"Aplicación de agentes antimicrobianos orgánicos en la inhibición de Salmonella spp en harinas de pescado exportación"

Joan Susa Gómez [(1)] *
Grace Vásquez [(2)] *
Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador
jmsusag@adilisa.com [(1)]

Resumen

El control sanitario de la harina de pescado es muy importante para poder conservar sus características intrínsecas, así como las condiciones de humedad, actividad de agua y de almacenamiento. Si no se mantiene un debido control sobre la harina de pescado, podrá dar lugar a la proliferación de patógenos, salmonella spp, pseudomas, aerobios y otros microorganismos causantes del deterioro ocasionando con estos la pérdida total de la harina de pescado. El informe profesional comenzará con la realización de un análisis microbiológico de la harina de pescado a fin de determinar la carga microbiana inicial, la carga microbiana que se considerara específicamente será la de salmonella spp y aerobios totales mesófilos, si en la harina de pescado no se encontrase carga de salmonella spp y aerobios totales mesófilos se procederá a inocular la muestra. Cuando se haya constatado que la muestra está contaminada se procederá a la aplicación del producto en tres dosis diferentes (0.5 %, 0,75 % y 1%). Para la constatación de la efectividad del producto se procederá a realizar el análisis de verificación de ausencia de salmonella y reducción de los ciclos log de aerobios totales mesófilos. El periodo de observación se realizara como máximo en 45 días, tiempo que se estima que llega al destino final la harina de pescado.

Palabras Claves: *Harina de pescado, microorganismos, aerobios totales, salmonella, ácidos orgánicos, humedad, actividad de agua.*

Abstract

Sanitary control in fish meal is extremely important regarding the conservation of it intrinsic characteristics, moreover, other critical factors also regard humidity conditions; water and storage activity. If there is no adequate control over fish meal, there can be absolute certainty that pathogen proliferation such as salmonella spp, pseudomonas and other microorganisms will arise and cause the deterioration of the fish meal, leaving it useless. The professional report will start with a microbiological analysis of the fish meal in order to determine the initial microbial load, which will focus on the previously mentioned salmonella spp and total aerobial mesophiles pathogens. If the fish meal shows no prescence of either microorganism, the sample will be inoculated and by the time the sample's contamination is confirmed, the addition of the product will follow in three different concentrations (0.5 %, 0.75% and 1%). In order to confirm the product's efficacy, there will be a verification analysis, examining salmonella absence and aerobial mesophile log cycle reduction. The observation period will have a maximum deadline of 45 days, which is the estimated time the fish meal will take to reach it's final destination.

Keywords: *fish meal, microorganisms, total aerobial, salmonella, organics acids, humidity, water activity.*

Introducción

La harina de pescado es una importante fuente de proteínas y rica en vitaminas y minerales y con un alto valor biológico básicamente en la elaboración de alimentos para animales.

Considerando que la harina de pescado es un buen sustrato, rico en proteínas la misma que por su naturaleza es de origen animal este tiende a deteriorarse muy fácilmente con ciertos microorganismos los mismos que son aerobios mesófilos, Clostridium, E. Coli, Pseudomonas, Shiguella, Salmonella. Los ácidos orgánicos son utilizados como preservantes de materias primas (propiedades antifúngicas y bactericidas). Los más utilizados como conservantes son el ácido fórmico (fuerte bactericida) y el ácido propiónico (potente antifúngico) y como acidificantes el ácido cítrico y el fumárico.

Capitulo 1

1. GENERALIDADES

1.1 Harina de Pescado.

La harina de pescado es un polvo fino obtenido del cocinado, prensado, secado y molido de la materia prima (pescado). Es una fuente de alimentación, con un alto contenido en proteínas y rica en vitaminas y minerales, que es usado como ingrediente en la elaboración de alimentos balanceados para la avicultura, la acuicultura, la ganadería y animales de compañía (1).

En la tabla 1 se muestran algunos datos analíticos sobre los principales componentes de la harina de pescado obtenida de diversas especies.

TABLA 1.1

PRINCIPALES COMPONENTES DE LA HARINA DE PESCADO

	Harina de pescado Tipo Blanco	Harina de pescado Tipo Arenque	Harina de pescado Tipo Sudamericano
Humedad	10	8	10
Proteína Bruta	65	72	65
Grasa Bruta	5	9	9
Cenizas Brutas	20	10	16

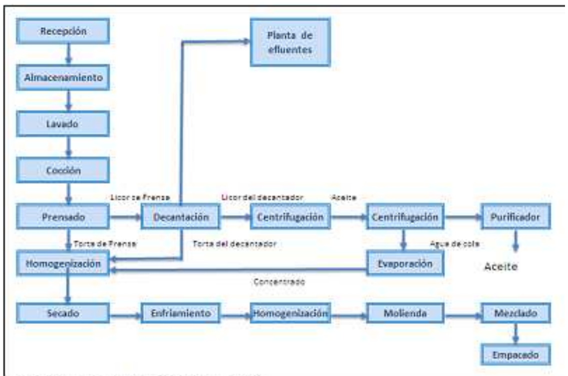
Fuente: Nueva Tecnología en la Producción de Harina de Pescado, 1993.

1.1.1 Descripción del Proceso.

En todo el mundo se utilizan diversos métodos y equipos para la obtención de la harina de pescado.
Título principal. En la figura 1.1 podemos observar el diagrama de bloques para la elaboración de la harina de pescado.

FIGURA 1.1

DIAGRAMA DE BLOQUES PARA ELABORACIÓN DE HARINA DE PESCADO



Fuente: Joan Susa Gómez, 2011.

1.1.2 Principales Componentes Químicos y Contenido Nutricional

La harina de pescado, natural y sostenible, proporciona una fuente concentrada de proteína de alta calidad y una grasa rica en ácidos grasos omega-3, DHA y EPA. El valor nutritivo de la harina depende en primer lugar del tipo de pescado. Por otra parte, la frescura del producto, la temperatura y condiciones de almacenamiento afectan a su deterioro por actividad bacteriana, enzimática o enranciamiento, y, como consecuencia, a su contenido en peróxidos, en nitrógeno volátil (TVN) y en aminas biogénicas tóxicas (4). En la tabla 1.2 se muestra los valores nutricionales de la harina de pescado.

TABLA 1.2

VALORES NUTRICIONALES DE LA HARINA DE PESCADO

Composición Química (%)	
Humedad	7,0
Cenizas	15,5
PB	66,6
EE	9,7
Grasa Verdadera (%)	80
FB	1,0
FND	1,5
FAD	1,1
LAD	0
Almidón	0
Azúcares	0

Macrominerales %	
Ca	3,80
P	2,60
P_{fitico}	0
$P_{disp.}$	2,28
$P_{dig. Av}$	1,85
$P_{dig. Porc}$	1,92
Na	0,84
Cl	1,50
Mg	0,20
K	0,85
S	0,57

Microminerales y vitaminas (mg/kg)	
Cu	8
Fe	300
Vit. E	13
Biotina	0,25
Colina	4225

Perfil de Ácidos Grasos	$C_{14:0}$	$C_{16:0}$	$C_{16:1}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{18:3}$	$C_{>=20}$
% Grasa verdadera	5,0	15,4	6,9	2,6	14,7	1,0	0,0	47,1
% Alimento	0,39	1,19	0,53	0,20	1,14	0,1	0,0	3,65

Fuente: FEDNA, 2003.

1.1.3 Información Microbiológica

Considerando que la harina de pescado es un buen sustrato, rico en proteínas la misma que por su naturaleza es de origen animal este tiende a deteriorarse muy fácilmente con ciertos microorganismos los mismos que son aerobios mesófilos, Clostridium, E. Coli, Pseudomonas, Shiguella, Salmonella,

1.1.4 Criterios para Evaluar la Calidad Harina de Pescado

Tradicionalmente la industria de las harinas de pescado se ha basado en criterios de calidad tales como proteína bruta, grasa bruta, humedad, cenizas o sal. Uno de los primeros criterios aceptados como indicación de calidad fue el del mayor contenido en proteína de algunas harinas de pescado, este es todavía un criterio muy válido en los casos en que se requieren dietas con altas concentraciones en nutrientes (2).

La capacidad de poder evaluar la calidad de un producto resulta tan importante para el fabricante y el vendedor, así como para el comprador y el consumidor final de las harinas. El fabricante no tiene ningún interés suministrar un producto que no se ajuste a las especificaciones. Los negocios a largo plazo deben resultar rentables para todas las partes interesadas y, por lo tanto, todas las partes están obligadas a buscar reglas comerciales y métodos de control en los que estén mutuamente de acuerdo.

1.2 Agente bactericida Orgánico

Los agentes orgánicos bactericidas de referencia en este informe profesional son básicamente productos orgánicos utilizados comúnmente para la descontaminación, prevención y control efectivo de bacterias, hongos y levaduras en harinas de pescado, vísceras, carne, aves, hueso, u otra de origen animal, alimentos balanceados, y materias primas en general.

El producto como se menciona anteriormente está elaborado a base de ácidos orgánicos como: ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, propianato de amonio, formiato de amonio, lactato de calcio y excipientes. En el apéndice B se detalla el proceso de elaboración del producto

Los ácidos orgánicos son sustancias fácilmente metabolizadles, con valores en energía superiores en general al de los cereales. Son productos intermedios del metabolismo animal y, en muchos casos, productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono por los microorganismos (4).

1.2 Principios activos de los principales ácidos orgánicos

El modo de acción de estos ácidos orgánicos no es totalmente conocido. Su acción beneficiosa parece estar relacionada con un incremento en la digestibilidad y retención de diversos nutrientes (minerales, proteína y energía), acompañado de una alteración de la población microbiana del tracto gastrointestinal. Le efectividad de inhibición del crecimiento microbiano depende no solo de su poder acidificante sino también de la capacidad de acido para penetrar a través de la pared celular del microorganismo en forma no disociada. Una vez dentro, el ácido se disocia y presenta un doble mecanismo de acción:

a) El Hidrogenión: reduce el pH de citoplasma, lo que obliga a la célula a incrementar sus gastos energéticos a fin de mantener su equilibrio osmótico.
b) El Anión: perjudica la síntesis de DNA, evitando la replicación de los microorganismos.

Los ácidos orgánicos son utilizados como preservantes de materias primas (propiedades antifúngicas y bactericidas). Los más utilizados como conservantes son el ácido fórmico (fuerte bactericida) y el ácido propiónico (potente antifúngico) y como acidificantes el ácido cítrico y el fumárico. Otros ácidos de uso creciente son el acético, láctico, sórbico, málico y combinaciones. Todos ellos combinan las propiedades conservantes y acidificantes. (11)

a) <u>Efectos antimicrobianos:</u> La acidificación puede reducir la colonización del tracto intestinal de la mayoría de los gérmenes patógenos, debido a que muchos de ellos tienen un pH óptimo para el crecimiento en torno a la neutralidad o ligeramente alcalino. Todos los ácidos orgánicos tienen capacidad antimicrobiana, pero la actividad depende entre otros factores de las dosis y de sus características físico-químicas. En la tabla 1.3 se muestra la concentración inhibitoria mínima de los ácidos orgánicos (g/kg. dieta). (10)

b) <u>Efecto antifúngico:</u> Los hongos son una preocupación constante para los técnicos de la industria de piensos. Aun en condiciones optimas de almacenaje, aparecen conteos elevados tanto en materia primas como piensos terminados, lo que puede reducir el contenido alimenticio y producir la liberación de sustancias toxicas (aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina y otras) capaces de dañar tanto al organismo animal como humano.

TABLA 1.3

CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA DE LOS ACIDOS ORGANICOS (g/kg. dieta)

		ACIDOS ORGANICOS		
	MICROORGNISMO	FORMICO	ACETICO	PROPIONICO
HONGOS	Aspergillus niger	1,00	1,25	5,00
	Penicillium expansum	1,00	1,00	2,50
	Fusurium nivale	2,50	2,50	2,50
	Cladosporium	5,00	5,00	2,50
BACTERIAS	Escherichia coli	1,00	1,25	5,00
	Staphylococcus aureus	1,25	2,50	2,50
	Bacillus subtilis	2,50	5,00	5,00
	Pseudonomas fluorescens	1,00	2,50	2,50

Fuente: Lípidos Toledo, 2000.

a) <u>Efecto antibacteriano:</u> La mayor parte de los gérmenes patógenos presentan un pH óptimo de crecimiento entorno a la neutralidad o en condiciones ligeramente alcalinas del medio. El mantenimiento del pH óptimo de crecimiento en torno a la neutralidad o en condiciones ligeramente alcalinas del medio. Las condiciones óptimas para el desarrollo de la salmonella corresponden a temperaturas superiores a 10ºC y pH entre 6,0 y 7,5. Los ácidos de cadena corta actúan principalmente contra bacterias gran negativas, destacando particularmente la actividad antisalmonelòsica y contra E. coli de muchos de ellos (10).

1.3 Comercialización de la Harina de Pescado

La harina de pescado de tipo Industrial es comercializada solo un 20 % en el país y el resto se exporta a los diferentes países.

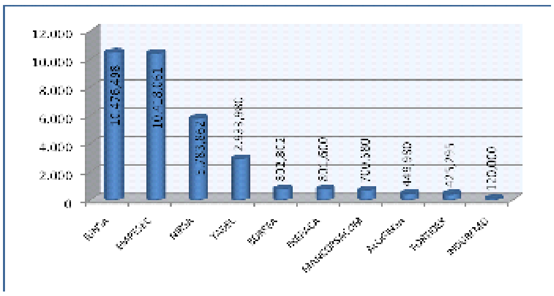
Según datos del Banco Central del Ecuador la harina de pescado representa un rubro del 1% de participación dentro de los productos de exportación. En la tabla 1.4 se muestra la clasificación de la harina de pescado de acuerdo a su contenido proteico.

1.3.1 Exportaciones y Divisas

Para tener una clara idea las cantidades producidas de harina de pescado en nuestro país, se presenta en la figura 1.2 los principales exportadores de harina de pescado en el año 2009.

FIGURA 1.2

PRINCIPALES EMPRESAS EXPORTADORAS DE HARINA DE PESCADO ENERO- JUNIO DEL 2009



Fuente: Revista Ecuador Pesquero N ° 49, 2009.

Según el BCE, el Ecuador recibió USD 39,9 millones por exportaciones de harina de pescado. El precio registró un alza del 81,1 % respecto del 2005. Pero el precio, poco a poco, empieza a caer por la sobreoferta del producto. Hoy, el valor más alto en los mercados extranjeros es de USD 1750 la tonelada. En los primeros seis meses del 2007 Ecuador vendió USD 27,3 millones. El mayor proveedor mundial es Perú, cada año ahí se procesan entre 5 y 6 millones de toneladas de anchovetas, pescado el cual se utiliza para la elaboración de la harina de pescado industrial.

1.3.2 Demanda de la Harina de Pescado

Tradicionalmente, la demanda de la harina de pescado se debía a su utilización como alimento de aves, cerdos, ganado vacuno, rumiante y ovino, sin embargo; el actual desarrollo de la acuicultura ha constituido un factor importante para el aumento de la demanda mundial de este producto, principalmente en países como Japón, Venezuela, Colombia, entre otros.

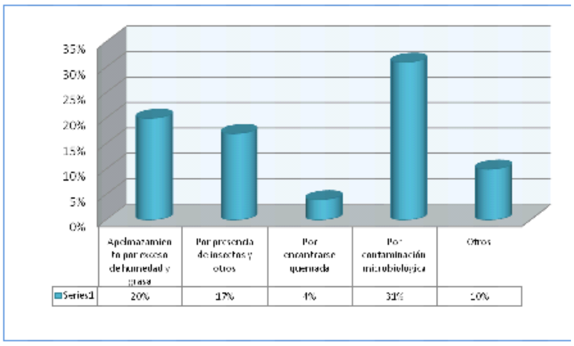
1.3.3 Principales causas de rechazo o reclamos

Las principales causas de reclamos o devoluciones se dan de acuerdo a las distintas normativas vigentes que tiene cada país para su importación, si la harina de pescado comercializada incumpliera con uno de los parámetros establecidos dará origen a reclamos al proveedor.

En la figura 1.3 se muestra los resultados de la evaluación realizada sobre los principales motivos de rechazo o reclamos que presentan las principales empresas exportadoras de harina de pescado. En el apéndice C se muestra el resultado de la encuesta realizado a la empresa JUNSA sobre las principales causas de rechazo y reclamos de la harina de pescado.

FIGURA 1.3

PORCENTAJE DE RECLAMOS DE LA HARINA DE PESCADO



Fuente: Joan Susa Gómez, 2011.

Capitulo ll

2. Planteamiento del problema y medida de control

El presente informe profesional propone determinar dosis mínimas inhibidoras del agente bactericida orgánico bajo condiciones previamente establecidas. Para ello se evaluará la eficacia de los componentes del producto en la inhibición de la salmonella spp. y reducción de aerobios totales mesófilos, durante su etapa de comercialización.

2.1 Agente bactericida aplicado

Se empleará como agente bactericida un producto desarrollado a base de mezcla de ácidos orgánicos en forma de sales, cuyos efectos antibacteriano se liberaran de forma paulatina dependiendo de la humedad del producto final, en la tabla 2.1 se detalla la composición del agente bactericida.

TABLA 2.1

PRINCIPIOS ACTIVOS DEL AGENTE BACTERICIDA A USAR SE

COMPOSICIÓN	EFECTO
Propianato de amonio	Fúngico
Formiato de amonio	Bactericida
Propianato de calcio	Fúngico
Formiato de calcio	Bactericida
Citrato de calcio	Bactericida y Fúngico
Lactato	Bactericida
Excipientes	Peso

Fuente: Joan Susa Gómez, 2011.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima empleada en el ensayo: La harina de pescado que se empleo en el ensayo fué de tipo industrial .En la tabla 2.2 se detallan los parámetros que presentó la harina de pescado.

Equipos e instrumentos empleados:

- Equipo de medición de humedad
- Equipo de medición de actividad de agua
- Balanza Analítica
- Termómetro
- Mortero
- Estufa
- Cajas de Petri
- Tubos de ensayo estériles
- Microscopio
- Pipetas
- Probetas
- Mechero
- Agitador de tubos

TABLA 2.2

CARACTERISTICAS DE LA HARINA DE PESCADO EMPLEADA

PARAMETRO	UNIDAD	RESULTADO	REQUISITOS	TOLERANCIA
Humedad	%	7	6 – 10	+/- 0,02 %
Proteína	%	65	Min 60	+/- 0,018 %
Grasa	%	9	Max 10	+/- 0,028 %
Aerobios Mesofilos	UFC/g	99x 10^{3}	Max 1 x 10^{6}	NA
Salmonella spp/25 g	Aus/Prese	Ausencia	Ausencia	NA

Fuente: Joan Susa Gómez, 2011.

2.2.1 Preparación e inoculación de la muestra

- Toma de muestra: se procedió con la toma de muestra, que consistió en colocar de 450 a 500 gramos de harina en una bolsa hermética plástica, la toma de muestra fué aséptica y esto se consiguió con la colocación de guantes al responsable de la toma y desinfección del calador que es el instrumento que permite sacar la harina de los sacos. La toma de muestra se basó en la cantidad de sacos presentes por pallet, la muestra fué extraída en un 2% del total de la población que fué de 500 sacos.

- Análisis de aerobios totales: Este análisis se lo realizó siguiendo el procedimiento establecido por la norma AOAC 18th 966.23, con modificaciones. A continuación se detalla el trabajo realizado:

  - Como diluyente se empleó Buffer Fosfato y el agar para el recuento en placa fue el Kleintong agar.

  - Para la preparación de la muestra se peso 10 +/- 0,1 gramos de muestra representativa y se la colocó dentro de una bolsa estéril, luego se procedió a realizar diluciones hasta 10 -6. Se agregó en cada una de las cajas de 18 a 20 ml de agar previamente fundido y enfriado, se dejó enfriar y una vez solidificado el agar se invirtió las cajas y estas fuerón colocadas en la incubadora por 48 horas +/- 2 horas a 35 °C +/- 1°C.

  - Transcurrido periodo de incubación se procedió con el contaje de colonias.

- Análisis de Salmonella: Este análisis se lo realizó siguiendo el procedimiento establecido por la norma AOAC 18th 967.26, con modificaciones que permite detectar la presencia de salmonella spp en la muestra de harina de pescado, a continuación se detalla el trabajo realizado:

  - La muestra fué sometida en caldo de pre-enriquecimiento (caldo selenito y tetrationato) a 35°C por 18 – 24 horas. Se inoculó 1 ml en caldo tetrationato y se procedió con la incubación del caldo por 24 horas a 43 °C.

  - Para la siembra se empleó en los agares selectivos XLDA (Agar Xilosa Lisina Dexocicolato), una placa de Agar Bismuto Sulfito , una placa de Agar Heptoen y una placa de SSA (Salmonella Shígella Agar). Las placas fuerón incubadas invertidas con la parte inferior hacia arriba a 35 °C por 24 horas.

  - La interpretación de la lectura en los agares fué: para el Agar Heptoen presencia de colinas azules con o sin centros negros, para el Agar XLDA presencia de colonias rosadas con o sin centros negros, para el Bismuto Sulfito presencia de colonias marrón, gris o negras en ocasiones con brillo metálico y del SSA presencia de colonias incoloras con puntos negros.

- Inoculación de Salmonella en la muestra: Para proceder a inocular la muestra de harina de pescado, se procedió a preparar un cultivo de la bacteria salmonella (ATCC), este cultivo fue mezclado con la muestra de la harina y se la dejó reposo. Al lapso de 24 horas se repitió el análisis de salmonella dándole un seguimiento por 5 días para verificar si la bacteria murió o se presentó una sobrepoblación de otra bacteria.

2.2.2 Aplicación de bactericida

A partir de la muestra contaminada con salmonella se procedió con la aplicación del bactericida, la mezcla sinérgica de los ácidos orgánicos fué probada a diferentes concentraciones: 0.5%, 0.75% y 1%. Las concentraciones fuerón mezcladas por un lapso de 5 minutos.

2.2.3 Métodos analíticos

- Determinación de la humedad: El método empleado para la determinación de la cantidad de agua presente en la muestra se basó en la pérdida de peso de la muestra por calentamiento en una estufa, refiriendo su peso al peso total de la muestra y expresada como porcentaje.

- Determinación de la Actividad de agua: La determinación de la actividad de agua se realizó con el equipo AQUALAB, la muestra fué colocada en un envase y colocada dentro del equipo, el equipo muestra la temperatura en que es tomada la muestra, el equipo se estabiliza y muestra la lectura de la actividad de agua.

2.3 Análisis de resultados

Se analizó el efecto del producto a diferentes dosis aplicado en la desinfección de la harina de pescado sobre la tasa de supervivencia de microorganismos aerobios mesófilos y salmonella; el tratamiento que sea más efectivo en la reducción de los microorganismos se lo considerará como la dosis efectiva.

2.3.1 Efecto en la reducción de micro-organismos aeróbicos

En la tabla 2.3 se observa el efecto del producto a diferentes dosis, mostrando una efectividad promedia en la reducción de dos y medio ciclos Log. Por lo tanto, la dosis de 0,5 % es la concentración idónea para la reducción de aerobios, ya que una dosis mayor encarecería los costos de producción.

TABLA 2.3

CONTEO DE AEROBIOS TOTALES

DÍAS	RESULTADOS DE PRESENCIA DE AEROBIOS TOTALES MESÓFILOS ufc/g		
	DOSIS DE 0,5 %	DOSIS DE 0,75%	DOSIS DE 1%
0	30×10^2	44×10^2	30×10^2
8	64×10^2	58×10^6	42×10^2
20	1×10^1	1×10^1	1×10^1

Fuente: Joan Susa Gómez, 2011.

2.3.2 Efecto en la reducción de micro-organismos salmonella

En la tabla 2.4 se observa el efecto del producto a diferentes dosis, mostrando una efectividad en la reducción de salmonella. Por lo tanto, la dosis de 0,5 % es la concentración idónea para la eliminación de salmonella, ya que una dosis mayor encarecería los costos de producción.

TABLA 2.4

REDUCCIÓN DE SALMONELLA

DÍAS	RESULTADOS DE PRESENCIA DE SALMONELLA		
	DOSIS DE 0,5 %	DOSIS DE 0,75%	DOSIS DE 1%
0	Presencia	Presencia	Presencia
8	Presencia	Presencia	Presencia
20	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Fuente: Joan Susa Gómez, 2011.

Capitulo lll

3. Conclusiones y recomendaciones

1. Para el caso particular de la harina se comprobó que la aplicación de ácidos orgánicos y sus sales logran reducir los contajes microbianos en dos y medio ciclos log. para lo cual debe de aplicarse solo para propósitos de conservación.

2. En el caso particular de la salmonella la aplicación de ácidos y sus sales también demostraron eficiencia en la reducción de la carga microbiana. Pues, las mismas se fueron liberando de forma paulatina hasta alcanzar una concentración inhibitoria, lo que se logro entre el 8avo y 20avo día. por ello, se podría utilizar dosis de 0,5%, del producto, con carácter preventivo.

3. Las condiciones de actividad y humedad de la harina de pescado, junto con los ácidos

orgánicos empleados logran una sinergia en su conservación. Es por ello importante que las condiciones de almacenamiento antes y durante su comercialización sean las adecuadas a fin de brindarle estabilidad.

4. Con la utilización de aditivos orgánicos, evitamos efectos colaterales al consumidor final. Además, durante la manipulación del producto se debe considerar que al contener ácidos pueden ocasionar problemas de salud a quien los manipule, por lo que se recomienda el uso de equipos de protección personal y un conocimiento de la ficha de seguridad. En el apéndice C se muestra la hoja de seguridad del producto.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por ser la luz que ilumina mi camino, a mi querida esposa, mis padres, hermanos y a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron en la elaboración de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. ROJAS GORDILLO IVAN. Análisis de energía en dos puntos críticos en una industria productora de harina de pescado. Tesis de Universidad de Puerto Rico, 2005.

2. SANDBOL. Nueva tecnología en la producción de harina de pescado para piensos. Esbjerg – Dinamarca, 2009.

3. IBAGUE, Diseño de planta para el procesamiento de harina de pescado, Facultad de Agronomía, Tolima 2009.

4. FEDNA. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos (2ª ed.). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 423 pp.

5. TECNOVET, Revista de extensión. Salmonelosis: Una enfermedad que se transmite por alimentos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. N° 4.

6. MANKIN, N. Gregory. Principios de Economía. 3ª edición. España, Madrid, Pag. 535. 2004.

7. Banco Central del Ecuador. Total de Exportaciones. 2008.

8. ACRIBIA. Ecología microbiana de los alimentos 2, icmsf, editorial Acribia, 1985 pag. 467.

9. ACRIBIA. Ecología microbiana de los alimentos 1, icmsf, editorial Acribia, 1985, pag, 98,100,105,107,108,109,112.

10. ACRIBIA. Microorganismos de los alimentos su significado y métodos de enumeración, 2 da edición, icmsf, 2000. pag 5,6,7.

11. CREUS EVA. Salmonella en la alimentación animal. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 2005.

Modificado por: JSusá / Febrero 2011