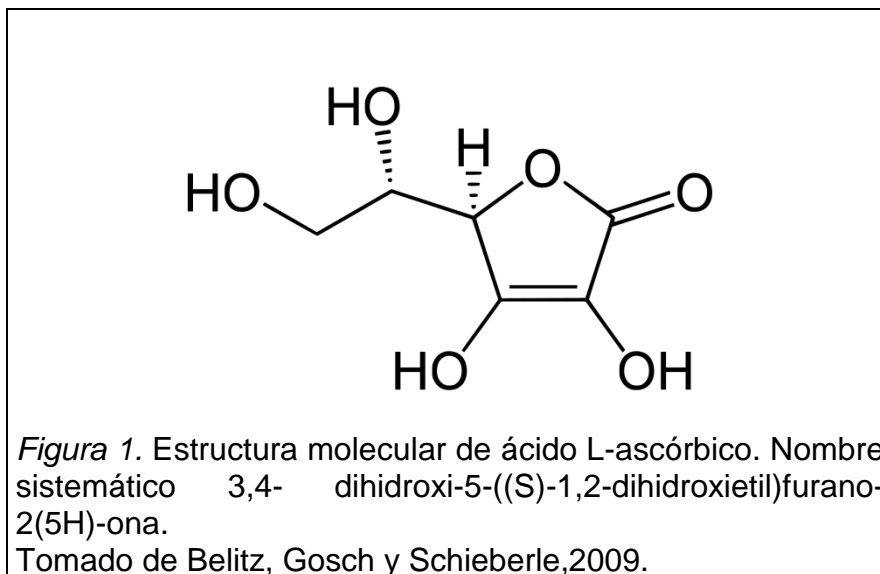
- **Ascorbatos**

Los ascorbatos son sales o ésteres provenientes del ácido ascórbico (Masagati, 2013); dentro de este grupo se encuentran los siguientes aditivos antioxidantes naturales o de síntesis (Gavilán, 2012):

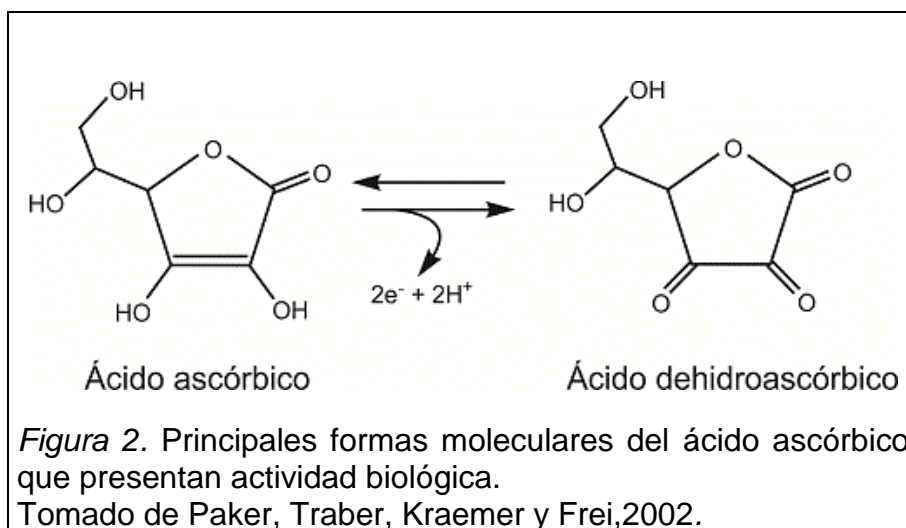
- a) **E300:** Ácido L-ascórbico o vitamina C
- b) **E301:** Ascorbato sódico
- c) **E302:** Ascorbato cálcico
- d) **E304 (i):** Palmitato de L-ascorbilo
- e) **E304 (ii):** Estearato de L-ascorbilo

- **Ácido L-ascórbico o vitamina C**

El ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble antioxidante, con la capacidad de inhibir la peroxidación de lípidos en las membranas celulares debido a su presencia en la fase acuosa extracelular (Belitzs, Grosch y Schieberle, 2009). La vitamina C se encuentra de forma natural en frutas y verduras, su fórmula molecular es $C_6H_8O_6$ (Figura1). Al ser una coenzima vitamínica de transporte electrónico o de óxido-reducción y tener potencial reductor, interviene en reacciones metabólicas de hidroxilación en la síntesis del colágeno, formación de paredes capilares y en el metabolismo de los carbohidratos (Belitzs, Grosch y Schieberle, 2009).



La actividad antioxidante del ácido ascórbico proviene de sus moléculas principales en equilibrio (Figura 2), es decir, del traslado de L-ascórbico a su estructura oxidada L-dehidroascórbico. Este proceso habilita la molécula para inhibir la acción de radicales oxidativos como $\cdot\text{O}_2$ y $\cdot\text{OH}$, así como de radicales acuosos (Paker, Traber, Kraemer y Frei, 2002).



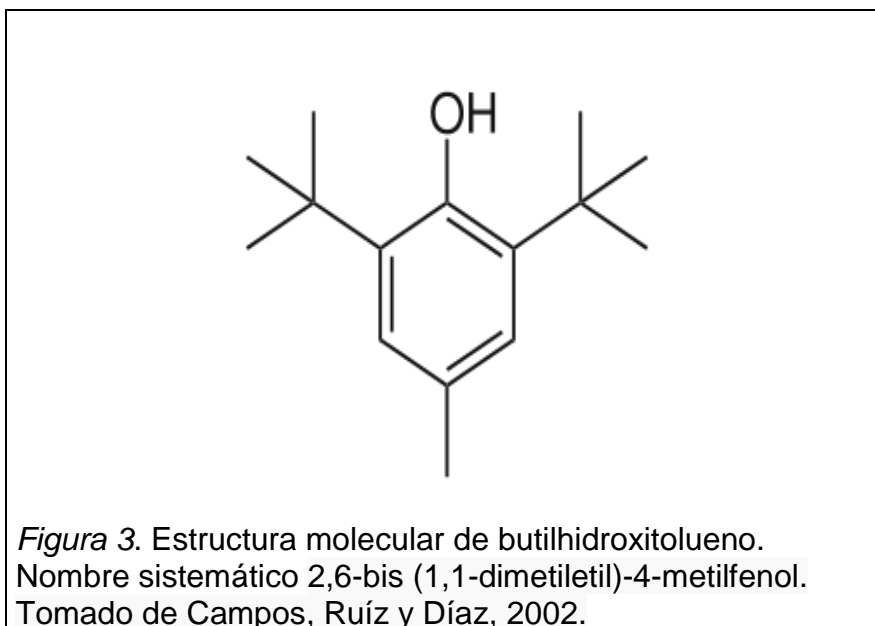
Sin embargo, los procesos de oxidación afectan a estas moléculas ya que el ácido L-ascórbico es susceptible a la formación de complejos de transición y el ácido L-dehidroascórbico a la degradación enzimática (Paker, Traber, Kraemer y Frei, 2002). El organismo humano requiere vitamina C para realizar procesos

metabólicos, por lo cual se ha determinado que el requerimiento mínimo diario es de 30mg/día mientras que la cantidad recomendada es de 60mg/ día; este aditivo antioxidante es utilizado con mayor frecuencia en la industria alimentaria y está presente en todo tipo de alimentos (Gil y Ruiz, 2010).

1.1.1.2.2 Antioxidantes sintéticos

- **Butilhidroxitolueno (BHT)**

El BHT es un antioxidante sintético, su fórmula molecular es $C_{15}H_{24}O$ (Figura 3). Este aditivo antioxidante liposoluble es utilizado en aceites y grasas, con el fin de retrasar y prevenir los procesos de enranciamiento de lípidos (Acofarma, 2009). Dentro de los alimentos la dosis recomendada de butilhidroxitolueno se encuentra entre 0,01- 0,03%, asegurando su reparto homogéneo en el alimento (Campos, Ruiz y Díaz, 2002).



El efecto antioxidante del BHT al combinarse con otros antioxidantes como el BHA produce mayor efectividad y precisión, siendo mayor su potencia que la de antioxidantes naturales (Acofarma, 2009). El BHT no evita la producción de radicales libres, pero estos compuestos de la oxidación al ligarse con el antioxidante sintético, los estabiliza formando radicales menos activos, que se

consumirán en la reacción otorgando estabilidad a los lípidos (Campos, Ruiz y Díaz, 2002).

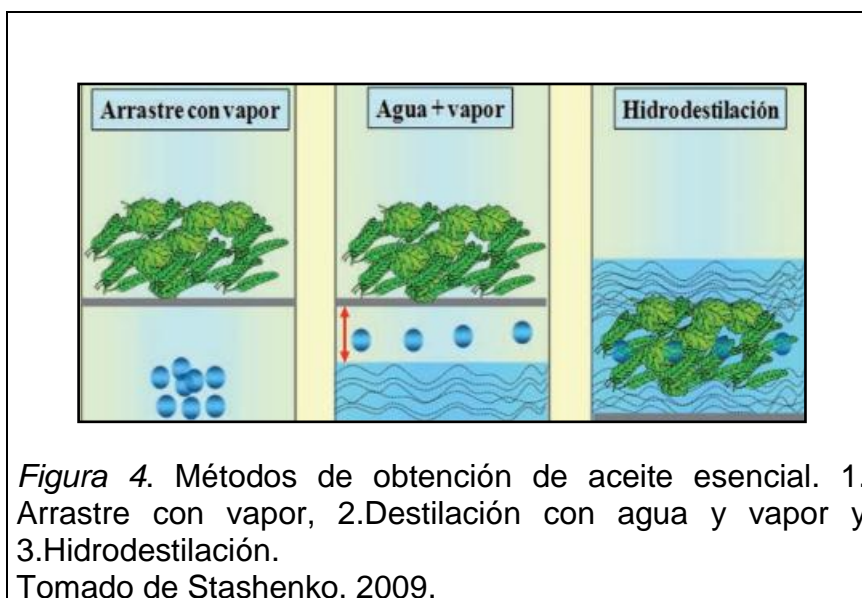
1.1.1.2.3 Bioantioxidantes

- **Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son extractos líquidos aromáticos y volátiles provenientes de material vegetal; las diferentes industrias han utilizado estos compuestos debido a sus propiedades biológicas (Martínez, 2003). En las plantas los aceites esenciales son considerados metabolitos secundarios debido sus propiedades antimicrobiana, antiparásitaria, insecticida, antiviral, anti fúngica y antioxidantes (Bruneton, 2001). Los aceites esenciales están combinados por componentes alifáticos de bajo peso molecular, monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Martínez, 2003). La industria alimentaria en la antigüedad, usaba estos aceites esenciales como saborizantes y aromatizantes. En la actualidad, estos aceites son utilizados como conservante natural antimicrobiano de alimentos. Para la aplicación de aceites esenciales como conservantes de alimentos se debe conocer la concentración mínima no tóxica, el tipo de microorganismos que combate e inhibe, el modo de acción y el efecto antioxidante en los componentes del alimento (Mygind, Lou, y Hyldgaard, 2012). Los extractos líquidos aromáticos se obtienen mediante diversos métodos de extracción ya sea de la raíz, tallo, hojas, flores o frutos; de acuerdo a la especie de la planta, se utiliza el órgano que posee una mayor cantidad de esta fracción (Bruneton, 2001). La obtención de los aceites esenciales puede realizarse mediante diversos métodos, ya sea de manera natural o a través de solventes; la ventaja de la obtención natural es que permite obtener aceites esenciales sin cambios en su composición (Martínez, 2003). Los tres métodos naturales más utilizados son:

- a) Arrastre de vapor (Figura 4):** proceso en el cual la materia prima vegetal es colocada en un alambique, que produce vapor saturado a baja presión; los aceites son separados y arrastrados por condensación para posteriormente ser separados por fases (Stashenko, 2009).

- b) **Destilación con agua y vapor (Figura 4):** proceso de extracción en el cual la materia vegetal se encuentra en suspensión y el vapor húmedo traspasa el tejido obteniendo fracciones de aceite esencial (Stashenko, 2009).
- c) **Hidrodestilación (Figura 4):** proceso en el cual la materia prima vegetal se coloca en el balón y posteriormente se afora con agua, sometiéndose a calor y generando vapor efluente saturado a presión atmosférica (Rodríguez, Alcaraz, y Real, 2012). La presión atmosférica superior provoca la extracción del aceite esencial mediante un reflujo interno de agua, se produce la condensación del vapor y se deposita el aceite esencial (Rodríguez, Alcaraz, y Real, 2012).



- **Aceite esencial de guayaba**

Algunas plantas presentan una fracción de aceite esencial con actividad biológica, como es el caso de *Psidium guajava* L. Esta especie mejor conocida como guayaba es una especie frutal perenne tropical y se encuentra distribuida en el continente Americano; se adapta a diferentes tipos de suelos y crece a temperaturas de 15 a 30°C (Pérez, Mitchell y Vargas, 2008). Estudios comprueban que del material vegetal, sea hojas o frutos, se obtienen extractos que contienen en su estructura flavonoides, polifenoles y compuestos bioactivos; sin embargo en las hojas de guayaba se encuentra también ácidos

fenólicos que otorgan una mayor capacidad antioxidante (Rodríguez *et al*, 2012).

De acuerdo al estudio realizado por Rodríguez, Árias, Vásquez, Martínez y Stashenko en 2012, los porcentajes de los compuestos encontrados en la hoja de guayaba originarias de Colombia (Tabla 3) en su mayoría son *trans-β*-cariofileno con 12,8% seguido por *β*-selineno con 7%; la proporción de componentes está regida estrictamente a factores genéticos y condiciones ambientales, por esta razón investigaciones del aceite esencial de guayaba en otros países presentan los mismos compuestos variando sus proporciones (Khadhri *et al*, 2014).

Tabla 3. Compuestos presentes en la hoja de Guayaba.

COMPUESTO	CANTIDAD RELATIVA EN HOJA%
<i>trans-β</i> -Cariofileno	12,8
<i>β</i> -Selineno	7,0
<i>α</i> -Selineno	6,9
<i>α</i> -Copaeno	6,5
<i>trans-α</i> -Bergamoteno	6,4
<i>trans</i> -Calameno	2,7
Limoneno	2,1
Neointermedeol	2,1
Trans-1,4-Cadinadieno	1,8
Óxido de cariofileno	1,6
<i>α</i> -Humuleno	1,4
Valenceno	1,3
<i>δ</i> -Cadineno	1,2
Amorfeno	1,0
<i>α</i> -Muuroleno	1,0
Aromadendreno +(Z)- <i>β</i> -farneseno	1,0
9- <i>epi</i> -(E) -Cariofileno	0,7
1,8-Cineol	0,4
Dauca-5,8,-dieno	0,4
<i>α</i> -Santaleno	0,3
<i>γ</i> -Cadineno	0,2
<i>α</i> -Calacoreno	0,2

Tomado de Rodríguez, Árias, Vásquez, Martínez, y Stashenko, 2012.

El aceite esencial de guayaba presenta un alto contenido de hidrocarburos sesquiterpénicos que actúan como fitoalexinas, es decir, compuestos con actividad antimicrobiana evitando la proliferación de bacterias y hongos en las plantas; la presencia de hidrocarburos sesquiterpénicos, terpenos y derivados oxigenados forman terpenoides (Stashenko, 2009).

Los aceites esenciales de la Guayaba que han sido investigados por la industria farmacológica han revelado una actividad de anti proliferación, antioxidante y antimicrobiana (Sacchetti *et al*, 2005); su aplicación en alimentos ha sido limitada debido a los cambios organolépticos evidentes en el alimento (Torres, Ricciardi, Agrelo y Ricciardi, 2002).

1.2 Embutidos

La norma INEN 1217: 2006 define a los embutidos como productos procesados con carne, grasa y otras partes del animal formando una emulsión conjuntamente con los condimentos, aditivos o vegetales que posteriormente se compactarán en envolturas naturales o artificiales (INEN, 2006). Los embutidos contienen ingredientes con funciones ligantes como proteína de soya o proteína de lácteos, con capacidad estabilizante como almidones, antioxidantes provenientes de especies y aditivos alimentarios como nitratos o polifosfatos (Amerling, 2001).

Los embutidos constituyen músculo y parte del tejido conectivo que se encuentra en la fase acuosa y contiene proteínas solubles y lípidos; las proteínas solubles como miofibrilares y sarcoplasmáticas, actúan como agentes emulsificantes y estabilizantes, la extracción de estas se realiza mediante cloruro de sodio (Amerling, 2001).

La formación y estabilidad de los embutidos depende de la temperatura en el proceso, dimensión de partículas de grasa, pH, viscosidad y proteínas solubles. La temperatura ideal de la emulsión oscila entre 20- 25°C en el proceso de picado, molienda y mezcla; por esta razón, se adiciona hielo que reduce la viscosidad y evita la fusión de las partículas de grasas (Amerling, 2001).

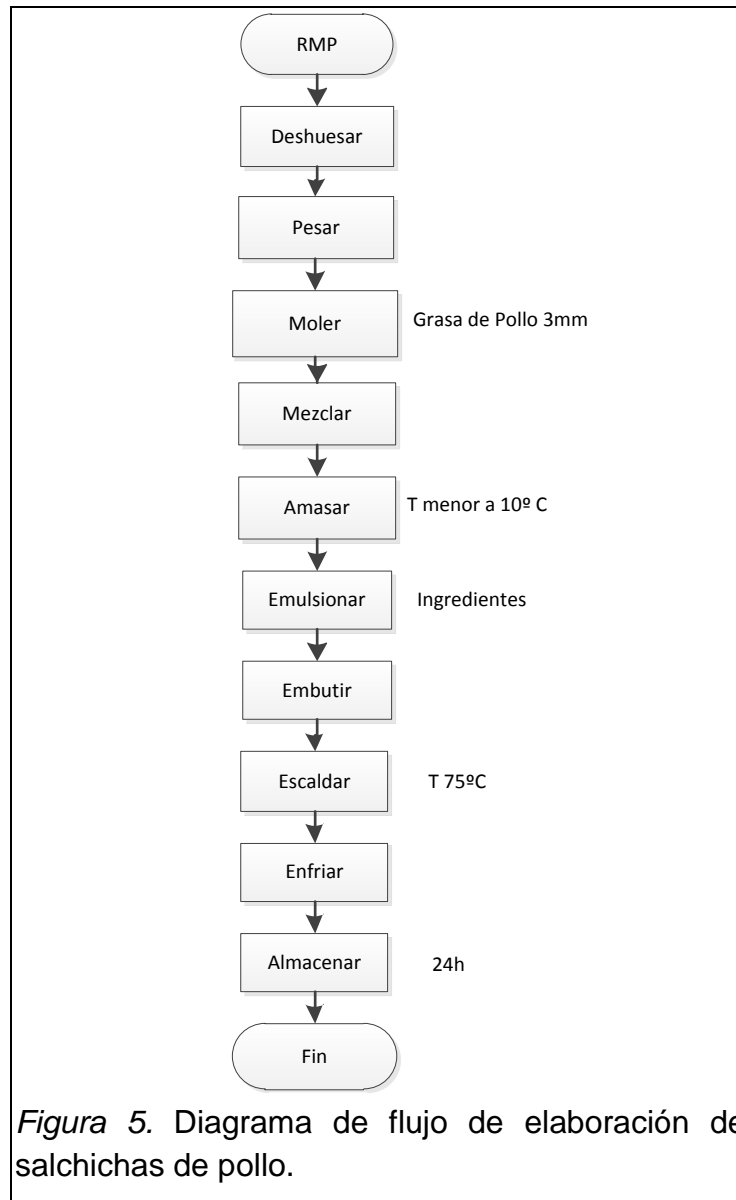
Las emulsiones cárnicas se clasifican en tres grupos principales:

- a) Embutidos crudos
- b) Embutidos cocidos
- c) Embutidos escaldados.

1.2.1 Norma INEN para productos cárnicos precocidos

La Norma INEN 1217: 2006 define a las salchichas como emulsiones de carne, grasa, otros ingredientes y aditivos que sufren un proceso de ahumado o cocción. Las salchichas pertenecen al grupo de embutidos escaldados (INEN, 2006). Este tipo de embutidos es sometido a un proceso térmico llamado escaldado o pre cocción; que permitir la conservación de la emulsión inhibiendo la actividad microbiana (Bedolla *et al*, 2004).

El proceso de escaldado tiene la finalidad de coagular proteínas y reducir las colonias de microorganismos, la temperatura óptima del agua para este tratamiento es de 75°C (Amerling, 2001). La carne de pollo debe pasar por una serie de procesos hasta obtener la emulsión embutida en las tripas naturales o artificiales, la representación de la elaboración de salchichas de pollo esta representada en el diagrama de flujo de la Figura 5. La carne más utilizada en la industria alimentaria es la de pollo, ya que estas aves tienen un crecimiento acelerado de carne, tiene textura blanda y su sabor es apetecido (Bedolla *et al*, 2004).



1.2.1.1 Análisis microbiológico

El análisis microbiológico es el método que permite la investigación de la presencia o ausencia de una amplia diversidad de microorganismos presentes en un alimento determinado; se realizan diluciones y posteriormente se siembra en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de los microorganismos (Allaert y Escolá, 2002).

El análisis microbiológico es un aspecto de importancia en cuanto a la calidad del alimento intrínseca y extrínsecamente, los microorganismos son causantes de procesos de deterioro, de la disminución de la vida útil del producto y

causantes de ETAs (enfermedades producidas por alimentos) (Andino y Castillo, 2010).

Cada microorganismo se desarrolla en condiciones controladas de nutrición, temperatura y humedad, el conteo de ufc se realiza entre 24 y 72 horas después de su incremento. Con el fin de determinar la concentración del microorganismo por gramos de alimento (Allaert y Escolá, 2002). De acuerdo a la Norma INEN 1338: 2012, los microorganismos que se desarrollan dentro de los embutidos escaldados son: Aerobios mesófilos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* (INEN 1338, 2010).

La calidad del producto y su deterioro depende de la cantidad de unidades formadoras de colonias de estos microorganismos, el Instituto Ecuatoriano de Regulación determinó el rango de ufc para cada microorganismo en embutidos escaldados como se observa en la Tabla 4 (INEN 1338, 2010).

Tabla 4. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos cocidos

Requisitos	n	c	m	M	Método de Ensayo
Aerobios mesófilos *ufc/g	5	1	$5,0 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^7$	NTE INEN 1529-5
<i>Escherichia coli</i> *ufc/g	5	0	< 3	-	NTE INEN 1529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> *ufc/g	5	1	$1,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^4$	NTE INEN 1529-14

Tomado de Norma INEN, 2011.

n: número de unidades de la muestra

c: número de unidades defectuosas

m: nivel de aceptación

M: nivel de rechazo

1.2.1.1.1 Aerobios mesófilos

Los aerobios mesófilos o también llamados de recuento total, se desarrollan a temperaturas entre 20 – 45°C en presencia de oxígeno libre; las condiciones óptimas de crecimiento son 30 y 40°C (INEN, 2006). Están conformados por bacterias, mohos y levaduras, cabe recalcar que la mayoría de bacterias mesófilas presentes en alimentos son patógenas (Andino y Castillo, 2010).

La presencia de aerobios mesófilos en la muestra determinan la inocuidad del alimento, con respecto a la materia prima, manipulación, procesamiento y almacenaje; la carga microbiana puede ser o no ser patógena, debido a que este grupo abarca a todo tipo de microorganismos (Andino y Castillo, 2010).

Para determinar las unidades formadoras de colonias se debe evitar la contaminación cruzada, el material debe encontrarse estéril y el procedimiento debe ser controlado; el medio de cultivo más utilizado para la determinación de aerobios mesófilos es el agar de recuento en placa (PCA) (INEN, 2006). Este medio sólido cuenta con los nutrientes que permitirán el desarrollo de aerobios mesófilos y un pH de 7, está compuesto por 5 gramos de triptona ,1 gramo de dextrosa, 2,5 gramos extracto de levadura y 12 gramos de agar (Mast Group, 2000).

1.2.1.1.2 *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria bacilos, gram negativo caracterizadas por la fermentación láctica y produce gas, pertenece al grupo de enterobacterias (INEN, 1990). Estas se encuentran presentes en el tracto intestinal, la contaminación se presenta cuando los procesos de manipulación del alimento son deficientes (Andino y Castillo, 2010). Algunos serotipos de esta bacteria no producen síntomas de intoxicación pero los cepas de *E. coli* enteropatógenas producen gastroenteritis, diarrea hemorrágica y otras enfermedades como insuficiencia renal y hasta la muerte por la ingesta de alimentos contaminados (Hernández, 2012).

El análisis microbiológico permite determinar a través de *E. coli* si los procesos térmicos han sido eficientes ya que esta puede ser patógena (Andino y Castillo, 2010). Los tratamientos térmicos mayores a 65°C eliminan la bacteria, por lo cual si existe presencia de este microorganismo en un alimento el proceso post- térmico presenta fallas en su implementación y el producto alimenticio sufrirá deterioro (Andino y Castillo, 2010).

Para identificar las colonias de *Escherichia coli*, existen varios medios de cultivo en los que la muestra puede ser sembrada; la coloración de las ufc depende de la composición del agar (INEN, 1990). El agar eosina-azul de metileno (EMB) de Levine es un medio sólido selectivo, permite la diferenciación de bacterias lactofermentadoras; el agar otorga a las bacterias coloración entre púrpura y verde metálico (BritaniaLab, 2014). El medio de cultivo EMB con pH 7,1 contiene: 10 gramos de peptona, 10 gramos de lactosa, 2 gramos de fosfato dipotásico, 15 gramos de agar, 0,4 gramos de eosina y 0,065 gramos de azul de metileno (BritaniaLab, 2014).

1.2.1.1.3 *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos son bacterias gram positivos, en forma de cocos caracterizados por ser catalasa positivos pertenecientes a la familia Micrococcaceae; la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, procesos térmicos de 60°C destruye las bacterias (Inen 1529-14, 1998). La ingesta de alimentos con presencia de *Staphylococcus aureus* produce vómitos, diarrea, náuseas, deshidratación, dolor abdominal entre otros. Esta bacteria produce una toxina que se forma en el alimento y produce los síntomas de intoxicación (Arreola, 2012). Estas bacterias se encuentran en superficies, vías respiratorias y piel; estos microorganismos son indicadores microbiológicos de control sanitario. *Staphylococcus aureus* producen toxiinfección cuando se encuentran en los alimentos, producen toxinas termoestables que afectan a la salud del consumidor (Andino y Castillo, 2010).

El medio de cultivo sólido utilizado con mayor frecuencia es el Agar Manitol Salado debido a que detecta *Staphylococcus aureus* y también se caracteriza

por su aislamiento selectivo (Dickinson, 2013). El agar Manitol Salado con pH 7,4 contiene 1 gramo de extracto de carne bovina, 5 gramos de digerido pancreático de caseína, 5 gramos de digerido péptido de tejido animal, 75 gramos de cloruro sódico, 10 gramos de D-manitol, 0,025 rojo fenol y 15 gramos de agar (Dickinson, 2013).

1.2.1.2 Análisis físico-químico

Los análisis físico-químicos evalúan la presencia de determinados componentes de una muestra de alimento, a través su medición se establecerán los parámetros óptimos de cada producto alimenticio (UNAM, 2007). En la industria alimentaria, se realizan muestreos al azar para determinar la presencia de sustancias constantes, aleatorias o ausentes, las variaciones se producen por reacciones endógenas de los componentes; esto determina la aceptabilidad del alimento (PAPIME, 2009).

1.2.1.2.1 pH

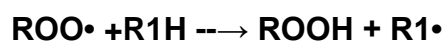
El pH es una técnica de análisis en la cual se establece la concentración de iones de hidrógeno de la muestra; esta medida determina la estabilidad en los alimentos ya que de acuerdo a la acidez del medio da paso al crecimiento de diversos microorganismos (Periago, 2011). En el proceso post-mortem el músculo se convierte en carne debido al descenso del pH producido por el ácido láctico, el pH óptimo establecido para una carne madura es de 5.4 y 5.6. La alteración del pH de la carne provoca cambios bioquímicos que afectan el tiempo de vida útil, características organolépticas y permiten el desarrollo de microorganismos alterativos (Periago, 2011). Para la elaboración de embutidos la selección de carne no alterada es primordial, ya que si la carne incrementa su pH se desarrollan microorganismos que degradan la proteína del producto produciendo alteraciones significativas; por lo cual con el fin de descender el pH y mantenerlo óptimo se adiciona hidratos de carbono como sustratos para el crecimiento de microorganismos acidófilos benéficos para este proceso (Periago, 2011).

1.2.1.2.2 Análisis de lípidos

Los alimentos están constituidos por lípidos, carbohidratos y proteínas que conforman su estructura. El análisis de lípidos determina los cambios bioquímicos de estos componentes que se desarrollan en los alimentos por el procesamiento y almacenamiento (UNAM, 2007). Los lípidos pueden estabilizarse a través de procesos térmicos, las condiciones que provocan oxidación o degradación de estos compuestos son: procesos tecnológicos con temperaturas elevadas y concentración de oxígeno en el alimento (Gil y Ruiz, 2010).

La segunda causa de deterioro de productos alimenticios es la oxidación de lípidos por los compuestos nocivos que originan enranciamiento, así como la alteración en las proteínas y aminoácidos; que causa modificaciones en el valor nutritivo y características organolépticas no deseadas (Gil y Ruiz, 2010).

La reacción de la oxidación de lípidos propaga los radicales libres, provocando que los ácidos grasos se combinen con el oxígeno formando compuestos llamados hidroperóxidos (Calvo, 2005). Estos compuestos estimulan la presencia de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer entre otras. La oxidación lipídica se representa en la siguiente reacción (Calvo, 2005):



- **Determinación de peróxidos**

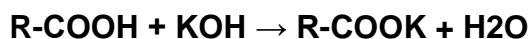
Los peróxidos son componentes que contienen un enlace oxígeno-oxígeno; en la industria alimentaria se utiliza esta sustancia para medir la calidad de grasas y aceites debido a que los alimentos se ven afectados por la alteración de los lípidos como la oxidación o enranciamiento lipídico (Belitz, Grosch, y Schieberle, 2009).

La determinación de peróxidos se realiza mediante diversos métodos cualitativos y cuantitativos ya sean volumétricos o colorimétricos (Belitz, Grosch, y Schieberle, 2009). El método para determinación de peróxidos en alimentos de Merck es una técnica práctica para estudiantes debido a que se realiza con tiras semi cuantitativas de comparación (Merck, 2015).

En una muestra de alimento en dilución se introduce la tira, en la cual el oxígeno del peróxido se transporta mediante la peroxidasa a la tira y por la presencia de un indicador redox orgánico el color de la tira cambia, la lectura depende de la cantidad de peróxidos producidos en el alimento (Merck, 2015).

- **Acidez titulable**

La acidez titulable es un método de análisis volumétrico para alimentos, el cual mide el contenido de ácidos grasos libres presentes en una muestra. Mediante titulación directa o también llamada método volumétrico se calcula la molaridad de uno o más ácidos grasos, provocando la siguiente reacción (PAPIME, 2009):



Para determinar la acidez de un alimento se utiliza agentes que actúan como titulantes (base), analitos (sustancia que contiene el ácido) e indicadores (fenoftaleína) (Enriquez, 2013). La reacción que se produce por la interacción del ácido y la base, el indicador es aquel que otorga el cambio de coloración en la muestra (PAPIME, 2009).

En la industria de alimentos se debe tomar en cuenta la acidez desarrollada naturalmente o por procesos térmicos o biológicos; este análisis permite determinar en los productos cárnicos las alteraciones y variaciones que sufren los compuestos dentro del alimento durante su período de vida útil (Enriquez, 2013).

1.2.1.2.3 Capacidad antioxidante (Método DPPH)

Los métodos para determinar la capacidad antioxidante están enfocados en la captación de radicales libres (Ramos, Castañeda y Ibáñez, 2008). En los alimentos se producen estos compuestos que afectan características intrínsecas y extrínsecas, el uso de soluciones antioxidantes impide la acción de los radicales libres y ejerce un efecto antioxidante sobre los mismos (Ramos, Castañeda y Ibáñez, 2008).

La capacidad antioxidante determina si una solución antioxidante neutraliza los radicales, mediante el compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidrazil o DPPH (Sharma, Yadav y Bhardwaj, 2013). El método DPPH se evalúa mediante espectrofotometría, la concentración inicial y final del compuesto determinan el efecto antioxidante de la solución (Ramos, Castañeda y Ibáñez, 2008). Williams, Cuvelier y Berset en 1995, investigan el principio del método que consiste en que el radical violeta tiene un electrón libre y el antioxidante capta este radical provocando una reacción de decoloración, así como una disminución en la absorbancia.

La capacidad de donar hidrógeno mide el efecto antioxidante de una muestra, la reacción de DPPH se estabiliza mediante los antioxidantes midiendo la absorbancia de la solución en el espectrofotómetro a 517 nm para determinar el porcentaje de actividad antioxidante (Palomo *et al*, 2009). La concentración final de DPPH refleja si la solución antioxidante cede electrones, por lo cual el compuesto disminuye su absorción de radiación. El compuesto es un radical que cuenta con las siguientes características: estabilidad, coloración violeta intensa y absorción de radiación (517nm) (Ramos, Castañeda y Ibáñez, 2008). El proceso de decoloración indica el 100 % de capacidad para atrapar radicales libres y un valor aproximado a 0 determina una capacidad nula (Palomo *et al*, 2009).

1.3 Estudio de vida útil

La vida útil es un estudio mediante la cual se determina el tiempo que perdurará un alimento sin presentar cambios intrínsecos o extrínsecos, siendo apto para su consumo (AditechCorp, 2010). Este estudio es un factor determinante para los productos alimentarios debido a que posterior a su fabricación el alimento debe encontrarse en condiciones óptimas y debe mantener su calidad (AditechCorp, 2010). De acuerdo a la legislación de cada país, cada producto debe ser evaluado y debe presentar una fecha máxima de consumo.

La industria alimentaria transforma materia prima en productos elaborados que deben ser evaluados en aspectos microbiológicos, nutritivos y sensoriales (AditechCorp, 2010). Los análisis de vida útil para alimentos están establecidos para garantizar la calidad del producto alimentario y su duración; se establecen los siguientes estudios (AditechCorp, 2010):

- a) **Estudios de vida útil a tiempo real:** análisis del alimento en el período de tiempo establecido, condiciones reales de almacenaje. Los resultados de este estudio son: los cambios secundarios, determinación de vida comercial y transformaciones bioquímicas, así como organolépticas en el producto.
- b) **Estudios de vida útil secundarios:** análisis del alimento abierto, en condiciones establecidas por el fabricante en el empaque.
- c) **Estudio microbiológico:** evaluación del desarrollo de colonias de microorganismos presentes o inoculadas en el alimento.
- d) **Estudio de desarrollo de modelos de predicción:** determinación de un factor de evaluación de productos similares en diversas condiciones de almacenaje.

- e) **Test acelerados:** evaluación del alimento y sus procesos de degradación en condiciones controladas como temperatura y humedad, reduciendo el tiempo de estudio de vida útil.

- f) **Estudio de extensión de vida útil:** mejoramiento de procesos, materia prima e ingredientes de los alimentos desarrollando un producto que perdurará en un periodo de tiempo extendido.

Los estudios que se realizan con mayor frecuencia en la industria alimentaria son de tiempo real y acelerados; los parámetros de control son similares para estos estudios. Los análisis que deben estar establecidos son análisis microbiológicos, análisis físico-químicos y sensoriales (AditechCorp, 2010). Se define la vida útil como período de estabilidad mínima de duración, en el cual el alimento deberá mantener sus características organolépticas y ser seguro para el consumo (AscaBrief, 2015). Los estudios de vida útil a tiempo real estiman la presencia de microorganismos en un producto alimentario estableciendo la estabilidad del alimento en condiciones experimentales, así como los cambios fisicoquímicos provocados (AscaBrief, 2015). Los criterios a analizar en el alimento se definen de acuerdo a la legislación y normas establecidas por cada país, en este caso los microorganismos que influyen de manera negativa en productos comercializados; disponiendo de información de durabilidad con respecto a las ufc presentes (AscaBrief, 2015).

2. METODOLOGÍA

La presente investigación se realizó en el laboratorio de procesamiento de cárnicos, en el laboratorio de microbiología y en laboratorio de química de la Universidad de las Américas. El diseño experimental se determinó de acuerdo a las concentraciones de soluciones antioxidantes, los porcentajes de antioxidantes se establecieron a través de pruebas preliminares. Se aplicó el diseño de bloques completamente al azar (DBCA) para analizar el efecto antioxidante de los tratamientos representados en la tabla 5. Se realizaron siete tratamientos con tres réplicas. El objetivo del diseño fue determinar el efecto antioxidante de las soluciones de aceite esencial de guayaba y ácido ascórbico en salchichas, tomando en consideración como actúan las variables de estudio que son: Aeróbios mesófilos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, pH, acidez titulable y peróxidos.

Tabla 5. Descripción de tratamientos aplicados en las muestras de salchicha de pollo.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
Tratamiento 1	Sin soluciones antioxidantes
Tratamiento 2	BHT 100 ppm
Tratamiento 3	500ppm aceite esencial de guayaba +200 ppm ácido ascórbico.
Tratamiento 4	600ppm aceite esencial de guayaba +300 ppm ácido ascórbico.
Tratamiento 5	800ppm aceite esencial de guayaba +500 ppm ácido ascórbico.
Tratamiento 6	1000ppm aceite esencial de guayaba +700 ppm ácido ascórbico.
Tratamiento 7	1000ppm aceite esencial de guayaba

Para formar las soluciones antioxidantes, el aceite esencial de guayaba se midió mediante una micropipeta Ecopipette Capp de 10-100 μ l; el ácido

ascórbico en cambio, se pesó en la balanza analítica de igual manera el antioxidante BHT. Posteriormente, se aplicó las soluciones en las muestras de salchichas de pollo, de acuerdo a las concentraciones establecidas para cada tratamiento. Cada muestra señalada se empacó a vacío individualmente y se almacenó en refrigeración de 0-4°C; estas se analizaron cada 5 días durante un mes como se representa en la Tabla 6. Las variables de estudio evaluadas pertenecen a los análisis microbiológicos y a los análisis fisicoquímicos. Mediante el programa Infostat 2008 se realizó el análisis de varianza para determinar la diferencia significativa entre tratamientos; se comparó los tratamientos en el período de tiempo establecido aplicando el método de Tukey calculando los valores críticos con un 95% de confiabilidad.

Tabla 6. Procedimiento establecido para análisis microbiológicos y fisicoquímicos de las muestras de salchichas de pollo.

	Día 0	Día 5	Día 10	Día 15	Día 20	Día 25	Día 30
Tratamiento 1							
Tratamiento 2							
Tratamiento 3							
Tratamiento 4							
Tratamiento 5							
Tratamiento 6							
Tratamiento 7							

2.1 Obtención del aceite esencial de guayaba

El aceite esencial se extrajo a través del método de hidrodestilación o destilación por arrastre, esta obtención se realizó a partir de las hojas de *Psidium guajava* L.. El método de hidrodestilación se realizó mediante el siguiente diagrama de flujo (Figura 6):

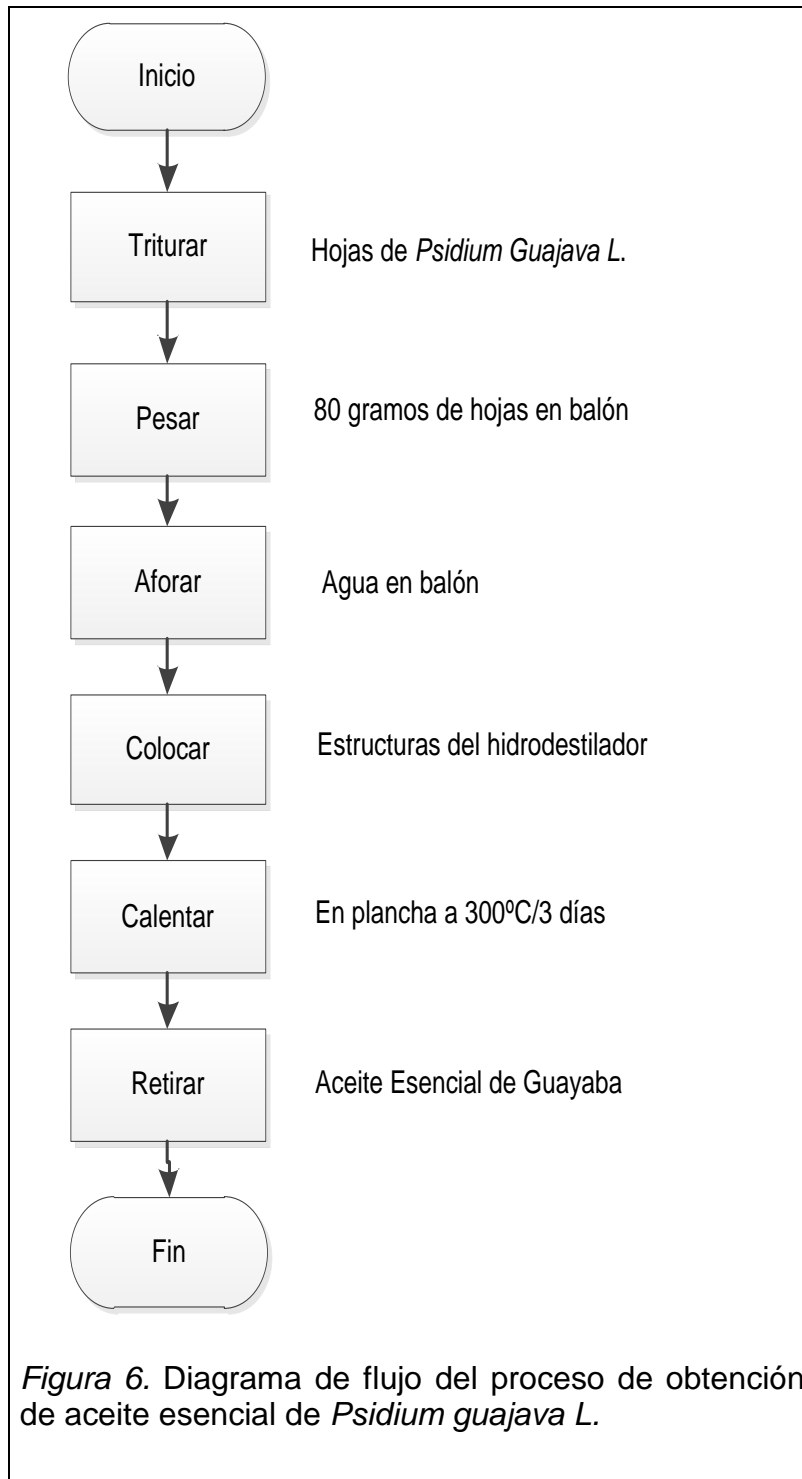


Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de obtención de aceite esencial de *Psidium guajava* L.

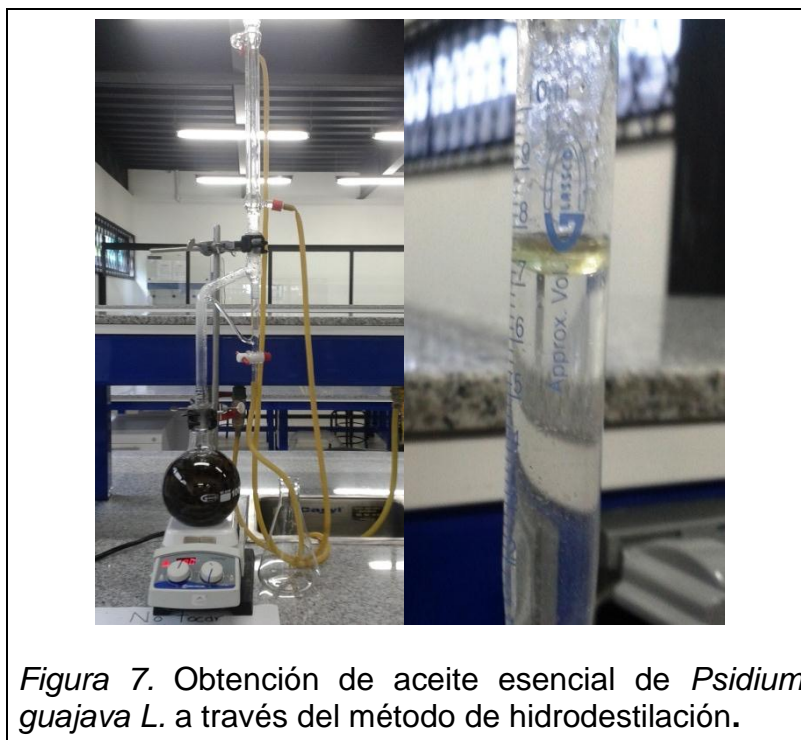


Figura 7. Obtención de aceite esencial de *Psidium guajava* L. a través del método de hidrodestilación.

La hidrodestilación genera vapor efluente saturado a presión atmosférica. La presión atmosférica superior provoca la extracción del aceite esencial mediante reflujo interno de agua, que también produce condensación del vapor por la corriente de agua fría; este proceso permitió que el aceite esencial se depositara en el hidrodestilador separando así las fases (Figura 7). Para calcular el rendimiento del aceite esencial se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{(ml de aceite esencial)}}{\text{(gr de material Vegetal)}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{(1 ml de aceite esencial)}}{\text{(80 gr de material Vegetal)}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 1,25.$$

El valor de rendimiento (1,25%) fue constante durante cada proceso de obtención de aceite esencial de guayaba.

2.2 Elaboración de las salchichas de pollo

Las salchichas de pollo se elaboraron en el laboratorio de procesamiento de alimentos de la Universidad de las Américas y se almacenaron durante 30 días. La formulación utilizada para la salchicha de pollo está representada en la Tabla 7.

Tabla 7. Formulación para salchichas de pollo.

INGREDIENTES	PORCENTAJE %
Carne de Pollo	40
Grasa de pollo	15
Proteína de Soya	13
Almidones y féculas	7
Sal	3
Especias	3
Azúcares y especias	2
Carrageninas	1
Agua 0-C	15

Adaptado de Guía de prácticas para laboratorio- UDLA, 2014.

2.2.1 Procedimiento para elaboración de salchichas de pollo

- 1) Recepción de la materia prima:** en esta fase se obtuvieron las materias primas como carne de pollo, grasa de pollo e ingredientes necesarios para la elaboración de salchichas.

2) Deshuesado: proceso en el cual se separó las estructuras óseas presentes de la carne de pollo (Figura 8).



Figura 8. Proceso de deshuese de carne de pollo.

3) Pesado: proceso en el que se estableció los porcentajes de materia prima e ingredientes para la elaboración de salchichas de pollo (Figura 9).



Figura 9. Proceso de pesaje de ingredientes de acuerdo a la formulación establecida.

4) Molienda: proceso en el cual se redujo el tamaño de la carne de pollo a 3mm, en el molino MAINCA (Figura 10).



Figura 10. Proceso de reducción de tamaño de carne de pollo a 3 mm, en molino MAINCA.

5) Mezclado y amasado: proceso en el cual se emulsionó la carne de pollo con las soluciones antioxidantes e ingredientes de la formulación paulatinamente; este proceso se realizó en un cutter manteniendo la temperatura de -10°C (Figura 11).



Figura 11. Proceso de mezclado y amasado de la emulsión de pollo, en cutter HOBART.

6) Embutido: proceso en el cual se compactó manualmente la emulsión de pollo en tripa de colágeno con la ayuda de un rodillo. Cada salchicha de pollo peso 20 gramos (Figura 12).



Figura 12. Proceso de embutido manual de salchichas de pollo, en tripa de colágeno.

- 7) Escaldado:** tratamiento térmico que coaguló la emulsión de pollo, la temperatura interna debió alcanzar los 65°C (Figura 13).



Figura 13. Proceso de escaldado de salchichas de pollo. Temperatura interna 65°C.

- 8) Enfriado y almacenaje:** proceso posterior al escaldado. El producto final redujo su temperatura, se empacó en bolsas herméticas a vacío (Figura 14) y se almacenó en refrigeración de 0- 4°C durante 30 días (Figura 15).



Figura 14. Proceso de enfriado de producto final y empaque a vacío de salchichas individuales.



Figura 15. Almacenamiento y refrigeración de salchichas de pollo.

2.3 Variables de estudio

2.2.1 Análisis microbiológico

Los microorganismos evaluados fueron: Aerobios mesófilos, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; establecidos de acuerdo a los requerimientos de la Norma INEN 1338: 2010. Para determinar la presencia de estos microorganismos en cada muestra se prepararon medios sólidos específicos y se sembraron por triplicado. El área de laboratorio destinada para el análisis microbiológico se esterilizó adecuadamente en cada proceso; el método aplicado para el análisis de estos 3 microorganismos partió del mismo principio. Mediante el uso de las buenas prácticas de laboratorio se establecieron los materiales, el equipo y el procedimiento adecuado para el proceso.

2.3.1.1 Materiales de laboratorio

- Cajas tripetri
- Tubos de ensayo
- Micropipeta Ecopipette Capp de 10-100 μ l
- Puntas de micropipeta
- Asa de Drigalski Triangular
- Bisturí
- Lámpara de alcohol
- Gradillas

2.3.1.2 Equipos de laboratorio

- Refrigerador Hardman
- Balanza Shimadzo Tx 3202L
- Agitador BOECO PSU-10i
- Cámara de Flujo Laminar Thermo Scientific 1300
- Incubadora Incucell
- Contador de Colonias BOECO Germany CC-1
- Autoclave Tuttnauer 3870

2.3.1.3 Procedimiento para siembra de muestras

Cada muestra de salchichas de pollo, empacada individualmente al vacío se desinfectó con alcohol al 99% para evitar contaminación cruzada (Figura 16).



Figura 16. Desinfección de empaques individuales de muestras con alcohol antiséptico.

El procedimiento para la siembra de muestras se realizó en la cámara de flujo laminar Thermo Scientific 1300 (Figura 17); para cada muestra se esterilizó un bisturí, asa de Drigalski y se desechó las puntas de la micropipeta.

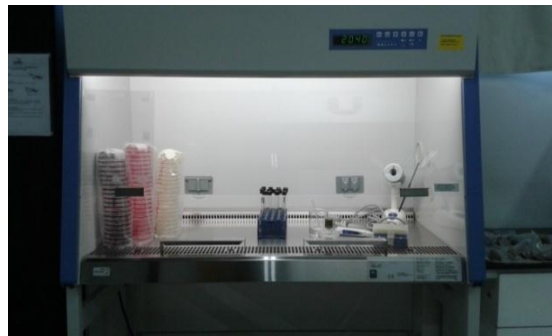
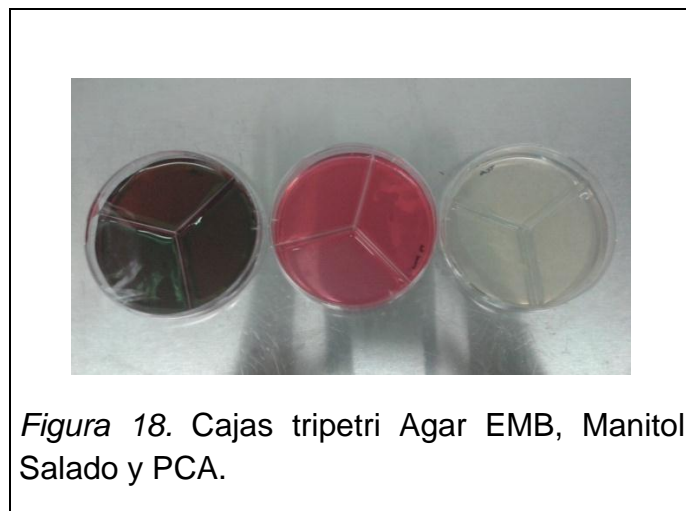


Figura 17. Cámara de Flujo laminar Thermo Scientific 1300.

Las cajas tripetri utilizadas están divididas en tres partes, en las cuales se colocó $33 \mu\text{l}$; debido a que en cajas Petri se coloca $100 \mu\text{l}$ se estableció una relación para hacer la siembra por triplicado (Figura 18).



Los procesos que se realizaron fueron los siguientes, representados en la (Figura 26):

- a) **Dilución:** se tomó 1 gramo de la muestra de la salchicha de pollo y posteriormente se colocó en un tubo de ensayo con tapa, que contenía 9 ml de agua peptona.
- b) **Agitación:** en una gradilla para tubos de ensayo, se colocaron los tubos con las muestras en dilución durante 10 minutos (Figura 19).



- c) **Extracción:** se tomó las muestras en dilución y mediante el uso de una micropipeta Ecopipette Capp de 10-100 μ l se sustrajo del tubo de ensayo

33 μ l de la dilución (cantidad establecida para cada área de cajas tripetri) (Figura 20).

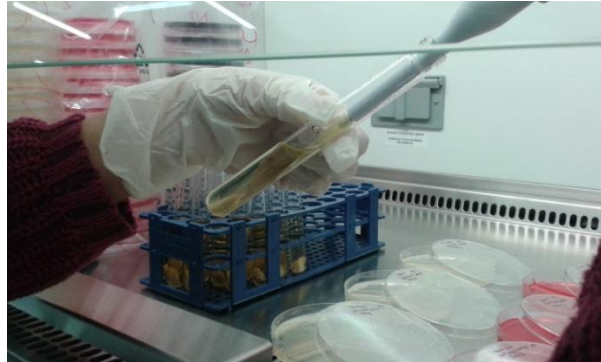


Figura 20. Extracción de 33 μ l de muestra de dilución de salchicha de pollo.

d) Inoculación: las cajas tripetri que contenían medios sólidos fueron sembradas con la dilución de la muestra (Figura 21).

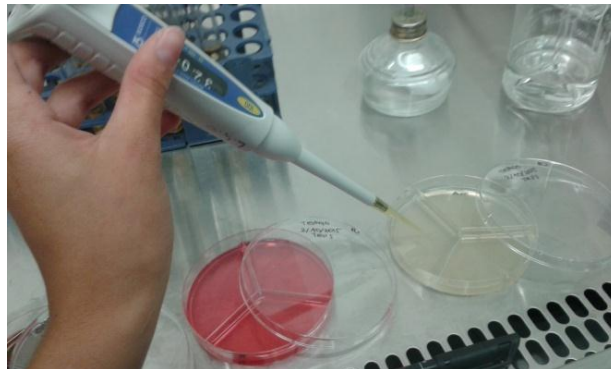


Figura 21. Inoculación de muestra en cajas tripetri con medios sólidos.

e) Esparcimiento y secado: los 33 μ l de la dilución fueron esparcidos homogéneamente en el medio sólido con el asa de Drigalski triangular (Figura 22), el secado consistió en esperar que el agua de la dilución se evapore durante 1 minuto (Figura 23).



f) Incubación: las cajas tripetri sembradas se colocaron dentro de la incubadora Incucell a 37°C, el tiempo de incubación dependió de cada microorganismo (Figura 24).



Figura 24. Cajas tripetri sembradas en Incubadora a 37°C.

g) Interpretación: posterior a la incubación se determinó la presencia de los 3 microorganismos de estudio en su propio agar nutritivo, la interpretación se realizó mediante parámetros especificados en las fichas técnicas de los medios de cultivo.

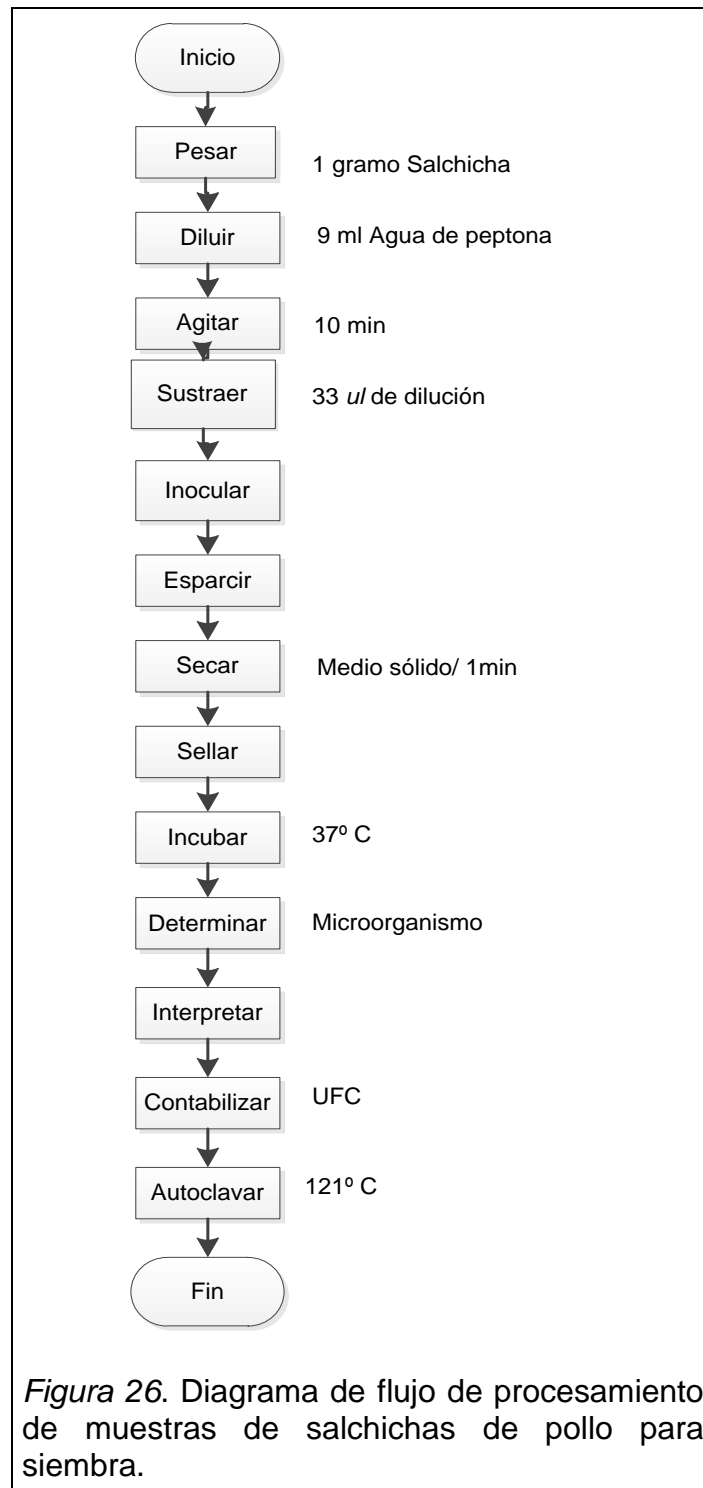
h) Contabilización: se determinó los microorganismos y se procedió al recuento de ufc colonias en los agares. El conteo se realizó en el Contabilizador de Colonias BOECO Germany CC-1. Después del tiempo estimado de crecimiento (Figura 25), se expresó el resultado en ufc/g del alimento que se calculó a través de la fórmula:

$$\text{UFC} = \text{N}^{\circ}\text{Colonias} \times \frac{1}{\text{Factor de Dilución}} \times \frac{1}{V \text{ (ml)}} \quad (\text{Ecuación 2})$$



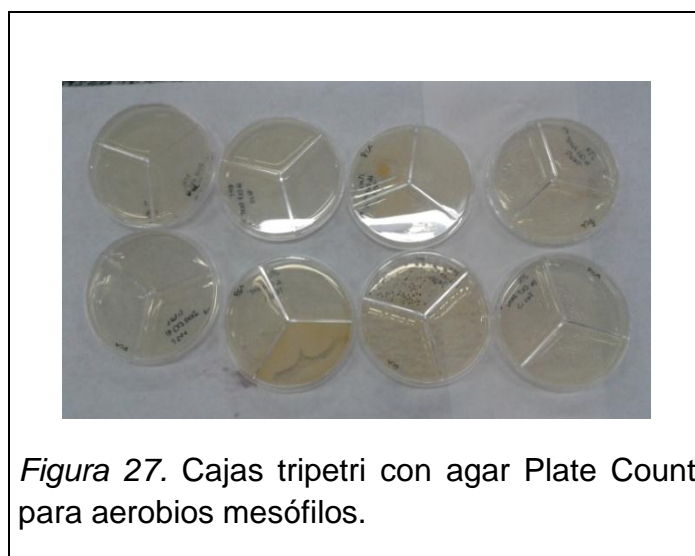
Figura 25. Contabilización de bacterias.

i) **Autoclavado:** al culminar el proceso se autoclavó las cajas tripetri contaminadas.



2.3.1.3.1 Aerobios mesófilos

Los aerobios mesófilos como la mayoría de microorganismos requieren de un medio específico para su desarrollo y crecimiento, en este caso, se preparó agar nutritivo PCA (Plate Count Agar) en cajas tripetri. Se realizó el procedimiento de siembra de muestras, con el fin de inocular la dilución de cada salchicha y se procedió a incubar a 37°C durante un período de 48 horas (Figura 27).

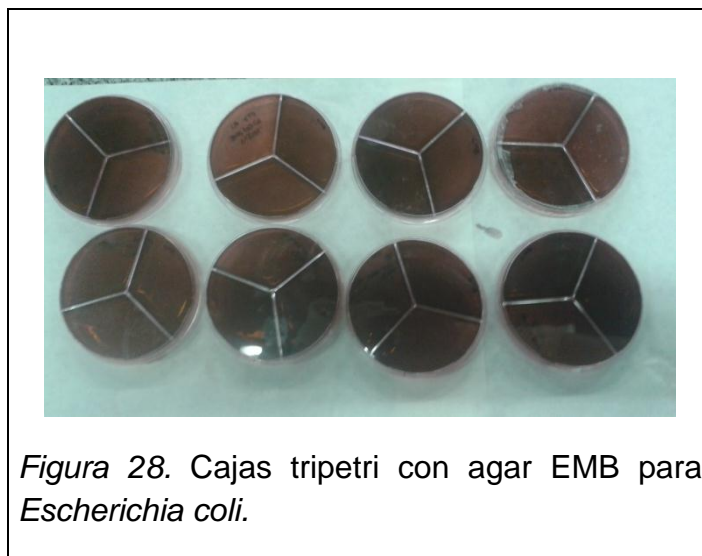


El agar PCA, es el medio de cultivo ámbar claro que se utilizó para el crecimiento de poblaciones de bacterias aerobias en salchichas. Los componentes del agar produjeron características específicas en las unidades formadoras de aerobios mesófilos como el color amarillo blanquecino, la forma circular y diversos tamaños que se desarrollaron en aerobiosis.

2.3.1.3.2 *Escherichia coli*

E. coli, como la mayoría de microorganismos requieren de un medio selectivo, por lo cual se seleccionó un agar en el cual se desarrollen enterobacterias y bacilos Gram negativos. En este caso, se preparó agar nutritivo EMB (Eosina-Azul de Metileno) cajas tripetri.

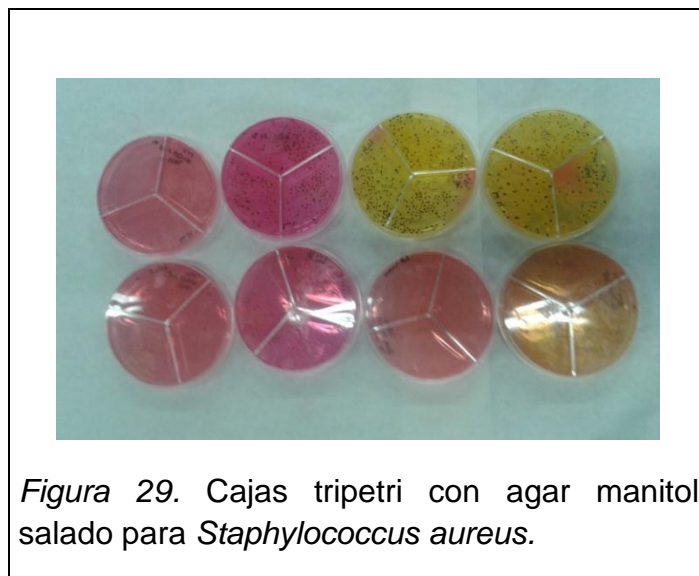
Se realizó el procedimiento de siembra de muestras, con el fin de inocular la dilución de cada salchicha y se procedió a incubar a 37°C durante un período de 48 horas (Figura 28).



El agar EMB, es el medio de cultivo morado que se utilizó para el crecimiento de poblaciones de microorganismos en salchichas. Los componentes del agar produjeron características específicas en las unidades formadoras de *E. coli* como el color verde metálico con brillo y centro negro azulado, la forma circular y diversos tamaños. En este medio también se desarrollaron otros microorganismos.

2.3.1.3.3 *Staphylococcus Aureus*

Staphylococcus Aureus, como la mayoría de microorganismos requieren de un medio selectivo. El agar manitol salado es el medio sólido seleccionado para estafilococos positivos para coagulasa. En este caso, se preparó agar nutritivo manitol salado en cajas tripetri. Se realizó el procedimiento de siembra de muestras, con el fin de inocular la dilución de cada salchicha y se procedió a incubar a 37°C durante un período de 24 horas (Figura 29).



El agar manitol salado, es el medio de cultivo rojo que se utilizó para el crecimiento de poblaciones de microorganismos en salchichas. Los componentes del agar produjeron características específicas en las unidades formadoras de estos microorganismos como el color amarillo, la forma circular y tamaño medio.

2.3.2 Análisis fisicoquímico

2.3.2.1 pH

El pH determina la concentración de iones de hidrógeno dentro de una muestra. La medición del pH es un proceso habitual en la industria alimentaria por lo cual se utilizó un procedimiento estandarizado:

- a) Se realizó una dilución de la muestra al 10% con agua destilada.
- b) La dilución con la muestra se homogenizó y se dejó reposar durante 30 minutos.
- c) El pH metro Fisher Scientific Accume se calibró previo a su uso.
- d) Se introdujo el pH metro dentro de la dilución.
- e) El equipo determinó el valor del pH en la muestra (Figura 30).



Figura 30. Determinación de pH en muestras de salchichas de pollo.

2.3.2.2 Determinación de peróxidos

La concentración de peróxidos se midió semicuantitativamente, la zona reactiva de la tira reaccionó al entrar en contacto con la muestra y se comparó la tonalidad producida con la escala de colores azul.

El Test de Peroxidos MQuant cuantificó la presencia de estas sustancias en la muestra dentro del rango 0.5 - 2 - 5 - 10 - 25 mg/L H_2O_2 , que se verificó mediante el cambio de color en las tiras medidoras.

2.3.2.2.1 Procedimiento para determinación de peróxidos

- a) Se realizó una dilución 1:1 de muestra y agua destilada en un vaso de precipitación en una temperatura de 15-30°C; para la medición de la muestra, Merck especifica que la dilución debe encontrarse en un pH entre 2-12 (Figura 31).



Figura 31. Test de peróxido y dilución de la muestra de salchicha de pollo.

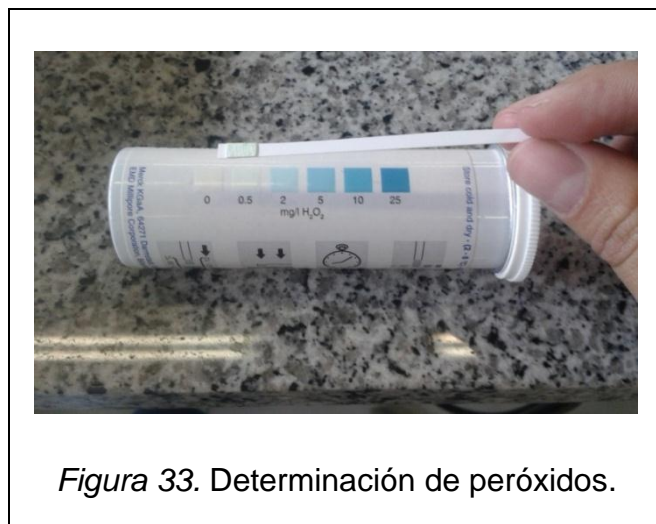
- b) La zona reactiva de la tira se sumergió en la muestra acuosa durante 1 segundo (Figura 32).



Figura 32. Tira de peróxidos sumergida en muestra acuosa.

- c) La tira medidora de peróxidos se escurrió en papel absorbente.

- d) Se determinó la tonalidad de la tira transcurridos 15 segundos después del contacto con la muestra.
- e) La escala de colores permitió determinar cualitativamente la presencia de peróxidos por medio de la comparación de la tonalidad (Figura 33).



- f) La lectura cualitativa de peróxidos se determinó de acuerdo al valor correspondiente de cada color en mg/L de H_2O_2 .

Es necesario tomar en cuenta qué:

- En algunos casos, a partir de los 3 minutos las tiras otorgaron una coloración azul positiva; esto indicó la presencia de peróxidos.
- Algunas tiras medidoras de peróxidos presentaron una tonalidad gris por lo cual se repitió el proceso, debido a falla en el proceso.

2.3.2.3 Acidez titulable

La acidez titulable constituye la presencia de ácidos orgánicos libres en una muestra, para determinar la acidez se tomó en cuenta el ácido orgánico más abundante que es el ácido acético. La acidez titulable se realizó mediante un procedimiento estándar para muestras sólidas que utiliza materiales y reactivos (Figura 34).



Figura 34. Materiales y reactivos para determinación de acidez titulable.

2.3.2.3.1 Materiales

- Matraz Erlenmeyer
- Vaso de precipitación
- Agitador
- Bureta
- Pipeta
- Probeta 100ml

2.3.2.3.2 Reactivos

- Fenolftaleína
- Hidróxido de sodio

2.3.2.3.3 Procedimiento para la medición de acidez titulable en la muestra.

- a) Se pesó 10 gramos de la salchicha de pollo y se trituro finamente.

- b) Se colocó la muestra en una probeta y se añadió agua destilada a 40°C hasta alcanzar 100 mL (Figura 35).

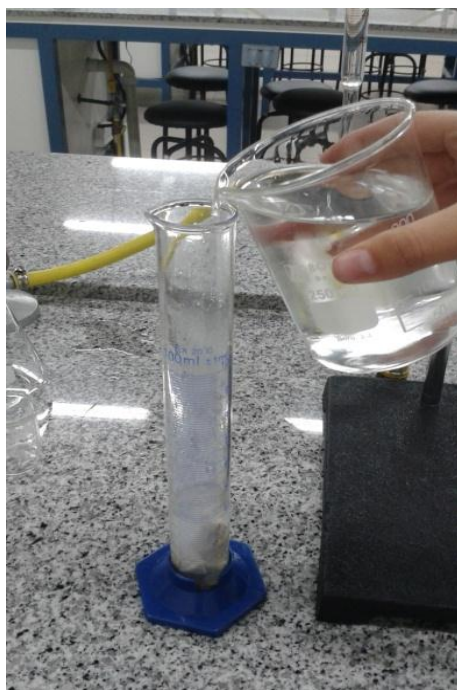


Figura 35. Adición de agua destilada a 40°C en muestra de salchicha de pollo.

- c) Se agitó y se filtró la solución
- d) Posteriormente se extrajo 25 mL de la dilución con la muestra; esto fue equivalente a 2,5 gramos de la salchicha de pollo (Figura 36).
- e) Para la medición de acidez se colocó la solución de hidróxido de sodio 0.1 N en una bureta.



Figura 36. Probeta con 25 mL de la muestra de salchicha de pollo.

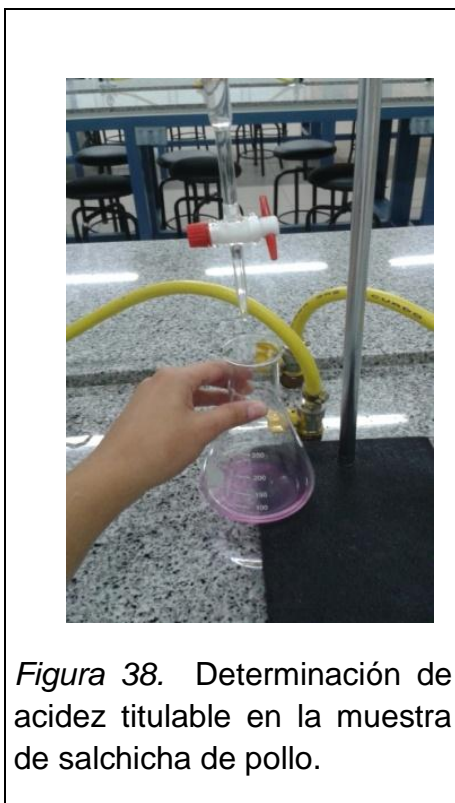
- f) Los 25 mL de la dilución con la muestra se colocaron en un matraz Erlenmeyer.
- g) Se adicionaron 5 gotas de fenoftaleína al 1% (indicador) (Figura 37).



Figura 37. Adición de fenoftaleína en la muestra.

- h) Para la titulación se adicionó lentamente hidróxido de sodio mientras se agitaba el matraz Erlenmeyer.

- i) La presencia del color rosa en la muestra indicaba la acidez, durante 15 minutos se agitaba la muestra constatando la permanencia del color (Figura 38).



- j) Se determinó la cantidad de hidróxido de sodio utilizado en la muestra
- k) La acidez de la muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{V \times N \times \text{Meq}}{\text{ml de muestra}} \times 100g \quad (\text{Ecuación 3})$$

V= Volumen de NaOH

N=Normalidad de NaOH

Meq= peso equivalente del ácido predominante en la muestra.

2.3.3 Medición del efecto antioxidante de las soluciones

El efecto antioxidante determinó si las soluciones antioxidantes neutralizaron los radicales libres, mediante el compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidrazil o DPPH.

La evaluación del efecto antioxidante se realizó mediante un procedimiento estandarizado para todas las soluciones, en el cual se utilizaron los siguientes materiales, equipos y reactivos.

2.3.3.1 Materiales y equipos

- Espectrofotómetro UV- Visible Génesis
- Refrigerador Hardman
- Balanza
- Agitador
- Matraces 10 ml
- Probeta de 100 l
- Pipetas de 1 a 10 ml.
- Papel Filtro
- Embudo
- Rayadora

2.3.3.2 Reactivos

- Agua destilada
- Metanol
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil o DPPH.
- Soluciones antioxidantes

2.3.3.3 Procedimiento para la medición del efecto antioxidante de las soluciones.

2.3.3.3.1 Recta de calibración

- a) Se preparó una solución 0.1 mM de DPPH en metanol y una solución testigo o blanco de 10mL de metanol puro (Figura 39).



- b) A partir de la primera solución se preparó las 5 soluciones de 10 mL; en concentraciones de 0.01, 0.02, 0.04, 0.05 y 0.1 mM (Figura 40).



Figura 40. Soluciones de 10 mL con DPPH. Concentraciones 0.01, 0.02, 0.04, 0.05 y 0.1 mM.

- c) Se midió la absorbancia de las a 517 nm (longitud de onda), durante 30 minutos.
- d) Las cubetas con DPPH 0.1 mM con 0,05 mL de solución antioxidante, se introdujeron en el Espectrofotómetro UV- Visible Génesis (Figura 41).



Figura 41. Cubetas en Espectrofotómetro UV- Visible Génesis.

- e) Se procedió a leer la absorbancia a 517nm y se realizó la recta de calibración; aplicando una regresión lineal.

2.3.3.3.2 Capacidad antioxidante de soluciones

- Se introdujo en el espectrofotómetro UV-Visible Génesis, la dilución de 0.1 mM.
- Se añadió 25 μ l de las soluciones antioxidantes óptimas y se midió la absorbancia durante 30 minutos.
- Se procedió a leer la absorbancia a 517 nm de las soluciones antioxidantes (Figura 42).

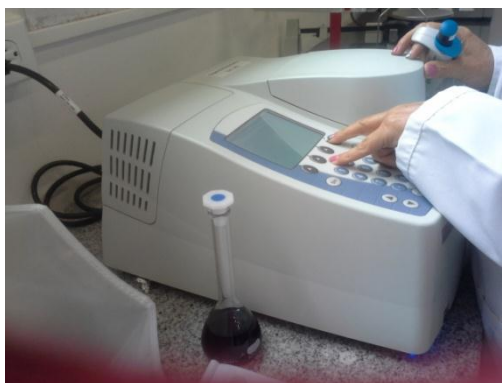


Figura 42. Lectura de absorbancia Espectrofotómetro UV- Visible Thermo Scientific.

- Se determinó el porcentaje de capacidad antioxidante mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Capacidad antioxidante} = \frac{1 - (\text{Abs muestra} - \text{Abs Blanco})}{\text{Abs DPPH}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Abs muestra= Absorbancia de la solución antioxidante

Abs Blanco= Absorbancia del metanol

Abs DPPH= Absorbancia de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Variables de estudio

Los resultados de las muestras de salchicha de pollo con aceite esencial de guayaba y ácido ascórbico, desplegaron diferencias significativas entre tratamientos debido a la dosificación de soluciones antioxidantes al aplicar el análisis de varianza. El tiempo, como factor constante determinó el cambio en las variables de estudio. Sin embargo, al realizar el análisis entre tratamientos se determina que las soluciones antioxidantes del tratamiento 6 y 7, mantienen la estabilidad en el crecimiento de microorganismos y no presenta cambios fisicoquímicos. Se realizó un ANOVA mediante el programa estadístico Infostat para comparar la efectividad de los tratamientos y se determinó las soluciones antioxidantes óptimas en salchichas de pollo.

3.1.1 Análisis microbiológico

3.1.1.1 Aeróbios mesófilos

El estudio de las muestras permitió la cuantificación de colonias de aerobios mesófilos en cada tratamiento durante 30 días. Se observa el análisis del crecimiento de aerobios mesófilos; una vez comparados los valores de estudio, se observó las diferencias significativas.

La presencia de aerobios mesófilos en la muestra determinan la inocuidad del alimento, con respecto a la materia prima, manipulación, procesamiento y almacenaje (Andino y Castillo, 2010). En los primeros 10 días los tratamientos no presentaron diferencias significativas, se puede apreciar que el desarrollo de ufc se mantiene con una cantidad de microorganismos relativamente. El proceso de crecimiento se presentó a partir del día 15 hasta el día 30, durante este período la estabilidad del alimento decayó notablemente en algunas muestras, en especial en las salchichas testigo y en aquellas muestras que no contenían altas concentraciones de soluciones antioxidantes. En el 2015 Domínguez *et al*, establecen en su estudio, que la carne de pollo es un

alimento que se contamina fácilmente con aerobios mesófilos, sin embargo al identificar este problema se realizaron tratamientos con aceites esenciales para la disminución de ufc y los resultados fueron positivos, es decir, que presentaron crecimiento de microorganismos controlables; por los principios activos de las soluciones.

Además, los compuestos que constituyen el aceite esencial son determinantes para la inhibición de microorganismos, en este caso el aceite esencial de guayaba está constituido por monoterpenos, 1,8-cineol, α -terpenil y p-cimen, entre otros, de manera que inhiben o retardan el crecimiento de los microorganismo como menciona Rogerio 2005, en su evaluación antibacterial de *Psidium guajava* L. Gómez y López (2009) demuestran que el estudio de aceite esencial de guayaba in vitro reduce las ufc, es decir que la actividad microbiana es controlada; por lo cual en una investigación aplicada, se espera que los aceites esenciales generarán una acción microbiana similar.

La investigación presentada por Hernández *at al*, 2009 y Domínguez *et al*, 2015 demuestran que los compuestos del aceite esencial provoca el decrecimiento de aeróbios mesófilos en carne de pollo. Nava *et al*, confirma que al añadir agentes antioxidantes a base de extractos de *Psidium guajava* L. en productos a base de pollo, los aerobios mesófilos presentes incrementan durante el tiempo en cantidades aceptables. Sin embargo, los efectos antioxidantes de las soluciones actúan sobre la población microbiana en crecimiento provocando una disminución de las ufc en un período de tiempo dado (Nava *et al*, 2013). Reyes, Paulo y López en 2012, sugieren que los aceites esenciales actúan sobre los microorganismos al aplicarlos en determinados valores obteniendo la concentración mínima inhibitoria o (CMI).

Domínguez *et al*, explica que los efectos de los compuestos de aceites esenciales en carne de pollo se disipan con facilidad y los efectos son limitados a comparación de los estudio del aceite esencial in vitro, por lo cual la concentración mínima inhibitoria de aceite esencial en carne de pollo que provocó cambios en el crecimiento de aerobios mesófilos es de 800mg.

En la presente investigación se determinó que los siete tratamientos se encuentran dentro de los parámetros aceptables que la norma INEN establece para embutidos en cuanto a aerobios mesófilos, es decir, $5,0 \times 10^5$ ufc. En este caso en cada tratamiento se establecieron concentraciones de ácido ascórbico y de aceite esencial de guayaba, que determinaron la acción de las soluciones sobre las muestras durante el período de tiempo establecido. En las salchichas de pollo, las soluciones antioxidantes no produjeron inhibición total sobre aerobios mesófilos, sin embargo la disminución de ufc se debió a su presencia.

Tabla 8 Análisis de varianza para aerobios mesófilos en el día 0

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	75,54			
Repetición	2	2,22	1,11	0,46	0,6410
Tratamiento	6	44,44	7,41	3,08	0,0462
Error	12	28,88	2,41		

Tabla 9 Ponderación de tratamientos para aerobios mesófilos en el día 0.

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
7	4,22	A
2	4,22	A
6	1,00	A
5	1,00	A
3	1,00	A
4	1,00	A
1	1,00	A

Nota: Desviación Estándar 0.90

Tabla 10 Análisis de varianza para aerobios mesófilos en el día 5

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	1517,57			
Repetición	2	452,11	226,05	4,38	0,0374
Tratamiento	6	445,53	74,26	1,444	0,2786
Error	12	619,93	51,66		

Tabla 11 Ponderación de tratamientos para aerobios mesófilos en el día 5

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
3	19,14	A
2	13,23	A
6	9,14	A
4	8,78	A
7	7,44	A
1	6,43	A
5	4,22	A

Nota: Desviación Estándar 4,15

Tabla 12 Análisis de varianza para aerobios mesófilos en el día 10

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	4714,33			
Repetición	2	598,88	299,44	1,85	0,1996
Tratamiento	6	2171,38	361,90	2,23	0,1112
Error	12	1944,06	162,01		

Tabla 13 Ponderación de tratamientos para aerobios mesófilos en el día 10

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
3	38,49	A
1	29,20	A
2	27,76	A
4	23,82	A
6	15,24	A
5	9,96	A
7	9,96	A

Nota: Desviación Estándar 7,35

Tabla14 Análisis de varianza para aerobios mesófilos en el día 15

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	20977,72			
Repetición	2	722,85	361,42	2,00	0,1786
Tratamiento	6	18081,63	3013,61	16,64	0,0001
Error	12	2173,24	181,10		

Tabla 15 Ponderación de tratamientos para aerobios mesófilos en el día 15

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
3	99,83	A
1	68,55	A B
2	50,42	B C
4	43,93	B C D
6	22,90	C D
5	16,63	C D
7	11,20	D

Nota: Desviación Estándar 7,77

Tabla 16 Análisis de varianza para aerobios mesófilos en el día 20

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P.VALOR
Total	20	38763,74			
Repetición	2	1198,36	599,18	1,30	0,3084
Tratamiento	6	32032,01	5338,67	11,5	0,0002
Error	12	5533,36	461,11		

Tabla 17 Ponderación de tratamientos para aerobios mesófilos en el día 20

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
3	122,44	A
1	110,02	A B
2	95,02	A B
4	78,99	A B C
6	49,10	B C D
5	26,73	C D
7	12,67	D

Nota: Desviación Estándar 12,40

Tabla 18 Análisis de varianza para aerobios mesófilos en el día 25

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	46691,28			
Repetición	2	1079,32	539,66	0,63	0,5510
Tratamiento	6	35277,62	5879,69	16,83	0,0025
Error	12	10334,34	861,20		

Tabla 19 Ponderación de tratamientos para aerobios mesófilos en el día 25

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
3	147,06	A
5	122,48	A B
1	121,81	A B
2	116,58	A B
4	85,50	A B C
6	54,33	B C
7	21,73	C

Nota: Desviación Estándar 16,94

Tabla 20 Análisis de varianza para aerobios mesófilos en el día 30

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P.VALOR
Total	20	75021,34			
Repetición	2	15,48	7,74	0,02	0,9824
Tratamiento	6	69786,99	11631,16	26,74	0,0001
Error	12	5218,87	434,91		

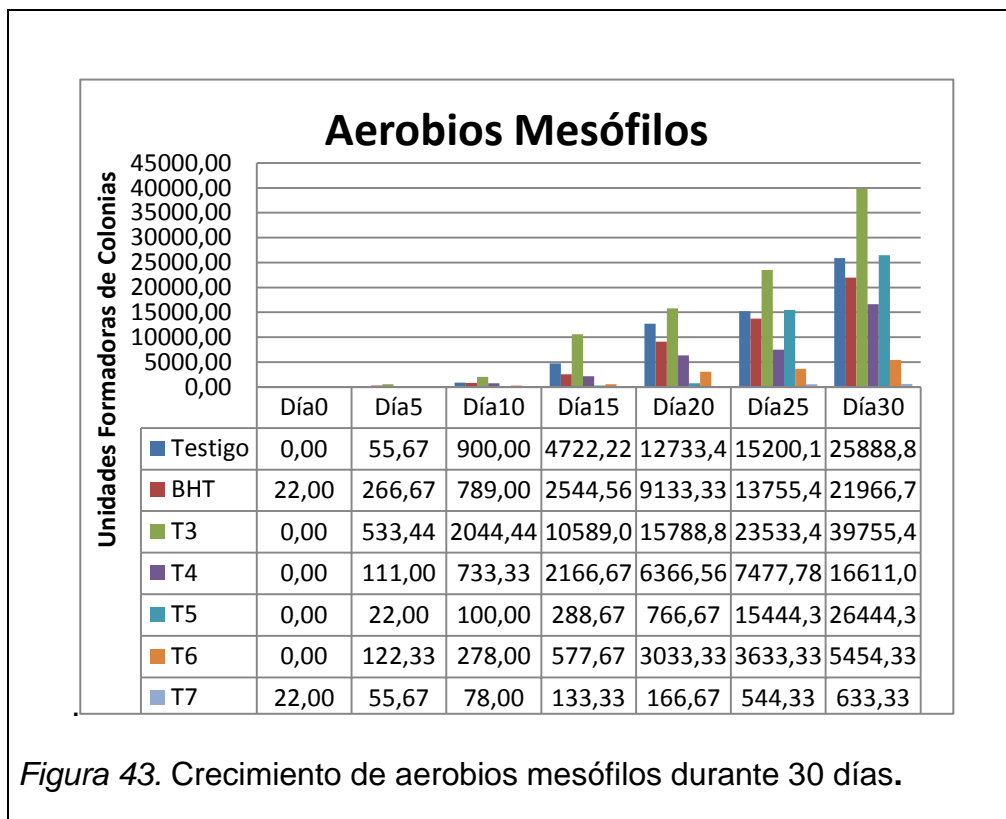
Tabla 21 Ponderación de tratamientos para aerobios mesófilos en el día 30

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
3	199,06	A
5	161,38	A B
1	160,32	A B
2	148,08	A B
4	126,15	B C
6	72,00	C D
7	16,04	D

Nota: Desviación Estándar 12,04

En las tablas de análisis de varianza de aerobios mesófilos del día 0 hasta el día 30, así como en las tablas de ponderación de tratamientos. Se realizó la comparación con el método de Tukey con el 95% de confiabilidad y al 5% de error, es decir valor de $p = 0,05$. Se determinó que los porcentajes de desviación estándar menor al 10%, se encuentran dentro de los parámetros de aceptabilidad. El análisis de varianza refleja en las tablas que los tratamientos tuvieron diferencias significativas pero aquellos tratamientos con soluciones antioxidantes que retardaron el crecimiento de los aerobios mesófilos durante

un período de 30 días fueron los tratamientos 6 (1000ppm aceite esencial de guayaba +700 ppm ácido ascórbico.) y tratamiento 7(1000ppm aceite esencial de guayaba).



En la Figura 43 se puede observar el crecimiento paulatino de aerobios mesófilos, el análisis de varianza determinó que a partir del día 15 se presentaron diferencias significativas asociadas al desarrollo de ufc. El desarrollo de estos microorganismos se inhibió por la acción de las soluciones antioxidantes en los tratamientos. Los tratamientos óptimos por un conteo de ufc menores son los tratamientos 7, 6 y 4; en orden ascendente; durante el período de estudio de estabilidad de las muestras en condiciones iguales. El tratamiento con mayor contaminación de aerobios mesófilos, es el tratamiento 3 seguido por el tratamiento 5,1 y tratamiento BHT (antioxidante sintético). Sin embargo, para determinar la vida útil de las salchichas de pollo mediante el crecimiento de colonias de aerobios mesófilos se realizó la comparación de los datos en la Figura 43 con la Tabla 4 de requisitos microbiológicos de la norma INEN 2010. Cada tratamiento presentó estabilidad en determinados días, en

similares condiciones de almacenamiento; el período de tiempo se estableció de acuerdo a la variable, en este caso colonias de aerobios mesófilos. El tratamiento testigo, BHT, tratamiento 3 y tratamiento 4 registraron 15 días de vida útil; el tratamiento 5 registró 20 días de vida útil, el tratamiento 6 así como el tratamiento 7 permanecieron estables durante los 30 días de evaluación. Al determinar el período de estabilidad, los días posteriores se presentaron aumentos en las ufc no siendo apto el producto para el consumo de acuerdo a la norma INEN para productos cárnicos escaldados.

3.1.1.2 *Escherichia coli*

El estudio realizado para *E.coli* no presentó resultados positivos, durante el período de estudio de 30 días por lo cual no se cuantificó ufc de este microorganismo. Las enterobacterias se encuentran presentes en la carne que se utiliza como materia prima para la elaboración de salchichas, en esta familia se encuentra *E. coli* que es una bacteria patógena que produce enfermedades (Prescott, Harley, y Klein, 2000) León *et al* (2006) determina que en el proceso de elaboración de salchichas se realiza un tratamiento térmico llamado escaldado, este reduce la cantidad de microorganismos presentes en la muestra ya que alcanza una temperatura de 70-75°C; algunas bacterias son eliminadas en su totalidad y otras no, debido a su termoresistencia. En la presente evaluación, se realizó el control del escaldado llegando a una temperatura interna de 65°C y una temperatura del agua de 75°C, garantizando la inocuidad del alimento con respecto a esta bacteria. Las muestras contaban con soluciones antioxidantes como aditivos de conservación, a pesar de que fueron sometidas a un proceso térmico que controla la presencia de microorganismos. Biswas *et al* 2013 menciona que al evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de guayaba en bacterias gram negativas no se produjo inhibición debido a que estas bacterias cuentan con una membrana permeable compuesta por un lipopolisacárido exterior que no permite el ingreso del extracto del aceite esencial. Por lo cual se ha demostrado que las bacterias gram negativa son mas resistentes a sustancias antimicrobianas de origen vegetal (Biswas *et al*, 2013). Sanches *et al* 2005,

extrajo aceite de *Psidium guajava* L. mediante diversos métodos y evaluó la presencia de bacterias gram negativas en cada sustancia obtenida; se demostró que ninguna de estas sustancias con principios activos inactivo la bacteria *E. coli*.

Los resultados de esta investigación determinan que a pesar del uso de soluciones antioxidantes estas no influyeron en la presencia del crecimiento de *E. coli*, debido a su estructura permeable. La ausencia de la bacteria confirma que las soluciones antioxidantes no tuvieron relación directa sobre las colonias ni su desarrollo. El tratamiento térmico al que se sometieron las muestras estableció la inhibición y control de la bacteria. La contaminación por *E. coli* en salchichas de pollo se debe a la contaminación de la carne de pollo, el empaque o en algunos casos por un control deficiente en los procesos térmicos. Al no presentar ufc de *E. coli* durante el período de 30 días se puede constatar que el embutido esta dentro de los parámetros de la Norma INEN que establece que las colonias de la bacteria deben ser <3. Sin embargo, para determinar la vida útil de las salchichas de pollo mediante el crecimiento de colonias de *E. coli* se realizó la comparación de los datos en la Tabla 4 de requisitos microbiológicos de la norma INEN 2010. Cada tratamiento presentó estabilidad en determinados días, en similares condiciones de almacenamiento; el período de tiempo se estableció de acuerdo a la variable, en este caso colonias de *E.coli*. Por lo tanto, la ausencia de esta bacteria establecería que las salchichas de pollo cuentan con una vida útil de 30 días, tomando en cuenta solo esta variable.

3.1.1.3 *Staphylococcus aureus*

El estudio de las muestras permitió la cuantificación de colonias de *Staphylococcus aureus* en cada tratamiento durante 30 días. El crecimiento de *Staphylococcus aureus* desde el día 0 hasta el día 15, establece que las soluciones antioxidantes de los tratamientos actúan sobre estos microorganismos.

Estas bacterias se encuentran en superficies, vías respiratorias y piel; estos microorganismos son indicadores microbiológicos de control sanitario; en los alimentos producen toxinas termoestables que afectan a la salud del consumidor (Andino y Castillo, 2010). En los primeros 10 días no se presentan diferencias significativas entre tratamientos, las soluciones antioxidantes de aceite esencial de guayaba y ácido ascórbico son efectivas en este período de tiempo. Desde el día 0 hasta el día 15 el crecimiento es bajo en todas las muestras y se encuentran dentro de los niveles aceptables de la norma INEN de embutidos para colonias de *Staphylococcus aureus* que es de $1,0 \cdot 10^3$ ufc.

Biswas *et al* (2013), estudió la actividad antimicrobiana de bacterias gram positivas y sugieren que el extracto de guayaba es antibacterial debido a sus constituyentes que limitan el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Las características del aceite esencial de guayaba provienen de las hojas con principios activos contra infecciones y enfermedades producidas naturalmente. Goncalves *et al* (2008), en su estudio de la actividad antibacterial de las hojas de guayaba, ratifican que los compuestos activos del aceite esencial de guayaba otorgan un efecto antimicrobiano e inhibición de algunas cepas de *Staphylococcus aureus*.

Además, la investigación de los extractos de guayaba obtenidos por diversos disolventes concluyó que para *Staphylococcus aureus* el extracto con mayor actividad es el extracto acuoso; ya que este mantiene sus estructuras intactas y sus compuestos activos (Sanches *et al*, 2005).

En los días posteriores (día 15 al día 30) se observa crecimiento de la bacteria y aumento notable de colonias en algunas muestras. Okechukwu *et al* (2012), determina que la concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de guayaba en *Staphylococcus aureus* es de 125 a 500 mg, por su potencial antimicrobiano. *Staphylococcus aureus* es una bacteria resistente a la meticilina, es decir resistente a antibióticos; sin embargo, la bacteria al estar expuesta al aceite esencial de *Psidium guajava* L. disminuye su crecimiento siendo un antimicrobiano más efectivo a comparación de los antibióticos.

Las cepas estudiadas de *Staphylococcus aureus* presentan mejores resultados de los extractos acuosos de los extractos que contienen metanol (Okechukwu *et al*, 2012). De acuerdo a Sanches *et al* 2005, los extractos de las hojas de *Psidium guajava L.* poseen actividad antimicrobiana sobre bacterias gram positivas, es decir sobre *Staphylococcus aureus*; el desarrollo controlado e inhibición de las ufc se debe a la presencia de aceite esencial determinando que la concentración mínima inhibitoria partió desde 500 a 1000 mg. En la presente investigación las muestras de salchichas con soluciones antioxidantes no se comportan de igual manera que en estudios in vitro, por lo cual, las concentraciones mínimas inhibitorias deben ser mayores.

Tabla 22 Análisis de varianza para *Staphylococcus aureus* en el día 0

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	0			
Repetición	2	0	0	Sd	Sd
Tratamiento	6	0	0	Sd	Sd
Error	12	0	0		

Tabla 23 Análisis de varianza para *Staphylococcus aureus* en el día 5

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P.VALOR
Total	20	75,54			
Repetición	2	35,55	17,77	8,00	0,0062
Tratamiento	6	13,33	2,22	1,00	0,4682
Error	12	26,66	2,22		

Tabla 24 Ponderación de tratamientos para *Staphylococcus aureus* en el día 5

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
3	2,61	A
1	2,61	A
7	2,61	A
5	2,61	A
6	1,00	A
4	1,00	A
2	1,00	A

Nota: Desviación Estándar 0,86

Tabla 25 Análisis de varianza para *Staphylococcus aureus* en el día 10

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P.VALOR
Total	20	87,04			
Repetición	2	40,08	20,04	7,05	0,0094
Tratamiento	6	12,86	2,14	0,75	0,6186
Error	12	34,10	2,84		

Tabla 26 Ponderación de tratamientos para *Staphylococcus aureus* en el día 10

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
7	7,24	A
3	6,64	A
5	6,64	A
6	5,83	A
4	5,83	A
1	5,03	A
2	5,03	A

Nota: Desviación Estándar 0,97

Tabla 27 Análisis de varianza para *Staphylococcus aureus* en el día 15

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P.VALOR
Total	20	610,78			
Repetición	2	5,38	2,92	0,54	0,5974
Tratamiento	6	539,87	89,98	16,59	0,0001
Error	12	65,08	5,42		

Tabla 28 Ponderación de tratamientos para *Staphylococcus aureus* en el día 15

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
6	23,50	A
3	11,99	B
5	11,02	B
7	10,47	B
4	9,96	B
2	7,75	B
1	7,24	B

Nota: Desviación Estándar 1,34

Tabla 29 Análisis de varianza para *Staphylococcus aureus* en el día 20

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P.VALOR
Total	20	13849,22			
Repetición	2	124,00	62,00	6,98	0,0098
Tratamiento	6	13618,64	2269,77	255,56	0,0001
Error	12	106,58	8,88		

Tabla 30 Ponderación de tratamientos para *Staphylococcus aureus* en el día 20

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
3	87,52	A
5	56,38	B
4	53,34	B
6	34,62	C
2	28,22	C
7	12,50	D
1	9,79	D

Nota: Desviación Estándar 1,72

Tabla 31 Análisis de varianza para *Staphylococcus aureus* en el día 25

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P.VALOR
Total	20	28031,36			
Repetición	2	75,41	37,71	2,50	0,1235
Tratamiento	6	27775,08	4629,18	307,14	0,0001
Error	12	180,86	15,07		

Tabla 32 Ponderación de tratamientos para *Staphylococcus aureus* en el día 25

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
4	104,02	A
3	103,54	A
5	89,18	B
2	75,85	C
6	38,32	D
7	20,07	E
1	11,71	E

Nota: Desviación Estándar 2,24

Tabla 33 Análisis de varianza para *Staphylococcus aureus* en el día 30

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P.VALOR
Total	20	25343,18			
Repetición	2	17,36	8,68	1,14	0,3516
Tratamiento	6	25234,57	4205,76	553,12	0,0001
Error	12	91,24	7,60		

Tabla 34 Ponderación de tratamientos para *Staphylococcus aureus* en el día 30

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
3	124,52	A
5	119,63	A B
2	114,99	B
4	114,91	B
6	85,36	C
1	56,65	D
7	26,86	D

Nota: Desviación Estándar 1,59

En las tablas de análisis de varianza de *Staphylococcus aureus* del día 0 hasta el día 30; una vez comparados los valores de estudio, se observó las diferencias significativas. Se realizó la comparación con el método de Tukey con el 95% de confiabilidad y al 5% de error, es decir valor de $p = 0,05$. Se determinó que los porcentajes de desviación estándar menor al 10%, se encuentran dentro de los parámetros de aceptabilidad. El desarrollo de *Staphylococcus aureus* se produjo a partir del día 15 por las condiciones de almacenamiento, empaque; sin embargo, los tratamientos 6 (1000ppm aceite esencial de guayaba +700 ppm ácido ascórbico.) y tratamiento 7 (1000ppm aceite esencial de guayaba), con altas concentraciones de soluciones antioxidantes, permanecieron estables durante el 30 días evidenciando un desarrollo mínimo, siendo valores de ufc aceptables en la norma INEN a comparación de los otros tratamientos.

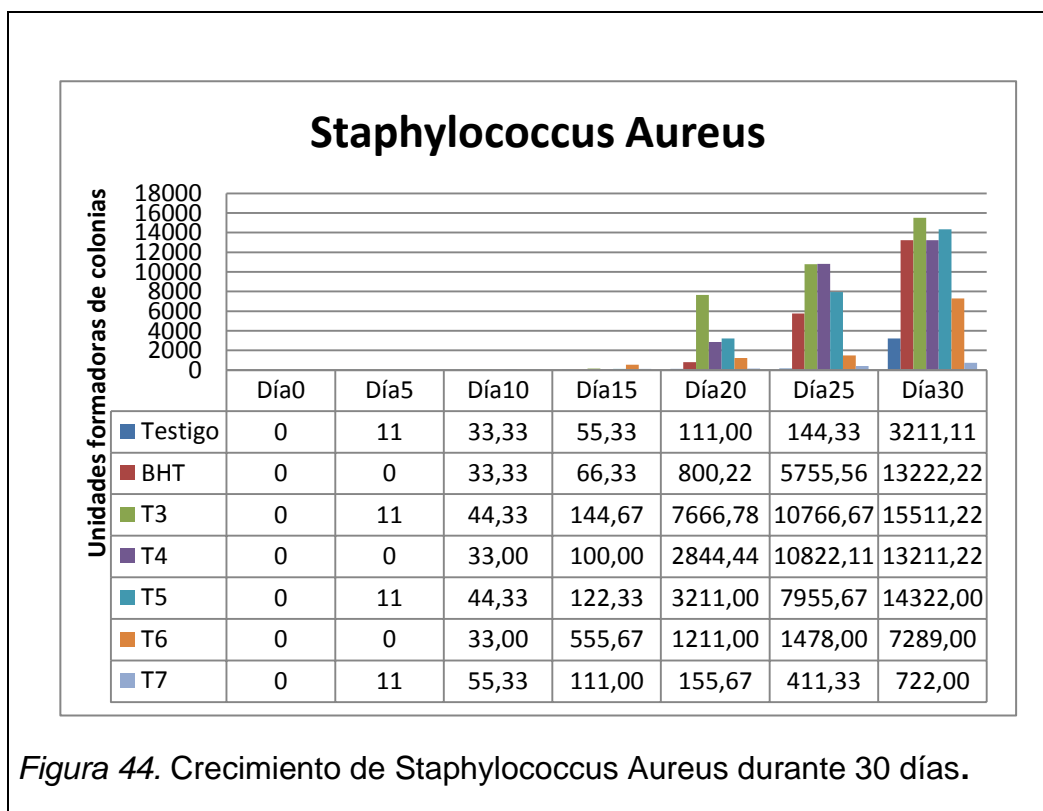


Figura 44. Crecimiento de *Staphylococcus Aureus* durante 30 días.

En la Figura 44 se puede observar el crecimiento paulatino de *Staphylococcus aureus*, el análisis de varianza determinó que a partir del día 15 se presenta diferencias significativas asociadas al desarrollo de ufc. El desarrollo de estos microorganismos se inhibió por la acción de las soluciones antioxidantes en los tratamientos. Los tratamientos óptimos por un conteo de ufc menores fueron los tratamientos 7, 6 y tratamiento testigo, en orden; durante el período de estudio de estabilidad de las muestras en condiciones iguales. El tratamiento con mayor contaminación de *Staphylococcus aureus*, es el tratamiento 3 seguido por el tratamiento 5,4 y tratamiento BHT (antioxidante sintético). Sin embargo, para determinar la vida útil de las salchichas de pollo mediante el crecimiento de colonias de *Staphylococcus aureus* se realizó la comparación de los datos en la figura 44 con la Tabla 4 de requisitos microbiológicos de la norma INEN 2010. Cada tratamiento presentó estabilidad en determinados días, en similares condiciones de almacenamiento; el período de tiempo se

estableció de acuerdo a la variable, en este caso colonias de *Staphylococcus aureus*.

Los tratamiento 3, tratamiento 4 y tratamiento 5 registran 15 días de vida útil; los tratamiento BHT y tratamiento 6 registraron 20 días de vida útil, el tratamiento testigo registró 25 días de vida útil y el tratamiento 7 permaneció estable durante los 30 días de evaluación. Al determinar el período de estabilidad, los días posteriores se presentaron aumento en las ufc no siendo apto el producto para el consumo de acuerdo a la norma INEN para productos cárnicos escaldados.

3.1.2 Análisis físico químico

3.1.2.1 pH

El estudio de las muestras permitió la determinación de pH en cada tratamiento durante 30 días. El pH es un valor intrínseco de la salchicha, esta medida determina la estabilidad en los alimentos ya que de acuerdo a la acidez del medio se produce el crecimiento de diversos microorganismos (Periago, 2011). Cayré, Judis y Garro 2009, mencionan en su investigación que las salchichas empacadas al vacío durante un período de 45 días presentan descenso de pH que está relacionado con el crecimiento microbiano de aerobios mesófilos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. De acuerdo a los requisitos bromatológicos de la norma INEN 1338: 1996, el pH determinado para embutidos escaldados debe encontrarse en un máximo de 6,2 y no se establecen pH mínimos. Esto se produce, ya que deben encontrarse con una acidificación baja con el fin de controlar la estabilidad del alimento. Hleap y Velasco (2012) sugieren que los alimentos que contienen proteínas que se encuentran almacenados están sujetos a experimentar acidificación, debido a procesos bioquímicos naturales de la salchicha o por presencia de microorganismos. Ramos *et al* 2014, investigan los cambios físico químicos en salchichas y establecen que el producto, al poseer una categorización como embutido acidificado bajo debe encontrarse en un pH mayor a 5,3; sin embargo, el pH de cada embutido depende de la materia prima y los

ingredientes añadidos. Los tratamientos con soluciones antioxidantes mantuvieron la estabilidad en cuanto a pH, a pesar de presentar un valor inicial mayor al aceptado por la norma INEN, esto se debe a los ingredientes utilizados en la elaboración de las salchichas de pollo. Se presentaron diferencias significativas a partir del día 20 hasta el día 30 entre tratamientos. La disminución de pH se evidenció notablemente en el tratamiento testigo con un pH inicial de 6,60 y pH final de 5,08, a pesar de que los valores se encuentran alejados durante un período de 30 días, la muestra de salchicha de pollo presentó un crecimiento de microorganismos controlado. Los procesos oxidativos de las muestras de salchichas mantuvieron la estabilidad por la presencia de las soluciones antioxidantes conformadas por aceite esencial de guayaba y ácido ascórbico.

Tabla 35 Análisis de varianza para pH en el día 0

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	0,31			
Repetición	2	0,18	0,09	23,49	0,0001
Tratamiento	6	0,08	0,01	3,72	0,0253
Error	12	0,05	3,8 E -03		

Tabla 36 Ponderación de tratamientos para pH en el día 0

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
2	6,63	A
1	6,60	A B
4	6,52	A B
7	6,50	A B
6	6,49	A B
5	6,47	A B
3	6,45	B

Nota: Desviación Estándar 0,04

Tabla 37 Análisis de varianza para pH en el día 5

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	0,85			
Repetición	2	0,70	0,35	42,06	0,0001
Tratamiento	6	0,05	0,01	1,02	0,4551
Error	12	0,10	0,01		

Tabla 38 Ponderación de tratamientos para pH en el día 5

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
2	6,49	A
5	6,41	A
4	6,41	A
6	6,40	A
3	6,38	A
1	6,37	A
7	6,31	A

Nota: Desviación Estándar 0,05

Tabla 39 Análisis de varianza para pH en el día 10

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	1,15			
Repetición	2	1,04	0,52	141,14	0,0001
Tratamiento	6	0,07	0,01	2,96	0,0520
Error	12	0,04	3,7 E -03		

Tabla 40 Ponderación de tratamientos para pH en el día 10

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
2	6,37	A
5	6,35	A
6	6,33	A
3	6,33	A
1	6,31	A
4	6,26	A
7	6,20	A

Nota: Desviación Estándar 0,04

Tabla 41 Análisis de varianza para pH en el día 15

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	2,15			
Repetición	2	1,44	0,72	23,27	0,0001
Tratamiento	6	0,34	0,06	1,81	0,1790
Error	12	0,37	0,03		

Tabla 42 Ponderación de tratamientos para pH en el día 15

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
5	6,32	A
6	6,25	A
4	6,22	A
3	6,19	A
7	6,15	A
2	6,12	A
1	5,89	A

Nota: Desviación Estándar 0,10

Tabla 43 Análisis de varianza para pH en el día 20

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	2,63			
Repetición	2	0,95	0,48	43,39	0,0001
Tratamiento	6	1,55	0,26	23,53	0,0001
Error	12	0,13	0,01		

Tabla 44 Ponderación de tratamientos para pH en el día 20

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
4	6,17	A
3	6,15	A
6	6,14	A
7	6,13	A
5	6,12	A
2	6,05	A
1	5,36	B

Nota: Desviación Estándar 0,06

Tabla 45 Análisis de varianza para pH en el día 25

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	3,06			
Repetición	2	1,14	0,57	64,94	0,0001
Tratamiento	6	1,82	0,30	34,67	0,0001
Error	12	0,01	0,01		

Tabla 46 Ponderación de tratamientos para pH en el día 25

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
4	6,13	A
7	6,10	A
3	6,09	A
6	6,09	A
5	6,05	A
2	5,99	A
1	5,24	B

Nota: Desviación Estándar 0,05

Tabla 47 Análisis de varianza para pH en el día 30

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	4,41			
Repetición	2	1,89	0,95	18,53	0,0002
Tratamiento	6	1,90	0,32	6,21	0,0037
Error	12	0,61	0,05		

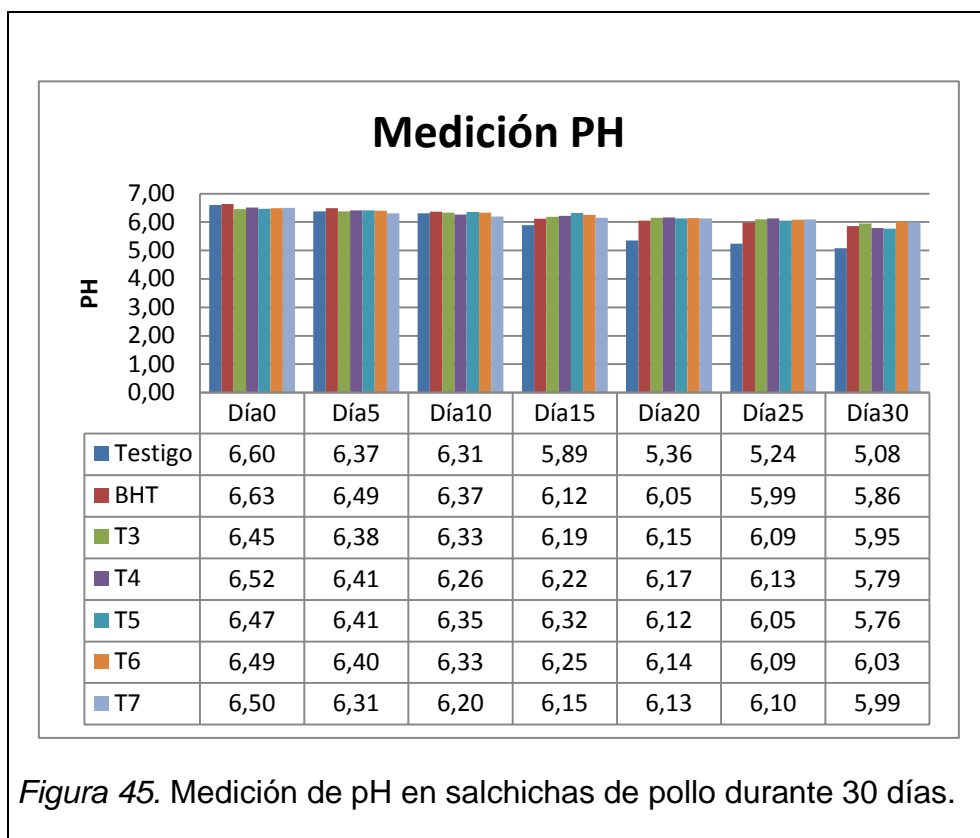
Tabla 48 Ponderación de tratamientos para pH en el día 30

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
6	6,03	A
7	5,99	A
3	5,95	A
2	5,86	A
4	5,79	A
5	5,76	A
1	5,08	B

Nota: Desviación Estándar 0,13

En las tablas de análisis de varianza de pH del día 0 hasta el día 30, así como en las tablas de ponderación de tratamientos se observa el análisis de los valores de PH de las muestras. Una vez comparados los valores de estudio, se observó las diferencias significativas. Se realizó la comparación con el método de Tukey con el 95% de confiabilidad y al 5% de error, es decir, valor de $p = 0,05$. Se determinó que los porcentajes de desviación estándar menor al 10%, se encuentran dentro de los parámetros de aceptabilidad. Los tratamientos que presentaron una acidificación baja aceptable durante el período de 30 días fueron los tratamiento 6 con un pH inicial 6,49 y un pH final de 6,03; así como

el tratamiento 7 con pH inicial 6,49 y un pH final de 5,99 siendo pH mayores a 5.3.



En la Figura 45 se puede observar el descenso paulatino de pH, el análisis de varianza determinó que a partir del día 20 se presentaron diferencias significativas asociadas al descenso de pH. Las soluciones antioxidantes dentro de las muestras, influyeron en los valores de pH tomados debido a los compuestos del aceite esencial de guayaba y el ácido ascórbico. Los tratamientos en el día 0 presentaron diferencias significativas, así como en el día 20, 25 y 30. El tratamiento con mayor descenso de pH fue el tratamiento testigo. Los demás tratamientos no presentaron un cambio significativo. Por lo cual, se determinó que en el caso del pH el tiempo de vida útil en las salchichas de pollo corresponde a 30 días.

3.1.2.2 Peróxidos

El estudio de las muestras permitió la determinación de peróxidos en cada tratamiento durante 30 días. Los ácidos grasos no saturados unen el oxígeno a sus dobles enlaces provocando la formación de peróxidos, los peróxidos están formado por un enlace oxígeno- oxígeno; oxidan los compuestos de los alimentos (Torres, 2012). De acuerdo a Sammet *et al* 2006, al procesar carne y subproductos de carne, la calidad se deteriora por la oxidación de lípidos que es una reacción determinante en la vida útil del producto. Decker *et al* 2005, determinaron que la presencia de antioxidantes en productos cárnicos preserva el producto aplazando la oxidación que produce deterioro. Alarcón *et al* 2010, mencionan que al medir el índice de peróxidos en productos cárnicos a partir de 20 meq/L se provoca la rancidez oxidativa y la deterioración.

Las salchichas, al tener grasa en su composición, están expuestas a sufrir este proceso de oxidación que ocurre durante su tiempo en percha, al empacar al vacío las salchichas se modifica el ambiente reduciendo las posibilidades de rancidez oxidativa según Parra *et al*, 2012. En la presente investigación se realizó un proceso de control de vida útil a través de la adición de soluciones antioxidantes, así como un empaque a vacío para evaluar la presencia de péroxidos en las muestras. A partir del día 5 se presentaron cambios significativos entre tratamientos por la formación de peróxidos por un proceso de lipólisis.

Tabla 49 Análisis de varianza para peróxidos en el día 0

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	0			
Repetición	2	0	0	Sd	Sd
Tratamiento	6	0	0	Sd	Sd
Error	12	0	0		

Tabla 50 Análisis de varianza para peróxidos en el día 5

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	0,16			
Repetición	2	0,02	0,01	2,40	0,1328
Tratamiento	6	0,09	0,02	4,00	0,0197
Error	12	0,05	3,8 E-03		

Tabla 51 Ponderación de tratamientos para peróxidos en el día 5

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
2	1,15	A
1	1,15	A
6	1,00	A
7	1,00	A
5	1,00	A
4	1,00	A
3	1,00	A

Nota: Desviación Estándar 0,04

Tabla 52 Análisis de varianza para peróxidos en el día 10

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	1,69			
Repetición	2	0,10	0,05	1,29	0,3115
Tratamiento	6	1,13	0,19	4,89	0,0095
Error	12	0,46	0,04		

Tabla 53 Ponderación de tratamientos para peróxidos en el día 10

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
1	1,56	A
2	1,49	A
7	1,07	A
6	1,00	A
5	1,00	A
4	1,00	A
3	1,00	A

Nota: Desviación Estándar 0,11

Tabla 54 Análisis de varianza para peróxidos en el día 15

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	1,64			
Repetición	2	0,34	0,17	4,78	0,0297
Tratamiento	6	0,86	0,14	4,00	0,0197
Error	12	0,43	0,04		

Tabla 55 Ponderación de tratamientos para peróxidos en el día 15

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
2	1,49	A
1	1,49	A
5	1,15	A
3	1,15	A
7	1,00	A
6	1,00	A
4	1,00	A

Nota: Desviación Estándar 0,11

Tabla 56 Análisis de varianza para peróxidos en el día 20

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	1,52			
Repetición	2	0,28	0,14	4,57	0,0344
Tratamiento	6	0,86	0,14	4,52	0,0122
Error	12	0,38	0,03		

Tabla 57 Ponderación de tratamiento para peróxidos en el día 20

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
2	1,56	A
1	1,56	A
5	1,32	A B
4	1,22	A B
3	1,22	A B
7	1,07	A B
6	1,00	B

Nota: Desviación Estándar 0,10

Tabla 58 Análisis de varianza para peróxidos en el día 25

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	2,53			
Repetición	2	0,41	0,21	4,34	0,0554
Tratamiento	6	1,45	0,24	3,72	0,0148
Error	12	0,67	0,06		

Tabla 59 Ponderación de tratamientos para peróxidos en el día 25

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
1	1,97	A
2	1,56	A B
5	1,49	A B
4	1,39	A B
3	1,22	B
7	1,22	B
6	1,15	B

Nota: Desviación Estándar 0,14

Tabla 60 Análisis de varianza para peróxidos en el día 30

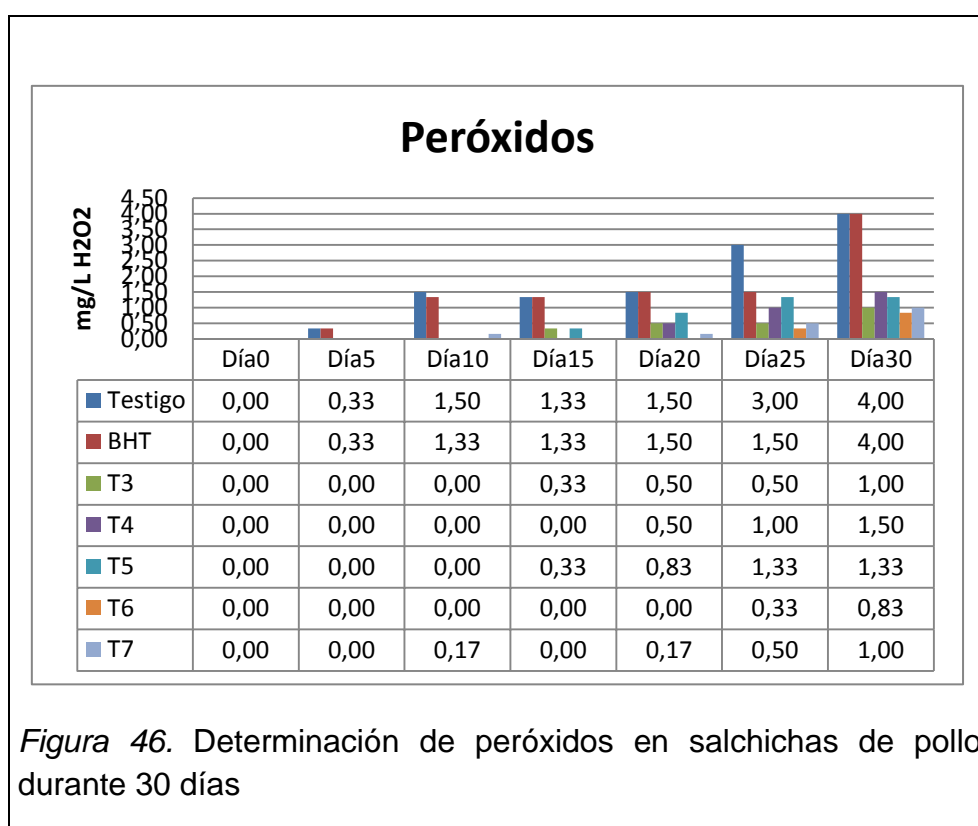
F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	4,57			
Repetición	2	1,45	0,72	21,66	0,0001
Tratamiento	6	2,72	0,45	13,60	0,0001
Error	12	0,40	0,03		

Tabla 61 Ponderación de tratamientos para peróxidos en el día 30

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
2	2,21	A
1	2,21	A
4	1,56	B
5	1,49	B
7	1,39	B
3	1,39	B
6	1,32	B

Nota: Desviación Estándar 0,11

En las tablas de análisis de varianza de peróxidos del día 0 hasta el día 30; una vez comparados los valores de estudio, se observó las diferencias significativas. Se realizó la comparación con el método de Tukey con el 95% de confiabilidad y al 5% de error, es decir valor de $p = 0,05$. Se determinó que los porcentajes de desviación estándar menor al 10%, se encuentran dentro de los parámetros de aceptabilidad. Se presentó una estabilidad en formación de peróxidos de 2 meq/L máxima en el día 30 en algunos tratamientos. Los tratamientos con formación baja de peróxidos fueron los tratamientos 6 y 7; debido a las altas concentraciones de antioxidantes en su composición.



En la Figura 46 se puede observar el crecimiento paulatino de peróxidos, el análisis de varianza determinó que en el día 0 no se presentó la formación de peróxidos. Las soluciones antioxidantes dentro de las muestras pudieron inhibir la presencia de los peróxidos analizados. Los cambios significativos se reportan desde el día 5, los tratamientos con mayor cantidad de peróxidos formados son el tratamiento testigo y BHT, seguidos por el tratamiento 4,5 y 3 en menor cantidad. Los tratamientos con menor cantidad de peróxidos

formados en ese período de estudio son los tratamientos 6 y 7. Por lo cual, se determinó que tiempo de vida útil en las salchichas de pollo corresponde a 30 días, en cuanto a presencia de peróxidos.

3.1.2.3 Acidez titulable

El estudio de las muestras permitió la determinación de acidez titulable en cada tratamiento durante 30 días. La acidez titulable determina el contenido ácido en las muestras de salchichas de pollo, de acuerdo a su concentración, el grado de acidez establece la presencia de microorganismos y las reacciones bioquímicas.

Solis 2015, en su manual de tecnología de carnes manifiesta que al evaluar la acidez titulable en 100 gramos de carne, los valores reportados para esta variable están dentro del rango de 0,30-0,60. En la presente investigación, a pesar de determinar la acidez titulable en embutidos, los porcentajes de acidez oscilaban entre 0,22-0,60 durante un período de 30 días, por lo cual, los valores se determinan por la materia prima de manera inicial y posteriormente por cambios intrínsecos del alimento. Sánchez et al 2009, sugiere que el grado de acidez de productos cárnicos se han visto influenciados por el deterioro del alimento provocado por la presencia de microorganismos y enzimas. Cabe recalcar que en el día 0 se observan cambios significativos entre tratamientos a diferencia de los días posteriores, es decir, las muestras presentaron un bajo porcentaje de acidez inicialmente, por adición las soluciones antioxidantes y seguidamente, los microorganismos y el deterioro del alimento determinaron el incremento de la acidez. Zimerma 2007, establece que el control de la acidez en la carne asegura la estabilidad microbiana debido a que a las condiciones ácidas no son toleradas por algunos microorganismos. Por lo cual, se deduce que las soluciones antioxidantes cumplen un papel de conservación.

Tabla 62 Análisis de varianza para acidez titulable en el día 0

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	0,07			
Repetición	2	0,04	0,02	16,70	0,0003
Tratamiento	6	0,02	3,2 E-03	3,03	0,0485
Error	12	0,01	1,1 E -03		

Tabla 63 Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 0

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
7	0,32	A
2	0,28	A B
4	0,26	A B
1	0,26	A B
3	0,24	A B
6	0,24	A B
5	0,22	B

Nota: Desviación Estándar 0,02

Tabla 64 Análisis de varianza para acidez titulable en el día 5

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	0,10			
Repetición	2	0,05	0,02	9,50	0,0034
Tratamiento	6	0,03	4,3 E-03	1,79	0,1849
Error	12	0,03	2,4 E -03		

Tabla 65 Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 5

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
2	0,34	A
7	0,34	A
4	0,30	A
1	0,30	A
3	0,28	A
6	0,26	A
5	0,24	A

Desviación Estándar 0,03

Tabla 66 Análisis de varianza para acidez titulable en el día 10

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	0,14			
Repetición	2	0,07	0,04	9,59	0,0032
Tratamiento	6	0,02	3,9 E-03	1,05	0,4440
Error	12	0,05	3,8 E -03		

Tabla 67 Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 15

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
7	0,40	A
2	0,34	A
6	0,32	A
4	0,32	A
1	0,32	A
3	0,32	A
5	0,28	A

Nota: Desviación Estándar 0,04

Tabla 68 Análisis de varianza para acidez titulable en el día 15

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	0,25			
Repetición	2	0,20	0,10	46,08	0,0001
Tratamiento	6	0,03	4,8 E-03	2,24	0,1105
Error	12	0,03	2,1 E -03		

Tabla 69 Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 15

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
7	0,40	A
2	0,40	A
1	0,40	A
6	0,34	A
3	0,34	A
4	0,34	A
5	0,30	A

Nota: Desviación Estándar 0,03

Tabla 70 Análisis de varianza para acidez titulable en el día 20

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	0,28			
Repetición	2	0,24	0,12	78,78	0,0001
Tratamiento	6	0,02	3,6 E-03	2,33	0,0997
Error	12	0,02	1,5 E -03		

Tabla 71 Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 20

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
1	0,42	A
2	0,42	A
7	0,40	A
5	0,38	A
6	0,36	A
4	0,34	A
3	0,34	A

Nota: Desviación Estándar 0,02

Tabla 72 Análisis de varianza para acidez titulable en el día 25

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
Total	20	0,37			
Repetición	2	0,23	0,12	18,50	0,0002
Tratamiento	6	0,05	0,01	1,34	0,3121
Error	12	0,08	20,01		

Tabla 73 Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 25

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
7	0,52	A
2	0,48	A
5	0,44	A
1	0,42	A
6	0,40	A
3	0,40	A
4	0,36	A

Nota: Desviación Estándar 0,05

Tabla 74 Análisis de varianza para acidez titulable en el día 30

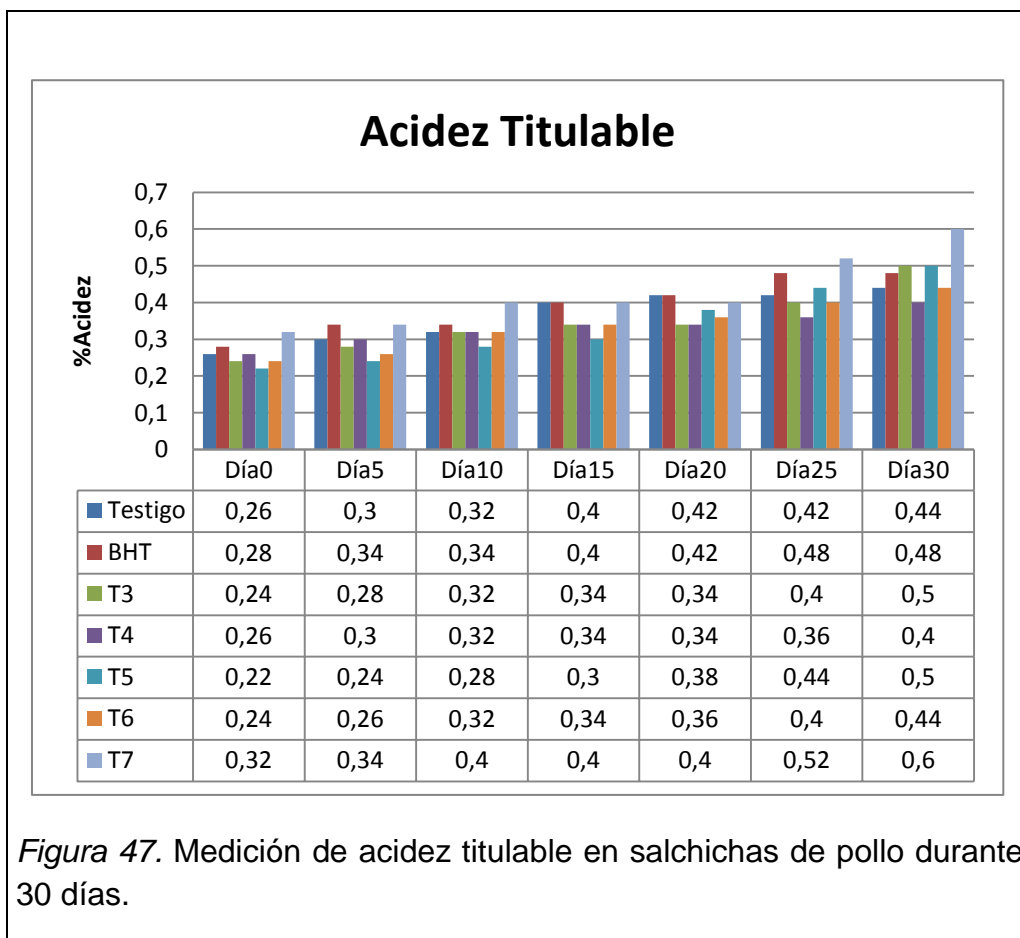
F.V	G.L	S.C	C.M	F	P. VALOR
TOTAL	20	0,27			
REPETICION	2	0,11	0,06	7,56	0,0075
TRATAMIENTO	6	0,07	0,01	1,69	0,2070
ERROR	12	0,09	0,01		

Tabla 75 Ponderación de tratamientos para acidez titulable en el día 30

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
7	0,60	A
5	0,50	A
3	0,50	A
2	0,48	A
6	0,44	A
1	0,44	A
4	0,40	A

Desviación Estándar 0,05

En las tablas de análisis de varianza de acidez titulable del día 0 hasta el día 30, así como en las tablas de ponderación de tratamientos se observa el análisis de los valores de acidez titulable de las muestras. Una vez comparados los valores de estudio, se observó las diferencias significativas y se realizó la comparación con el método de Tukey con el 95% de confiabilidad y al 5% de error, es decir valor de $p = 0,05$. Se determinó que los porcentajes de desviación estándar menor al 10%, se encuentran dentro de los parámetros de aceptabilidad. Los resultados de esta investigación determinaron que los tratamientos que mantienen una acidez apropiada son los tratamientos en los cuales las soluciones antioxidantes contaban con la presencia de ácido ascórbico.



En la Figura 47 se puede observar el crecimiento paulatino de la acidez titulable, el análisis de varianza determinó que en el día 0 se presentan diferencias significativas asociadas al aumento de la acidez. Las soluciones antioxidantes dentro de las muestras pudieron determinar los valores de acidez titulable analizados. Los tratamientos se encuentran dentro de los estándares establecidos en todos los tratamientos, por lo cual, se determinó que en el caso de la acidez titulable, el tiempo de vida útil en las salchichas de pollo corresponde a 30 días.

3.1.2.4 Efecto antioxidante

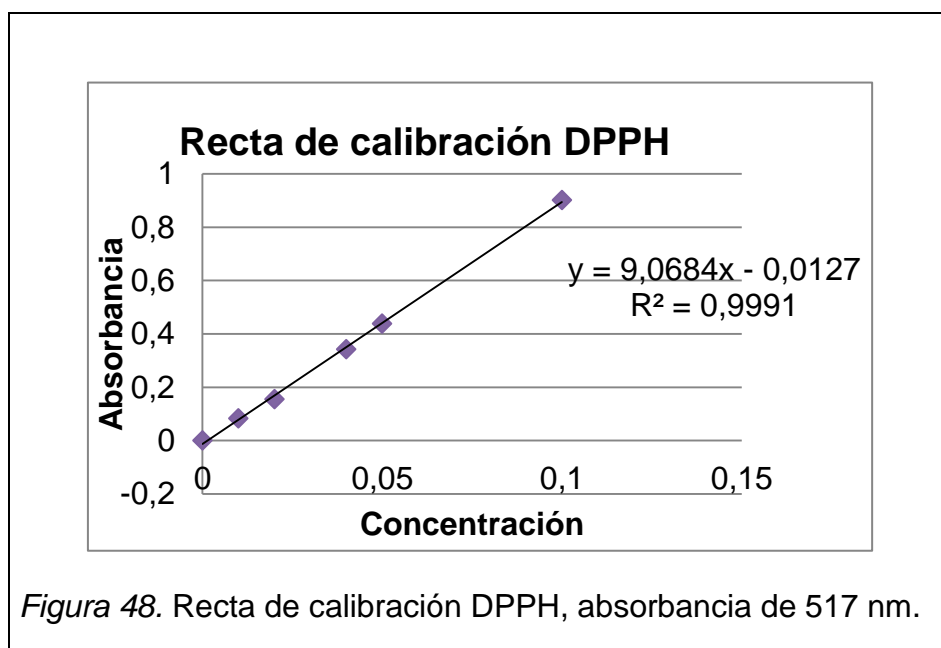
3.1.2.4.1 Recta de calibración

Mediante la recta de calibración se obtuvieron los valores de absorbancia para las diluciones de DPPH, como se muestran en la Tabla 76.

Tabla 76 Concentraciones de DPPH, determinación de absorbancia en espectrofotómetro UV para recta de calibración.

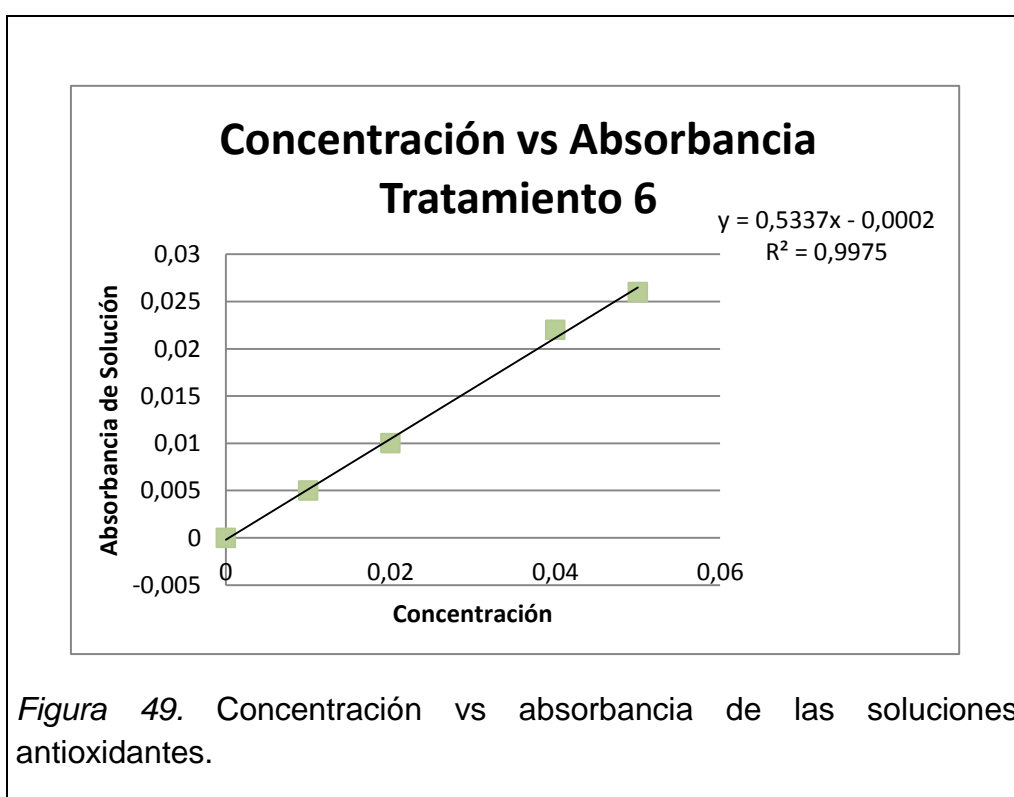
	CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA
a	Blanco	0,000
b	0,01	0,082
c	0,02	0,155
d	0,04	0,343
e	0,05	0,438
f	0,10	0,901

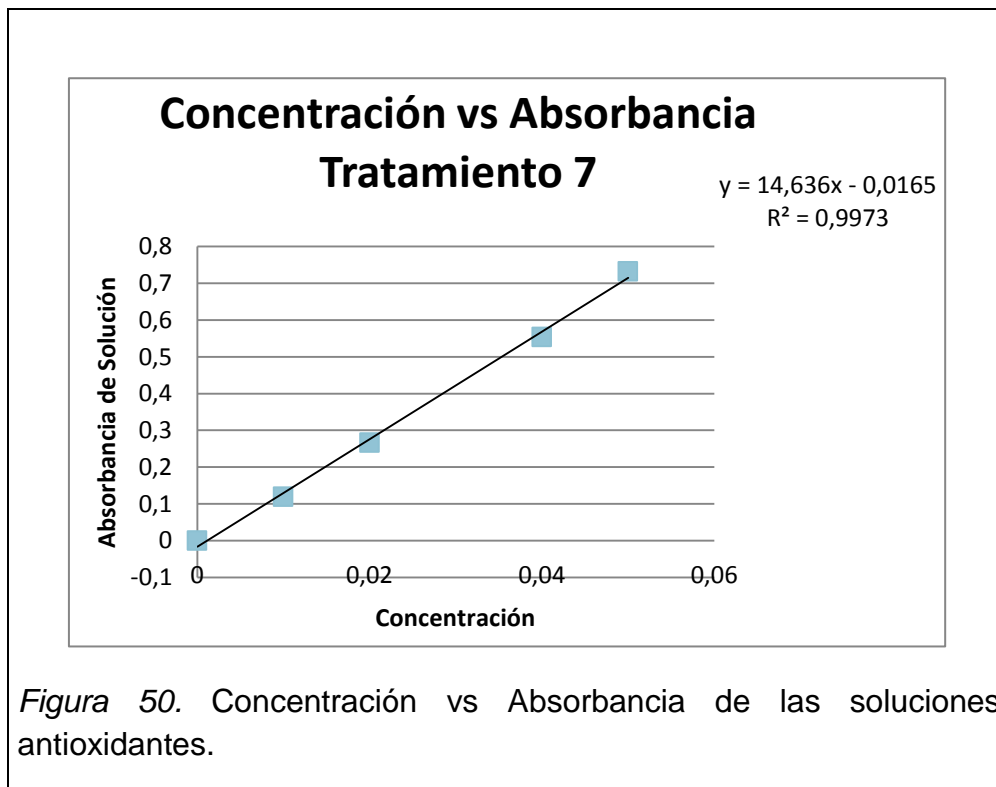
Se realizó la recta de calibración DPPH, se aplicó la fórmula de regresión lineal y se determinó el R^2 . En la figura 47 se observa la recta de calibración de DPPH, en la cual el R^2 es 0,991; con el fin de verificar el efecto antioxidante de los tratamientos se adicionó a las concentraciones de DPPH las soluciones antioxidantes. El método DPPH o de decoloración a través del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil permitió determinar la capacidad antioxidante de las soluciones utilizadas en los tratamientos. Los radicales libres del compuesto tienen como función estabilizarse electroquímicamente mediante la captación de un electrón, generando más radicales libres (Housam, Warid y Zaid, 2014).



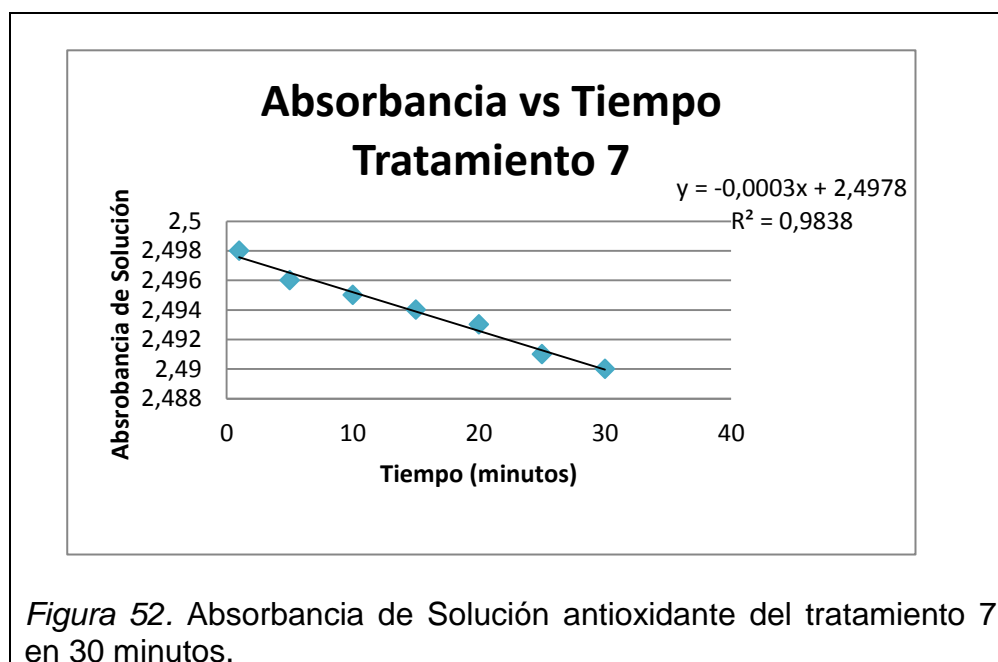
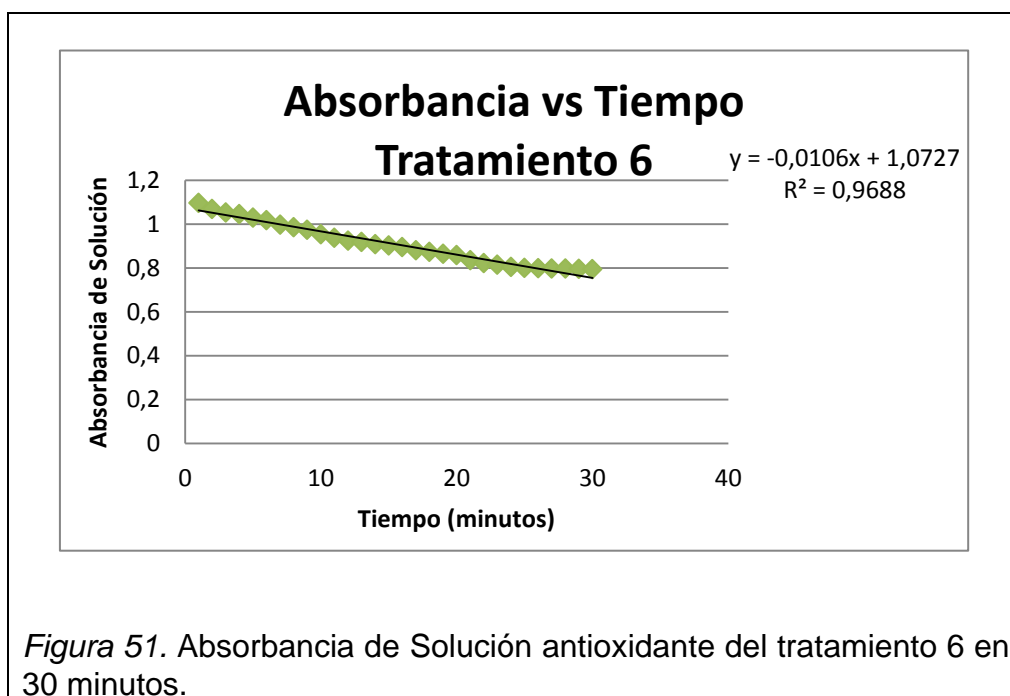
En esta investigación, se realizó la recta de calibración con el compuesto DPPH (Figura 48). Este compuesto es fotosensible por lo cual se realizaron las

pruebas en oscuridad, el compuesto, al ser de color violeta cambia instantáneamente al añadir las soluciones antioxidantes porque estas atrapan los radicales libres reduciendo el color, debido al efecto antioxidante. Mediante la medición de la recta se puede determinar la absorbancia del compuesto a 517nm (Kuskoski *et al*, 2005). Por lo tanto, en la Figura 49 y Figura 50 se observa la concentración vs la absorbancia en las soluciones antioxidantes del tratamiento 6 y tratamiento 7; constatando que al realizar la regresión lineal se forma una recta y el R^2 es de 0,997 para el tratamiento 6 y el R^2 es de 0,997 para el tratamiento 7.





Repo y Encina 2008, establecen que la capacidad antioxidante de un alimento depende de los compuestos que lo conforman; por lo cual, en su estudio de capacidad antioxidante aceites esenciales determinan que los compuestos activos en conjunto con componentes fenólicos, carotenos y ácido ascórbico generan mayor efecto antioxidante. Housam, Warid y Zaid 2014, mencionan que el efecto antioxidante entre el DPPH y un antioxidante determinan el tiempo en que tardan en producirse esta reacción de efecto antioxidante, debido a que la combinación de antioxidantes produce un efecto sinérgico y provoca la atracción de radicales libres. Kuskoski *et al* 2005, sugiere que la concentración de un extracto determina la actividad antioxidante. El método de DPPH fija un período de 30 minutos para evaluar la captación de radicales libres a pesar de que estos poseen una vida corta. Por lo cual, el tiempo es un factor primordial en este estudio. En la Figura 51 y Figura 52 se representan las curvas de la absorbancia de las soluciones antioxidantes con las concentraciones de DPPH medidas en un período de 30 minutos, en las cuales el valor decrece debido a la captación de radicales libres.



Se realizó la evaluación de la absorbancia vs el tiempo de los tratamientos 6 y 7; en los cuales las absorbancias establecen el grado de inhibición de radicales libres. En la figura 51 y 52 se observa cómo actúan las soluciones antioxidantes y mediante el R^2 se determina que el tratamiento 7 que contiene

1000 ppm de aceite esencial de guayaba es el tratamiento con mayor potencial antioxidante con R^2 de 0,98 y % de capacidad antioxidante de 92%.

En el caso del tratamiento 6 el R^2 es de 0,96 y el % capacidad antioxidante de 73%. Esto quiere decir que las soluciones antioxidantes cumplen su función y su efecto dentro de las salchichas de pollo, comprobando que el análisis presentaron cambios mínimos pero el efecto antioxidante ha actuado evitando deterioro del alimento.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

El efecto antioxidante del aceite esencial de guayaba en combinación con ácido ascórbico en salchichas de pollo presentó resultados positivos en las evaluaciones microbiológicas y físico químicas. Las salchichas de pollo con soluciones antioxidantes demostraron mejores resultados que la salchicha testigo y la salchicha con BHT.

En el análisis microbiológico se evaluó Aerobios mesófilos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Las soluciones antioxidantes controlaron el crecimiento de las ufc de Aerobios Mesófilos y Staphylococcus Aureus, es decir, que el desarrollo de microorganismos se encuentra dentro de los parámetros establecidos por la norma INEN, presentando un cambio significativo durante el período de evaluación de 30 días.

En el caso de *Escherichia coli* no se reportó unidades formadoras de colonias debido a que la salchicha de pollo fue sometida a un tratamiento térmico en el cuál se redujo notablemente el crecimiento de este microorganismo.

En el análisis físico químico se evaluó el pH, peróxidos y acidez titulable. La salchicha con presencia de las soluciones antioxidantes no presentaron un cambio significativo apreciable durante el período de evaluación de 30 días. Estos análisis se mantuvieron dentro de los rangos permitidos pero son factores decisivos para el desarrollo de los microorganismos.

De acuerdo a la evaluación, los tratamientos óptimos fueron el tratamiento 6 (1000ppm Aceite Esencial de Guayaba +700 ppm Ácido ascórbico.) y tratamiento 7 (1000ppm Aceite Esencial de Guayaba). Las dosificaciones con soluciones antioxidantes más altas presentaron mejores resultados.

Las soluciones antioxidantes del tratamiento 6 y tratamiento 7 se sometieron a un análisis de efecto antioxidante a través del método de decoloración de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil en el espectrofotómetro UV.

Los resultados del porcentaje de capacidad antioxidante para cada tratamiento son: 73% para el tratamiento 6 y 92% para el tratamiento 7. Es decir que, el aceite esencial de guayaba en combinación con ácido ascórbico en altas concentraciones es una solución antioxidante potente para salchichas de pollo. En cambio, el aceite esencial de guayaba es altamente antioxidante, mejor que la solución antioxidante del tratamiento 6. Debido a la acción de los componentes del aceite esencial de guayaba, esta solución controla el crecimiento de microorganismos en salchichas de pollo.

La vida útil de las salchichas de pollo se determinó en tiempo real, los criterios de evaluación que establecieron la durabilidad del embutido con soluciones antioxidantes fueron las unidades formadoras de colonias. Para el tratamiento 6 y tratamiento 7 la estimación de vida útil es de 30 días. Los análisis fisicoquímicos no presentaron cambios significativos, por lo tanto no garantizan la estimación del tiempo de vida útil.

4.2 Recomendaciones

Dadas las conclusiones, se recomienda que en próximas investigaciones se evalúe las soluciones antioxidantes en diversos embutidos a partir de las dosis establecidas.

Se recomienda realizar una evaluación sensorial de las salchichas de pollo con soluciones antioxidantes que contengan aceite esencial de guayaba en combinación con ácido ascórbico, con el fin de determinar las características organolépticas.

Se recomienda evaluar los componentes bioactivos de las soluciones antioxidantes óptimas, con el fin de establecer su acción en salchichas de pollo.

REFERENCIAS

- Acofarma. (2009). *FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA*. Obtenido de BUTILHIDROXITOLUENO (BHT)
- AditechCorp. (2010). *Estudios de Vida Útil*. España: CNTA.
- Alarcón, J., Panez, R., Romos, P., Valle, E., y Yon, A. (2010). Determinación de Índice de Peróxidos en Aceites y Grasas. *UNFV*.
- Allaert, C., y Escolá, M. (2002). *Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos*. Madrid: Díaz de Santos. S.A.
- Amerling, C. (2001). *Tecnología de la Carne*. Madrid: UNED.
- Anas, K., Jayasree, P., Vijayakumar, T., y Manish, P. (2008). In vitro antibacterial activity of Psidium guajava Linn. leaf extract on clinical isolates of multidrug resistant Staphylococcus aureus. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41-46.
- Andino, F., y Castillo, Y. (2010). *Microbiología de alimentos: Enfoque práctico para la inocuidad de alimentos*. Estelí: Universidad Nacional de Ingeniería.
- Arreola, J. (2012). *Enfermedades Producidas por Alimentos cárnicos*. México: NOM123.
- Belitzs, H., Grosch, W., y Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Berlin: Springer.
- Biswas, B., Rogers, K., MacLaughlin, F., Daniels, D., y Yadav, A. (2013). Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (Psidium guajava L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Microbiology*, DOI: 10.1155/2013/746165.
- Branen , L., Davidson, M., y Salminen, S. (2005). *Food Additives*. New York: Marcel Dekker,Inc.
- BritaniaLab. (2014). *Levine EMB Agar*. Argentina.

- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. Zaragoza: Acribia S.A.
- Cadenas, E., y Packer, L. (2005). *Handbook of Antioxidants*. New York: Taylor & Francis.
- Calvo, M. (2005). *Oxidación de Lípidos*.
- Campos, J., Ruiz, R., y Díaz, E. (2002). EFECTO SINÉRGICO DEL BUTIL-HIDROXI-TOLUENO (BHT) Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN UN PRODUCTO CEREAL LACTEADO. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 89-95.
- Castañeda, C., Ramos, E., y Ibáñez, L. (2008). Evaluation of the antioxidant capacity of seven peruvian medicinal p. *Revista Horizonte Médico*.
- Cayre , M., Judis, M., y Garro, O. (2009). Población Microbiana Asociedad a Salchichas Tipo Viena. *Facultad de Agroindustrias - UNNE*.
- Davidson, P. (1997). *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds*. Washington D.C: ASM Press.
- Decker, E., Warner, K., Richards, M., y Shah, F. (2005). Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4303-4310.
- Dickinson, B. (2013). *BD Mannitol Salt Agar*. Alemania.
- Domínguez, P., Ávila, F., Carmona, C., Macías, H., Escalera, F., y Mendoza, M. (2015). *EFFECT OF DIETARY OREGANO OIL ON THE QUANTITY OF AEROBIC MESOPHILIC DETECTED IN FRESH AND FROZEN BROILER BREAST*. Abanico Veterinario.
- El telegráfo. (2014). En 2014 se han reportado 3.418 casos de intoxicación alimentaria.
- Enriquez, E. (2013). *Investigación Análisis de Cárnicos*. México.

- Fernández, M., García, M., Morales, L., y Troncoso, A. (2012). *Toxicología de los Aditivos Alimentarios*. Madrid: Díaz Santos.
- García, A., Córdova, L., Urpin, L., Mendez, R., y Malave, A. (2012). Propiedades fisicoquímicas de la carne de conejos suplementados con follaje de *Gliricidia sepium* y fibra de *Elaeis guineensis*. *Revista Científica UDO Agrícola*.
- García, S. (2006). *Productos Naturales para el Control de Microorganismos*.
- Gavilán, Á. (2012). *Seguridad Alimentaria y nutrición: Actualidad y nuevos enfoques*. Santiago de Compostela: AFCA.
- Gil, Á., y Ruiz, M. (2010). *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los alimentos*. Madrid: Médica Panamericana.
- Gómez, S., y López, M. (2009). Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). *Ingeniería de Alimentos*, 33-45.
- Goncalvez, F., Andrade, M., Bezerra, J., Macrae, A., Sousa, O., Fontoles, A., y otros. (2008). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GUAVA, *Psidium guajava* LINNAEUS, LEAF EXTRACTS ON DIARRHEA-CAUSING ENTERIC BACTERIA ISOLATED FROM SEABOB SHRIMP. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 11-15.
- Gould, G. (2001). *Mechanisms of action of food preservation procedures*. Irlanda: Elsevier Applied Science.
- HOUSAM, H., WARID, K., y Zaid, A.. (2014). ESTIMATING THE ANTIOXIDANT ACTIVITY FOR NATURAL ANTIOXIDANTS (TOCOCHROMANOL) AND SYNTHETIC ONE BY DPPH. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, ISSN- 0975-1491.
- INEN 1338. (2010). *Norma INEN Productos Cárnicos Crudos, Curados, Precocidos. Requisitos*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Regularización.

- INEN 1529-14. (1998). *Control microbiológico de los alimentos. Staphylococcus aureus*. . Quito.
- INEN 1529-5 . (2006). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad demicroorganismos aerobios mesofilos*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Regularización.
- INEN 1529-8. (1990). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y E.coli*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Regularización.
- INEN. (2006). CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. DEFINICIONES. NTE INEN 1 217:2006 .
- INEN. (Abril de 2012). *Carne y Productos cárnicos*. Recuperado el 13 de Mayo de 2014, de <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte/1338-3.pdf>
- INEN. (2013). NORMA GENERAL DEL CÓDEX PARA LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS (MOD). NTE INEN-CODEX 192:2013.
- Khadhri, A., Monkhi, R., Almeida, C., y Machado, M. (2014). Chemical composition of essential oil of Psidium Guajava L. growing in Tunisia. *Industrial Crops and Products*.
- León, V., Totosaus, A., Guerrero, I., y Pérez, M. (2006). EFECTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS TERMORESISTENTES EN SALCHICHAS COCIDAS. *Cienc. Technol. Aliment*, 135-141.
- López, F. (2007). *Preelaboración y Conservación de Alimentos*. Madrid-España: Amertown Internatinal S.A.
- Martínez, A. (2003). *Aceites Esenciales*. Medellín: Universidad de Antioquía.
- Masagati, T. (2013). *Chemistry of food additives and preservatives*. Oxford: WILEY-BLACKWELL.
- Mast Group. (2000). *Plate Count Agar*. Virginia.

- Merck. (2015). *Peroxid- Test: MQUANT 110011*. Estados Unidos.
- Morton, J. (1987). *Fruits of warm Climates* . Miami: Creative Resource System Inc.
- Norma INEN. (2011). Carne y productos cárnicos. Productos cárnicos crudos, productos cárnicos curados-madurados y productos cárnicos precocidos-cocidos. *NTE INEN 1 338:2010* .
- Okechukwu , C., Amaechi, A., Salamatou, K., Nwamaka, N., y Chah, K. (2012). Antimicrobial activity of *Psidium guajava* Linn. stem extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus*. *African Journal of Biotechnology*, DOI: 10.5897/AJB12.1284.
- Paker, L., Traber, M., Kraemer, K., y Frei, B. (2002). *The Antioxidants: Vitamins C and E*. Illinois: AOCS Press.
- Parra, V., Viguera, J., Sánchez, J., Peinado, J., Esparrago, L., y Gutierrez, J. (2012). Effect of exposure to light on physico-chemical quality attributes of sliced dry-cured Iberian ham under different packaging systems. *Meat Science*.
- Pepton, M., Broncano, J., Otte, J., Martín, L., y Timón, J. (2013). Effect of commercial proteases on shelf-life extension of Iberian dry-cured. *Food Science and Technology*, 191-197.
- Pérez, R., Mitchell, R., y Vargas, S. (2008). *Psidium Guajava: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology*. *Ethnopharmacol.*
- Periago, M. (2011). *Protocolos de Control de Cárnicos*. Murcia: Universidad de Murcia.
- Prescott , L., Harley, J., y Klein, D. (2000). *Microbiología*. Madrid: McGraw Hill Interamericana,.
- Ramírez, M. (2014). *Análisis de determinación de humedad*. Perú: Universidad Nacional Hermilio Valdizan.

- Ramos, E., Castañeda, B., y Ibáñez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas. *PERU SALUD* 15, 42-48.
- Ramos, D., San Martín, V., Rebatta, M., Arbaiza, T., Salva, B., Caro, I., y otros. (2014). Características fisicoquímicas de la salchicha de cerdo del departamento de Tumbes, Perú. *Salud tecnol.*, 120-128.
- Readorn, J. (2009). *PH y los Alimentos*. Carolinda del Norte: North Carolina Department of Agriculture.
- Repo, R., y Christian, E. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, ISSN 1810-634X.
- Rodríguez, E., Árias, G., Vásquez, J., Martínez, R., y Stashenko, E. (2012). RENDIMIENTO Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ROSMARINUS OFFICINALIS, SALVIA OFFICINALIS Y PSIDIUM GUAJAVA OBTENIDOS CON CO₂. *Acad. Colomb. Ciencias*, 305-316.
- Sanches, R., García, D., Schiaviani, M., Nakamura, C., y Prado, B. (2005). An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* L. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
- Sharma, R., Yadav, A., y Bhardwaj, R. (2013). DPPH FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN ARGEMONE. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- Stashenko, E. (2009). *Aceites Esenciales*. Bucaramanga: CENIVAM.
- Torres, A., Ricciardi, G., Agrelo, A., y Ricciardi, A. (2002). *Estabilidad fitoquímica de Psidium guajava*. Corrientes: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura.
- Torres, J. (2012). Índice de Peróxidos. *Universidad de Cartagena*.

UNAM. (2007). *TÉCNICAS DE ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO DE ALIMENTOS*. México.

UNAM. (9 de Febrero de 2011). *Canales y Cortes del Bovino*.

Vieira, E. (2003). *Elementary Food Science*. Massachusetts: Chapman & Hall.

Williams , B., Cuvelier , M., y Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.Wiss*, 25-30.

Yausín, C. (2007). *Evaluación de tres tipos de aceites esenciales en un salchicha de ternera*. Riobamba: ESPOCH.

ANEXOS

Anexo 1. Aerobios Mesófilos, datos de unidades formadoras de colonias. Promedio de la evaluación durante 30 días.

Repe tición	Trata miento	aerobios 0	aerobios 5	aerobios 10	aerobios 15	aerobios 20	aerobios 25	aerobios 30	aerobios 0 Raíz (n+1)	aerobios 5 Raíz (n+1)	aerobios 10 Raíz (n+1)	aerobios 15 Raíz (n+1)	aerobios 20 Raíz (n+1)	aerobios 25 Raíz (n+1)	aerobios 30 Raíz (n+1)
1	1	0	0	500	4033	5567	9000	31067	1,00	1,00	22,38	63,51	74,62	94,87	176,26
1	2	33	600	1100	2300	9500	18100	19700	5,83	24,52	33,18	47,97	97,47	134,54	140,36
1	3	0	667	700	15467	24933	26167	34033	1,00	25,85	26,48	124,37	157,91	161,77	184,48
1	4	0	100	1267	1800	8567	10633	26500	1,00	10,05	35,61	42,44	92,56	103,12	162,79
1	5	0	0	133	133	667	10133	18633	1,00	1,00	11,58	11,58	25,85	100,67	136,51
1	6	0	100	167	633	3833	4267	4900	1,00	10,05	12,96	25,18	61,92	65,33	70,01
1	7	33	67	67	233	267	300	300	5,83	8,25	8,25	15,30	16,37	17,35	17,35
2	1	0	67	1500	5667	16800	18567	26233	1,00	8,25	38,74	75,29	129,62	136,26	161,97
2	2	0	0	500	2567	9100	11033	21867	1,00	1,00	22,38	50,68	95,40	105,04	147,88
2	3	0	0	300	4300	7867	7700	45200	1,00	1,00	17,35	65,58	88,70	87,76	212,61
2	4	0	0	33	667	4200	5233	13033	1,00	1,00	5,83	25,85	64,82	72,35	114,17
2	5	0	33	67	333	333	22800	34467	1,00	5,83	8,25	18,28	18,28	151,00	185,66
2	6	0	0	67	167	200	333	2796	1,00	1,00	8,25	12,96	14,18	18,28	52,89
2	7	33	33	67	67	100	1133	133	5,83	5,83	8,25	8,25	10,05	33,67	11,58
3	1	0	100	700	4467	15833	18033	20367	1,00	10,05	26,48	66,84	125,83	134,29	142,72
3	2	33	200	767	2767	8800	12133	24333	5,83	14,18	27,71	52,61	93,81	110,16	155,99
3	3	0	933	5133	12000	14567	36733	40033	1,00	30,57	71,65	109,55	120,70	191,66	200,09
3	4	0	233	900	4033	6333	6567	10300	1,00	15,30	30,02	63,51	79,59	81,04	101,49
3	5	0	33	100	400	1300	13400	26233	1,00	5,83	10,05	20,02	36,07	115,76	161,97
3	6	0	267	600	933	5067	6300	8667	1,00	16,37	24,52	30,56	71,19	79,38	93,10
3	7	0	67	100	100	133	200	367	1,00	8,25	10,05	10,05	11,58	14,18	19,18

Anexo 2. Staphylococcus Aureus, datos de unidades formadoras de colonias. Promedio de la evaluación durante 30 días.

Repetición	Tratamiento	s.aureus 0	s.aureus 5	s.aureus 10	s.aureus 15	s.aureus 20	s.aureus 25	s.aureus 30	s.aureus 0 Raíz (n+1)	s.aureus 5 Raíz (n+1)	s.aureus 10 Raíz (n+1)	s.aureus 15 Raíz (n+1)	s.aureus 20 Raíz (n+1)	s.aureus 25 Raíz (n+1)	s.aureus 30 Raíz (n+1)
1	1	0	33	67	100	233	233	3267	1	5,83	8,25	10,05	15,30	15,30	57,16
1	2	0	0	67	133	967	5767	13200	1	1,00	8,25	11,58	31,11	75,95	114,90
1	3	0	33	67	167	7933	12800	14567	1	5,83	8,25	12,96	89,07	113,14	120,70
1	4	0	0	33	100	2833	11033	14200	1	1,00	5,83	10,05	53,24	105,04	119,17
1	5	0	33	67	100	4033	7467	13233	1	5,83	8,25	10,05	63,51	86,42	115,04
1	6	0	0	33	433	1333	1767	6833	1	1,00	5,83	20,83	36,52	42,05	82,67
1	7	0	33	100	133	167	400	633	1	5,83	10,05	11,58	12,96	20,02	25,18
2	1	0	0	0	33	33	67	2967	1	1,00	1,00	5,83	5,83	8,25	54,48
2	2	0	0	0	33	767	5400	13333	1	1,00	1,00	5,83	27,71	73,49	115,47
2	3	0	0	33	167	6967	9633	15867	1	1,00	5,83	12,96	83,47	98,15	125,97
2	4	0	0	33	67	2800	11133	12667	1	1,00	5,83	8,25	52,92	105,52	112,55
2	5	0	0	33	167	2433	8033	14633	1	1,00	5,83	12,96	49,34	89,63	120,97
2	6	0	0	33	667	867	1167	7367	1	1,00	5,83	25,85	29,46	34,18	85,84
2	7	0	0	33	67	133	267	800	1	1,00	5,83	8,25	11,58	16,37	28,30
3	1	0	0	33	33	67	133	3400	1	1,00	5,83	5,83	8,25	11,58	58,32
3	2	0	0	33	33	667	6100	13133	1	1,00	5,83	5,83	25,85	78,11	114,61
3	3	0	0	33	100	8100	9867	16100	1	1,00	5,83	10,05	90,01	99,34	126,89
3	4	0	0	33	133	2900	10300	12767	1	1,00	5,83	11,58	53,86	101,49	113,00
3	5	0	0	33	100	3167	8367	15100	1	1,00	5,83	10,05	56,28	91,48	122,89
3	6	0	0	33	567	1433	1500	7667	1	1,00	5,83	23,83	37,87	38,74	87,57
3	7	0	0	33	133	167	567	733	1	1,00	5,83	11,58	12,96	23,83	27,09

Anexo 3. Determinación de pH, promedio de datos evaluados durante 30 días.

Repetición	Tratamiento	PH0	PH5	PH10	PH15	PH20	PH25	PH30
1	1	6,43	5,96	5,93	5,1	4,95	4,88	4,88
1	2	6,64	6,34	6,07	5,92	5,75	5,66	5,63
1	3	6,28	6,08	6	5,96	5,93	5,81	5,54
1	4	6,36	6,09	5,86	5,77	5,66	5,58	4,92
1	5	6,32	6,16	6,02	6,01	5,95	5,82	5,06
1	6	6,3	6,29	6,12	5,96	5,94	5,84	5,78
1	7	6,42	6,05	5,95	5,83	5,83	5,79	5,69
2	1	6,7	6,59	6,51	6,3	5,57	5,43	5,19
2	2	6,64	6,57	6,53	6,23	6,21	6,16	5,99
2	3	6,55	6,54	6,51	6,31	6,27	6,24	6,17
2	4	6,59	6,57	6,45	6,45	6,44	6,42	6,24
2	5	6,56	6,56	6,56	6,52	6,25	6,22	6,17
2	6	6,58	6,46	6,45	6,41	6,25	6,22	6,17
2	7	6,53	6,43	6,31	6,31	6,28	6,26	6,16
3	1	6,68	6,57	6,49	6,28	5,55	5,41	5,17
3	2	6,62	6,55	6,51	6,21	6,19	6,14	5,97
3	3	6,53	6,52	6,49	6,29	6,25	6,22	6,15
3	4	6,6	6,58	6,47	6,44	6,4	6,38	6,2
3	5	6,52	6,52	6,48	6,44	6,17	6,11	6,06
3	6	6,59	6,44	6,43	6,39	6,23	6,2	6,14
3	7	6,55	6,45	6,33	6,3	6,27	6,25	6,12

Anexo 4. Determinación de peróxidos, promedio de datos evaluados durante 30 días

Repetición	Tratamiento	P0	P5	P10	P15	P20	P25	P30	P0 Raíz (n+1)	P5 Raíz (n+1)	P10 Raíz (n+1)	P15 Raíz (n+1)	P20 Raíz (n+1)	P25 Raíz (n+1)	P30 Raíz (n+1)
1	1	0	0	0,5	0	0,5	2	2	1,0	1,0	1,2	1,0	1,2	1,7	1,7
1	2	0	0	0	0	0,5	0,5	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,7
1	3	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,2
1	4	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,2
1	5	0	0	0	0	0	0	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1	6	0	0	0	0	0	0	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1	7	0	0	0,5	0	0	0,5	0,5	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,2	1,2
2	1	0	0,5	2	2	2	2	5	1,0	1,2	1,7	1,7	1,7	1,7	2,4
2	2	0	0,5	2	2	2	2	5	1,0	1,2	1,7	1,7	1,7	1,7	2,4
2	3	0	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,2	1,2
2	4	0	0	0	0	0,5	2	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,7	1,7
2	5	0	0	0	0,5	0,5	2	2	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,7	1,7
2	6	0	0	0	0	0	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2
2	7	0	0	0	0	0	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2
3	1	0	0,5	2	2	2	5	5	1,0	1,2	1,7	1,7	1,7	2,4	2,4
3	2	0	0,5	2	2	2	2	5	1,0	1,2	1,7	1,7	1,7	1,7	2,4
3	3	0	0	0	0,5	0,5	0,5	2	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,2	1,7
3	4	0	0	0	0	0,5	0,5	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,7
3	5	0	0	0	0,5	2	2	2	1,0	1,0	1,0	1,2	1,7	1,7	1,7
3	6	0	0	0	0	0	0,5	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,7
3	7	0	0	0	0	0,5	0,5	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,7

Anexo 5. Determinación de acidez titulable, promedio de datos evaluados durante 30 días.

Repetición	Tratamiento	AT0	AT5	AT10	AT15	AT20	AT25	AT30
1	1	0,3	0,3	0,3	0,6	0,6	0,6	0,6
1	2	0,36	0,42	0,42	0,54	0,6	0,48	0,6
1	3	0,3	0,36	0,36	0,42	0,42	0,48	0,48
1	4	0,3	0,42	0,42	0,48	0,48	0,6	0,6
1	5	0,3	0,3	0,36	0,42	0,54	0,6	0,6
1	6	0,3	0,3	0,42	0,42	0,48	0,6	0,6
1	7	0,36	0,42	0,6	0,6	0,6	0,72	0,6
2	1	0,24	0,3	0,36	0,3	0,3	0,3	0,36
2	2	0,24	0,3	0,3	0,3	0,3	0,48	0,36
2	3	0,24	0,24	0,3	0,3	0,3	0,42	0,6
2	4	0,18	0,3	0,3	0,3	0,24	0,18	0,3
2	5	0,18	0,24	0,24	0,24	0,3	0,36	0,42
2	6	0,18	0,18	0,24	0,3	0,3	0,3	0,36
2	7	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,42	0,6
3	1	0,24	0,3	0,3	0,3	0,36	0,36	0,36
3	2	0,24	0,3	0,3	0,36	0,36	0,48	0,48
3	3	0,18	0,24	0,3	0,3	0,3	0,3	0,42
3	4	0,3	0,18	0,24	0,24	0,3	0,3	0,3
3	5	0,18	0,18	0,24	0,24	0,3	0,36	0,48
3	6	0,24	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,36
3	7	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,42	0,6

Anexo 6. Evaluación de efecto antioxidante durante 30 minutos. Datos de tratamiento 6 y tratamiento 7.

Tratamiento 6		Tratamiento 7	
t/ (min)	ABS	t/ (min)	ABS
1	1,096	1	2,498
2	1,069	2	2,498
3	1,053	3	2,498
4	1,046	4	2,498
5	1,029	5	2,496
6	1,018	6	2,496
7	0,998	7	2,496
8	0,986	8	2,496
9	0,974	9	2,496
10	0,953	10	2,495
11	0,937	11	2,495
12	0,924	12	2,495
13	0,918	13	2,495
14	0,909	14	2,495
15	0,902	15	2,494
16	0,895	16	2,494
17	0,881	17	2,494
18	0,873	18	2,494
19	0,865	19	2,494
20	0,859	20	2,493
21	0,836	21	2,493
22	0,822	22	2,493
23	0,815	23	2,493
24	0,804	24	2,493
25	0,801	25	2,491
26	0,799	26	2,491
27	0,798	27	2,491
28	0,798	28	2,491
29	0,796	29	2,491
30	0,795	30	2,49