



FACULTAD DE POSGRADOS

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS FORMULACIONES DEL ÁCIDO
ASCÓRBICO (AA) CON ACEITE ESENCIAL (AEG) Y GENGIBRE POLVO (GP)
(*Zingiber officinale*), EN BALANCEADO PARA AVES ETAPA INICIAL.

Autora

Angélica María Bayas Aguilar

Año
2018



FACULTAD DE POSGRADOS

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS FORMULACIONES DEL ÁCIDO
ASCÓRBICO (AA) CON ACEITE ESENCIAL (AEG) Y GENGIBRE
POLVO (GP) (*Zingiber officinale*), EN BALANCEADO PARA AVES
ETAPA INICIAL.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de magíster en Agroindustrias con mención
en calidad y seguridad alimentaria

Profesora Guía

Dra. Janeth Fabiola Proaño Bastidas

Autora

Angélica María Bayas Aguilar

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, Efecto antimicrobiano de las formulaciones del ácido ascórbico con aceite esencial de jengibre y jengibre en polvo (*Zingiber officinale*), en balanceado para aves etapa inicial, a través de reuniones periódicas con el estudiante Angélica María Bayas Aguilar, en el semestre (2018-1), 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 DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Efecto antimicrobiano de las formulaciones del ácido ascórbico con aceite esencial de jengibre y jengibre en polvo (*Zingiber officinale*), en balanceado para aves etapa inicial, de Angélica María Bayas Aguilar, en el semestre (2018-1), dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Milene Fernanda Díaz Basantes

MÁSTER EN INGENIERÍA DE LOS PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

CI: 1711274066

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

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

Angélica María Bayas Aguilar

CI: 0201880200

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Américas, a los docentes de la Maestría de Agroindustrias. A Dra. Janeth Proaño, por su gran aporte científico en la realización de esta investigación.

A mis amigos: Kelvin Ortiz, German Lopez, Irvin Díaz por su apoyo para la culminación de esta investigación. A Leonardo Andrade por su gran cariño incondicional y apoyo en toda esta etapa de formación académica.

DEDICATORIA

A Dios por se mi guía y fortaleza para afrontar los retos en mi vida.

A mis padres especialmente Nancy Aguilar Solis (Madre), Alberto Bayas (Padre), Carmen Solis Martínez (Abuelita), Mirella y Maria Bayas (Hermanas), y sobrinos por sus consejos, cariño y apoyo en cada etapa de mi vida, siendo perseverantes en lograr objetivos y metas.

RESUMEN

La presente investigación tiene la finalidad de evaluar el efecto antimicrobiano de las formulaciones del ácido ascórbico con aceite esencial de jengibre y jengibre en polvo (*Zingiber officinale*), en balanceado para aves etapa inicial.

Se prepararon 5 tratamientos con ácido ascórbico, aceite esencial de jengibre y jengibre en polvo a distintas concentraciones. El tratamiento 1 tuvo un aditivo sintético, al tratamiento 2 y 3 se le agregó jengibre en polvo, y a los tratamientos 4 y 5 se agregó aceite esencial de jengibre, las cuales fueron aplicadas al balanceado para aves etapa inicial y fueron almacenadas por 90 días en temperatura ambiente.

El efecto antimicrobiano de los diferentes tratamientos se determinó utilizando placas Petrifilm para cada tipo de microorganismo: hongos, levaduras, enterobacterias y *Salmonella*. Se tomaron los datos de unidades formadoras de colonias (UFC) en el día 0, día 30, día 60 y día 90. También se tomaron datos de pH y peróxidos.

Estos tratamientos inhibieron por completo a las bacterias de *Salmonella*, la cantidad de unidades formadoras de colonias de los otros microorganismos que se registraron fueron inferiores a las que da la norma NTE INEN 1829:2014.

Los tratamientos aplicados previnieron la formación de peróxidos en los balanceados para aves etapa inicial. Los niveles de pH se mantuvieron en el rango establecido por la norma NTE INEN 1829:2014.

Como resultado final se tiene que las formulaciones de ácido ascórbico con aceite esencial de jengibre y jengibre en polvo, pueden sustituir a los aditivos sintéticos. Se pudo mantener la vida útil del balanceado de aves etapa inicial, desde el punto de vista microbiológico, por 90 días.

ABSTRACT

The purpose of this research is to evaluate the antimicrobial effect of the ascorbic acid formulations with ginger essential oil and powdered ginger (*Zingiber officinale*), of poultry feed in initial stage.

Five treatments were prepared with ascorbic acid, ginger essential oil and ginger powder at different concentrations. Treatment 1 had a synthetic additive, with treatment 2 and 3, powdered ginger was added and treatments 4 and 5 were added with essential ginger oil, which were applied to poultry feed in initial stage and were stored for 90 days to surrounding temperature.

Antimicrobial effect of the different treatments was determined using petrifilm plates for each type of microorganism: fungi, yeasts, enterobacteria and *Salmonella*. Data were collected from colony-forming unit (CFU) on day 0, day 30, day 60 and day 90. pH and peroxide data were also taken.

These treatments completely inhibited *Salmonella* bacteria. The number of colony-forming units of the other microorganisms that were registered were lower than those given by the NTE INEN 1829: 2014.

The applied treatments prevented the formation of peroxides in the poultry feed in initial stage. The pH levels were maintained within the range established by the NTE INEN 1829: 2014 standard.

As a final result we have that the ascorbic acid formulations with ginger essential oil and ginger powder, can substitute for the synthetic additives. It was possible to maintain the shelf life of poultry feed in initial stage from the microbiological point for 90 days.

Keywords: antimicrobial effect, ascorbic acid, ginger essential oil, powdered ginger, poultry feed in initial stage, *Salmonella*, peroxides.

INDICE

1. Capitulo I: Introducción	1
1.1 Alcance	2
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos Específicos	4
2. Capitulo II: Marco Teórico.....	5
2.1 Producción del sector avícola en el Ecuador.....	5
2.2 Alimento balanceado para aves.....	5
2.2.1 Normativa Técnica de Alimento Balanceado para aves	6
2.3 Conservantes Químicos y Naturales	7
2.3.1 Preservantes	7
2.3.2 Antioxidantes.....	8
2.3.2.1 Ácido Ascórbico.....	9
2.4 Aceites Esenciales	9
2.4.1 Aceite Esencial de Jengibre (AEJ) (<i>Zingiber officinale</i>).....	10
3. Capitulo III: Materiales y Metodología	12
3.1 Obtención de Aceite Esencial de Jengibre, (AEJ)	13
3.2 Obtención de Jengibre Polvo, (JP).....	14
3.3 Formulación del balanceado para aves	15
3.4 Balanceado de aves ficha técnica	16
3.5 Análisis microbiológicos de hongos, levaduras, enterobacterias y <i>Salmonellas</i> , por el método petrifilms.....	17
3.6 Procedimiento para siembra de las muestras balanceados. 18	
3.6.1 Identificación de colonias de hongos y levaduras en 3M™ Petrifilm™	21
3.6.2 Identificación de colonias de enterobacterias y <i>Salmonella</i> en 3M™ Petrifilm™	21
3.7 Determinación de aflatoxina, método Microelisa	24
3.7.1 Fundamento	24
3.7.2 Definiciones.....	24
3.7.3 Materiales y Equipos	25
3.7.4 Reactivos.....	25
3.7.5 Procedimiento Neogen.....	26
3.8 Análisis fisicoquímicos.	27
3.8.1 pH.....	27
3.8.2 Análisis de Peróxido.....	28
3.8.2.1 Método	28
3.8.2.2 Técnica.....	28
4. Capitulo IV: Resultados y Discusión.....	29
4.1 Análisis microbiológico de hongos	38
4.1.1 Análisis de varianza de hongos.....	39

4.1.1.1 Análisis del Día 90.....	39
4.1.2 Comprobación de la Hipótesis.....	41
4.2 Análisis microbiológico de levaduras	42
4.2.1 Análisis de varianza de Levaduras.....	43
4.2.1.1 Análisis del Día 90.....	43
4.2.2 Comprobación de la Hipótesis.....	45
4.3 Análisis microbiológicos de enterobacterias	46
4.3.1 Análisis de varianza de enterobacterias.....	47
4.3.1.1 Análisis del Día 90.....	47
4.3.2 Comprobación de la Hipótesis.....	49
4.4 Análisis pH	49
4.4.1 Análisis de varianza de pH.....	51
4.4.1.1 Análisis del Día 90.....	51
4.5 Análisis de peróxidos.....	52
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
5.1. Conclusiones.....	53
5.2. Recomendaciones.....	54
REFERENCIAS	55
ANEXOS	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Requisitos microbiológicos para balanceados.....	6
Tabla 2	Contaminantes en el balanceado	6
Tabla 3	Antimicrobianos sintéticos de acción directa	7
Tabla 4	Aceites esenciales de plantas y raíces.....	10
Tabla 5	Composición química del jengibre.....	11
Tabla 6	Tratamientos experimentales	12
Tabla 7	Formulación de balanceado	15
Tabla 8	Tipo de balanceados por etapa del ave.....	15
Tabla 9	Procedimiento Neogen para Aflatoxinas	26
Tabla 10	Unidades formadoras de colonia hongos expresados ufc	29
Tabla 11	Resultados de aflatoxina	30
Tabla 12	Resultados de ufc de levaduras	32
Tabla 13	Unidades formadoras de colonias de enterobacterias.....	33
Tabla 14	Unidades formadoras de colonias de Salmonella	34
Tabla 15	Resultados de análisis pH de las muestras de balanceados.....	35
Tabla 16	Intervalos de pH para el crecimiento de algunos microorganismos	36
Tabla 17	Resultado de análisis de índice de peróxido de las muestras de balanceados almacenado durante 90 días	37
Tabla 18	Resultados promedios del análisis hongos en el día 90.....	40
Tabla 19	Resultados promedios del análisis levaduras en el día 90	44
Tabla 20	Resultados promedios del análisis enterobacterias en el día 90.....	47
Tabla 21	Resultados promedios del análisis pH en el día 90.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de proteína animal en Ecuador	1
Figura 2. Ácido Ascórbico	9
Figura 3. Preparación de las muestras de balanceado etapa inicial	12
Figura 4. Diagrama de flujo proceso de obtención de aceite esencial de jengibre.....	13
Figura 5. Obtención de aceite esencial de jengibre a través del método de hidrodestilación.....	14
Figura 6 Jengibre en rodajas, secado estufa 100°C.....	14
Figura 7. Jengibre en polvo, humedad 12 %.....	14
Figura 8. Elaboración de balanceado para aves etapa inicial	16
Figura 9. Diagrama determinación de método 3M™ Petrifilm™	17
Figura 10. Balanceado para aves etapa inicial, almacenada por 90 días	18
Figura 11. Cámara de flujo laminar Thermo Scientific 1300.....	19
Figura 12. Agitación de los tubos de ensayo con muestras de balanceados ...	19
Figura 13. Inoculación de la muestra de dilución en la placa de petrifilm.....	20
Figura 14. Incubación muestras de placa petrifilms hongos y levaduras	20
Figura 15. Incubación muestras de placas petrifilms enterobacterias y Salmonella.....	20
Figura 16. Placa hongos	21
Figura 17. Placa levaduras.....	21
Figura 18. Placas colonias asociadas a burbujas de gas enterobacterias	22
Figura 19. Placas colonias rojas con zonas ácidas enterobacterias	22
Figura 20. Colonia azul, oscuro/negra con precipitado azul.....	22
Figura 21. Colonia azul oscuro/negra con centro rojo oscuro y precipitado azul.....	22
Figura 22. Colonia roja con zona amarilla y asociada a burbuja de gas.	23
Figura 23. Colonia roja con zona amarilla	23
Figura 24. Colonia roja y asociada a burbuja de gas, sin zona amarilla.....	23
Figura 25. Determinación de aflatoxina.....	26
Figura 26. Determinación pH de las muestras de balanceados	27
Figura 27. Determinación pH de las muestras de balanceados	28
Figura 28. Determinación aflatoxina en balanceado de aves etapa inicial	31
Figura 29. Tendencia de crecimiento hongos.....	38
Figura 30. Crecimiento logarítmico de las ufc hongos.....	39
Figura 31. Prueba de significancia de tukey hongos día 90	40
Figura 32. Tendencia crecimiento levaduras.....	42
Figura 33. Crecimiento logarítmico de las ufc levaduras	43
Figura 34. Prueba de significancia de tukey levaduras día 90	44
Figura 35. Tendencia crecimiento enterobacterias.....	46
Figura 36. Crecimiento logarítmico de las ufc enterobacterias.....	47
Figura 37. Prueba de significancia de tukey enterobacterias día 90	48
Figura 38. pH de las muestras de balanceados	50
Figura 39. pH muestras de balanceados almacenados 90 días.....	50
Figura 40. Prueba de significancia de tukey pH día 90	52

1. Capítulo I: Introducción

En el Ecuador el consumo de carne de pollo por parte de la población es alto. Los avicultores se enmarcan en la crianza convencional o tradicional, mediante la utilización formulada de dietas balanceadas con la inclusión de antifúngicos, antioxidantes, acidificantes y promotores de crecimiento para garantizar la mejor conversión del pollo y a la vez cuidando su salud, estos productos poseen un alto precio, lo que afecta a la rentabilidad de pequeños y medianos productores en los costos de producción, sin considerar los residuos tóxicos que pueden generar en producto procesado, por la utilización de los aditivos químicos sintéticos. (Bhandari, 2012).

En la figura 1, se observa la preferencia del consumo de carne pollo, seguido por carne de cerdo y luego la carne de pavo. (Conave, 2006).

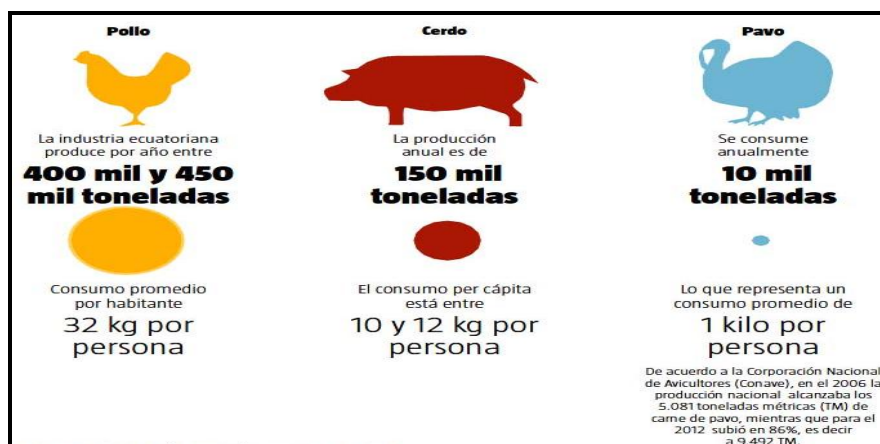


Figura 1. Producción de proteína animal en Ecuador

En los últimos años la producción de pollo en carne a nivel mundial se orienta a excluir todos los aditivos químicos. El incorporar fuentes de principios activos de forma natural principalmente en los extractos vegetales y ácido orgánicos, esto conlleva a una producción avícola más sana. Los extractos naturales son efectivos al igual que los químicos, ayudan a bajar la mortalidad, mejoran la asimilación y aprovechamiento de los nutrientes mostrando excelentes

resultados por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitarias; (Ávila V. 2013).

Para la conservación de los alimentos en la actualidad se aplican ácidos orgánicos como agentes antioxidantes, los cuales controlan los niveles pH y procesos oxidativos. Estos ácidos actúan como preservantes debido a su actividad bactericida. (Plumridge, 2004).

Dentro de la gama de ácidos orgánicos se tiene el ácido ascórbico, es uno de los compuestos naturales con mayor actividad antioxidante, elimina los radicales libres y reduce el proceso oxidativo en las células. (Temple, 2000).

Existen conservantes naturales en los cuales se encuentra los aceites esenciales, donde existen evidencias científicas a través de pruebas de sensibilidad, el aceite esencial de jengibre tiene efecto contra el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas como *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* y *Streptococcus viridans*, *Bacillus cereus*, *S. aureus* y *Streptococcus faecalis* (enterococos). (F. Salgado, 2011)

1.1 Alcance

La presente investigación se realizó en los laboratorios de la Universidad de las Américas. Con el fin de evaluar el efecto antimicrobiano de las formulaciones del ácido ascórbico con aceite esencial de jengibre y jengibre en polvo (*Zingiber officinale*), en balanceado para aves etapa inicial, se realizó a través de análisis microbiológicos de hongos, levaduras, enterobacterias y *Salmonellas*, así como la evaluación físico química de pH y peróxidos en las muestras.

El proceso de extracción del aceite esencial jengibre se realizó por medio de destilación por arrastre de vapor, las soluciones antimicrobianas se prepararon en rangos de 2000 ppm hasta 3000 ppm, realizando diferentes combinaciones entre ácido ascórbico (5000 ppm), con aceite esencial de jengibre y jengibre en polvo (*Zingiber officinale*). A estas soluciones se midió la capacidad antimicrobiana del conservante natural a través del crecimiento de microorganismos en el alimento balanceado expresado en ufc, pH, cantidad de peróxidos, en comparación con la acción de un conservante sintético como testigo en el mismo alimento procesado.

1.2 Justificación

Los aceites esenciales en la actualidad se utilizan como aditivos en la elaboración de balanceados debido a su función como antibacterianos, antioxidantes, antifúngicos, analgésicos además de ser enunciados como promotores significativos del crecimiento (Tipu, Akhta, Anjum, & Raja, 2006).

La 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 avícola y el consumidor, buscan alimentos con bajo contenido de aditivos sintéticos y libres de microorganismos (EUFIC, 2006). En la actualidad la tendencia de la alimentación del consumidor, está enfocada en alimentos elaborados con conservantes naturales que eviten la contaminación con microorganismos patógenos; de esta manera, el consumidor disminuye el nivel de consumo de productos con conservantes sintéticos.

Los aceites esenciales contienen compuestos fenólicos o componentes activos, pero con la adición de ácido ascórbico se produciría una sinergia entre los componentes con el fin de facilitar un efecto conservante de mayor alcance. (Cardona y Mejía, 2009).

En esta investigación, se evaluó el efecto antimicrobiano de las formulaciones del ácido ascórbico (AA) con aceite esencial de jengibre (AEJ) y Jengibre en polvo (JP) (*Zingiber officinale*), en balanceado para aves etapa inicial. En esta investigación se evaluó las variables de estudios cantidad de microbiológicos expresado en ufc, durante 90 días.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antimicrobiano de las formulaciones del ácido ascórbico con aceite esencial de jengibre y jengibre en polvo (*Zingiber officinale*), en balanceado para aves etapa inicial.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.3.2.1 Elaborar el balanceado y aplicar las formulaciones de inhibidores evaluados.

1.3.2.2 Realizar un análisis microbiológico (hongos, levaduras, enterobacterias y *Salmonellas*) en el balanceado para aves etapa inicial, en el que se aplicó las diferentes formulaciones de ácido ascórbico (AA) con aceite esencial de jengibre (AEJ) y jengibre en polvo (JP) (*Zingiber officinale*).

1.3.2.3 Determinar el pH en el balanceado para aves etapa inicial, después de aplicar las diferentes formulaciones de ácido ascórbico (AA) con aceite esencial de jengibre (AEJ) y Jengibre en polvo (JP) (*Zingiber officinale*).

1.3.2.4 Determinar la cantidad de peróxidos en el balanceado para aves etapa inicial, que contienen las formulaciones de ácido ascórbico (AA) con aceite esencial de jengibre (AEJ) y Jengibre en polvo (JP) (*Zingiber officinale*).

2. Capítulo II: Marco Teórico

2.1 Producción del sector avícola en el Ecuador

En los años 1970, el sector avícola se evidencia un incremento en la crianza, producción de huevos y finalmente en el procesamiento de aves en plantas industriales.

Este sector es un pilar fundamental de la economía en el país, fortaleciendo el comercio y desencadenando un sin número de plazas en las diversas etapas hasta llegar a los mercados que ofertan todos los productos y sub productos de dicha especie. Alcanzando una producción de huevos de 64 333 y 12 332 581 aves criadas en el campo y 66 763 566 aves criadas en planteles avícola (Inen-Censo, 2015).

2.2 Alimento balanceado para aves

Los balanceados son dietas equilibradas de nutrientes que el animal necesita para su crecimiento. La nutrición animal considera importante en la formulación de estas dietas, comprender las funciones que tienen los ingredientes que suplan las necesidades biológicas que el pollo necesita en la etapa de inicial y engorde. (FAO, 2014)

En proceso productivo existen riesgos de contaminación biológica y química, las cuales son controladas en el proceso de elaboración de balanceado, para evitar afectaciones de rendimiento de conversión del ave, y no repercuta en los seres humanos.

Las materias primas utilizadas para formular las dietas de balanceados, pueden contener los contaminantes perjudiciales como las micotoxinas producidas por los hongos, que podrían provocar la muerte al animal y la contaminación microbiológica por *Salmonella*. (FAO, 2014)

2.2.1 Normativa Técnica de Alimento Balanceado para aves

El alimento para ser suministrado en el programa de alimentación de las aves de producción zootécnica (de engorde, reproductoras y ponedoras), deben cumplir con los requisitos establecidos en la norma INEN 1829:2014 en cuanto a los requisitos microbiológicos, como se mencionan en la Tabla 1.

Tabla 1

Requisitos microbiológicos para balanceados

Microorganismo	Caso	n	C	m	M	Método de ensayo
Enterobacteriaceae ufc/g	2 ¹	5	2	10 ²	10 ³	ISO 21528-1
<i>Salmonella</i> *	10 ²	5	0	Ausencia /25g	-	ISO 6579 NTE INEN 1529-15

*Evaluar *Salmonella* cuando el resultado de Enterobacteriaceae un riesgo para la inocuidad.

Tomado de (INEN, 2014)

En los balanceados el contaminante que se presenta es la aflatoxina B1, el cual debe ser monitoreado y debe cumplir con los requisitos indicados en la tabla 2.

Tabla 2

Contaminantes en el balanceado

Contaminante	Requisito	Método de Ensayo
Aflatoxina B1	20 µg/kg (ppb)	ISO 17375 AOAC 990.32*

Tomado de (INEN, 2014)

2.3 Conservantes Químicos y Naturales

2.3.1 Preservantes

Preservantes sintéticos son los compuestos químicos que se añaden a los alimentos en forma voluntaria bajo las dosis permitidas citadas en normas, para prolongar la vida útil de los alimentos, su mecanismo de acción altera las funciones biológicas producidas por microorganismo. (Gavilán, 2012).

Entre los ácidos orgánicos existen los lipófilos que cuenta con actividad antimicrobiana atribuida a las moléculas no disociadas, estos compuestos inhiben el crecimiento de los microorganismos, por interferir con la permeabilidad de la membrana celular al producir un desacoplamiento en el transporte de sustratos, en este grupo se encuentra el ácido sórbico y los ésteres del ácido parahidroxibenzoico, los boratos, sorbatos, benzoatos, p-hidrtoxi- benzoatos entre otros. Los sulfatos, nitritos, nitratos y propianatos son preservantes inorgánicos. (Gavilán, 2012).

El pH de los ácidos orgánicos está entre 3 a 5, lo que aumenta la efectividad de inhibición microbiana. Los principales grupos microbianos sobre los cuales muestran ser efectivos se presenta en la siguiente tabla 03.

Tabla 3

Antimicrobianos sintéticos de acción directa

Antimicrobiano	Microorganismos sobre los que actúa
Ácido propiónico y propionatos	Mohos
Ácido sórbico, sorbatos y ascórbicos	Mohos
Ácido benzoico y benzoatos	Mohos y Levaduras
Parabenos	Mohos y Levaduras
SO ₂ y sulfitos	Bacterias, mohos y levaduras
Óxido de etileno y de propileno	Mohos y Levaduras
Diacetato de sodio	Mohos
Nisina	Bacterias ácido lácticas, Clostridia
Ácido dehidroacético	Insectos
Nitrito de sodio	Clostridia
Etil-formato	Mohos y Levaduras

Tomado de (Jay, 1991).

Estos aditivos actúan como 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 la rancidez por la oxidación de grasas insaturadas, decoloración de pigmentos y otros componentes (Vieira, 2003).

2.3.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que retrasan el proceso oxidativo de grasas insaturadas en presencia de oxígeno y radicales libres. (Vieira, 2003)

Entre los antioxidantes naturales se encuentran los ascorbatos y tocoferoles; y entre los antioxidantes sintéticos se encuentran el butil hidroxil tolueno BHT, galatos y bioantioxidantes. (Gavilán, 2012).

En la actualidad los alimentos que mayor aceptación tienen por el consumidor son los alimentos naturales e inocuos, por ello, la tendencia a aprovechar preservantes naturales, procedentes de extractos de plantas, raíces, y derivados naturales químicamente modificados. (Rauha, 2000).

A pesar que existen métodos físicos de conservación: calentamiento, deshidratación, irradiación y congelación o métodos de reacción química de origen animal como enzima lipasas, proteasas, lisozimas e hidrolasas. El consumidor prefiere los métodos a base de compuestos naturales. (Davidson y Zivanovic, 2003).

2.3.2.1 Ácido Ascórbico

El ácido ascórbico es un antioxidante natural más eficaz y menos tóxico, se caracteriza por secuestrar radicales libres, súper óxido e hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y el oxígeno singulete (Halliwell, Chirico, 1993). Figura 2.

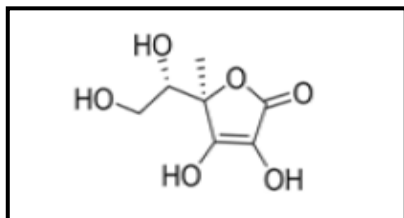


Figura 2. Ácido Ascórbico

En la industria el ácido ascórbico se utiliza como antioxidante, en frutas y hortalizas, en bebidas, zumos, vinos, productos de repostería y cárnicos, porque evita procesos de pardeamiento y reduce la carga microbiana. (Shafiur, 2007).

Además, es muy importante considerar la propiedad sinergista del ácido ascórbico, que hace que aumente su poder antioxidante al unirse con otras sustancias como los tocoferoles. Los compuestos como los α -tocoferoles aumentan el poder antioxidante en los lípidos y proteínas de las membranas celulares, este proceso se denomina co-antioxidante producido por la vía del secuestro de radicales soluble en lípidos, evitando daños oxidativos en los alimentos. (Gutiérrez, 2000).

2.4 Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son producto de metabolitos secundarios, especialmente los compuesto fenólicos tiene propiedades antimicrobianas, antiparásitos, insecticida, antiviral, antifúngica, antioxidante y fungicida. (Bruneton, 2001).

En la tabla 4, se observa diferentes plantas y raíces de los que se pueden extraer aceites esenciales.

Tabla 4

Aceites esenciales de plantas y raíces

Ajo	Anís	Cardamono	Hinojo	Nuez Moscada
Ajonjolí	Apio	Cebolla	Jengibre	Orégano
Albahaca	Azafrán	Cilantro	Manzanilla	Perejil
Alcaparra	Caléndula	Clavo	Mejorana	Pimienta
Alfalfa	Canela	Glicirrizo	Mostaza	Vainilla

Tomado de (Bruneton, 2001)

De toda la gama de aceites esenciales según investigaciones el orégano se utiliza por su alto contenido de carvacol y terpinenol, estos componentes químicos son reguladores de pH, el jengibre contiene alto contenido de terpenos responsables de la inhibición de hongos, levaduras y bacterias. (Plaus, Flores y Ataucusi, 2001).

2.4.1 Aceite Esencial de Jengibre (AEJ) (*Zingiber officinale*)

“El jengibre es una planta de la familia de las *Zingiberáceas*, cuya raíz está formada por rizomas horizontales muy apreciados por su aroma y sabor picante. La planta llega a 90 cm. de altura, con largas hojas de 20 cm.” (Vásquez O, Alva A, Marreros J, 2001).

Taxonomía del Jengibre (*Zingiber officinale*)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Zingiberales

Familia: Zingiberaceae

Género: ***Zingiber***

Especies: ***Zingiber officinale***

Entre los principales componentes del jengibre, se encuentran los que se detallan en la tabla 5.

Tabla 5

Composición química del jengibre

COMPUESTO	PORCENTAJE
Oleoresina	4-7,5%
Neral	9.7- 10 %
Geranial	11,6-14%
Zingibereno	7.7- 8.4%
Cafeno	5,4-6%
Arcurcumeno	2,8-3,3%
Alfa farneseno	3,2-3,6%
Sesquifelantreno	2,5- 2,8%
Linanol	3.3-3-6%

Tomado de (Sellar, 1992).

Los componentes α gingerol y zingerona bloquean la unión entre la enterotoxina termolábil de la *Escherichia coli* al receptor de la superficie del medio de zingerona (vanillil acetona) (Chen et al., 2007). El jengibre tienen un amplio rango de efecto antimicrobiano relacionado con las especies: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium*, *Mavium*, *M tuberculosis* (Kikuzaki, 2000).

Además, el gingerol, shogaol y zingerona tienen actividad antimicrobiana contra la *Salmonella typhi*, *Tricophyton violaceum*, *Vibrio cholerae* y *Trichomonads vaginalis*. Los gingeroles y shogaoles actúan en contra de la *E. coli*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Salmonella*, y estimulan el crecimiento del *Lactobacillus*, saludable en la microflora del estómago (Kuss, 2005; Pakrashi, 2003).

La presente investigación está enfocada en el efecto antimicrobiano de las formulaciones del ácido ascórbico (AA) con aceite esencial de jengibre (AEJ) y Jengibre en polvo (JP) (*Zingiber officinale*) para aves etapa inicial.

3. Capítulo III: Materiales y Metodología

Se tomó 4 muestras de 200 g de balanceados de aves etapa inicial, en la muestra uno se trabajó con los antioxidantes químicos 0.10%, en las muestras 3, 4 y 5 se incrementó Aceite Esencial de Jengibre (AEJ), Jengibre Polvo (JP) y Ácido Ascórbico (AA), de acuerdo a los siguientes tratamientos tabla 6:

Tabla 6

Tratamientos experimentales

Tratamientos	AEJ	JP	AA	Aditivo Sintético
T1	-	-	-	0.10%
T2	-	2000 ppm	5000 ppm	
T3	-	3000 ppm	5000 ppm	
T4	2000 ppm	-	5000 ppm	
T5	3000 ppm	-	5000 ppm	

Las muestras fueron mezcladas e identificadas según lo indicado anteriormente, para llevar la trazabilidad de la investigación. (Figura 3).



Figura 3. Preparación de las muestras de balanceado etapa inicial

El diseño experimental que se utilizó en este estudio es un diseño de bloques completamente al azar (ANOVA), para evaluar el efecto antimicrobiano se tomaron datos de los cuatro tratamientos y del testigo cada 30 días, con tres repeticiones en los balanceados para ave etapa inicial, se analizó la carga de

microorganismos presente en balanceados, a través de análisis microbiológicos de: hongos, levaduras, enterobacterias y *Salmonellas*. Se aplicó pruebas de Tukey (ANOVA), con un nivel de confianza 95%, para verificar si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

3.1 Obtención de Aceite Esencial de Jengibre, (AEJ)

El aceite esencial fue extraído a través del método de hidrodestilación o destilación por arrastre, esta obtención se realizó a partir del Jengibre (*Zingiber officinale*). El método de hidrodestilación se realizó mediante el siguiente diagrama de bloques (Figura 4):



Figura 4. Diagrama de flujo proceso de obtención de aceite esencial de jengibre

La hidrodestilación genera vapor efluente saturado a presión atmosférica donde 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, esta etapa del proceso permitió que el aceite esencial se depositará en el hidroddestilador separando así las fases. Figura 5.

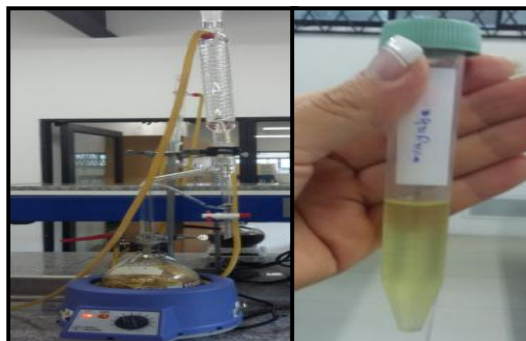


Figura 5. Obtención de aceite esencial de jengibre a través del método de hidroddestilación.

3.2 Obtención de Jengibre Polvo, (JP)

Se procesó el jengibre en rodajas, se sometió a un secado en estufa a 100°C por tres horas, y luego se trituró y tamizó, para lograr obtener el polvo de este producto. (Figuras 6, 7).



Figura 6 Jengibre en rodajas, secado estufa 100°C



Figura 7. Jengibre en polvo, humedad 12 %

3.3 Formulación del balanceado para aves

A continuación, se detallan los ingredientes de la formulación de balanceados donde se aplicó los tratamientos de la presente investigación. Tabla 7.

Tabla 7

Formulación de balanceado

Ingredientes	Porcentaje
Maíz Nacional	52.99%
Pasta de Soya	34.63%
Harina de Origen Animal	4.00%
Aceite Palma	4.50%
Antioxidante	0.02%
Antimicótico	0.08%
Micronutrientes	3.79%

Existen en el mercado diferentes presentaciones de balanceados de acuerdo a la semana o etapa de crecimiento del animal. Lo cual se detalla a continuación tabla 8:

Tabla 8

Tipo de balanceados por etapa del ave

Tipo de Alimento	Días de Consumo	Presentación balanceado
Engorde Etapa Inicial	1-21	Migajeado
Engorde Etapa Desarrollo	22-36	Peletizado

El tipo de alimento que se evaluó en la presente investigación fue el engorde etapa inicial, cuyo proceso de elaboración se describe a continuación en el diagrama de bloques. (Figura 8).

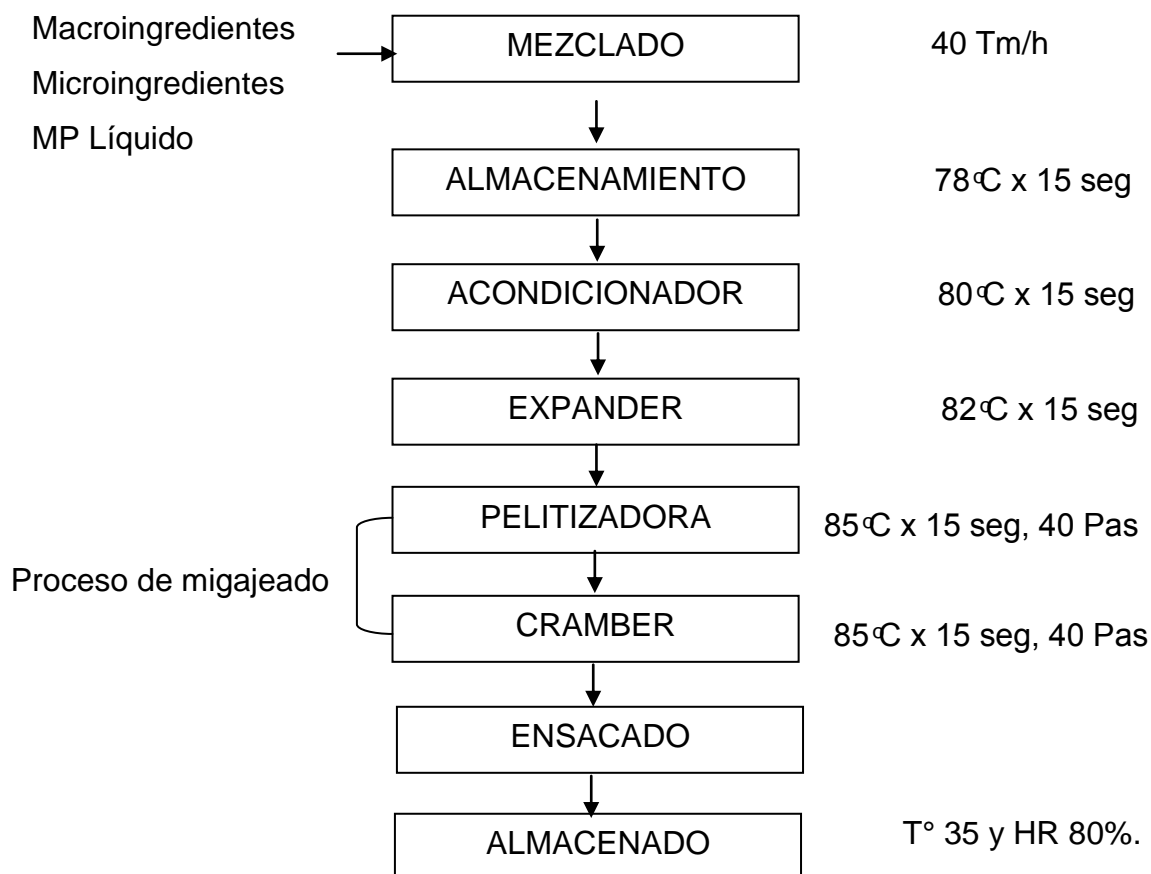


Figura 8. Elaboración de balanceado para aves etapa inicial

3.4 Balanceado de aves ficha técnica

La NORMA técnica en que se basó esta investigación es la NTE INEN 1829:2014 (Anexo A-3), con la cual se evaluó los tratamientos propuestos, realizando los siguientes análisis.

3.5 Análisis microbiológicos de hongos, levaduras, enterobacterias y *Salmonellas*, por el método petrifilms

Los microorganismos a evaluar son: hongos, levaduras, enterobacterias y *Salmonella*; establecidos de acuerdo a los requerimientos de la NTE INEN 1829:2014. Para determinar la presencia de estos microorganismos en cada muestra se utilizó placas Petrifilm, aplicando el procedimiento en el siguiente diagrama de bloques (figura 9).

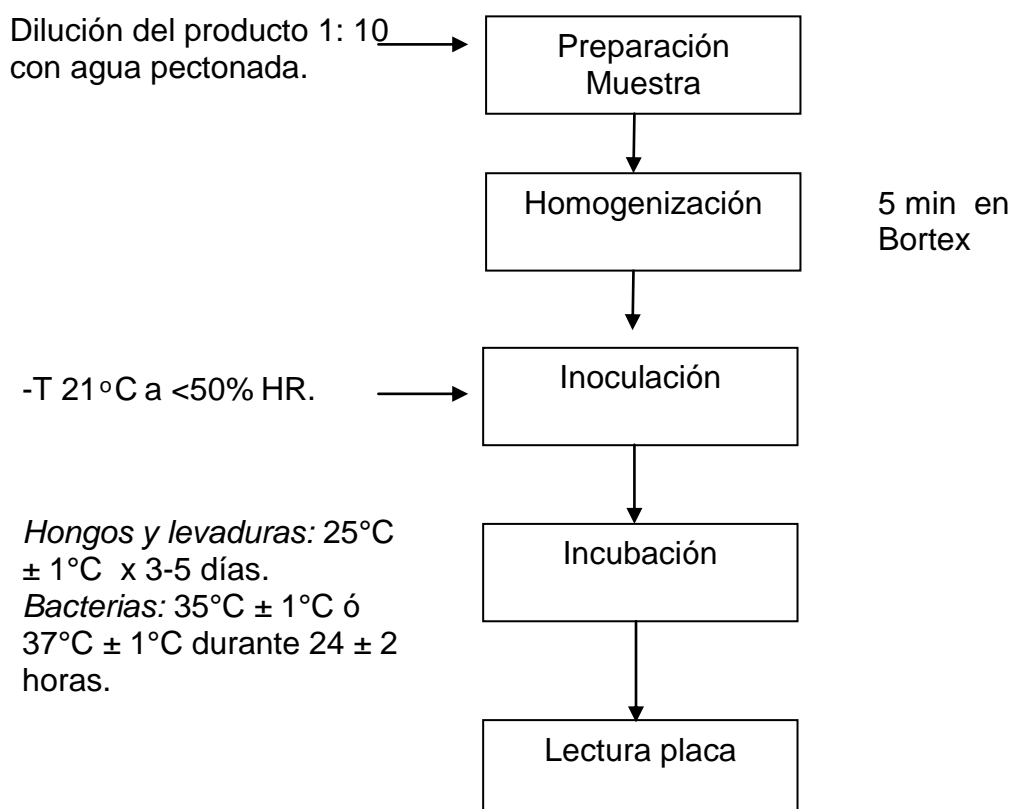


Figura 9. Diagrama determinación de método 3M™ Petrifilm™

Materiales de Laboratorio

- Petrifilms hongos, levaduras, enterobacterias y *Salmonella*
- Tubos de ensayo

- Micropipeta ecopipette capp de 10-100 μ l
- Puntas de micropipeta
- Lámpara de alcohol
- Gradillas

Equipos de Laboratorio

- Balanza shimadzo Tx 3202L
- Agitador BOECO PSU-10i
- Cámara de Flujo laminar thermo scientific 1300
- Incubadora Incucell
- Contador de Colonias BOECO Germany CC-1

3.6 Procedimiento para siembra de las muestras balanceados

De cada muestra de balanceados, se pesaron 1g en 9 ml de agua pectonada. (Figura 10).



Figura 10. Balanceado para aves etapa inicial, almacenada por 90 días

El procedimiento para la siembra de muestras se realizó en la cámara de flujo laminar Thermo Scientific 1300, donde utilizó placas de petrifilms (Figura 11).



Figura 11. Cámara de flujo laminar Thermo Scientific 1300

Los procesos que se realizaron fueron los siguientes:

Dilución: se tomó 1 g de la muestra del balanceado y posteriormente se colocó en un tubo de ensayo con tapa, que contenía 9 ml de agua de peptona.

Agitación: se colocaron los tubos con las muestras en un agitador eléctrico Boeco, durante 10 minutos (Figura 12).



Figura 12. Agitación de los tubos de ensayo con muestras de balanceados

Inoculación: Colocar la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film, con una pipeta perpendicular a la placa Petrifilm colocar 1 ml de muestra en el centro del film inferior (Figura 13).

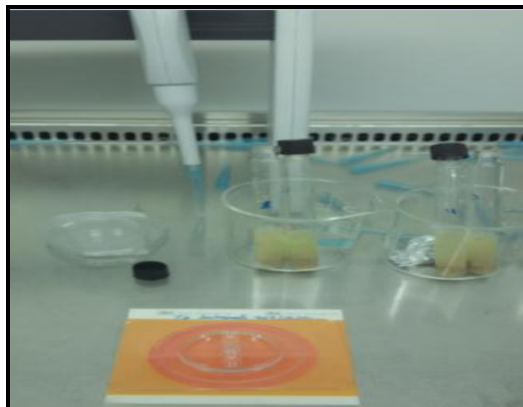


Figura 133. Inoculación de la muestra de dilución en la placa de petrifilm

Incubación: Incubar las placas petrifilms a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 2 horas, para hongos y levaduras (Figura 14), y para bacterias como enterobacterias y *Salmonella* incubar las placas petrifilms a temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ó $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. (Figura 15).



Figura 14. Incubación muestras de placa petrifilms hongos y levaduras

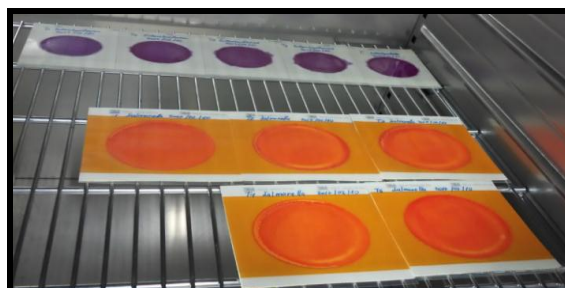


Figura 15. Incubación muestras de placas petrifilms enterobacterias y *Salmonella*

3.6.1 Identificación de colonias de hongos y levaduras en 3M™ Petrifilm™

Mohos son grandes colonias de color variable (los hongos pueden producir su propio pigmento), con bordes difusos un foco en el centro y forma planas. (Figura 16).

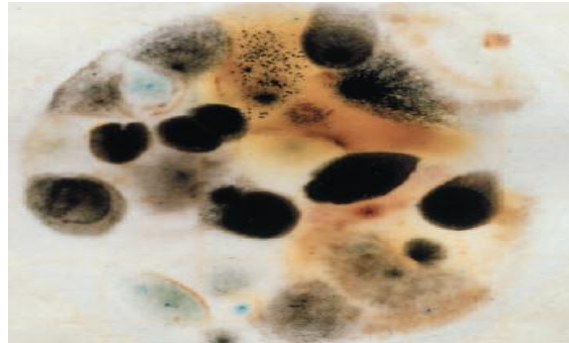


Figura 16. Placa hongos

Levaduras son colonias pequeñas, de color azul-verdoso, con bordes definidos y sin foco. (Figura 17).

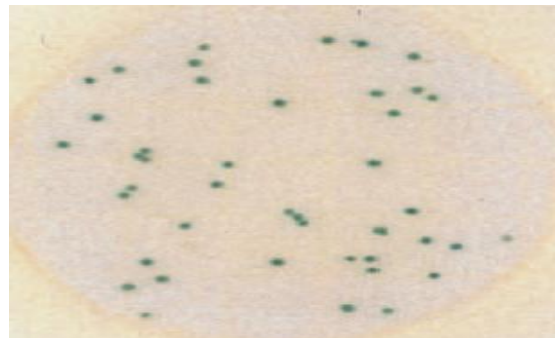


Figura 17. Placa levaduras

3.6.2 Identificación de colonias de enterobacterias y *Salmonella* en 3M™ Petrifilm™

Enterobacterias presentan un indicador rojo en la placa coloreada de todas las colonias, y el film superior atrapa el gas si es producido por las bacterias. Las bacterias productoras de ácido aparecen como colonias rojas rodeadas por una zona amarilla asociada a la producción de ácido que es detectado por el indicador de pH del medio. Los productores de ácido y gas se consideran presuntamente enterobacterias. (Figura 18, 19).

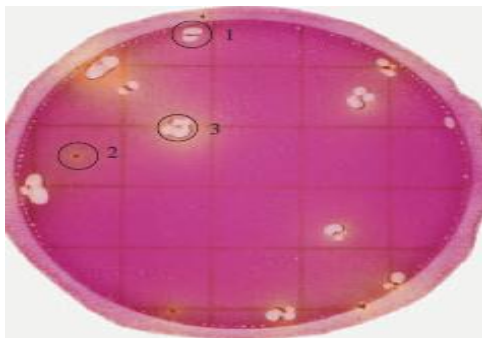


Figura 18. Placas colonias asociadas a burbujas de gas enterobacterias

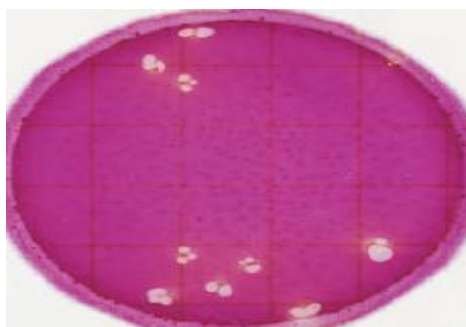


Figura 19. Placas colonias rojas con zonas ácidas enterobacterias

En las (Figuras 20, 21) se presenta colonias de *Salmonella* confirmadas

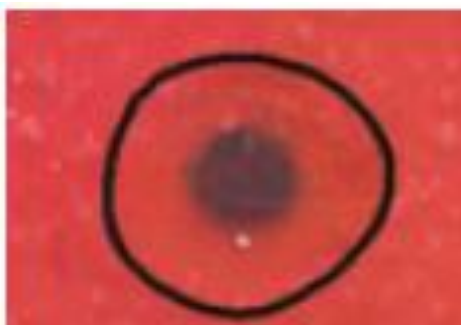


Figura 20. Colonia azul, oscuro/negra con precipitado azul.

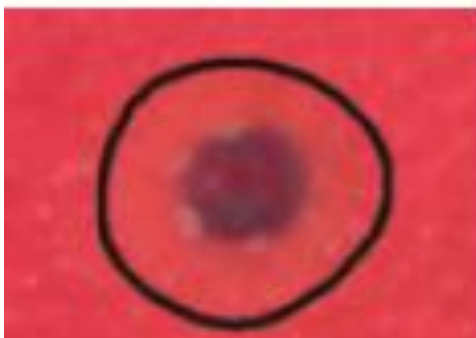


Figura 21. Colonia azul oscuro/negra con centro rojo oscuro y precipitado azul

También pueden presentarse colonias presuntivas positivas en la placa, las cuales se demuestran en las siguientes figuras (22, 23, 24).

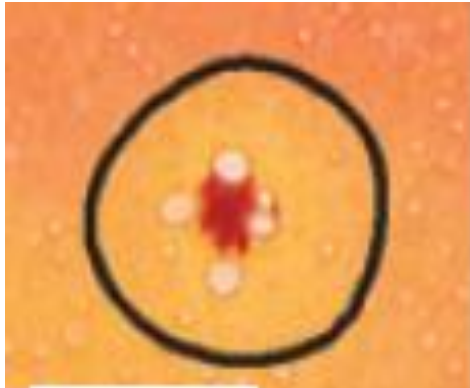


Figura 22. Colonia roja con zona amarilla y asociada a burbuja de gas.

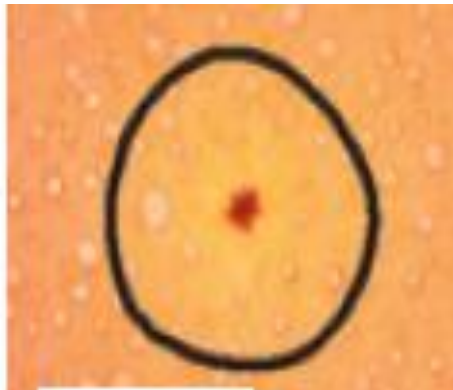


Figura 23. Colonia roja con zona amarilla



Figura 24. Colonia roja y asociada a burbuja de gas, sin zona amarilla

3.7 Determinación de aflatoxina, método Microelisa

3.7.1 Fundamento

El ensayo de ELISA, método inmunológico de competencia directa.

La micotoxinas (Aflatoxina) de la muestra se mezcló con una solución de metanol-agua. La toxina extraída es mezclada con el conjugado (toxina - enzima), ésta mezcla es transferida a celdas recubiertas con anticuerpos específicos para cada micotoxina, donde la toxina libre y la presente en el conjugado compiten por la unión en los sitios activos del anticuerpo. El conjugado libre y otras sustancias son eliminados de la celda mediante lavado. Se añade la enzima sustrato, que es catalizada por la enzima del conjugado ligado, el color desarrollado es el resultado de la presencia del conjugado ligado al anticuerpo.

La solución de enzima coloreada es finalmente añadida, para intensificar el color producido. El color azul oscuro indica ausencia de la Micotoxinas libres proveniente de la muestra, el color azul menos intenso indica presencia de la micotoxina libre en la muestra. El color desarrollado fue evaluado por medición de la absorbancia de las soluciones a 650 nm. La cuantificación se la realizó por interpolación del valor medido en la muestra en una curva obtenida con las mediciones de los estándares, en un rango de 0 a 20 ppb.

3.7.2 Definiciones

Micotoxina. Son metabolitos secundarios, tóxicos producidos por cepas toxigénicas de varios géneros y especies de hongos.

Aflatoxina. Sustancia tóxica y carcinogénica producida por ciertos tipos de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Hay cuatro tipos principales de

aflatoxinas: B1, B2, G1 y G2. Aflatoxina B1 es la más tóxica y frecuentemente encontrada.

3.7.3 Materiales y Equipos

- ✓ Vasos plásticos estériles con tapa.
- ✓ Dosificador de líquidos
- ✓ Agitador mecánico
- ✓ Cronómetro
- ✓ Papel filtro de porosidad fina
- ✓ Portaceldas
- ✓ Portapuntas o gradilla.
- ✓ Cubetas plásticas para líquidos.
- ✓ Micropipeta multicanal de 100 uL
- ✓ Micropipeta unicanal de 100 uL
- ✓ Micropipeta unicanal de 100 – 1000 uL
- ✓ Molino con criba de 1 mm
- ✓ Balanza analítica con precisión de 0.1g
- ✓ Puntas de Micropipeta de 1 – 200 uL
- ✓ Puntas de Micropipeta de 100 – 1000 uL
- ✓ Espectrofotómetro provisto de un filtro de longitud de onda de 650 nm

3.7.4 Reactivos

Metanol 70 %. Mezclar 700 ml de metanol con 300 ml de agua destilada y permitir que la solución alcance la temperatura ambiente.

Metanol 50%. Mezclar 500 ml de metanol con 500 ml de agua destilada y permitir que la solución alcance la temperatura ambiente.

Kit de micotoxinas Neogen

- a. Conjugado
- b. Sustrato

- c. Red stop
- d. Estándares: para cada micotoxina
- e. Celdas marcadas con una línea roja
- f. Celdas con anticuerpo (no tienen marca)

3.7.5 Procedimiento Neogen

El procedimiento Neogen para *Aflatoxinas* se detalla a continuación en la tabla 9.

Tabla 9

Procedimiento Neogen para Aflatoxinas

Determinación del método	Aflatoxina
Extracción. 5 gramos de muestra con 25 ml de metanol al 70 %	X
Agitación alta velocidad, luego filtración	3 min
Todos los filtrados o diluciones deben ajustarse a un pH entre 6-7	X
En los Pocillos rojos colocar 100 ul de conjugado y sobre estos colocar 100 ul de estándares y muestras filtradas o diluidas.	X
Mezclar 3 Veces.	X
Transferir 100 ul a los pocillos de reacción (claros)	X
Mezclar (10-20) seg.	X
Incubar 2 minutos (T <30°C)	X
Desechar el contenido de los pocitos	X
Lavar 5 veces con agua destilada	X
Secar bien los pocitos sin dejar gotas de agua	X
Adicional 100 ul de sustrato y mezclar bien	X
Incubar 3 minutos (T <30°C)	X
Añadir 100 ul del Red Stop.	X
Lectura con filtro 650 nm	X

Tomado de (AOAC, 2006)



Figura 25. Determinación de aflatoxina

3.8 Análisis fisicoquímicos.

3.8.1 pH

La determinación de pH permite medir la concentración de iones de hidrógeno dentro de una muestra. La medición del pH se basa en el siguiente procedimiento estandarizado:

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

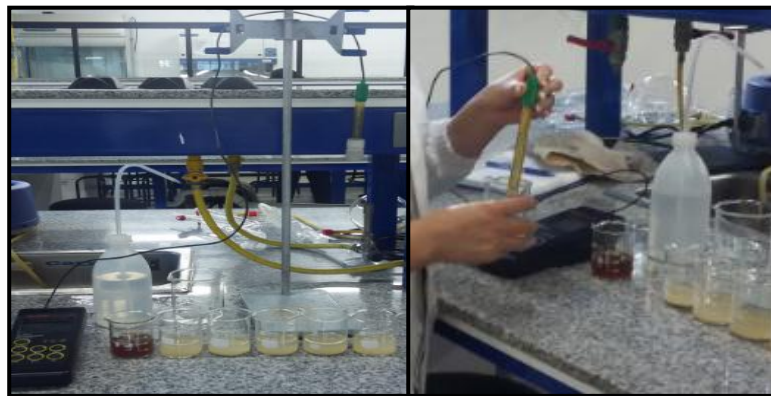


Figura 26. Determinación pH de las muestras de balanceados

3.8.2 Análisis de Peróxido

3.8.2.1 Método

La peroxidasa transfiere el oxígeno del peróxido a un indicador redox orgánico. Se forma un producto de oxidación pardo-amarillento. La concentración de peróxidos se determina semicuantitativamente por comparación visual de la zona de reacción de la tira de ensayo con las zonas de una escala calorimétrica. Cada tira tiene además una segunda zona de reacción (zona de alarma).

3.8.2.2 Técnica

Introducir la tira de ensayo con ambas zonas de reacción durante 1 segundo en la muestra preparada (15 – 25° C). Eliminar el exceso de líquido de la tira sacudiéndola y, después de 30 segundos, clasificar el color de la zona de reacción de la mejor manera posible de acuerdo con zona de color H_2O_2 de la etiqueta.



Figura 27. Determinación pH de las muestras de balanceados

4. Capítulo IV: Resultados y Discusión

Los resultados de los análisis microbiológicos de unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras, enterobacterias y *Salmonellas*, fueron realizados con el método de conteo de ufc en petrifilms.

Los resultados obtenidos durante el presente estudio, se reportan en la tabla 10.

Tabla 10

Unidades formadoras de colonia hongos expresados ufc

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	30	0	130	280
1	2	60	50	60	220
1	3	30	30	140	180
1	4	10	30	80	120
1	5	20	30	30	70
2	1	36	10	120	240
2	2	50	30	45	250
2	3	25	30	120	200
2	4	10	20	60	80
2	5	10	30	30	50
3	1	20	10	100	130
3	2	50	30	40	230
3	3	20	30	80	180
3	4	10	20	60	80
3	5	10	30	30	50

Se puede observar en el día 90 de almacenamiento, los tratamientos 1 y 2 presentan contaminación microbiológica por hongos, evidenciando en el T1 (testigo) tuvo 216 ufc y el T2 (2000 ppm de jengibre en polvo y 5000 ppm ácido

ascórbico) presentó 233 ufc, cuyos valores fueron altos a comparación con los demás tratamientos.

Los valores de aflatoxina que se encontraron están entre 1.95, 1.85, 1.65, 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb), para los tratamientos 1, 2, 3, 4 respectivamente, estos valores no superan el rango establecido en la norma NTE INEN 1829:2014 que es de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb). El T5 (3000 ppm AEJ y 5000 ppm AA), presento nivel bajo de Aflatoxina de 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb), no tuvieron crecimientos significativos en este análisis (Tabla 11).

Tabla 11

Resultados de aflatoxina

Tratamientos	Absorbancia	$\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)
Patrón	2.646	0
Patrón	2.016	5
Patrón	1.313	15
Patrón	0.654	50
1	3.6725	1.95
2	3.673	1.85
3	3.716	1.65
4	3.607	2.5
5	3.809	1.1

Según resultados de la determinación de aflatoxina por el método de microelisa se obtuvo un $R^2 = 0.8951$ que indica que tiene correlación entre los valores determinados. El coeficiente de variación fue 2,53. (Figura 28)

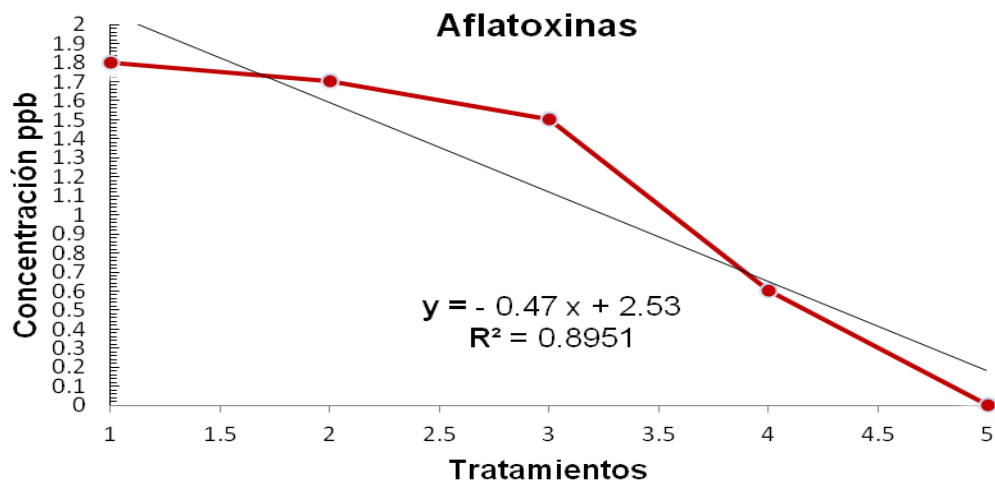


Figura 28. Determinación aflatoxina en balanceado de aves etapa inicial

La micotoxina es producida *por hongos del género Aspergillus (especialmente A. flavus y A. parasiticus)*, la temperatura de producción de las aflatoxinas es de 11°C a 35°C y con una temperatura óptima de 22°C y humedad relativa del 85%. El tratamiento 5 al que se agregó 3000 ppm AEJ y 5000 ppm AA, presentó bajo crecimiento 1.1 µg/kg de aflatoxinas producto almacenado a temperatura ambiente y humedad relativa aproximadamente 86%.

El efecto sinérgico de la combinación de AEJ y AA, presentan buenos resultados como conservantes de alimentos, según (Lázara Ayala González, Manuel Castro Perdomo y Mayuly Martínez, pertenecientes al Instituto de Ciencia Animal de Cuba, 2012). Estos investigadores indicaron que: “No son solo una alternativa para sustituir los antibióticos como promotores del crecimiento, sino también una opción para obtener incrementos de eficiencia y aumentar palatabilidad en sistemas donde se utilicen subproductos y alimentos de escaso valor nutricional, que generalmente tienden a afectar el comportamiento y la salud animal”

Los resultados de número de unidades formadoras de colonia de *levaduras* expresadas en ufc, obtenidos durante el presente estudios, se reportan en la tabla 12.

Tabla 12

Resultados de ufc de levaduras

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	60	110	700	800
1	2	130	250	500	800
1	3	80	110	130	150
1	4	30	70	80	110
1	5	20	30	40	60
2	1	50	110	600	1000
2	2	120	240	480	750
2	3	80	100	120	130
2	4	30	60	70	100
2	5	20	40	50	80
3	1	50	120	800	600
3	2	120	260	520	800
3	3	80	110	130	150
3	4	20	60	70	100
3	5	20	30	40	60

Según resultados de las unidades formadoras de colonias *levaduras* expresados en (ufc), se observa que existe crecimiento significativo en los resultados desde el día 0 hasta los 90 días de almacenamiento de los tratamientos analizados. Donde se visualiza que el tratamiento T5 (3000 ppm AEJ y 5000 ppm AA), presenta menor crecimiento de levaduras en tiempo de almacenamiento.

La presencia de levaduras en los balanceados, granos etc. es de menor importancia con respecto a los hongos causantes de grandes pérdidas económicas (Orberá, 2004).

Los resultados en número de unidades formadoras de colonia *enterobacterias* expresados en ufc, se reportan en la tabla 13.

Tabla 13

Unidades formadoras de colonias de enterobacterias

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	320	130	120	90
1	2	170	130	150	150
1	3	180	120	150	100
1	4	90	50	50	50
1	5	50	60	60	80
2	1	300	120	110	100
2	2	150	130	160	190
2	3	170	100	130	110
2	4	80	50	60	40
2	5	40	70	70	70
3	1	310	120	120	100
3	2	160	120	140	190
3	3	190	110	140	110
3	4	90	60	40	40
3	5	40	60	70	70

Según la Tabla 14, los tratamientos que presentaron crecimiento significativo son T1, T2, T3 en los cuales se encontró resultados en el límite de aceptación que es 10^2 ufc/g y límite de rechazo 10^3 ufc/g según norma NTE INEN 1829:2014, mientras que los tratamientos que fueron más estables en el tiempo de almacenamiento desde el día 0 hasta 90 días fueron los tratamientos T4, T5, esto es un buen indicador de conservación del balanceado ante este microorganismo indicador de contaminación fecal.

El balanceado está constituido por materias primas de origen vegetal y animal, con alto foco de contaminación por la naturaleza del origen. Según Jones 2002, la exclusión de gérmenes patógenos en los balanceados, es obtener proveedores con programas de control donde verifiquen la calidad de los ingredientes adquiridos por análisis microbiológicos rápidos y la aplicación de

aditivos eficientes para inhibir la contaminación del balanceado y evitar secuelas en los animales como son la digestión rápida, el rechazo del producto y por ende baja conversión en el ave.

Los resultados en número de unidades formadoras de colonia *Salmonella* expresados en ufc, se reportan en la tabla 14.

Tabla 14

Unidades formadoras de colonias de Salmonella

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	0	0	0	0
1	2	0	0	0	0
1	3	0	0	0	0
1	4	0	0	0	0
1	5	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0
2	3	0	0	0	0
2	4	0	0	0	0
2	5	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
3	2	0	0	0	0
3	3	0	0	0	0
3	4	0	0	0	0
3	5	0	0	0	0

Los balanceados a los que se les aplicaron los 5 tratamientos, no reportaron la presencia de *Salmonella*, durante los 90 días de experimentación, existen investigaciones donde se puede corroborar el efecto antibacteriano del jengibre, sobre la crianza de pollos broiler, cuyas muestras analizadas de mortalidad se realizó pruebas de presencia de *E. coli*, en los días 21, 28 y 35, utilizando un aplicador se obtuvo muestras del tracto nasofaríngeo del animal

en los días 21, 28 y 35, los resultados de incidencia de esta bacteria fueron bajos entre 10-15%, lo que comprueba que al utilizar jengibre produce un efecto antimicrobiano. (M. Herrera, 2006)

Salmonella es una bacteria Gram-negativa capaz de infectar humanos y una gran variedad de animales vertebrados. Las infecciones por *Salmonella* en humanos y animales van desde infecciones asintomáticas hasta enfermedades sistémicas y muerte (Lahiri, 2010) ;(Hugas & Beloeil, 2014).

Los resultados de pH en las muestras de balanceado durante los 90 días de almacenamiento se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15

Resultados de análisis pH de las muestras de balanceados

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	5.99	5.97	5.87	5.79
1	2	6.33	6.36	6.12	6.23
1	3	5.87	5.90	5.89	5.91
1	4	5.92	6.12	6.01	5.98
1	5	6.03	5.58	6.02	6.21
2	1	5.78	5.69	5.89	5.62
2	2	6.11	6.27	6.34	6.27
2	3	5.78	5.86	5.78	5.89
2	4	5.34	6.09	5.97	5.56
2	5	5.98	5.56	5.67	5.56
3	1	5.89	5.83	5.88	5.71
3	2	6.22	6.315	6.23	6.25
3	3	5.83	5.88	5.84	5.90
3	4	5.63	6.105	5.99	5.77
3	5	6.01	5.57	5.85	5.89

Los balanceados a los que se les aplicaron los 5 tratamientos, reportaron rango de pH 5.9 a 6.00, cuyos datos son representativos para el crecimiento de hongos y levaduras, para bacterias la incidencia es menor para el crecimiento de estos microorganismos (M/O). Lo antes mencionados se basa en los intervalos de pH para el crecimiento M/O. Tabla 16.

Tabla 16

Intervalos de pH para el crecimiento de algunos microorganismos

Microorganismo	pH Mínimo	pH óptimo	pH Máximo
Mohos	1.5 a 3.5	4.5 a 6.8	8 a 11
Levaduras	1.5 a 3.5	4 a 6.5	8 a 8.5
Bacterias (mayoría)	4.5 a 5.5	6.5 a 7.5	8.5 a 9
Bacterias Lácticas	3 a 5	5.5 a 7.5	6.5 a 8

Tomada de (Sylvia, David, 1999. 550p)

El jengibre regula el pH en los productos a los cuales es aplicado, inclusive tiene su efecto en la flora intestinal (*Lactobacillus*) de los animales que ingieren el balanceado que contiene jengibre y de esta manera se eliminan microorganismos perjudiciales como *Escherichia coli*. (S. Estrada, 2010).

Los resultados de peróxido en las muestras de balanceado durante los 90 días de almacenamiento. Tabla 17.

Tabla 17

Resultado de análisis de índice de peróxido de las muestras de balanceados almacenado durante 90 días

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	0	0	0	0
1	2	0	0	0	0
1	3	0	0	0	0
1	4	0	0	0	0
1	5	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0
2	3	0	0	0	0
2	4	0	0	0	0
2	5	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
3	2	0	0	0	0
3	3	0	0	0	0
3	4	0	0	0	0
3	5	0	0	0	0

Los balanceados a los que se les aplicaron los 5 tratamientos, no presentaron formación de peróxidos durante los 90 días de experimentación. Las soluciones antioxidantes inhibieron la presencia de los peróxidos en las muestras analizadas.

4.1 Análisis microbiológico de hongos

La figura 29, representa el número de unidades formadoras de colonia ufc para hongos, de los 5 tratamientos estudiados durante los 90 días de la investigación.

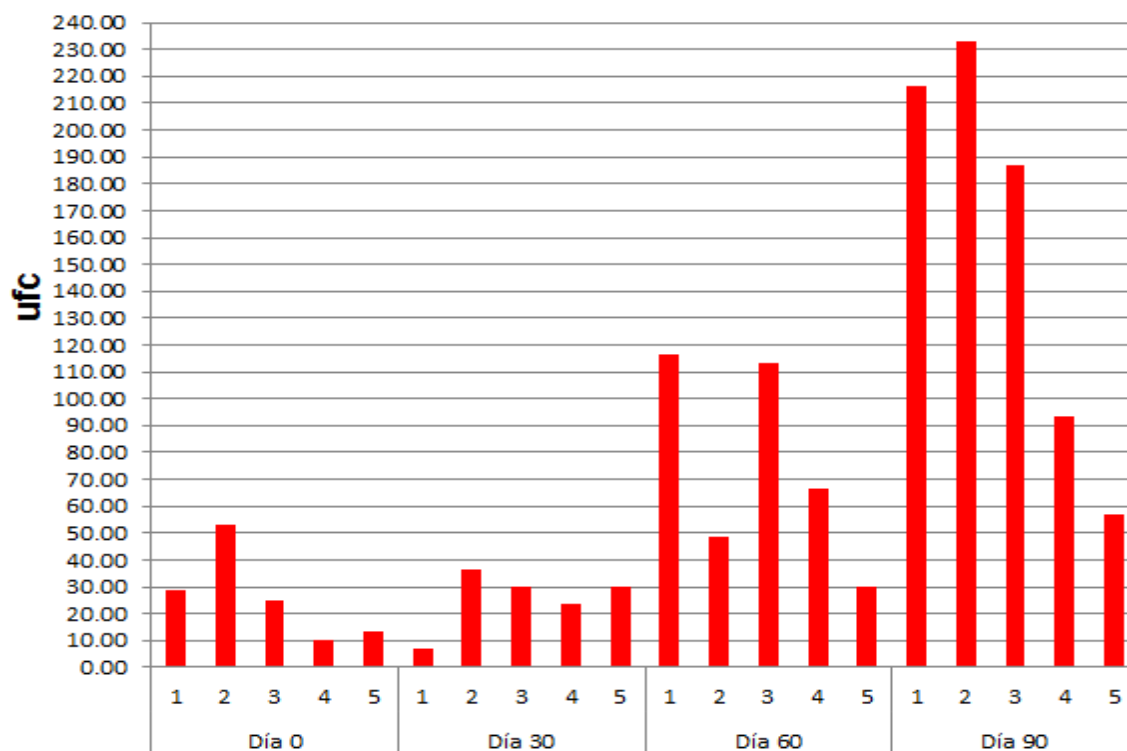


Figura 29. Tendencia de crecimiento hongos

En el día 0 los tratamientos T4 (10 ufc) y T5 (20 ufc) presentan menos crecimiento de unidades de colonias de hongos. En el día 30 el T1 tuvo mayor inhibición de crecimiento de hongos con relación a los tratamientos evaluados, el valor fue de 10 ufc. En los días 60 y 90 el T5 tiene mayor control de crecimiento de hongos con un valor de 30 ufc y 50 ufc respectivamente, cabe indicar que la vida útil o tiempo de anaquel de los balanceados es 60 días según las especificaciones del fabricante. En esta investigación se comprobó que el jengibre inhibe el crecimiento de hongos hasta el día 90. Según estudios realizados por (J Tapiero, R Soleno, A Lozada, V Blandón, K Ramírez,

M Rosero y Rivas, 2017), comprobaron que el AE de jengibre inhibió la proliferación de mohos y levaduras en quesos semimaduros.

En la figura 30 se detalla el crecimiento logarítmico de las ufc hongos, en los tratamientos de balanceados durante el tiempo de almacenamiento desde el día 0 hasta 90 días hubo crecimiento (ufc) unidades formadoras de colonias. Se puede observar que el T5 tiene mayor inhibición de hongos, seguido del T4.

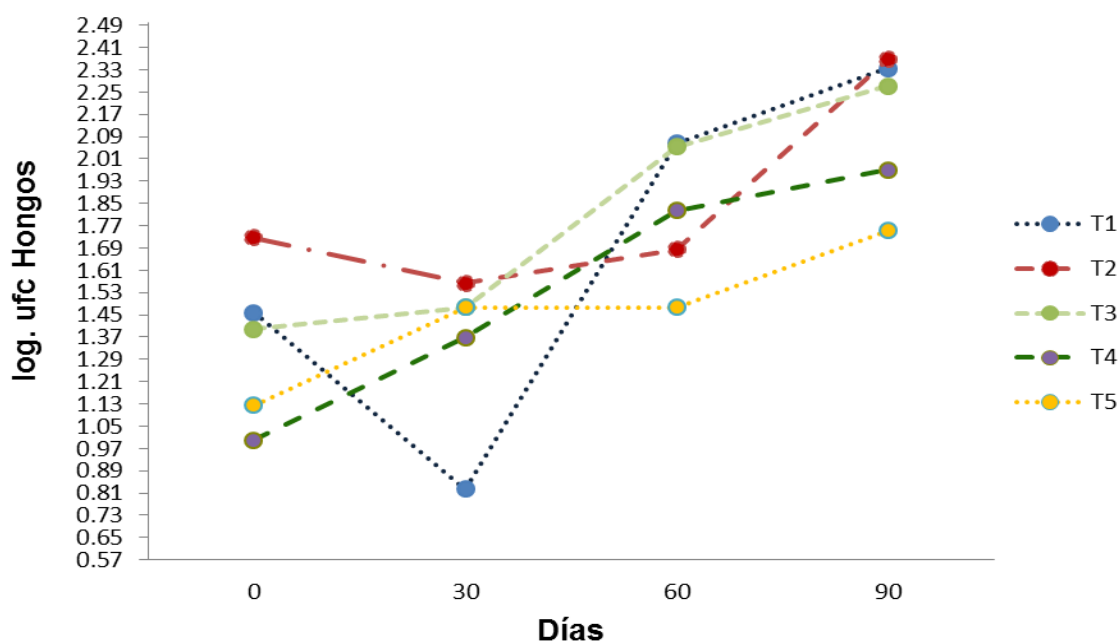


Figura 30. Crecimiento logarítmico de las ufc hongos

4.1.1 Análisis de varianza de hongos

4.1.1.1 Análisis del Día 90

Se realizó un ANOVA de bloques totalmente al azar de los 5 tratamientos durante los días 0, 30, 60 y 90 para analizar los resultados obtenidos de hongos. En todos estos días se obtuvieron diferencias mínimas significativas entre los tratamientos (ANEXO A-2) sin embargo en día 90, presentaron

mayores diferencias significativas hasta ese día se comprobó la vida útil del balanceado.

Los resultados de las medias con las desviaciones estándar de los tratamientos, se reportan en la tabla 18, análisis de Tukey.

Tabla 18

Resultados promedios del análisis hongos en el día 90

Tratamientos	PM±DE	Tukey
1	216.67±77.67	a
2	233.33±15.28	a
3	186.67±11.55	ab
4	93.33±23.09	bc
5	56.67±11.55	c

El valor p (probabilidad) de los tratamientos es igual a 0.0001 siendo menor a 0.05 (error experimental o nivel de significancia), lo que indica que si existen diferencias significativas en los tratamientos. (Anexo A-2 Tabla 11).

Según la prueba de significancia de Tukey, los tratamientos que mantienen diferencias significativas con menores promedios de ufc de hongos son el T5 y T4, contienen mayor concentración de AEJ 5(3000 ppm) y 4(2000 ppm); el resto de tratamientos T1, T2, T3, tienen mayores promedios de ufc de hongos (Figura 31).

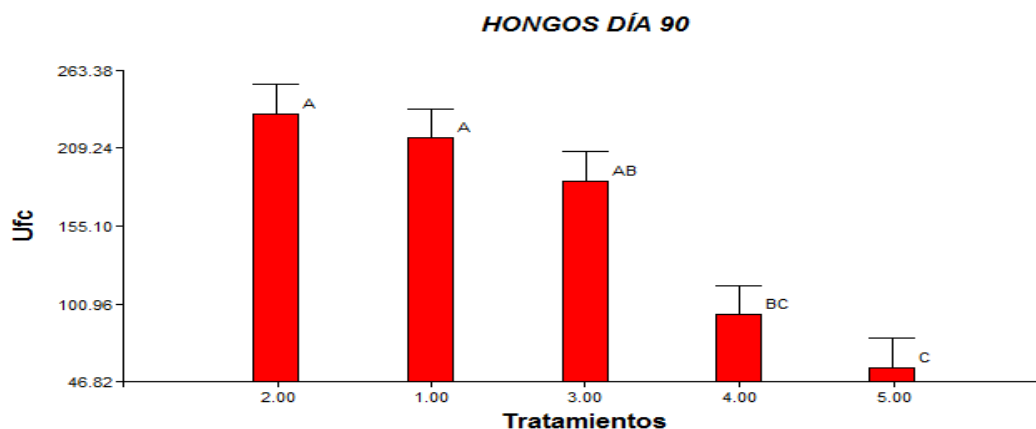


Figura 31. Prueba de significancia de tukey hongos día 90

En el día 90 se muestra que el T5 inhibió el crecimiento de hongos en las muestras de balanceados, esto coinciden con lo expuesto (J Tapiero, R Soleno, A Lozada, V Blandón, K Ramírez, M Rosero y Rivas 2017) que comprobaron que el AE de jengibre inhibió la proliferación de mohos y levaduras en quesos semimaduros, en todos los días de maduración.

El T4 2000 ppm AEJ (Aceite Esencial Jengibre) y T5 (3000 ppm AEJ) con la adición de 5000 ppm AA (Ácido Ascórbico), tiene efectos similares y mejores a los aditivos químicos como se puede comprobar al comparar con el testigo que es el tratamiento T1. El sinergismo de aceite esencial con ácido ascórbico, genera una acción directa de inhibición del crecimiento de microorganismos.

Según estudios realizados el rango efectivo para impedir el desarrollo de fumonisina y ergosterol, responsables del deterioro del alimento es de 500 – 4000 ppm de aceite esencial de jengibre, el tratamiento 4 y 5 se encuentran dentro de este rango y son los que reportaron el menor crecimiento de colonias en comparación con los tratamientos T1, T2, T3. (Ribeiro, Grespan y Kohiyama, 2013)

La vida útil del balanceado de aves etapa inicial considerando solo a los hongos es de 90 días.

4.1.2 Comprobación de la Hipótesis.

Hipótesis:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$$

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5$$

μ : promedio de unidades formadoras de colonia de hongos para los 5 tratamientos.

Según el ANOVA de bloques completamente al azar y la prueba de significancia de Tukey se rechaza la hipótesis nula, debido a que el p-valor es menor que 0.05. Se acepta la hipótesis alterna, los tratamientos tienen diferencias significativas, los 5 tratamientos aplicados al balanceado de pollo de la etapa inicial tienen diferentes efectos antimicrobianos, el T5 es el que inhibe de mejor manera la proliferación de hongos.

4.2 Análisis microbiológico de levaduras

La figura 32, representa el número de unidades formadoras de colonia ufc de levaduras, por tratamiento durante los 90 días de la investigación.

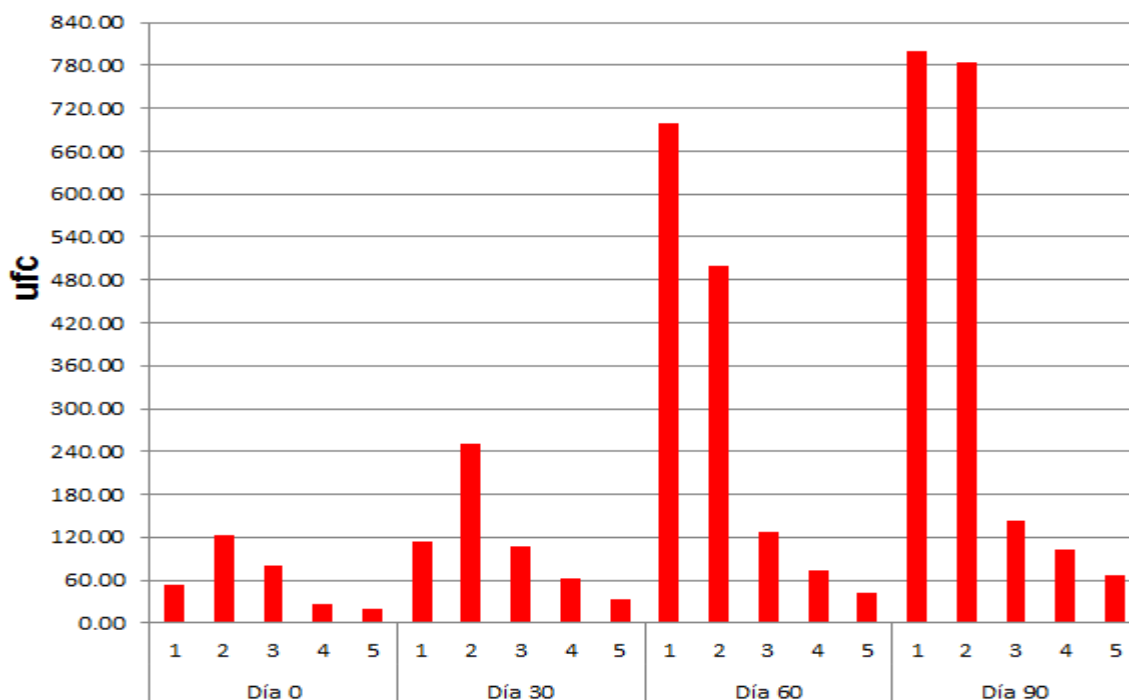


Figura 32. Tendencia crecimiento levaduras

Al observar durante los días de almacenamiento las muestras de balanceados, el día 0 los tratamientos T4 (30 ufc) y T5 (20 ufc) presentan menos crecimiento de unidades de colonias de levaduras. En el día 30 los tratamientos T4 (70 ufc) y T5 (30 ufc) tuvieron mayor inhibición de crecimiento de levaduras. En el día 60 el T5 se observa que tiene mayor control de crecimiento de levaduras de (40

ufc). En el día 90 el T5 alcanza mayor inhibición crecimiento de levaduras (60 ufc) durante el último día de evaluación, dando resultados relevantes la conservación durante 3 meses el balanceado para aves etapa inicial, no presenta contaminación.

En la figura 33 se detalla el crecimiento logarítmico de las ufc levaduras, en los tratamientos de balanceados durante el tiempo de almacenamiento desde el día 0 hasta 90 días hubo crecimiento (ufc) unidades formadoras de colonias. Se puede observar que el T5 tiene mayor inhibición de levaduras, seguido del T4.

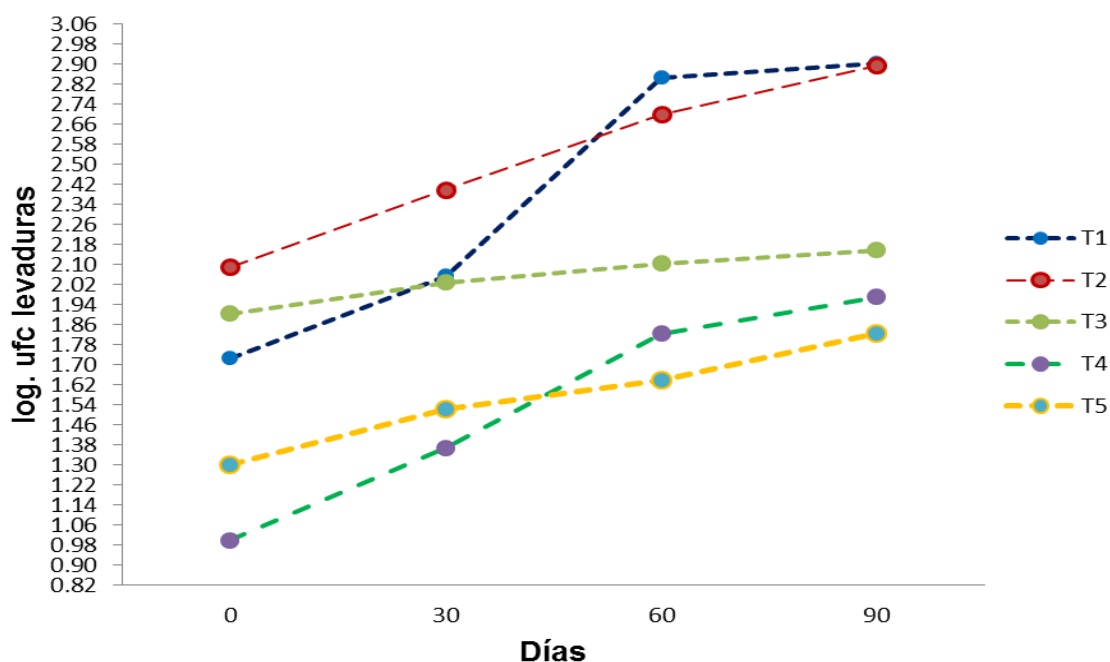


Figura 33. Crecimiento logarítmico de las ufc levaduras

4.2.1 Análisis de varianza de Levaduras

4.2.1.1 Análisis del Día 90

El coeficiente de variación CV fue 24.63, los datos tomados no son dispersos y son confiables. (Anexo A-2 Tabla 22).

Según Anexos A-2 (Tabla 23) análisis de varianza, el p-valor de los tratamientos es igual a <0.0001 siendo menor a 0.05 lo que indica que si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados de las medias de los tratamientos, se reportan en la tabla 19, análisis de Tukey.

Tabla 19

Resultados promedios del análisis levaduras en el día 90

Tratamientos	PM±DE	Tukey
1	800.00±200.00	a
2	783.33±28.87	a
3	143.33±11.55	b
4	103.33±5.77	bc
5	66.67±11.55	bc

Según la prueba de significancia de tukey los tratamientos que mantienen diferencias significativas con menores promedios de ufc de levaduras son el T4 y T5 contienen mayor concentración de aceite esencial de jengibre (2000-3000 ppm) representativamente, el resto de tratamientos T1, T2, T3, tienen mayores promedios de ufc de levaduras como se muestra en (Figura 34).

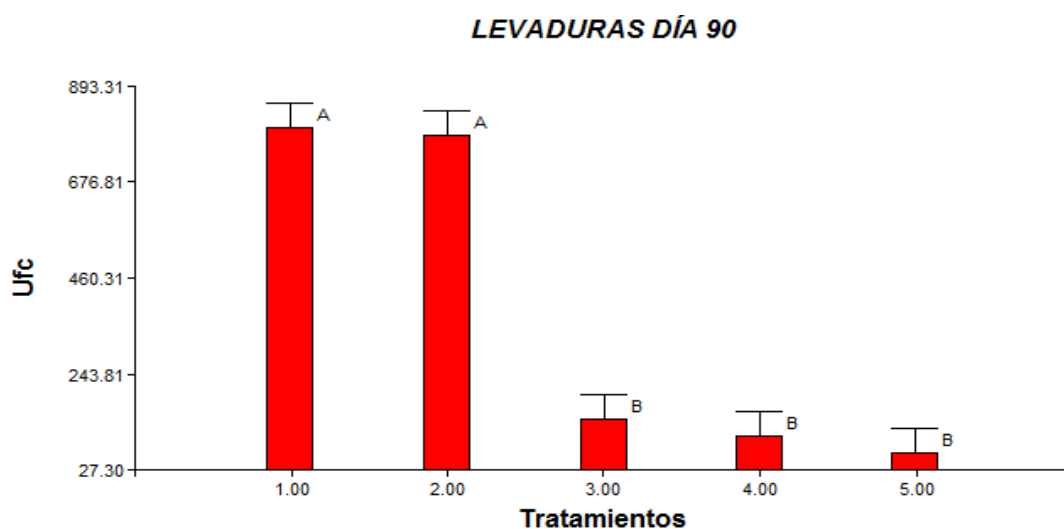


Figura 34. Prueba de significancia de tukey levaduras día 90

El efecto inhibición del aceite esencial jengibre en las levaduras en el día 90 de almacenamiento fue controlado. Esto tiene sustento en la investigación realizada por (S Callejas, S Sotelo, J Ramírez, J Jiménez; R Ibarra, 2008), donde se evaluó la capacidad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, de extractos obtenidos de ajo (*Allium sativum*), cebolla (*Allium cepa*), árnica (*Arnica montana L.*), jengibre (*Zingiber officinale*) y orégano (*Origanum vulgare*), mostraron diferentes halos de inhibición del crecimiento bacteriano dependiendo de las características de la cepa utilizada. Estos resultados permiten proponer la necesidad de comprobar si el efecto observado es realmente bacteriostático o bactericida.

Para determinar la vida útil del balanceado de ave etapa inicial, se consideró el día 90, es el último día de almacenamiento, en este día la cantidad de levaduras reportadas para los tratamientos T4 y T5 no sobrepasa lo establecido por la norma INEN 1829:2014. Esto implica que la vida útil del balanceado es de 90 días con respecto a la presencia de levaduras.

4.2.2 Comprobación de la Hipótesis

Hipótesis:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$$

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5$$

μ : promedio de unidades formadoras de colonia de levaduras para los 5 tratamientos.

Según el ANOVA de bloques completamente al azar y la prueba de significancia de Tukey se rechaza la hipótesis nula, debido a que el p-valor es menor que 0.05. Se acepta la hipótesis alterna, los tratamientos tienen diferencias significativas, los 5 tratamientos aplicados al balanceado de aves etapa inicial tienen diferentes efectos antimicrobianos, el tratamiento 5 es el que inhibe de mejor manera la proliferación de levaduras.

4.3 Análisis microbiológicos de enterobacterias

En la figura 35, representa el número de unidades formadoras de colonia ufc de levaduras, por tratamiento durante los 90 días de la investigación.

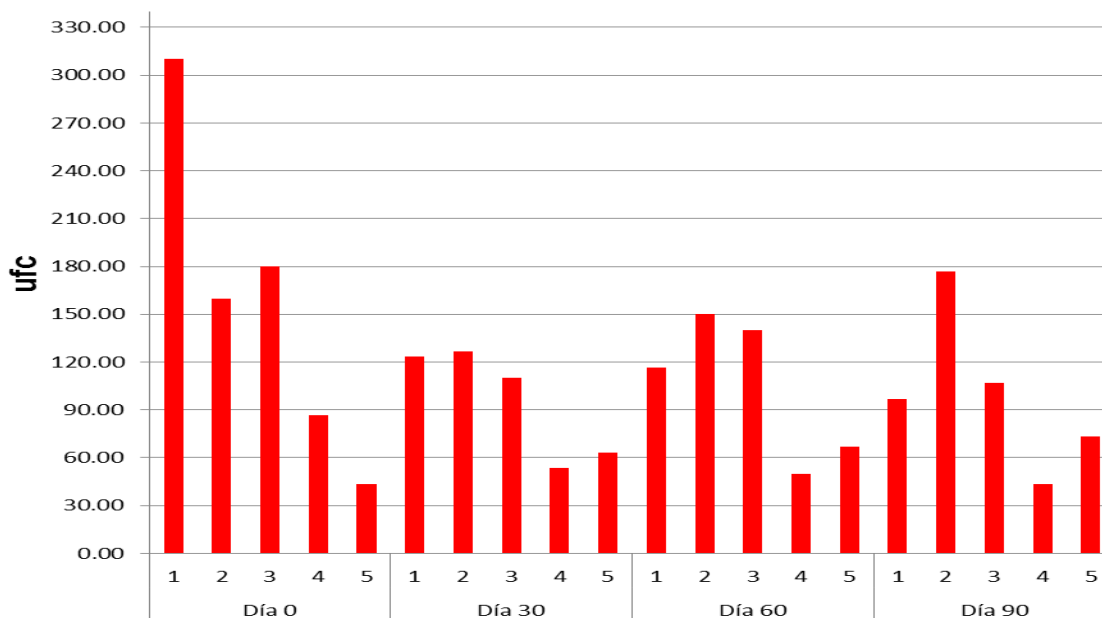


Figura 35. Tendencia crecimiento enterobacterias

Al observar durante los días de almacenamiento las muestras de balanceados en el día 0 el T5 presentó menos crecimiento de unidades de colonias de enterobacterias (50 ufc). En el día 30 el tratamiento T4 (50 ufc) tuvo mayor inhibición de crecimiento de enterobacterias. En el día 60 el T4 se observa que tiene mayor control de crecimiento de enterobacterias de (50 ufc). En el día 90 el T4 alcanza mayor inhibición crecimiento de enterobacterias (50 ufc) durante el último día de evaluación, dando resultados relevantes la conservación durante 3 meses el balanceado para aves etapa inicial, no presenta contaminación.

En la figura 36, se detalla el crecimiento logarítmico de las ufc enterobacterias, en los tratamientos de balanceados durante el tiempo de almacenamiento desde el día 0 hasta 90 días hubo crecimiento (ufc) unidades formadoras de colonias. Se puede observar que el T4 tiene mayor inhibición de enterobacterias, seguido del T5.

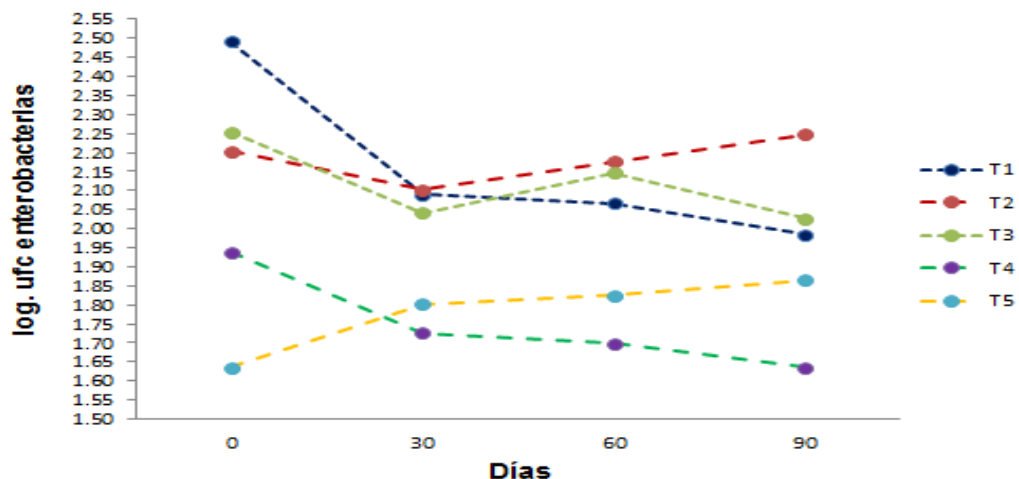


Figura 36. Crecimiento logarítmico de las ufc enterobacterias

4.3.1 Análisis de varianza de enterobacterias

4.3.1.1 Análisis del Día 90

Se analizó el día 90 de almacenamiento porque la vida útil de un balaceado comercial está en 60 días, y en esta investigación se comprobó que hasta el día 90 fueron controlados la presencia de enterobacterias sin sobrepasar lo establecido por la norma INEN 1829:2014

Según Anexos A-2 (Tabla 35) análisis de varianza, el p-valor de los tratamientos es igual a <0.0001 siendo menor a 0.05, lo que indica que si existen diferencias significativas en los tratamientos. Los resultados de las medias de los tratamientos, se reportan en la tabla 20, análisis de Tukey.

Tabla 20

Resultados promedios del análisis enterobacterias en el día 90

Tratamientos	PM±DE	Tukey
1	96.67±5.77	b
2	176.67±23.09	a
3	106.67±5.77	b
4	43.33±5.77	c
5	73.33±5.77	bc

Según la prueba de significancia de Tukey los tratamientos que mantienen diferencias significativas con menores promedios de ufc de enterobacterias son el T4 y T5, el resto de tratamientos T1, T2 y T3, tienen mayores promedios de ufc de enterobacterias (Figura 37).

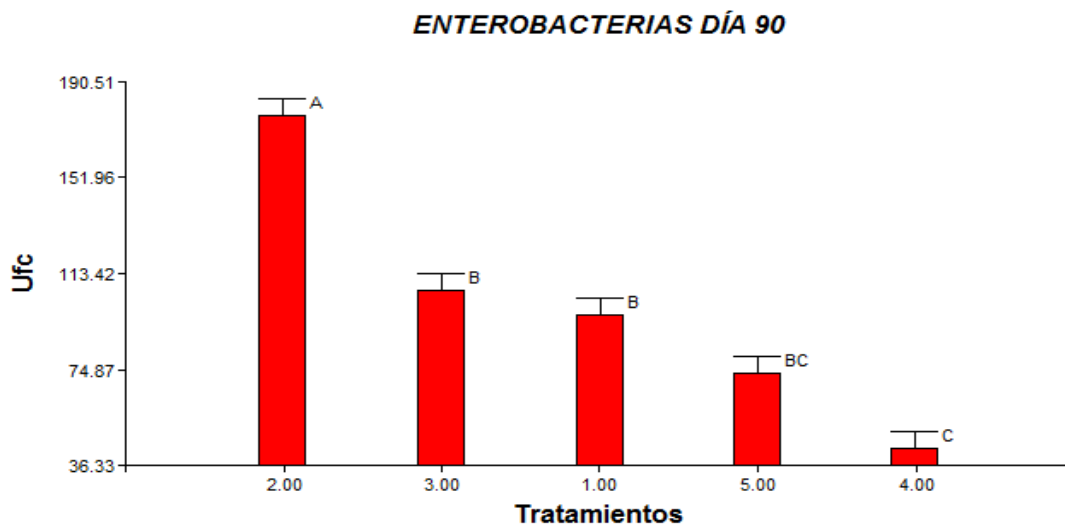


Figura 37. Prueba de significancia de tukey enterobacterias día 90

Los tratamientos en los que se agregó AEJ T4 (2000 ppm) y T5 (3000 ppm) se observa mayor efecto de inhibición del crecimiento de enterobacterias en las muestras de balanceados. Comparando en otros estudios el AE de jengibre tiene un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacterias por ejemplo *Porphyromonas gingivalis*. (D. Ayala, 2015)

De acuerdo a la investigación “Evaluación del desempeño sanitario al aplicar *zingiber officinale* (Jengibre), en la alimentación de cerdos york*landrace, en la etapa post - destete – acabado, se comprobó que al utilizar jengibre se tiene efectos bactericidas similares a los antibióticos promotores de crecimiento, lo que indica que al utilizar jengibre existe control de bacterias en el organismo del cerdo. (M Reyes, 2015).

En las diferentes revisiones bibliográficas, hay estudios que demuestran la capacidad antimicrobiana del jengibre contra el crecimiento de bacterias Gran

positivas siendo el *S. mutans* una de ellas. (Fernández VD, Ortiz FC, Salguero LM, 2014).

Con los antecedentes mencionados se puede concluir que el T4 y T5 son los mejores tratamientos y que tienen efectos iguales o mayores que los aditivos químicos o sintéticos, puesto que si comparamos con el T1 que es el testigo éstos tienen mejores resultados de inhibición de enterobacterias. Dando como resultado que la vida útil desde el punto de vista de enterobacterias es de 90 días.

4.3.2 Comprobación de la Hipótesis.

Hipótesis:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$$

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5$$

μ : promedio de unidades formadoras de colonia de *Enterobacterias* para los 5 tratamientos.

Según el ANOVA de bloques completamente al azar y la prueba de significancia de Tukey se rechaza la hipótesis nula, debido a que el p-valor es menor que 0.05. Se acepta la hipótesis alterna, los tratamientos tienen diferencias significativas, los 5 tratamientos aplicados al balanceado de aves de etapa inicial tienen diferentes efectos antimicrobianos, el tratamiento 4 es el que inhibe de mejor manera la proliferación de enterobacterias.

4.4 Análisis pH

En la figura 38, representa los resultados de pH en balanceados, por tratamiento durante los 90 días de la investigación.

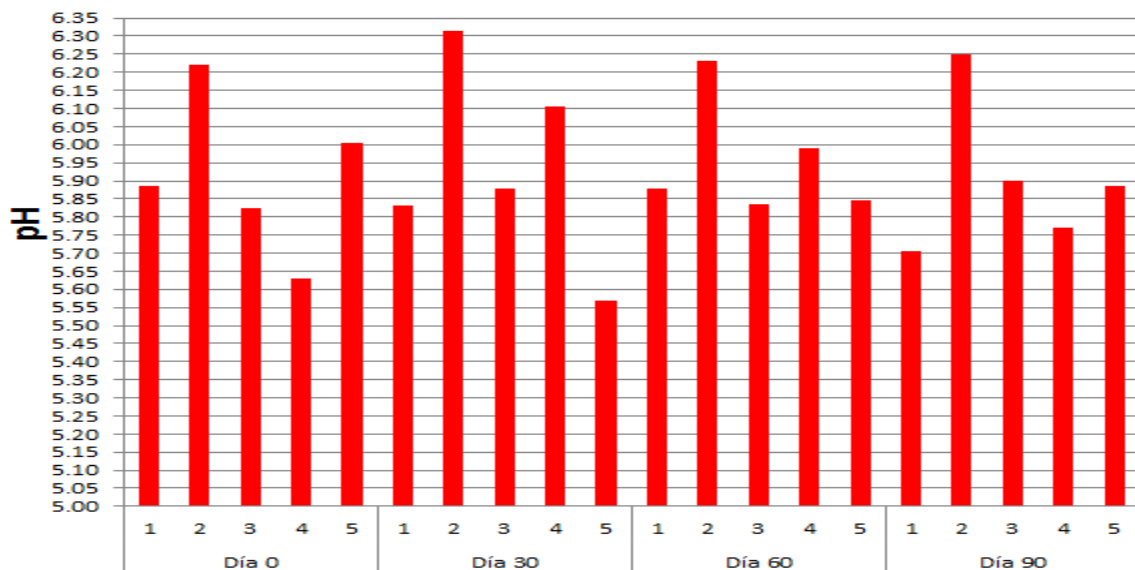


Figura 38. pH de las muestras de balanceados

En la figura 39, se detalla los promedios de pH obtenidos de las muestras de balanceados almacenados durante 90 días.

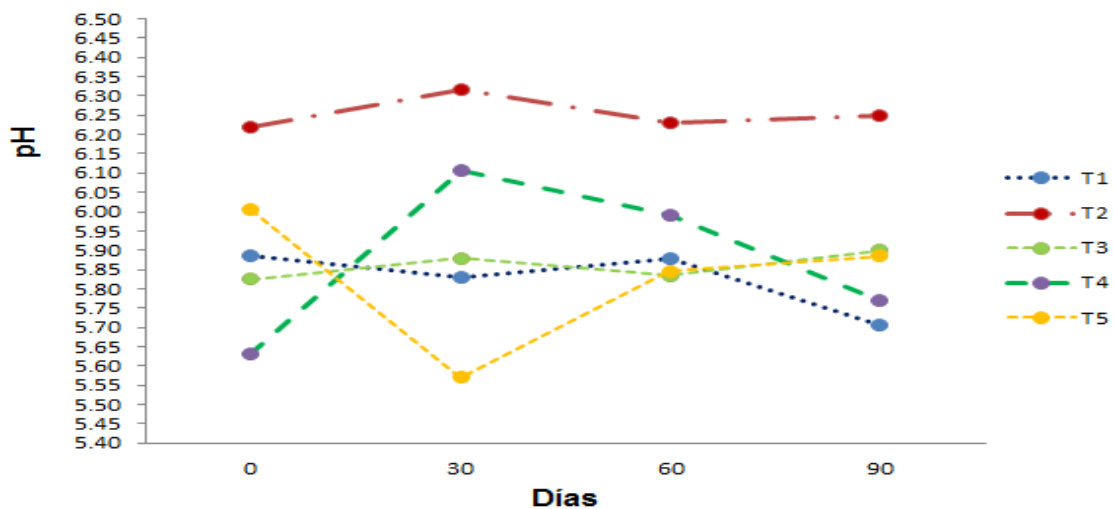


Figura 39. pH muestras de balanceados almacenados 90 días

Datos bibliográficos de microbiología se considera que la mayor parte de microorganismos, incluyendo a hongos, levadura, enterobacterias y *Salmonella*, crecen con facilidad a un pH neutro entre 5 y 8. Respecto a los datos obtenidos de la medición del pH de las muestras de balanceados, se

evidencia que se mantuvo en un rango 5.5 a 6.05 los tratamientos T1, T3, T4 y T5, a excepción de T2, que tuvo un valor de 6.35.

4.4.1 Análisis de varianza de pH

4.4.1.1 Análisis del Día 90

Todos los tratamientos controlaron el pH del balaceado de aves etapa inicial, en todos los días de almacenamiento y control existieron diferencias significativas entre los tratamientos, se analizó el día 90 debido a que fue el último día de almacenamiento y es que determina la vida útil del alimento.

Según Anexos A-2 Tabla 47 análisis de varianza, el p-valor de los tratamientos es igual a 0.0131 siendo menor a 0.05, lo que indica que si existen diferencias significativas en los tratamientos. Los resultados de las medias de los tratamientos, se reportan en la tabla 21 análisis de Tukey.

Tabla 21

Resultados promedios del análisis pH en el día 90

Tratamientos	PM±DE	Tukey
1	5.71±0.09	b
2	6.25±0.02	a
3	5.90±0.01	ab
4	5.77±0.21	b
5	5.89±0.33	ab

Según la prueba de significancia de Tukey los tratamientos que mantienen diferencias significativas con mayor pH son las muestras de balanceados T2 y T3 con rango pH 5.71 y 5.90 respectivamente, los demás tratamientos T1, T4, T5 presentaron pH 5.89, 5.77 y 5.89 respectivamente.

Existe una relación directa del pH con la proliferación de hongos, levaduras y bacterias como se puede observar, en el día 0 para el T2 ((2000 ppm JP y

(5000 ppm AA) el crecimiento de hongos fue (233.33 ufc), de levaduras (783.33 ufc), enterobacterias (176.67 ufc) con pH 6.25, sin embargo para el T3 (3000 ppm JP y 5000 ppm AA) el crecimiento hongos fue (186.67 ufc), de levaduras (143.33 ufc), enterobacterias (106.67 ufc) con pH 5.90. Con estos resultados se puede evidenciar que con un pH menor también existe disminución del conteo ufc de los diferentes microorganismos tendiendo un efecto directamente proporcional.

De los tratamientos que obtuvieron bajos los rangos de pH el mejor tratamiento fue T4 y el testigo. (Figura 40).

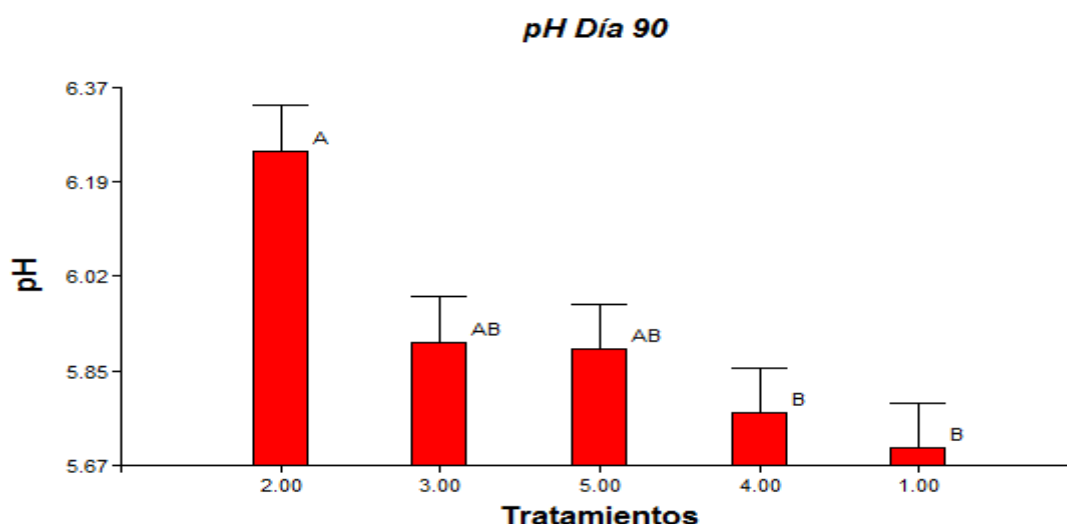


Figura 40. Prueba de significancia de tukey pH día 90

4.5 Análisis de peróxidos

Los 5 tratamientos controlaron la proliferación de peróxidos, no se reportó crecimiento de peróxidos durante los 90 días de investigación.

Según la investigación realizada por Según Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD (2000), los componentes activos de *Zingiber officinale* Roscoe (jengibre), posee un efecto protector ante la lipoperoxidación y estrés oxidativo realizado con ratas con malatión, en la dieta en dosis bajas.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Las formulaciones de ácido ascórbico, aceite esencial de jengibre y jengibre en polvo inhibieron la proliferación de hongos, levaduras, enterobacterias y *Salmonella*, los mejores resultados se evidenciaron en el tratamiento 5. ((5000 ppm de AA, 3000 ppm de AEJ).

Todas las formulaciones de ácido ascórbico, aceite esencial de jengibre y jengibre en polvo inhibieron el crecimiento de los microorganismos evaluados, durante los 90 días de experimentación, de tal manera que no sobrepasaron los niveles establecidos por la norma NTE INEN 1829:2014.

Los tratamientos presentaron niveles bajos de aflatoxinas, no sobrepasaron la norma NTE INEN 1829:2014, en los 90 días de investigación.

Todos los tratamientos inhibieron el crecimiento de *Salmonella*, de tal manera que no excedieron la norma NTE INEN 1829:2014, en los 90 días de investigación.

Los tratamientos con mayor pH en las muestras de balanceados fueron T2 y el T3 con valores de 5.71 y 5.90 respectivamente, los demás tratamientos T1, T4, T5 presentaron pH 5.89, 5.77 y 5.89 respectivamente. Mientras menor es el valor del pH menor contaminación por microorganismos existe.

Los tratamientos no presentaron niveles altos de peróxidos, la acción del perseverante natural formulado alcanzó la estabilidad del producto efectivamente hasta 90 días, libres de contaminación por la presencia de peróxidos.

5.2.Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios de antioxidantes naturales con otros aceites esenciales.

Se recomienda realizar un análisis de palatibilidad de los balanceados a las que se les ha aplicado las formulaciones de estudios.

REFERENCIAS

- Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD, (2000). *Influence of dietary ginger (Zingiber officinales Rose) on oxidative stress induced by malathion in rats. Food Chem Toxicol.*; 38(5):443-50. Recuperado 25 de Agosto 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10762730>.
- Aslan, I., Ozbek H., Calma sur, O, y Sah In, F, (2004). *Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, Tetranychus urticae Koch and Bemisia tabaci Genn. Industrial Crops and Products.* 19(2): 167-173. Recuperado el 23 de Septiembre 2016 de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20043037516>.
- Ávila-Sosa, R., Palou, E., Jiménez, M.T., Nevárez-Moorillón, G.V., Navarro, A. R. y López –Malo, A, (2012). *Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. International Journal of Food Microbiology.* 153 (1-2): 66-72. Recuperado el 17 de mayo 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22100789>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización, (2014). Alimentos para Animales. Alimentos Balanceados para Aves de Producción Zootécnica. Requisitos. NTE INEN 1829:2014. Quito Recuperado el 17 de diciembre del 2016 de http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/NORMAS_2014/ACO/17122014/nte-inen-1829-1r.pdf.
- Ayala Almeida Diana Carolin, (2016). “Efecto antibacteriano del aceite esencial de margarita (*calendula officinalis*) y jengibre (*zingiber officinale*) vs. clorhexidina al 2% sobre cepas de (*porphyromona gingivalis*): estudio in vitro”. (Tesis). Quito – Ecuador. Facultad de Odontología. Universidad Central del Ecuador. Recuperado 15 octubre 2017 de

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8253/1/T-UCE-0015-431.pdf>

Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th Edition, Arlington, USA, (1995), 49:16-17. Recuperado el 16 de Diciembre 2016 de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19951414840>

A .Grigore et al. (2010). *Chemical composition and antioxidant activity of Thymus Vulgaris L. volatile oil obtained by two different methods. Romanian Biotechnological Letters. 15:5436-5443. Recuperado el 16 de abril 2016 de http://www.jonnsaromatherapy.com/pdf/GC-MS_Thymus_vulgaris_2010_01.pdf*

Burt, S. (2004). *Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods a review. International Journal of Food Microbiology. 94(3): 223-253. Recuperado el 14 de febrero 2016 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504001680>*

Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E. (2013). *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In Food microbiology (pp. 765-801). American Society of Microbiology. Recuperado el 02 de Abril 2016 de [https://books.google.com.ec/books?id=PpVZDgAAQBAJ&pg=PA158&lpg=PA158&dq=Davidson,+P.+M.,+Taylor,+T.+M.,+%26+Schmidt,+S.+E.+\(2013\).+Chemical+preservatives+and+natural+antimicrobial+compounds.+In+Food+microbiology+\(pp.+765-801\).+American+Society+of+Microbiology.&source=bl&ots=6MihLX-LUi&sig=97NaMGeWdMGbue3Z_xK72wImPMU&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj804Of1OfZAhXEu1MKHVxYB2wQ6AEIJTAA#v=onepage&q=Davidson%2C%20P.%20M.%2C%20Taylor%2C%20T.%20M.%2C%20%26%20Schmidt%2C%20S.%20E.%20\(2013\).%](https://books.google.com.ec/books?id=PpVZDgAAQBAJ&pg=PA158&lpg=PA158&dq=Davidson,+P.+M.,+Taylor,+T.+M.,+%26+Schmidt,+S.+E.+(2013).+Chemical+preservatives+and+natural+antimicrobial+compounds.+In+Food+microbiology+(pp.+765-801).+American+Society+of+Microbiology.&source=bl&ots=6MihLX-LUi&sig=97NaMGeWdMGbue3Z_xK72wImPMU&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj804Of1OfZAhXEu1MKHVxYB2wQ6AEIJTAA#v=onepage&q=Davidson%2C%20P.%20M.%2C%20Taylor%2C%20T.%20M.%2C%20%26%20Schmidt%2C%20S.%20E.%20(2013).%20)*

20Chemical%20preservatives%20and%20natural%20antimicrobial%20compounds.%20In%20Food%20microbiology%20(pp.%20765-801).%20American%20Society%20of%20Microbiology.&f=false

Estrada S. (2010). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Riobamba. Ecuador. Pp 1 - 87. Recuperado el 21 de Agosto 2017 de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/handle/123456789/699/56T00229.pdf?sequence=1>.

Fernández VD, Ortiz FC, Salguero LM. (2014). Agente antimicrobianos alternativos de origen natural con acción inhibitoria de *S. mutans* como mecanismo de desinfección de preparaciones cavitarias dentales (Tesis). Costa Rica: Facultad de Odontología. Universidad de Costa Rica 2014. Recuperado el 03 de octubre 2016 de <http://www.fodo.ucr.ac.cr/node/94>

Gómez-Sánchez, A., Palou, E. y López-Malo, A. (2011). *Antifungal Activity Evaluation of Mexican Oregano (Lippia berlandieri Schauer) Essential Oil on the Growth of Aspergillus flavus by Gaseous Contact. Journal of Food Protection.* 74(12): 2192-2198. Recuperado el 12 de febrero 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186064>

INEC-CENSO-AVES, (2015) DE PLANTELES AVICOLAS EN EL ECUADOR CONAVE Recuperado 06 septiembre 2016 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Bibliotecas/Compendio/Compendio-2015/Compendio.pdf>

Información Técnica (2012). *Veratox Quantitative Aflatoxin, Toxin T-2, Zearalenone. Ochratoxin, Vomitoxin, Fumonisin, Test, ensayo*

cuantitativo. Neogen Corporation, 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912. Recuperado el 27 de enero del 2016 de <http://foodsafety.neogen.com/en/mycotoxins>

Ippolito, A., y Nigro, F. (2000). *Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables*. *Crop Protection*, 19, 715-723. Recuperado el 13 de Abril 2017 https://www.researchgate.net/publication/228687616_Impact_of_preharvest_application_of_biological_agents_on_postharvest_diseases_of_fresh_fruits_and_vegetables.

Kalemba, D. y Kunicka, A. (2003). *Antibacterial and antifungal properties of essential oils*. *Current Medicinal Chemistry*. 10(10): 813-829. Recuperado el 12 de Mayo 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678685>

Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kakoska, L., Valterova, I. y Pavela, R. (2011). *Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase*. *Food Research International*. 0(0): 1-5. Recuperado el 23 de Septiembre 2016 de https://www.researchgate.net/publication/305309539_Antimicrobial_activity_of_biochemical_substances_against_pathogens_of_cultivated_mushrooms_in_Serbia

López, P., Sánchez, C., Batle, R. y Nerín, C. (2005). *Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (17): 6939-6946. Reportado el 23 de Septiembre 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104824>

López, P., Sánchez, C., Batle, R. y Nerín, C. (2007). *Vapor- Phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents*

against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (11): 4348-4356. Recuperado el 16 de Enero 2017 de <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf063295u>.

Marcelo Fernando Herrera Apolo, (2016), "Evaluación de los efectos del extracto de raíz de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) en la crianza de pollos broiler". (Tesis). Facultad de Ciencias Agropecuarias Domingo. Universidad Escuela Politécnica del Ejército. Recuperado 13 de Abril 2016 de <http://docplayer.es/22279895-Escuela-politecnica-del-ejercito-facultad-de-ciencias-agropecuarias-santo-domingo-de-los-colorados-evaluacion-de-los-efectos-del-extracto-de-raiz-de.html>.

María Paula Urresta Valencia, (2016). "Evaluación del Efecto Antioxidante del Aceite Esencial de Guayaba (*Psidium guajaya* L) en combinación con Ácido Ascórbico en salchichas de pollo". Facultad de Agroindustria. Universidad de las Américas. Quito. Recuperado el 18 de abril del 2016 de [https://www.google.com.ec/search?q=Mar%C3%ADa+Paula+Urresta+Valencia+\(2016\).+Evaluaci%C3%B3n+del+Efecto+Antioxidante+del+Aceite+Esencial+de+Guayaba+\(Psidium+guajaya+L\)+en+combinaci%C3%B3n+con+%C3%81cido+Asc%C3%B3rbico+en+salchichas+de+pollo.+Facultad+de+Agroindustria.+Universidad+de+las+Am%C3%A9ricas.+Quito.+Recuperado+el+18&sa=X&ved=0ahUKEwih3cmGrufZAhUMvIMKHcz4CRgQgwMIlw&biw=1366&bih=637](https://www.google.com.ec/search?q=Mar%C3%ADa+Paula+Urresta+Valencia+(2016).+Evaluaci%C3%B3n+del+Efecto+Antioxidante+del+Aceite+Esencial+de+Guayaba+(Psidium+guajaya+L)+en+combinaci%C3%B3n+con+%C3%81cido+Asc%C3%B3rbico+en+salchichas+de+pollo.+Facultad+de+Agroindustria.+Universidad+de+las+Am%C3%A9ricas.+Quito.+Recuperado+el+18&sa=X&ved=0ahUKEwih3cmGrufZAhUMvIMKHcz4CRgQgwMIlw&biw=1366&bih=637).

Salgado F. El jengibre (*Zingiber officinale*). *Ginger (Zingiber officinale)*. Revista Internacional de Acupuntura. 2011; 5(4):167-173. Adaptado el 12 de Septiembre 2016 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1887836911700412>

Trajano, V., Lima, E., Souza, E. y Travazzos, A. E. R. (2010). *Inhibitory effect of the essential oil from Eugenia caryophyllata Thumb leaves on coalho*

cheese contaminating microorganisms. Ciencia e Tecnología de Alimentos, 30 (4), 1001-1006. Adaptado el 18 de Junio 2017 de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000400025

Tzortzakis N. (2007). *Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8 (1): 111-116. Adaptado el 16 de Julio 2016 de https://www.researchgate.net/publication/223872317_Maintaining_postharvest_quality_of_fresh_produce_with_volatile_compounds

Temple, N. J. (2000). *Antioxidants and disease: more questions than answers. Nutrition Research*, 20(3), 449-459. Adaptado el 27 de Abril 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027153170000138X>

Valero, M., & Giner, M. J. (2006). *Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of Bacillus cereus INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. International journal of food microbiology*, 106(1), 90-94. Adaptado el 24 de octubre 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213622>

ANEXOS

Anexos A-1

Resultados microbiológicos y fisicoquímicos

Tabla 1 *Resultados de análisis microbiológicos mohos ufc*

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	30	0	130	280
1	2	60	50	60	220
1	3	30	30	140	180
1	4	10	30	80	120
1	5	20	30	30	70
2	1	36	10	120	240
2	2	50	30	45	250
2	3	25	30	120	200
2	4	10	20	60	80
2	5	10	30	30	50
3	1	20	10	100	130
3	2	50	30	40	230
3	3	20	30	80	180
3	4	10	20	60	80
3	5	10	30	30	50

Tabla 2 *Resultados de análisis microbiológicos levaduras ufc*

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	60	110	700	800
1	2	130	250	500	800
1	3	80	110	130	150
1	4	30	70	80	110
1	5	20	30	40	60
2	1	50	110	600	1000
2	2	120	240	480	750
2	3	80	100	120	130
2	4	30	60	70	100
2	5	20	40	50	80
3	1	50	120	800	600
3	2	120	260	520	800
3	3	80	110	130	150
3	4	20	60	70	100
3	5	20	30	40	60

Tabla 3 *Resultados de análisis microbiológicos enterobacterias ufc*

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	320	130	120	90
1	2	170	130	150	150
1	3	180	120	150	100
1	4	90	50	50	50
1	5	50	60	60	80
2	1	300	120	110	100
2	2	150	130	160	190
2	3	170	100	130	110
2	4	80	50	60	40
2	5	40	70	70	70
3	1	310	120	120	100
3	2	160	120	140	190
3	3	190	110	140	110
3	4	90	60	40	40
3	5	40	60	70	70

Tabla 4 *Resultados de análisis microbiológicos Salmonella ufc.*

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	0	0	0	0
1	2	0	0	0	2
1	3	0	0	0	0
1	4	0	0	0	0
1	5	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
2	2	0	0	0	3
2	3	0	0	0	0
2	4	0	0	0	0
2	5	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
3	2	0	0	0	2
3	3	0	0	0	0
3	4	0	0	0	0
3	5	0	0	0	0

Tabla 5 *Resultados de análisis pH de las muestras de balanceados.*

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	5.99	5.97	5.87	5.79
1	2	6.33	6.36	6.12	6.23
1	3	5.87	5.90	5.89	5.91
1	4	5.92	6.12	6.01	5.98
1	5	6.03	5.58	6.02	6.21
2	1	5.78	5.69	5.89	5.62
2	2	6.11	6.27	6.34	6.27
2	3	5.78	5.86	5.78	5.89
2	4	5.34	6.09	5.97	5.56
2	5	5.98	5.56	5.67	5.56
3	1	5.89	5.83	5.88	5.71
3	2	6.22	6.315	6.23	6.25
3	3	5.83	5.88	5.84	5.90
3	4	5.63	6.105	5.99	5.77
3	5	6.01	5.57	5.85	5.89

Tabla 6 *Resultados de análisis peróxidos de las muestras de balanceados.*

Replicas	Tratamientos	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1	1	0	0	0	0
1	2	0	0	0	0
1	3	0	0	0	0
1	4	0	0	0	0
1	5	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0
2	3	0	0	0	0
2	4	0	0	0	0
2	5	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
3	2	0	0	0	0
3	3	0	0	0	0
3	4	0	0	0	0
3	5	0	0	0	0

ANEXO A-2

Análisis estadísticos de los resultados microbiológicos y fisicoquímicos

Tabla 1 *Análisis estadísticos mohos en el día 0.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 0	15	0.96	0.93	16.82

Tabla 2 *Análisis de la varianza, para mohos en día 0 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	3675.07	612.51	31.85	<0.0001
Replicas	2	160.13	80.07	4.16	0.0577
Tratamientos	4	3514.93	878.73	45.69	<0.0001
Error	8	153.87	19.23		
Total	14	3828.93			

Tabla 3 *Ponderación de tratamientos para mohos en el día 0.*

Tratamientos	Medidas	n	E.E			
2	53.33	3	2.5	a		
1	28.67	3	2.5		b	
3	25.00	3	2.5		b	c
5	13.33	3	2.5			c d
4	10.00	3	2.5			d

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa=0.5 DMS=12.37081 Error: 19.2333 gl: 8**

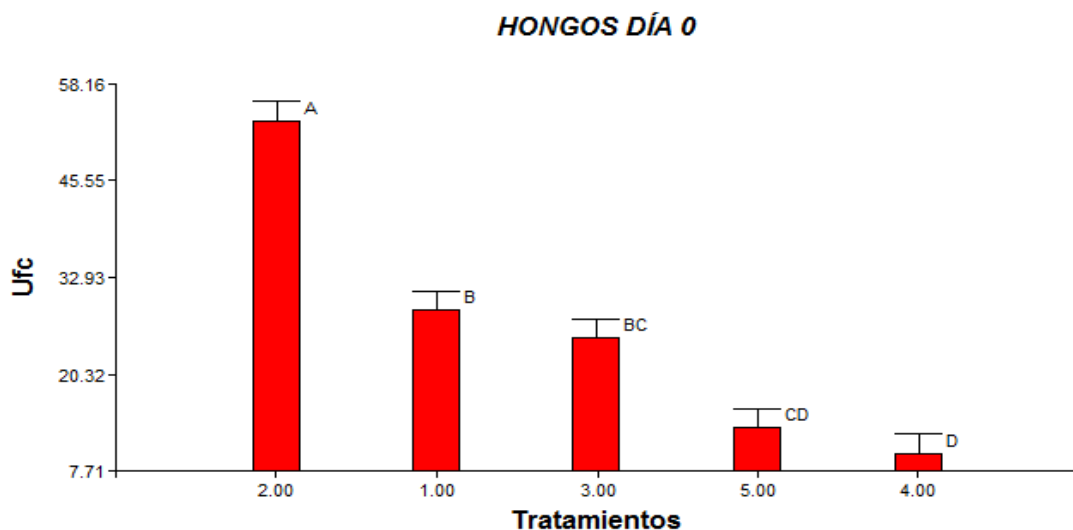


Figura 41. Prueba de significancia de tukey hongos día 0.

Tabla4 *Análisis estadísticos mohos en día 30.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 30	15	0.82	0.69	25.98

Tabla 5. Análisis de la varianza, para mohos en día 30 (SC tipo III)

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	1626.67	271.11	6.26	0.0106
Replicas	2	53.33	26.67	0.62	0.5642
Tratamientos	4	1573.33	393.33	9.08	0.0045
Error	8	346.67	43.33		
Total	14	1973.33			

Tabla 6 *Ponderación de tratamientos para mohos en el día 30*

Tratamientos	Medidas	n	E.E		
2	36.67	3	3.80	a	
5	30.00	3	3.80	a	
3	30.00	3	3.80	a	
4	23.33	3	3.80	a	b
1	6.67	3	3.80		b

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=18.56872 **Error:** 43.3333 **gl:**8

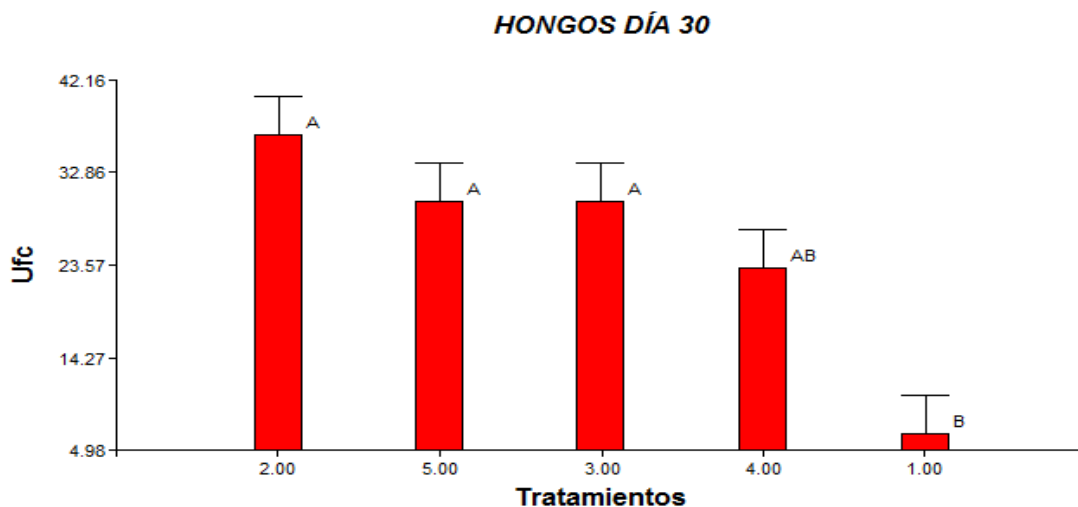


Figura 42. Prueba de significancia de tukey hongos día 30.

Tabla 7 *Análisis estadísticos mohos en día 60.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 60	15	0.95	0.91	15.82

Tabla 8 *Análisis de la varianza, para mohos en día 60 (SC tipo III)*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	19723.33	3287.22	23.34	0.0001
Replicas	2	1690.00	845.00	6.00	0.0256
Tratamientos	4	18033.33	4508.33	32.01	0.0001
Error	8	1126.67	140.83		
Total	14	20850.00			

Tabla 9 *Ponderación de tratamientos para mohos en el día 60.*

Tratamientos	Medidas	n	E.E			
1	116.67	3	6.85	a		
3	113.33	3	6.85	a		
4	66.67	3	6.85		b	
2	48.33	3	6.85		b	c
5	30.00	3	6.85			c

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=33.47524 **Error:** 140.8333 **gl:** 8

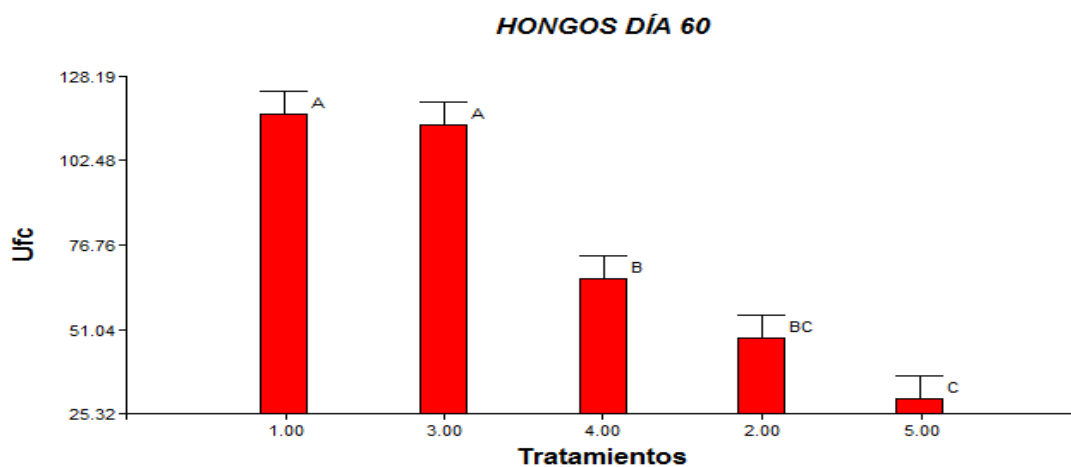


Figura 43. Prueba de significancia de tukey hongos día 60.

Tabla 10 *Análisis estadísticos mohos en día 90*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 90	15	0.89	0.80	22.25

Tabla 11 *Análisis de la varianza, para mohos en día 90 (SC tipo III)*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	77493.33	12915.56	10.54	0.0020
Replicas	2	4333.33	2166.67	1.77	0.2312
Tratamientos	4	73160.00	18290.00	14.93	0.0009
Error	8	9800.00	1225.00		
Total	14	87293.33			

Tabla 12 *Ponderación de tratamientos para mohos en el día 90*

Tratamientos	Medidas	n	E.E		
2.00	233.33	3	20.21	a	
1.00	216.67	3	20.21	a	
3.00	186.67	3	20.21	a	b
4.00	93.33	3	20.21		b c
5.00	56.67	3	20.21		c

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=98.72770 **Error:** 1225.0000 **gl:** 8

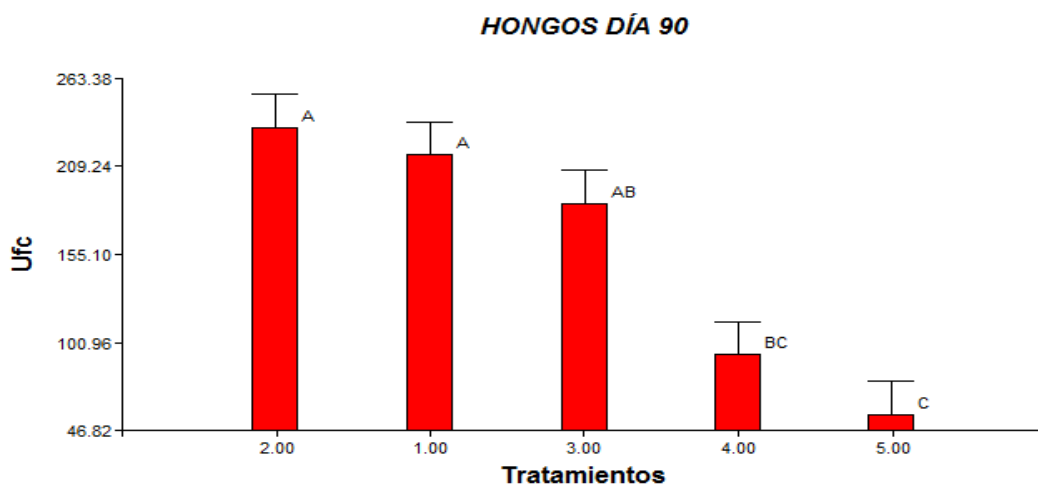


Figura 44. Prueba de significancia de tukey hongos día 90.

Tabla 13 *Análisis estadísticos levaduras en día 0.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 0	15	1.00	0.99	6.02

Tabla 14 *Análisis de la varianza, para levaduras en día 0 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	21586.67	3597.78	269.83	<0.0001
Replicas	2	93.33	46.67	3.50	0.0809
Tratamientos	4	21493.33	5373.33	403.00	<0.0001
Error	8	106.67	13.33		
Total	14	21693.33			

Tabla 15 *Ponderación de tratamientos para levaduras en el día 0.*

Tratamientos	Medidas	n	E.E		
2.00	123.33	3	2.11	a	
3.00	80.00	3	2.11		b
1.00	53.33	3	2.11		c
4.00	26.67	3	2.11		d
5.00	20.00	3	2.11		d

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=10.30007 **Error:** 13.3333 **gl:** 8

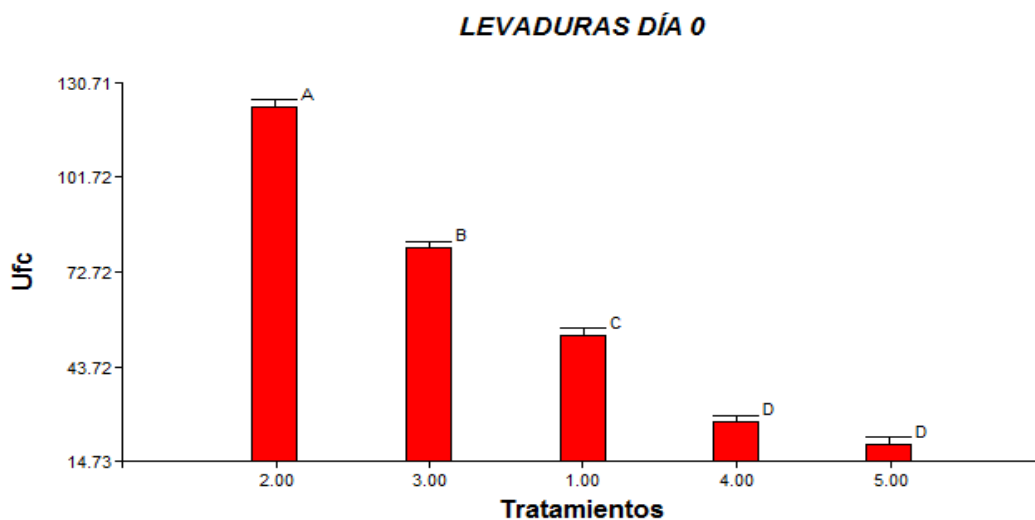


Figura 45. Prueba de significancia de tukey levaduras día 0.

Tabla 16 *Análisis estadísticos levaduras en día 30.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 30	15	1.00	0.99	6.03

Tabla 17 *Análisis de la varianza, para levaduras en día 30 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	82960.00	13826.67	296.29	<0.0001
Replicas	2	93.33	46.67	1.00	0.4096
Tratamientos	4	82866.67	20716.67	443.93	<0.0001
Error	8	373.33	46.67		
Total	14	83333.33			

Tabla 18 *Ponderación de tratamientos para levaduras en el día 30.*

Tratamientos	Medidas	n	E.E	
2.00	250.00	3	3.94	a
1.00	113.33	3	3.94	b
3.00	106.67	3	3.94	b
4.00	63.33	3	3.94	c
5.00	33.33	3	3.94	d

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=19.26967 **Error:** 46.6667 **gl:** 8

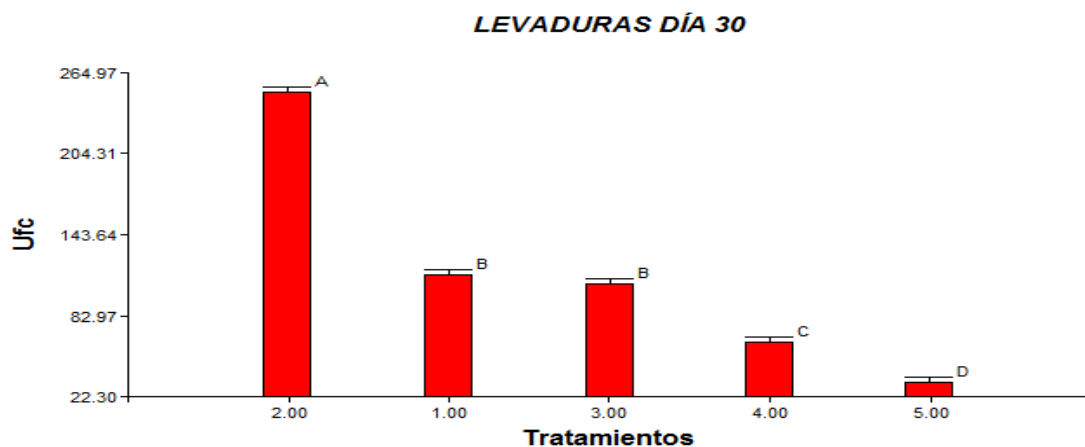


Figura 46. Prueba de significancia de tukey levaduras día 30.

Tabla 19 *Análisis estadísticos levaduras en día 60.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 60	15	0.99	0.97	15.11

Tabla 20 *Análisis de la varianza, para levaduras en día 60 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	1045746.67	174291.11	91.57	<0.0001
Replicas	2	5773.33	2886.67	1.52	0.2764
Tratamientos	4	1039973.33	259993.33	136.60	<0.0001
Error	8	15226.67	1903.33		
Total	14	1060973.33			

Tabla 21 *Ponderación de tratamientos para levaduras en el día 60.*

Tratamientos	Medidas	n	E.E		
1.00	700.00	3	25.19	a	
2.00	500.00	3	25.19		b
3.00	126.67	3	25.19		c
4.00	73.33	3	25.19		c
5.00	43.33	3	25.19		c

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=123.06326 **Error:** 1903.3333 **gl:** 8

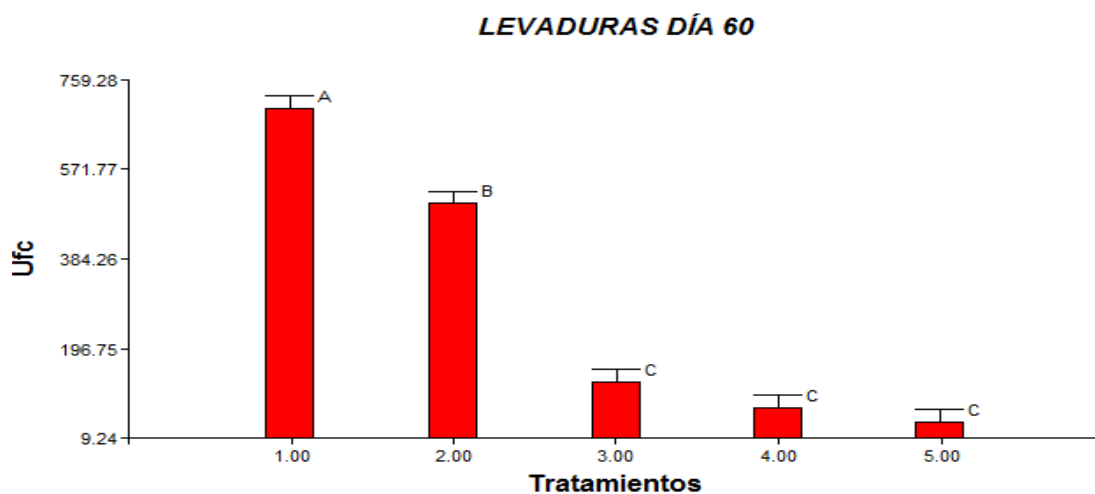


Figura 47. Prueba de significancia de tukey levaduras Día 60.

Tabla 22 *Análisis estadísticos levaduras en día 90.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 90	15	0.96	0.93	24.63

Tabla 23 *Análisis de la varianza, para levaduras en día 90 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	1721840.00	286973.33	32.87	<0.0001
Replicas	2	12413.33	6206.67	0.71	0.5198
Tratamientos	4	1709426.67	427356.67	48.94	<0.0001
Error	8	69853.33	8731.67		
Total	14	1791693.33			

Tabla 24 *Ponderación de tratamientos para levaduras en el día 90.*

Tratamientos	Medidas	n	E.E	
1.00	800.00	3	53.95	a
2.00	783.33	3	53.95	a
3.00	143.33	3	53.95	b
4.00	103.33	3	53.95	b
5.00	66.67	3	53.95	b

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=263.58432 **Error:** 8731.6667 **gl:**8

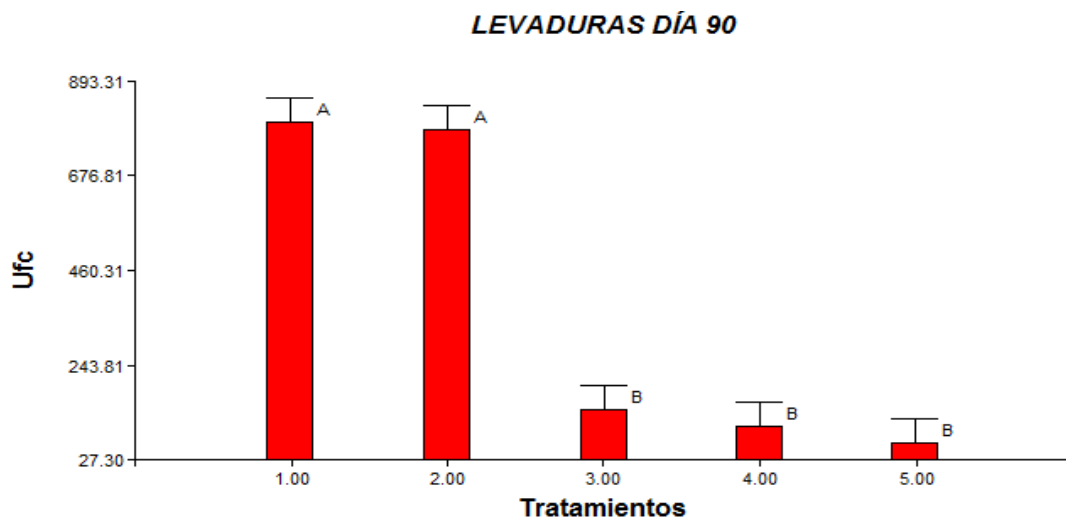


Figura 48. Prueba de significancia de tukey levaduras día 90.

Tabla 25 *Análisis estadísticos enterobacterias en día 0.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 0	15	1.00	1.00	3.31

Tabla 26 *Análisis de la varianza, para enterobacterias en día 0 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	125946.67	20991.11	787.17	<0.0001
Replicas	2	520.00	260.00	9.75	0.0072
Tratamientos	4	125426.67	31356.67	1175.88	<0.0001
Error	8	213.33	26.67		
Total	14	126160.00			

Tabla 27 *Ponderación de tratamientos para enterobacterias en el día 0.*

Tratamientos	Medias	n	E.E	
1.00	310.00	3	2.98	a
3.00	180.00	3	2.98	b
2.00	160.00	3	2.98	c
4.00	86.67	3	2.98	d
5.00	43.33	3	2.98	e

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=14.56650 **Error:** 26.6667 **gl:** 8

ENTEROBACTERIAS DÍA 0

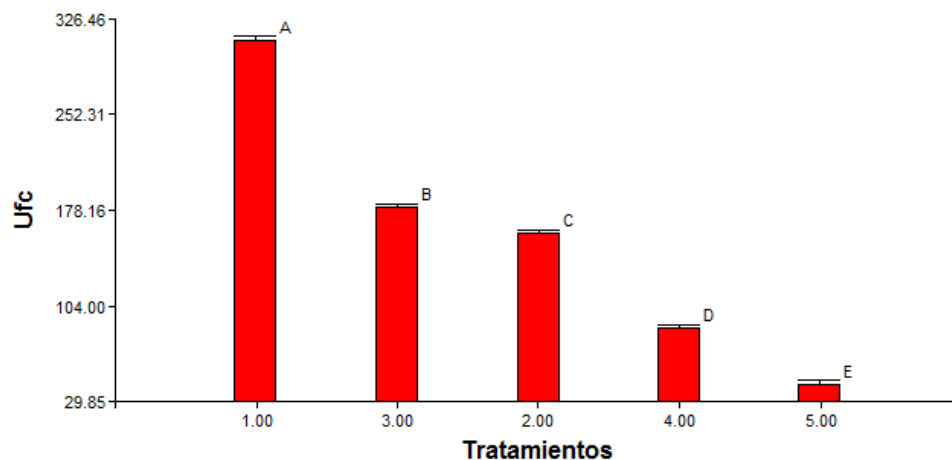


Figura 49. Prueba de significancia de tukey enterobacterias día 0.

Tabla 28 *Análisis estadísticos enterobacterias en día 30.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 30	15	0.97	0.95	7.54

Tabla 29 *Análisis de la varianza, para enterobacterias en día 30 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	14360.00	2393.33	46.32	<0.0001
Replicas	2	53.33	26.67	0.52	0.6154
Tratamientos	4	14306.67	3576.67	69.23	<0.0001
Error	8	413.33	51.67		
Total	14	14773.33			

Tabla 30 *Ponderación de tratamientos para enterobacterias en el día 30.*

Tratamientos	Medidas	n	E.E	
2.00	126.67	3	4.15	a
1.00	123.33	3	4.15	a
3.00	110.00	3	4.15	a
5.00	63.33	3	4.15	b
4.00	53.33	3	4.15	b

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=20.27572 **Error:** 51.6667 **gl:** 8

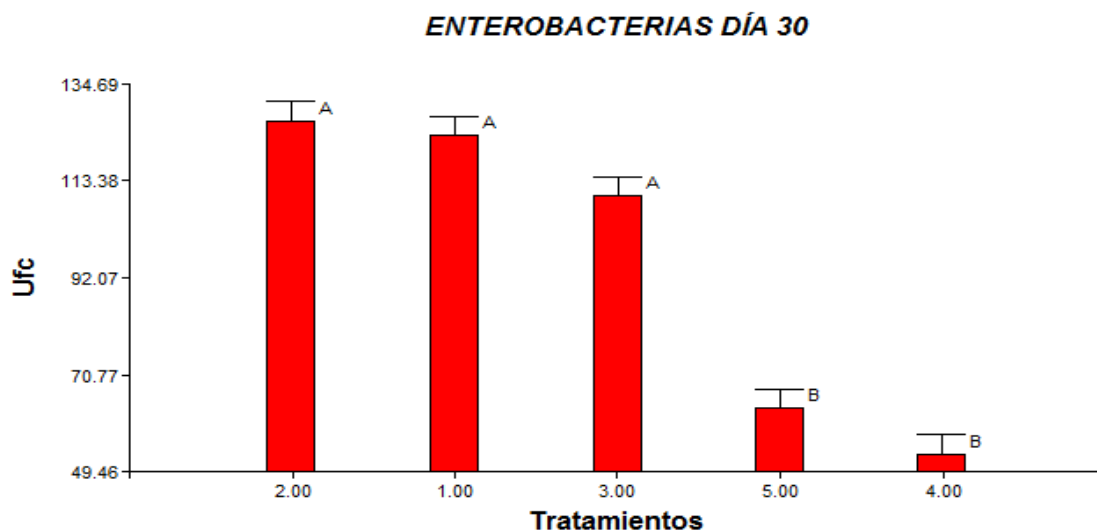


Figura 50. Prueba de significancia de tukey enterobacterias día 30.

Tabla 31 *Análisis estadísticos enterobacterias en día 60.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 60	15	0.97	0.95	8.81

Tabla 32 *Análisis de la varianza, para enterobacterias en día 60 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	23693.33	3948.89	46.46	<0.0001
Replicas	2	53.33	26.67	0.31	0.7393
Tratamientos	4	23640.00	5910.00	69.53	<0.0001
Error	8	680.00	85.00		
Total	14	24373.33			

Tabla 33 *Ponderación de tratamientos para enterobacterias en el día 60.*

Tratamientos	Medidas	n	E.E		
2.00	150.00	3	5.32	a	
3.00	140.00	3	5.32	a	b
1.00	116.67	3	5.32		b
5.00	66.67	3	5.32		c
4.00	50.00	3	5.32		c

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=26.00641 **Error:** 85.0000 **gl:** 8

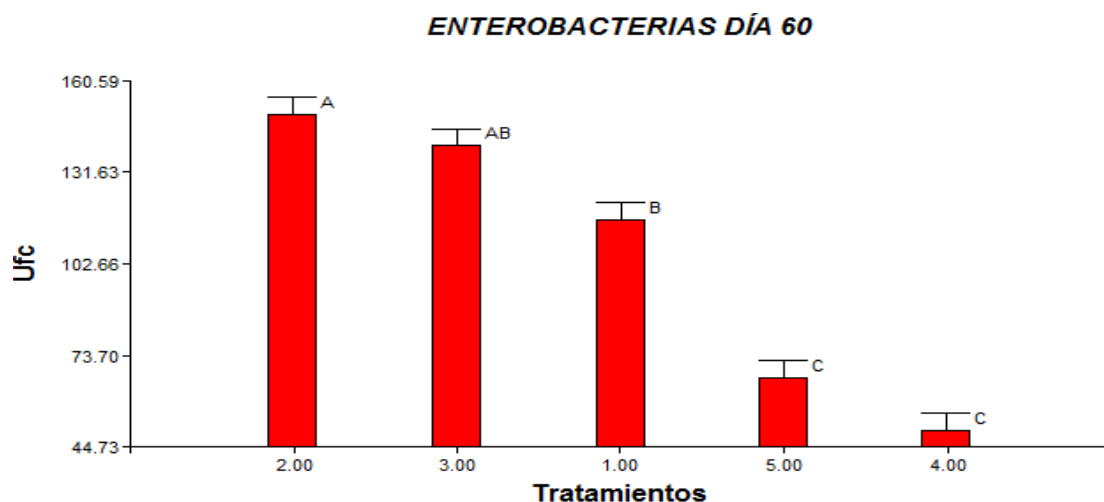


Figura 51. Prueba de significancia de tukey enterobacterias día 60.

Tabla 34 *Análisis estadísticos enterobacterias en día 90.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 90	15	0.96	0.94	11.91

Tabla 35 *Análisis de la varianza, para enterobacterias en día 90 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	29773.33	4962.22	35.44	<0.0001
Replicas	2	213.33	106.67	0.76	0.4979
Tratamientos	4	29560.00	7390.00	52.79	<0.0001
Error	8	1120.00	140.00		
Total	14	30893.33			

Tabla 36 *Ponderación de tratamientos para enterobacterias en el día 90.*

Tratamientos	Medidas	n	E.E		
2.00	176.67	3	6.83	a	
3.00	106.67	3	6.83		b
1.00	96.67	3	6.83		b
5.00	73.33	3	6.83		b c
4.00	43.33	3	6.83		c

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=33.37606 **Error:** 140.0000 **gl:** 8

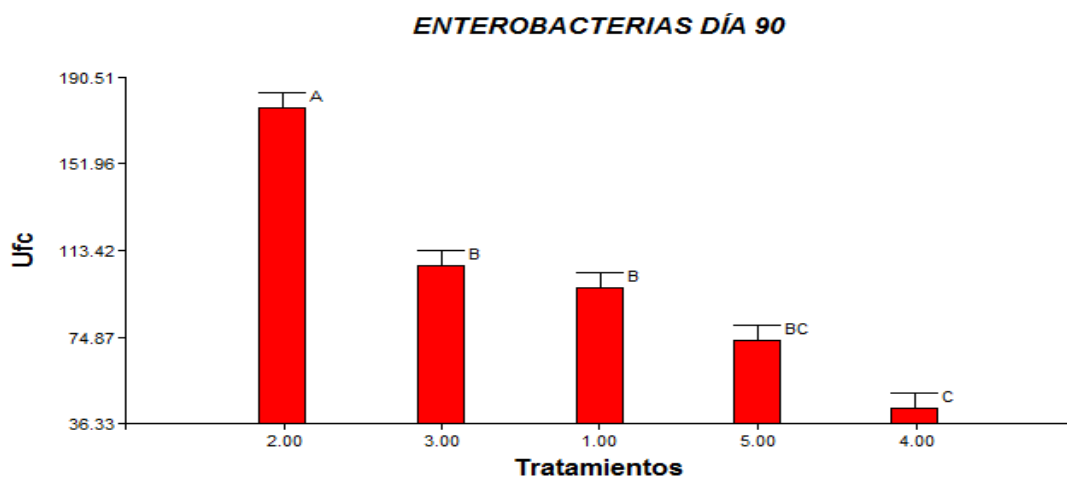


Figura 52. Prueba de significancia de tukey enterobacterias día 90.

Tabla 37 *Análisis estadísticos pH en día 0.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 0	15	0.89	0.81	1.77

Tabla 38 *Análisis de la varianza, de pH en día 0 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	0.71	0.12	10.76	0.0018
Replicas	2	0.13	6.05	6.05	0.0251
Tratamientos	4	0.57	13.11	13.11	0.0014
Error	8	0.09	0.01		
Total	14	0.79			

Tabla 39 *Ponderación de pH de tratamientos en día 0 (SC tipo III).*

Tratamientos	Medidas	n	E.E			
2.00	6.22	3	0.06	a		
5.00	6.01	3	0.06	a	b	
1.00	5.89	3	0.06		b	c
3.00	5.83	3	0.06		b	c
4.00	5.63	3	0.06			c

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=0.29504 **Error:** 0.0109 **gl:** 8

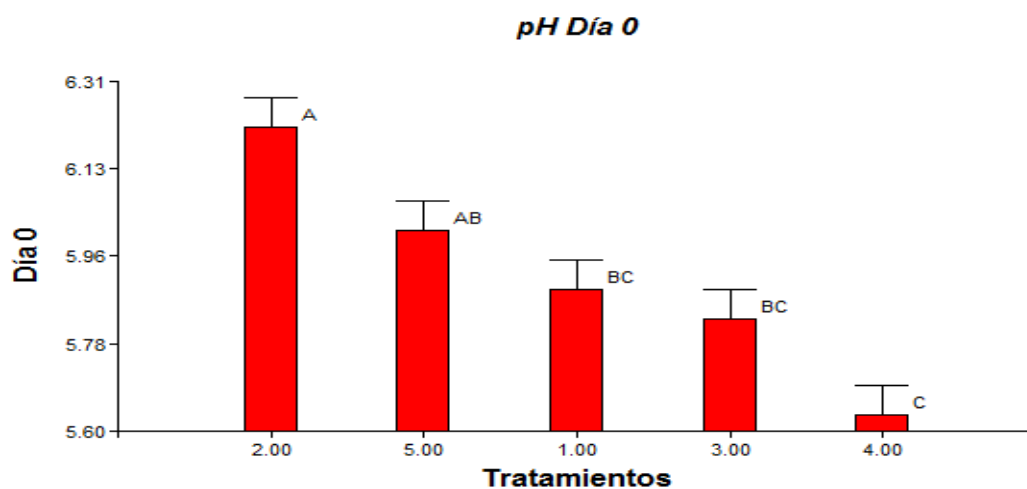


Figura 53. Prueba de significancia de tukey pH día 0.

Tabla 40 *Análisis Estadísticos pH en día 30*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 30	15	0.98	0.96	0.91

Tabla 41 *Análisis de la Varianza, de pH en día 30 (SC tipo III)*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	0.98	0.16	55.65	<0.0001
Replicas	3	0.02	0.01	3.60	0.0769
Tratamientos	4	0.96	0.24	81.68	<0.0001
Error	8	0.02	2.9 E-03		
Total	14	1.00			

Tabla 42 *Ponderación de pH de tratamientos en día 30 (SC tipo III)*

Tratamientos	Medias	n	E.E	
2.00	6.32	3	0.03	a
4.00	6.11	3	0.03	b
3.00	5.88	3	0.03	c
1.00	5.83	3	0.03	c
5.00	5.57	3	0.03	d

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=0.15301 **Error:** 0.0029 **gl:** 8

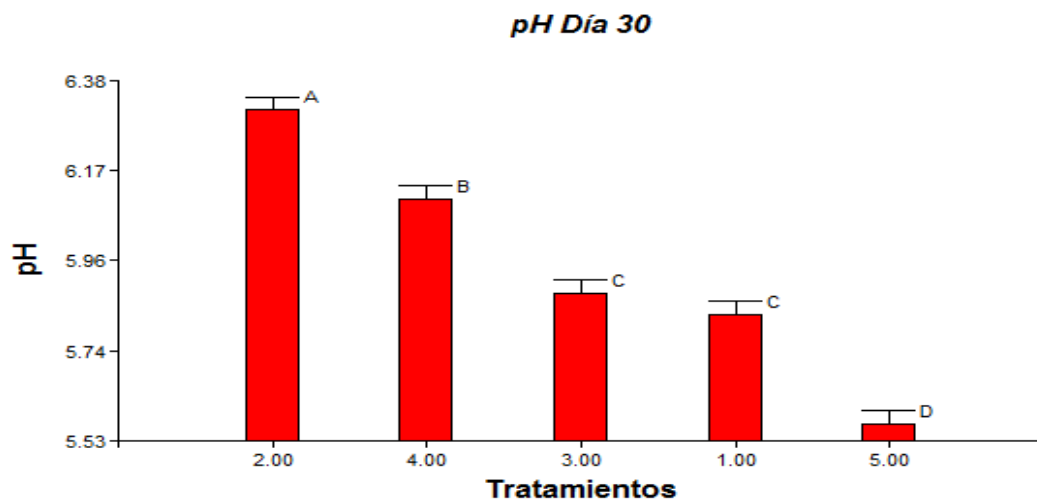


Figura 54. Prueba de significancia de tukey pH día 30.

Tabla 43 *Análisis estadísticos pH en día 60.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 30	15	0.79	0.64	1.74

Tabla 44 *Análisis de la varianza, de pH en día 60 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	0.33	0.06	5.15	0.0187
Replicas	3	0.01	3.4 E-03	0.32	0.7378
Tratamientos	4	0.32	0.08	7.57	0.0079
Error	8	0.09	0.01		
Total	14	0.42			

Tabla 45 *Ponderación de pH de tratamientos en día 60 (SC tipo III).*

Tratamientos	Medidas	n	E.E		
2.00	6.23	3	0.06	a	
4.00	5.99	3	0.06	a	b
1.00	5.88	3	0.06		b
5.00	5.85	3	0.06		b
3.00	5.84	3	0.06		b

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=0.29206 **Error:** 0.0107 **gl:** 8

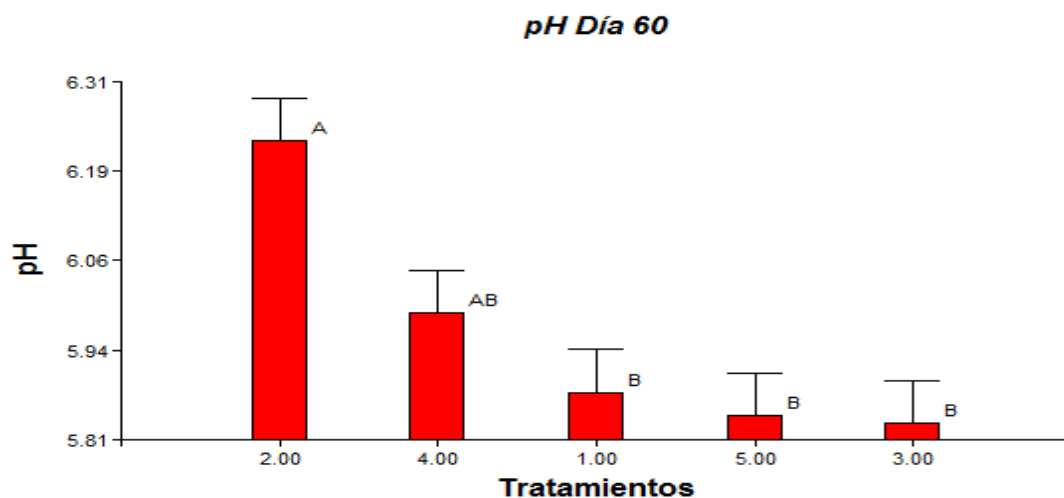


Figura 55. Prueba de significancia de tukey pH día 60.

Tabla 46 *Análisis estadísticos pH en día 90.*

Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV
Día 30	15	0.80	0.66	2.44

Tabla 47 *Análisis de la varianza, de pH en día 90 (SC tipo III).*

FV	GL	SC	CM	F	p-Valor
Modelo	6	0.68	0.11	5.46	0.0159
Replicas	2	0.15	0.07	3.59	0.0773
Tratamientos	4	0.53	0.13	6.39	0.0131
Error	8	0.17	0.02		
Total	14	0.85			

Tabla 48 *Ponderación de pH de tratamientos en día 90 (SC tipo III).*

Tratamientos	Medidas	n	E.E		
2.00	6.25	3	0.08	a	
3.00	5.90	3	0.08	a	b
5.00	5.89	3	0.08	a	b
4.00	5.77	3	0.08		b
1.00	5.71	3	0.08		b

Medidas con una letras común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey **Alfa**=0.05 **DMS**=0.40643 **Error:** 0.0208 **gl:** 8

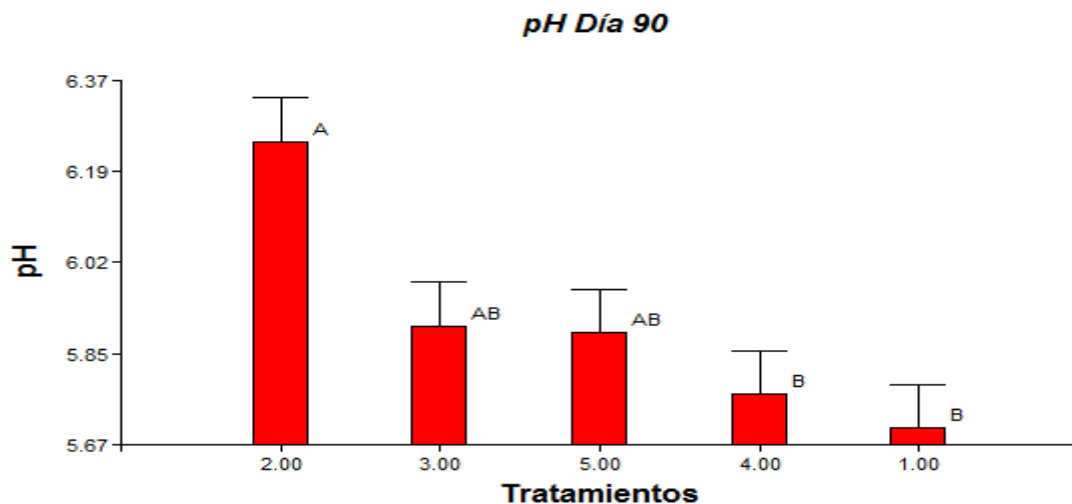


Figura 56. Prueba de significancia de tukey pH día 90.

ANEXO A-3

ALIMENTOS PARA ANIMALES. ALIMENTOS BALANCEADOS PARA AVES DE PRODUCCIÓN ZOOTÉCNICA. REQUISITOS. NTE INEN 1829:2014. Primera revisión

1.4.1 OBJETO

Esta norma establece los requisitos que deben cumplir los alimentos balanceados destinados a la alimentación de aves de producción zootécnica.

1.4.2 ALCANCE

- ✓ Esta norma aplica para alimentos balanceados para todas las especies de aves de engorde, reproductoras y ponedoras.
- ✓ Esta norma se aplica a los alimentos balanceados que se comercializan en forma de harina, pellets y migas.

1.4.3 DEFINICIONES

- ✓ Para efectos de esta norma se adoptan las definiciones contempladas en la NTE INEN 1643, y las que a continuación se detallan:
- ✓ *Alimento balanceado para aves de producción zootécnica.* Es el alimento para ser suministrado durante la o las fases de un programa de alimentación para aves de producción zootécnica (aves de engorde, reproductoras y ponedoras) y están en función de la especie, genética, del fin productivo y de otras variables.

- ✓ *Ave de Engorde.* Es un animal cuyo fin de producción es la obtención de carne y coproductos.
- ✓ *Ave Reproductora.* Es un animal cuyo fin de producción es la obtención de huevos fértiles.
- ✓ *Ave Ponedora.* Es un animal cuyo fin de producción es la obtención de huevos para consumo.
- ✓ *Huevo fértil.* Es un óvulo fertilizado que contiene un embrión viable cuya principal finalidad es perpetuar la especie.

1.4.4 CLASIFICACIÓN

Los alimentos balanceados para aves según el objetivo de producción zootécnica se clasifica en:

- ✓ Alimentos para aves de engorde
- ✓ Alimentos para aves reproductoras
- ✓ Alimentos para aves ponedoras
- ✓ Los diferentes tipos de alimentos balanceados para aves, se definirán acorde a los programas, planes y/o sistemas de alimentación de cada granja y empresa balanceadora.

1.4.5 DISPOSICIONES GENERALES

- ✓ El alimento balanceado debe tener las características físicas, químicas, y biológicas aptas para la alimentación de las aves de producción zootécnica.

- ✓ El alimento balanceado debe estar libre de insectos (insectos vivos o partes de éstos, huevos o larvas), plaguicidas, elementos extraños y de adulterantes.
- ✓ El alimento balanceado no debe contener ingredientes o aditivos que se encuentren de uso prohibido por la Autoridad Nacional Competente.
- ✓ Los ingredientes para alimentos balanceados deben obtenerse de fuentes seguras, y someterse a un análisis de riesgos desde el punto de vista de la inocuidad de los alimentos.

1.4.6 REQUISITOS

- ✓ Requisitos generales
- ✓ Los alimentos balanceados deben cumplir con una homogeneidad de mezclado de los ingredientes no menor al 90% (coeficiente de variación menor o igual al 10%). El método de ensayo se realizara de conformidad con el método *AOAC 969.10
- ✓ El alimento balanceado debe cumplir con la composición declarada en el rotulado con los rangos de tolerancia establecidos en la tabla 03.
- ✓ La verificación de la composición declarada en el rotulado debe realizarse con los análisis bromatológicos de la tabla 4.

Tabla 1 *Métodos de Ensayo para los análisis bromatológicos*

Parámetro (%)	Método de ensayo	Tolerancias
Proteína Cruda	ISO 5983-1	±3 puntos porcentuales del contenido declarado para proteína cruda igual o superior al 24%.
Fibra cruda	ISO 6865	±2,5 puntos porcentuales del contenido declarado para proteína cruda entre el 8% y el 24 %.
Grasa Cruda	ISO 6492	±1,7 puntos porcentuales del contenido declarado para fibra cruda inferior al 10%.
Cenizas	ISO 5984	±2,5 puntos porcentuales del contenido declarado para grasa cruda entre el 8% y el 24%
Calcio	ISO 6490-1	±1 punto porcentual del contenido declarado para cenizas.
Fósforo	ISO 6491	± 1 punto porcentual del contenido declarado para calcio.
		±1 punto porcentual del contenido declarado para fósforo total.

Tomada de (INEN, 2014)

1.4.7 REQUISITOS ESPECÍFICOS

- ✓ Requisito físico-químico. El alimento balanceado debe cumplir con el requisito indicado en la tabla 5.

Tabla 2 *Requisito físico-químico de los alimentos balanceados*

Requisito	Valor		Método de Ensayo
	Mínimo	Máximo	
Humedad %	-	13,0%	ISO 6496

- ✓ Requisitos microbiológicos. El alimento balanceado debe cumplir con los requisitos indicados en la tabla 06.

Tabla 3 *Requisitos microbiológicos de los alimentos balanceados*

Microorganismo	Caso	n	C	m	M	Método de ensayo
Enterobacteriaceae ufc/g	2 ¹	5	2	10 ²	10 ³	ISO 21528-1
<i>Salmonella</i> *	10 ²	5	0	Ausencia /25g	-	ISO 6579 NTE INEN 1529-15

*Evaluar *Salmonella* cuando el resultado de *Enterobacteriaceae* un riesgo para la inocuidad.

Dónde:

Caso: Rigurosidad del muestreo y las condiciones de uso.

(1) El caso 2 es para una contaminación general, sin cambios en el riesgo

(2) El caso 10 es un peligro serio que usualmente no amenaza la vida, las secuelas son raras, de duración moderada sin cambios en el riesgo

n: número de muestras de lote que deben analizarse

c: número de muestras defectuosas aceptables con resultados entre m y M

m: límite de aceptación

M: límite de rechazo

- ✓ Contaminantes. El límite máximo de aflatoxina B1 en el alimento balanceado debe cumplir con los requisitos indicados en la tabla 7.

Tabla 4 *Contaminantes*

Contaminante	Requisito	Método de Ensayo
Aflatoxina B1	20 µg/kg (ppb)	ISO 17375 AOAC 990.32*

*Métodos generales recomendados

- ✓ Los alimentos balanceados se ajustarán a los límites máximos de residuos de plaguicidas establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius, CAC/LMR 01 vigente.

1.4.8 INSPECCIÓN

- ✓ El muestreo se debe efectuar de acuerdo con la Norma ISO 6497

Criterios de aceptación y rechazo

- ✓ Si la muestra ensayada no cumple con uno o más de los requisitos indicados en esta norma, se debe rechazar el lote. En caso de discrepancia se debe repetir los ensayos sobre la muestra reservada para tales efectos. Cualquier resultado no satisfactorio en este segundo, es motivo para rechazar el lote.

1.4.9 ENVASADO Y EMBALADO

- ✓ Los empaques deben ser de material resistente a la acción del producto y que mantengan la calidad del mismo sin transmitir sabores ni olores extraños. Además deben permitir el manejo conveniente del producto hasta su destino en buenas condiciones e impedir la pérdida o deterioro del producto.
- ✓ No se permite la utilización de empaques que hayan contenido alimentos para animales, fertilizantes, plaguicidas y otros productos que puedan ofrecer cualquier posibilidad de contaminación.
- ✓ En los locales de venta o almacenes los alimentos deben mantenerse separados de plaguicidas o productos afines de fácil absorción por los mismos.
- ✓ El producto debe ser almacenado en adecuadas condiciones de temperatura y humedad de acuerdo con las buenas prácticas de manejo y almacenaje.

1.4.10 ROTULADO

- ✓ Las etiquetas o rótulos en los empaques deben llevar impresa con caracteres legibles e indelebles la información requerida en la Decisión Andina para el Registro, Control, Comercialización y Uso de

Productos Veterinarios vigentes, y los que a continuación se detallan:

- ✓ 9.1.1 Análisis de composición garantizada, expresado en porcentaje con los siguientes datos:

a) Contenidos mínimos de proteína y grasa,

b) Contenidos máximos de fibra, humedad y cenizas,

- ✓ Lista de ingredientes declarados en orden decreciente de las proporciones usadas.
- ✓ Fechas de producción y número de lote
- ✓ País de origen
- ✓ Fecha de vencimiento

El producto consignado a granel debe ir acompañado por la documentación pertinente que lo ampara, la cual debe incluir la siguiente información:

- ✓ Nombre del producto.
- ✓ El análisis garantizado, expresado en porcentaje con los siguientes datos:

a) Contenidos mínimos de proteína y grasa,

b) Contenidos máximos de fibra, humedad y cenizas,

NTE INEN 1829 2014-01 -5- 2014-0262

- ✓ 9.2.3 Lista de ingredientes declarados en orden decreciente de las proporciones usadas.
- ✓ 9.2.4 Fecha de producción y número de lote
- ✓ 9.2.5 País de origen.
- ✓ 9.2.6 Fecha de vencimiento

