



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Estudio de la composición y estabilidad química del agua electrolizada neutra, así como la formación de trihalometanos, actividad antimicrobiana y su impacto en vida de anaquel en carne de pollo”.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

M. IC. VICTOR MANUEL HERNÁNDEZ PIMENTEL

DIRIGIDA POR

DRA. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ

CO-DIRIGIDA POR

DR. YUNNY MEAS VONG

Santiago de Querétaro, Qro.

Noviembre, 2020



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

“Estudio de la composición y estabilidad química del agua electrolizada neutra, así como la formación de trihalometanos, actividad antimicrobiana y su impacto en vida de anaquel, en carne de pollo”.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M. IC. Víctor Manuel Hernández Pimentel

Dirigido por:

Dra. Blanca Estela García Almendárez

Co-Dirigido por:

Dr. Yunny Meas Vong

Dra. Blanca Estela García Almendárez

Presidente

Dr. Yunny Meas Vong

Vocal

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Secretario

Dr. Carlos Regalado González

Suplente

Dra. María Del Pilar Castañeda Serrano

Suplente

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación, fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración, o cita textual presentadas en el documento.

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe
Flavia Loarca Piña

Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Noviembre, 2020
Querétaro, Qro. México.

RESUMEN

El principal agente antimicrobiano empleado en la industria avícola es el hipoclorito de sodio (NaClO) y se ha reportado que reacciona con materia orgánica generando compuestos tóxicos como los trihalometanos (THMs). El agua electrolizada neutra (AEN) presenta diversas ventajas como su actividad antimicrobiana en productos en fresco, bajo costo de producción, menor corrosión al equipo industrial, producción *in situ*, entre otras. Se ha establecido que su composición química está conformada principalmente por ácido hipocloroso, ion hipoclorito, dióxido de cloro y ozono, sin embargo, no se ha podido confirmar su composición química mediante técnicas analíticas. El objetivo de este trabajo es evaluar el agua electrolizada neutra en aspectos como la composición química y estabilidad fisicoquímica, así como la formación de trihalometanos, actividad antimicrobiana y su impacto en la vida de anaquel de carne de pollo. No se lograron identificar las especies químicas presentes en AEN mediante voltametría, sin embargo, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se detectó el ácido hipocloroso (teniendo la misma señal que el ion hipoclorito) y dióxido de cloro. El pH y ORP se mantienen constantes mientras que la CLT de AEN disminuye 20% si no es almacenada en refrigeración. En un cultivo mixto de *S. Typhimurium* ATCC 14028 Na^+ y *S. Infantis* Na^+ . La concentración mínima inhibitoria para el AEN fue de 90 ppm mientras que el NaClO es de 120 ppm. Mediante microscopía electrónica de barrido, así como de fluorescencia mediante una tinción de DNA y membrana celular, se logró visualizar el daño celular en células tratadas letal y sub letalmente con AEN. No se observó diferencia ($P > 0.05$) en la reducción de *Salmonella* en canales de pollo tratadas con 50 ppm de AEN y 50 ppm de NaClO. En la carne de pollo tratada con AEN se observó un menor cambio de color y pH ($P > 0.05$). Además, se observó diferencia significativa en NBVT entre AP y AEN al comparar todos los tratamientos mientras que al comparar únicamente AEN y NaClO si hubo diferencia significativa. No se encontraron THMs en carne de pollo tratadas con 50 ppm de AEN ni NaClO. Con tratamientos ≥ 100 ppm de AEN se detectó y cuantificó $CHCl_3$, mientras que con tratamientos similares de NaClO se detectaron y cuantificaron $BrCHCl_2$ y $CHBr_3$. En general, se pudo ver que el AEN presenta actividad antimicrobiana similar al NaClO ante patógenos en carne de pollo y un mayor control ante la microbiota natural y propiedades fisicoquímicas durante la vida de anaquel. Sin embargo, el principal hallazgo fue que al comparar NaClO con AEN, éste último genera una menor cantidad de THMs en carne de pollo en caso de exceder la concentración de cloro permitida en EUA (> 50 ppm). Se propone continuar este trabajo con la aplicación de AEN en una prueba piloto en línea de producción, así estudiar su efectividad en otras áreas como desinfección de granjas, transportes, equipos de procesamiento, o incluso analizando si promueve otros cambios fisicoquímicos en la carne.

Palabras Clave: Canales de pollo, intervención antimicrobiana, trihalometanos, agua electrolizada neutra

SUMMARY

Sodium hypochlorite (NaClO) is the most common antimicrobial agent used during poultry production, but it has been reported that after reacting with organic matter, toxic compounds such as trihalomethanes (THMs), are generated. Some advantages of neutral electrolyzed water (NEW) are antimicrobial activity in fresh products, low production cost, less industrial equipment corrosion, *in situ* production, among others. It has been stated that its chemical composition comprises hypochlorous acid, hypochlorite ion, chlorine dioxide and ozone nevertheless it has not been confirmed by analytical methods. The aim of this research is to evaluate neutral electrolyzed water about its chemical composition and stability, as well as, THMs formation, antimicrobial activity and shelf life on chicken meat. Voltammetry did not allow to determine NEW chemical composition. However, hypochlorous acid and chlorine dioxide were detected by gas chromatography coupled to mass spectrometry. ORP and pH valuer remain constant while chlorine concentration decreased 20% if not stores under refrigeration. Against a mixed culture of *S. Typhimurium* ATCC 14028 *Na⁺* y *S. Infantis* *Na⁺*, the minimal inhibitory concentration was 90 ppm with NEW meanwhile 120 ppm of NaClO were required. By using scanning electron microscopy as well as fluorescence microscopy using dyes for DNA and cell membrane, cell swelling and morphological changes were visualized on treated cells with lethal and sub lethal NEW treatments. No significant difference was observed between 50 ppm of NEW and 50 ppm of NaClO treatments against *Salmonella* on chicken carcasses. Chicken meat treated with 50 ppm NEW showed lower ($P>0.05$) pH and color change than NaClO 50 ppm treatment. However, significant difference was observed in NBVT between AP and NEW treatments when comparing all treatments, but if comparison was only between NEW and NaClO, difference ($P>0.05$) was observed. No THMs were detected on chicken meat using 50 ppm of either antimicrobial agent. Only CHCl_3 , was quantified after ≥ 100 mg/L NEW treatments, whereas two other THMs, CHBr_3 and BrCHCl_2 , were generated after similar concentration of NaClO treatments. In general, it could be seen that NEW has similar antimicrobial activity against pathogens, similar to NaClO in chicken meat, as well as a higher control to natural microbiota and physicochemical properties during shelf life. However, the main finding when comparing NaClO with NEW, was that NEW used in an over chlorination generated lower amount of THMs in chicken meat. It is proposed to continue this work, applying NEW treatment in a pilot test on a production line, thus analyzing its antimicrobial effectiveness in other areas such as farm and equipment sanitizing or analyzing whether it promotes other physicochemical changes in meat.

Key words: Chicken carcasses, antimicrobial intervention, trihalomethanes and neutral electrolyzed water.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por la beca de doctorado con número de registro 423812, otorgada durante el periodo 2013-2017.

A la **Universidad Autónoma de Querétaro**, por el apoyo a mi formación profesional y personal.

A la **Dra. Blanca García**, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A la **Dra. Blanca García, Dr. Yunny Meas, Dr. Gerardo Nava, Dra. Pilar Castañeda y Dr. Carlos Regalado**, por todas sus aportaciones hechas para el proyecto.

Al **Dr. Jose Luz González y Dr. Yunny Meas**, por su paciencia y conocimiento brindado en el área de electroquímica.

Al **M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes**, por su siempre atenta y profesional disposición y enseñanza para el uso del cromatógrafo. Quiero externarle mi total inconformidad al haberlo excluído como autor en el artículo, es algo que jerárquicamente me inmovilizó y pudo comprometer más mi grado académico. Tiene mi total admiración, como professor y persona.

.....
Al **Dr. Castaño**, por enseñarme lo que es no tener la mínima empatía con alumnos ni sentido docente, dejando claro que, el grado académico ni el SNI no forman al alumno.

A la **Dra. Blanca**, por mostrarme hasta donde es capaz de llegar mi paciencia con sus ofensas, cambios de humor y regaños por su alta capacidad de olvidar sus propias instrucciones.

“Educo en la verdad y en el honor” / “Por mi raza hablará el espíritu”

DEDICATORIAS

A mis padres y hermano, por su total e incondicional apoyo y estar conmigo en los momentos de éxito y sobre todo de frustración y estrés, y hacerme sentir siempre su confianza y respaldo.

A Diana por todo su apoyo, tolerancia, y comprensión. Gracias por decidir compartir tu vida conmigo y cerrar con broche de oro este ... ciclo, dando un color y sabor diferente en mi vida.

A mi Valentina, que desde tu existencia revolucionaste mi vida, y das un nuevo sentido a cada momento.

A Rodrigo y familia, por compartir tus momentos de vida, reflexiones, y espacio. Demuestras que, la Amistad no depende del tiempo juntos sino de la calidad del tiempo y momentos compartidos.

A mis amigos, que tuve la fortuna de ir colectando y mantener durante este proceso, dentro y fuera del laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	2
2.1. Carne de pollo	2
2.1.1. <i>Salmonella</i> en la carne de pollo	3
2.1.2. Parámetros fisicoquímicos de carne de pollo.	5
2.1.3. Procesamiento de la carne de pollo	6
2.2. Intervención antimicrobiana durante el procesamiento de carne de pollo	8
2.2.1. Intervención antimicrobiana con hipoclorito de sodio	11
2.2.2. Formación de Trihalometanos (THMs)	12
2.3. Aplicación general del agua electrolizada	13
2.3.1. Composición química del AEN	15
2.3.2. Mecanismo de acción del AEN	18
2.3.3. Aplicación del agua electrolizada en carne	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVO GENERAL	22
4.1. Objetivos Específicos	22
5. HIPÓTESIS	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1. Composición química de AEN	24
6.1.1. Elaboración de AEN en CIDETEQ	24
6.2. Propiedades fisicoquímicas de AEN	25
6.2.1. Determinación del pH de AEN	25
6.2.2. Determinación del Potencial de óxido-reducción de AEN	26
6.2.3. Determinación la concentración de Cloro total por método iodométrico	26
6.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de AEN y NaClO	27
6.3.1. Material biológico	27
6.3.1.1. Activación de cepas	27

6.4. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de AEN y NaClO sobre <i>Salmonella</i>	28
6.5. Determinación del efecto de AEN en la estructura/superficie de células de <i>Salmonella</i> mediante microscopía de fluorescencia	28
6.7. Actividad antimicrobiana de AEN y NaClO ante <i>Salmonella</i> en medio semisólido	30
6.8. Actividad antimicrobiana de AEN y NaClO ante <i>Salmonella</i> en canales de pollo	30
6.8.1. Material biológico	30
6.8.2. Reto microbiológico ante <i>Salmonella</i>	31
6.9. Determinación de actividad antimicrobiana sobre BMAs y coliformes totales, así como parámetros fisicoquímicos	32
6.9.1. Material biológico	32
6.9.2. Determinación de bacterias mesófilas aerobias por vaciado en placa	33
6.9.3. Determinación de coliformes totales por conteo en placa	33
6.9.4. Determinación de color	34
6.9.5. Determinación de pH	34
6.9.6. Determinación de Nitrógeno Volátil Total	34
6.9.7. Determinación de la técnica para la detección y cuantificación de los THMs	35
6.9.7.1. Material biológico	35
6.9.7.2. Método cromatográfico	35
6.9.7.3. Detección y cuantificación de THMs	36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1. Determinación de la composición química de AEN	38
7.1.1. Voltametría	38
7.1.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	41
7.2. Determinación de la estabilidad fisicoquímica de AEN durante su almacenamiento	42
7.2.1. Determinación de la concentración de CLT	42
7.2.2. Determinación de pH	43
7.2.3. Determinación del Potencial de óxido-reducción	44
7.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de AEN y NaClO	46
7.3.1. Actividad antimicrobiana de AEN y NaClO sobre <i>Salmonella</i>	46
7.3.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de AEN y NaClO sobre <i>Salmonella</i> en medio semisólido	47

7.3.3. Visualización del efecto antimicrobiano de AEN mediante microscopía de fluorescencia	49
7.3.4. Visualización del efecto antimicrobiano de AEN mediante microscopía electrónica de barrido	51
7.3.5. Actividad antimicrobiana de AEN y NaClO sobre <i>Salmonella</i> en canales de pollo.	55
7.3.6. Actividad antimicrobiana de AEN y NaClO sobre bacterias mesófilas y coliformes totales	57
7.4. Determinación de parámetros fisicoquímicos en carne de pollo durante vida de anaquel	61
7.4.1. Determinación de pH	61
7.4.2. Determinación de NBVT	62
7.4.3. Determinación de color	64
7.4.4. Detección y cuantificación de los THMs	67
8. CONCLUSIONES	73
9.- BIBLIOGRAFÍA	75

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Páginas
1	Brotos de salmonelosis por consumo de carne de pollo en EUA	12
2	Etapas del procesamiento de carne de pollo	15
3	Intervenciones antimicrobianas reportadas en carne de pollo	18
4	Reacciones químicas reportadas durante la obtención de AEN	24
5	Tratamientos aplicados en las canales de pollo inoculadas con <i>Salmonella</i>	38
6	Tratamientos aplicados en canales de pollo para estudio durante vida de anaquel sobre microbiota natural	39
7	Población sobreviviente de <i>Salmonella</i> después de tratamientos con AEN y NaClO en canales de pollo	63
8	Detección de THMs en canales de pollo tratadas con AEN y NaClO a 50 ppm CLT a 2 – 4 °C durante 90 min	77
9	Cuantificación de THMs en piernas de pollo después de la intervención antimicrobiana de AEN y NaClO	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Diagrama de estabilidad de los alimentos, en función a su disponibilidad de agua	15
2	Diagrama de sistema de enfriamiento usado en la industria avícola	17
3	Modelo de formación de trihalometanos	22
4	Diagrama de una celda electrolítica productora de AEN	23
5	Formación de especies de cloro en función del pH	25
6	Mecanismo de acción de AEN	28
7	Voltagrama de NaClO comercial a pH 10, mostrando el efecto de la concentración mediante el incremento en la señal del ClO ⁻ .	47
8	Voltagrama mostrando el efecto de pH sobre una solución 0.005 M de NaClO comercial	48
9	Voltagrama mostrando la señal de AEN a diferentes concentraciones	49
10	Cromatograma de AEN mostrando las señales de HOCl/ClO ⁻ y ClO ₂ , obtenidas mediante CG/EM	50
11	Efecto de la temperatura sobre concentración de CLT del AEN almacenada durante un mes	51
12	Efecto de la temperatura sobre el pH de AEN almacenada durante un mes	53
13	Efecto de la temperatura sobre el potencial redox de AEN almacenada durante un mes	54
14	Actividad antimicrobiana sobre células planctónicas de un cultivo mixto de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 <i>Na⁺</i> y <i>S. Infantis</i> <i>Na⁺</i> de: a) AEN y b) NaClO	55
15	Actividad antimicrobiana sobre un cultivo mixto de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 <i>Na⁺</i> y <i>S. Infantis</i> <i>Na⁺</i> en medio semisólido de: a) NaClO y b) AEN	57
16	Micrografías de células planctónicas de un cultivo mixto de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 <i>Na⁺</i> y <i>S. Infantis</i> <i>Na⁺</i> teñidas con el kit <i>Baclight Live and Death</i> [®]	59

17	Micrografías obtenidas por SEM de células planctónicas de un cultivo mixto de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 <i>Na⁺</i> y <i>S. Infantis Na⁺</i>	61
18	Micrografías obtenidas por SEM de células planctónicas de <i>S. Typhimurium</i> tratadas con fosfato trisódico	62
19	Micrografías obtenidas por SEM de células planctónicas de <i>S. Typhimurium</i> tratadas con cloruro de cetilpiridinio	63
20	A) Canales empleadas por tratamiento, B) Inóculo en el interior de la cavidad gastrointestinal, C) Tratamiento por inmersión, D) Lavado de cada canal completa para recuperación de población sobreviviente a cada tratamiento	64
21	Crecimiento de la población sobreviviente de BMAs en canales de pollo tratadas durante 90 min a 2-4 °C con AEN (50 ppm de CLT), NaClO (50 ppm de CLT) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel	67
22	Crecimiento de la población sobreviviente de coliformes totales en carne de pollo tratada durante 90 min a 2-4 °C con AEN (50 ppm de CLT), NaClO (50 ppm de CLT) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel	69
23	Comportamiento del pH en carne de pollo tratada con AEN (50 ppm), NaClO (50 ppm) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel	70
24	Cuantificación de nitrógeno volátil total en carne de pollo tratada durante 90 min a 2-4 °C con AEN (50 ppm de CLT), NaClO (50 ppm de CLT) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel	72
25	Determinación del cambio de color total (ΔE) en canales de pollo tratadas durante 90 min a 2-4 °C con AEN (50 ppm de CLT), NaClO (50 ppm de CLT) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel	73
26	Fotografías donde se evidencia el cambio de color de canales de pollo tratadas durante 90 min a 2-4 °C con AEN (50 ppm de CLT), NaClO (50 ppm de CLT) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel	74
27	Fotografías donde se evidencia una coloración morada dónde hay hematomas o presencia de sangre en las canales de pollo tratadas durante 90 min a 2-4 °C con AP (140 ppm).	75

28	Cromatograma con las señales detectadas de los estándares (CHCl ₃ , CHBrCH ₃ , CHClBr ₂ y CHBr ₃) y sus tiempos de retención mediante CG/EM	76
29	Cromatograma que muestra el efecto de la concentración en la intensidad de las señales obtenidas del estándar cromatográfico a diferentes concentraciones (20 ppm, 5 ppm, 1 ppm, 0.5 ppm y 0.05 ppm)	77
30	Curvas de calibración de cada THM contenido en el estándar cromatográfico donde se presentan los coeficientes de correlación, límites de detección y límites de cuantificación del método empleado	78
31	Detección de THMs presentes en piernas de pollo tratadas durante 50 min a 4-5 °C con: a) 100 ppm de CLT y b) 150 ppm de CLT de ambos agentes	80

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la producción de carne de pollo se ha incrementado (1.8 %) en los últimos años, siendo la carne más comercializada (FAO, 2015). La Unión Nacional de Avicultores [UNA] (2018) reporta que la producción de carne de pollo aporta el 34.9% del sector pecuario, equivalente a 3.47 millones de toneladas de carne al año. Querétaro es el 3° lugar nacional como productor de carne de pollo, lo que representa el 10% de la producción nacional. En México, el 68 % del pollo comercializado es procesado en rastro y requiere de al menos un lavado durante su procesamiento.

Durante el procesamiento de carne de pollo, tanto en la legislación mexicana como en la Unión Europea, está estipulado que las canales y vísceras deben ser lavadas a chorro de agua fría (NOM-194-2004). No obstante, en Estados Unidos (EUA), se realizan intervenciones antimicrobianas para optimizar la calidad microbiológica de la carne y con ello extender la vida de anaquel del producto (FSIS, 2012). El agente antimicrobiano más usado durante el procesamiento de carne de pollo es hipoclorito de sodio (NaClO), sin embargo, se ha reportado que al usarse en concentraciones mayores a 100 ppm oxida a la materia orgánica y genera compuestos volátiles, tóxicos y con potencial cancerígeno como los trihalometanos (THMs) dentro de los cuáles, el cloroformo es el más común y se considera un indicador en análisis de aguas y alimentos tratados con NaClO (EPA, 2006).

El Departamento de Agricultura en EUA (2012), admitió también en su lista de agentes antimicrobianos permitidos al agua electrolizada neutra (AEN) para el procesamiento de carne de pollo. Este agente ha mostrado tener actividad antimicrobiana en superficies inertes, y superficies de algunos alimentos como frutas y verduras, principalmente. Sin embargo, aún no existe evidencia científica sobre su efecto en la formación de compuestos tóxicos (THMs) en carne, por lo que, en este estudio se analizará el efecto de la aplicación de AEN en carne de pollo.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Carne de pollo

La carne, según la NOM-194-SSA1-2004, es la estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos provenientes de los animales para abasto, que no ha sido sometida a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas y debe ser refrigerada a una máxima temperatura en su centro térmico de 4 °C.

La FAO (2015) reportó la composición química de la carne de pollo con 75% de humedad, 22.8% de proteína, 1% de grasa y 1.3% de cenizas. Castañeda *et al.* (2013), reportaron diversos nutrientes presentes en carne de pollo como vitaminas A, D, E y K (liposolubles) y C, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantoténico y biotina, además es una fuente de calcio, magnesio, hierro zinc, potasio, fósforo, azufre, cloro y yodo.

Por otro lado, Gálvez (2006) indicó que el principal componente orgánico en la carne son las proteínas y se clasifican en: a) Miofibrilares, que conforman un 55% del tejido muscular donde hay una conversión de energía química en mecánica durante la contracción-relajación y sus principales componentes son la miosina, actina, tropomiosina y actinina. b) Sarcoplasmáticas, representan el 35% de tejido muscular en forma de polipéptidos siendo fundamentalmente globulinas y albúminas, y mioglobina. c) Proteínas del estroma, representando un 5% de proteínas musculares siendo polipéptidos que conforman el tejido conectivo (tendones, piel, huesos, capa que envuelve y soporta al músculo). De éstas, el colágeno es la proteína más abundante y contiene 33% glicina, 12% prolina, 11% de alanina y 10% de hidroxiprolina. El músculo en animales vivos y sanos presenta un valor de pH de 7, una vez sacrificado el animal se convierte en carne y debido a procesos bioquímicos (producción de ácido láctico a partir de glucógeno) existe un descenso en el pH hasta valores de 5.5 (Braña *et al.*, 2011).

Goll *et al.*, (2003) indicaron que de las proteínas que se tienen en la carne, no todas son estructurales y algunas son enzimas endógenas (propias de la carne), como las calpaínas, catepsinas, calpastatinas, creatinina kinasa, entre

otras. De éstas, la calpaina es una de las principales enzimas que tienen un papel importante en la proteólisis de las proteínas estructurales, es activada por iones de calcio y una disminución en pH gracias al ácido láctico producido a partir de glucógeno, y que promueve que la carne se suavice después del rigor mortis.

Berkhit (2010) reportó que existen también enzimas exógenas (no propias de la carne) provenientes de microorganismos que se encuentran relacionados a la carne. Como ejemplo de estas enzimas, se tiene la elastasa alcalina producida por *Bacillus* sp. y que trabaja en condiciones óptimas de 10 a 50 °C y pH de 5.5 a 6. Por otro lado, *Bacillus subtilis* también es productora de proteasas como subtilisina y otras proteasas neutras, y se ha reportado que disminuyen la dureza de la carne hasta 30% debido a la proteólisis que generan.

2.1.1. *Salmonella* en la carne de pollo

Salmonella, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo que no desarrolla cápsula, móvil flagelado, produce ácido sulfhídrico consumiendo algunos azúcares como glucosa, excepto lactosa y requiere de un potencial oxido-reducción negativo para su sobrevivencia (Madigan *et al.*, 2009). Se encuentra principalmente en intestinos de animales y su crecimiento óptimo es entre 30-40 °C, pH entre 6-8 y una actividad acuosa >0.90. Los serotipos Typhimurium y Enteritidis son los principales causantes de ETAs mostrando una dosis infectiva de 10 células (Fernández, 2008). Karuiki *et al.* (2013), señalaron que la carne es un vehículo potencial de ETAs. Según la NOM-194-2004, *Salmonella* es microorganismo indicador patógeno y por lo tanto no existe límite máximo permitido de esta bacteria en carne, por lo que se busca que los análisis reporten la ausencia de *Salmonella spp.* en / 25 g de producto.

Huang *et al.* (2015), reportaron en EUA que durante el período de 1996 a 2010, *Salmonella* fue el microorganismo patógeno de mayor incidencia y aunque cuenta con una baja letalidad su fácil transmisión ha representado un costo económico de 365 millones de dólares en atención médica. En el Cuadro (1), se muestran los brotes alimentarios reportados en los últimos años en Estados Unidos por consumo de carne de pollo.

Cuadro 1.- Brotes de salmonelosis por consumo de carne de pollo en EUA

Año	Estados	Micro-organismo	Hosp. ¹	Muerte	Conta. ²	Empresas
2018	32	<i>S. Infantis</i>	25	1	129	Varios rastros
	6	<i>Salmonella</i> l 4,[5],12:i:	11	1	25	Empire Kosher brand chicken
2016 y 2017	48	<i>S. Enteritidis</i> <i>S. Hadar</i> <i>S. Infantis</i> <i>S. Mbandaka</i> <i>S. Indiana</i>	209	3	895	Diferentes Granjas y rastros.
	4		3	0	9	Barber Foods
2015	1	<i>S. Enteritidis</i>	2	0	3	Aspen Foods
	1		2	0	9	Tyson Foods
2014	25	<i>S. Heidelberg</i>	162	0	524	Foster Farms Chicken
	39	<i>S. Typhimurium</i>	62	0	356	Privett Hatchery in Portales
2013	30	<i>S. Infantis</i> , <i>S. Lille</i> , <i>S. Newport</i> y <i>S. Mbandaka</i>	29	0	158	Mt. Healthy Hatchery
	23	<i>S. Montevideo</i>	21	1	93	Estes Hatchery
2012	27	<i>S. Infantis</i> , <i>S. Lille</i> , <i>S. Newport</i>	34	2	195	Mt. Healthy Hatchery
	10	<i>S. Hadar</i>	3	0	12	Jennie-O Turkey Burgers
2011	6	<i>S. Heidelberg</i>	30	0	190	Schreiber Processing Corp.
	10	<i>S. Chester</i>	16	0	44	Marie Callender's Chessy Chick. and Rice
2010	8	<i>L. monocytogenes</i>	-	7	46	Pilgrim's Pride Foods

¹Hosp.= Personas hospitalizadas, ²Conta.= Personas contagiadas (CDC, 2020)

2.1.2. Parámetros fisicoquímicos de carne de pollo.

El color es uno de los principales atributos de calidad debido a que se relaciona a frescura y puede determinarse mediante el espacio CIELAB con los parámetros de color L^* de luminosidad con escala de 0 (blanco) a 100 (negro), a^* con escala de valores positivos (color rojo) a valores negativos (color verde), y b^* con escala de valores positivos (amarillo) a valores negativos (azul) (Braña *et al.*, 2011). Además, se ha establecido una relación (ΔE) en función de tiempo donde se incluyen los tres parámetros para determinar el cambio total de color en una muestra (Zouaghi y Cantalejo, 2016). Para carne de pollo, se ha reportado que diversos factores como nutrición animal, manejo de animales previo a sacrificio, escaldado y enfriamiento de canales, y almacenamiento, intervienen con el color de carne de pollo (Carvalho, *et al.*, 2015 and Chan *et al.*, 2011; Filgueras, *et al.*, 2011; Wang, *et al.*, 2015). Kralik *et al.*, (2014) reportaron que el color de la carne de pollo debe estar dentro de los siguientes parámetros: L^* (44 a 53), a^* (1 a 3) y b^* (9 a 15).

El nitrógeno básico volátil total (NBVT) permite determinar la frescura y calidad de la carne, donde el contenido de NBVT es proporcional al grado de descomposición de la carne. Esto debido a la producción de amoníaco causado por la desaminación de los aminoácidos presentes en la carne. Un método ampliamente usado debido a su facilidad, costo y reproducibilidad es el método de microdifusión de Conway, donde se produce un lisado de las proteínas cárnicas provocando la desaminación que es medida mediante una titulación con ácido bórico (Min *et al.*, 2007). Balamatsia *et al.*, (2007) reportaron que la carne de pollo empacada al vacío alcanza 40 % mg de N /100 g de NBVT al sexto día de vida de anaquel, sin embargo, la carne de pollo que no esté empacada bajo estas condiciones, puede superar fácilmente y considerarse en descomposición.

De los parámetros anteriores, el pH está relacionado con otras propiedades como el color, NBVT y capacidad de retención de agua. A valores de pH cercanos a 5, la coloración de la carne de pollo es más pálida y debido a una mayor desnaturalización de las proteínas se tendrá disminución en la capacidad de retención de agua y un aumento en la producción de NBVT (Braña *et al.*, 2011).

Badui (2006), reportó que la carne de pollo al tener una actividad acuosa >0.90 presenta una elevada actividad enzimática, oxidación de grasas y fomenta el desarrollo de bacterias y hongos (Figura 1).

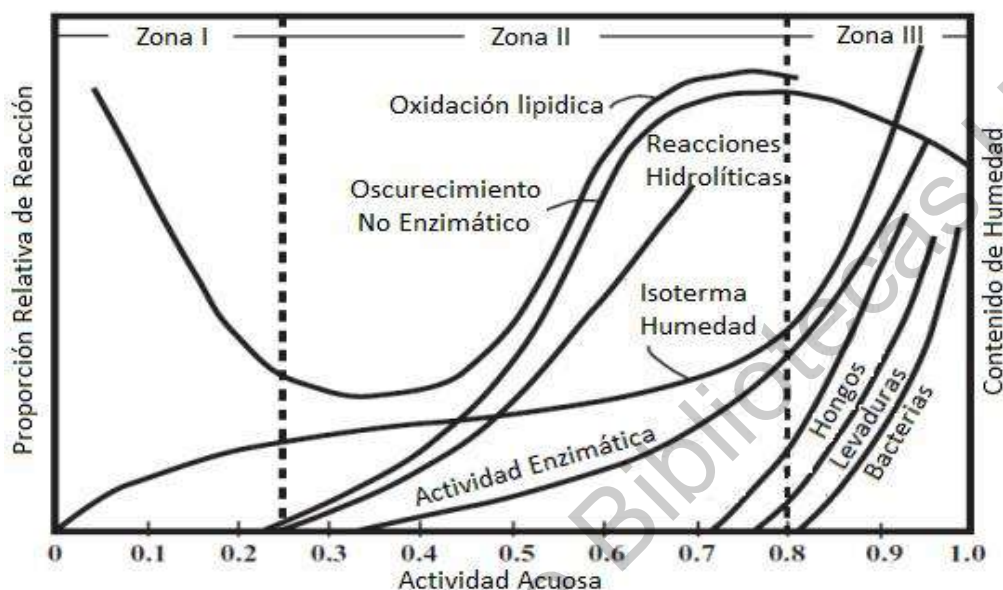


Figura 1.- Diagrama de estabilidad de los alimentos, en función a su disponibilidad de agua. (Badui, 2016)

2.1.3. Procesamiento de la carne de pollo

El procesamiento de la carne de pollo comprende desde el programa de ayuno hasta su punto de venta. Un mal manejo antes y durante la matanza puede representar pérdidas, tanto en las canales por pérdida de peso como por depreciación por hematomas, huesos rotos y/o dislocados (Castañeda *et al.*, 2013; Sams, 2001). En el Cuadro (2), se presentan las etapas del procesamiento de la carne de pollo:

Cuadro 2.- Etapas del procesamiento de carne de pollo

Etapas del Proceso	Descripción
Programa de ayuno	Debe hacerse entre 8 y 12 horas
Captura	Levantamiento manual por las patas de los animales

Transporte	Cuidar factores estresantes (T °C, humedad, etc.)
Clasificado y colgado	Por género y peso para ajustar equipos.
Aturdimiento	Solución salina 1%, 10 – 20 mA por 10 – 12 s ó 90 mA por 4 – 6 s
Degüelle y desangrado	Manual o automatizado, por 2 min
Escaldado	Suave: 53° C por 120 s; Fuerte: 62° C por 45 s
Desplume	Automatizado en cilindros o túneles con dedos de hule por 1 -2 min
Evisceración	Extracción de cloaca, buche, intestinos, vísceras rojas y pulmones. Se hace un lavado interno y externo
Enfriamiento	Duración: 90 min; temperatura: 4°C (centro térmico); además se lleva a cabo una intervención antimicrobiana con NaClO (50 ppm) y se inicia cadena de frío para inhibir procesos enzimáticos
Almacenamiento y distribución	Debe mantenerse la cadena de frío

(Castañeda *et al.*, 2013; Sams, 2001)

Del procesamiento arriba descrito, el enfriamiento se suele dar en dos tanques conocidos como enfriadores (pre-chiller y chiller, nombres técnicos en inglés) con una longitud de 10 a 50 m, donde las aves entran al primer enfriador y circulan en la misma dirección que el agua, y al finalizar pasan al segundo enfriador, donde circulan en tornillo sin fin y el flujo de agua es contrario, de tal forma que los pollos que apenas entran tendrán contacto con el agua menos fría y conforme avanzan en este proceso van entrando cada vez más en zona más fría. Las canales deben alcanzar una temperatura de 10 °C en el primer tanque enfriador durante 50 min, y posteriormente pasarán al segundo tanque donde alcanzarán 3 °C en 45 min medidos al centro de la pechuga por punción. Durante esta etapa, se detienen procesos bioquímicos de las enzimas endógenas y exógenas, evitando la proteólisis temprana de las proteínas en la carne. A continuación, se presenta en la Figura (2), un diagrama de un sistema de enfriadores usados comúnmente en la industria avícola:

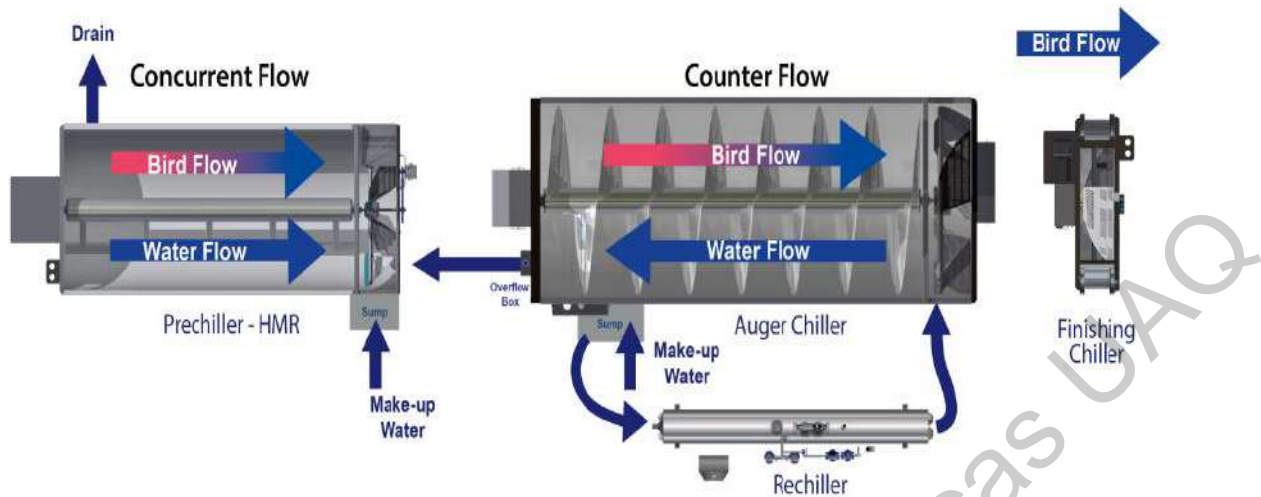


Figura 2.- Diagrama de sistema de enfriamiento usado en la industria avícola. (Barbut, 2015)

Es importante mencionar que durante el lavado de las canales, así como en el enfriamiento es donde se realizan intervenciones antimicrobianas, y en el enfriamiento es donde se inicia la cadena de frío para evitar el desarrollo de la microbiota remanente y de igual forma retrasar los procesos bioquímicos propios de la carne (Barbut, 2015; USDA, 1999).

2.2. Intervención antimicrobiana durante el procesamiento de carne de pollo

Un peligro es cualquier sustancia de origen físico (material extraño como trazas de metal), químico (residuos de pesticidas o algún otro químico empleado en el proceso) o biológico (presencia de microorganismos patógenos), que provoque que el alimento deje de ser seguro para el consumidor.

El concepto de intervención antimicrobiana refiere a los procesos físicos y/o químicos que puedan ser empleados durante al procesamiento de la carne con el fin de prevenir o controlar microorganismos patógenos y deterioradores. En EUA se hace uso de diversos agentes bajo buenas prácticas de manufactura siendo el NaClO el más común y con límite máximo permitido de 50 ppm (EFSA, 2005; FSIS, 2012). Sin embargo, en la Unión Europea y en México, la legislación estipula que la carne debe ser lavada con agua fría a presión (NOM-194, 2004).

La FAO (2007), reportó un mayor efecto antimicrobiano al emplear un lavado y enfriamiento simultáneo, en comparación con el efecto individual de un lavado y su posterior enfriado. Es importante mencionar, que el agua en los enfriadores debe estar en constante movimiento para evitar que el agua que rodea a las canales aún con temperatura corporal forme una delgada cápsula de agua tibia que impida el enfriamiento de las canales (Masri, 1985).

Moretro *et al.* (2012), indicaron varios factores que deben considerarse al elegir un agente antimicrobiano como su espectro de inhibición, facilidad y seguridad en el manejo, la ausencia de residuos tóxicos (compuestos cancerígenos), costos, relación volumen/concentración, temperatura óptima, tiempo de exposición, carga orgánica, pH así como la dureza del agua donde se aplicará. La Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) (1999), reportó que la inactivación de microorganismos patógenos puede ocurrir mediante a) destruir o alterar la estructura de la pared celular, b) Interferir con el metabolismo y c) Interferir con la biosíntesis y el crecimiento. A continuación, se presentan en el Cuadro (3), las intervenciones antimicrobianas en carne de pollo que se han reportado:

Cuadro 3.- Intervenciones antimicrobianas reportadas en carne de pollo

Agente	Microorganismo	Reducción	Condiciones	Referencia
Agua con Cl ₂	Bacterias mesófilas	2.2	21-54 °C / 55 ppm / 6 s	Northcutt, <i>et al.</i> , (2005)
		0.9	NR / 50 ppm / 5 min	Sinhamapatra, <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Campylobacter</i> <i>spp.</i>	2.6	21-54 °C / 55 ppm / 6 s	Northcutt, <i>et al.</i> , (2005)
	<i>E. coli</i>	2.3	NR / 50 ppm / 40 min	Kim, <i>et al.</i> , (2005)
		2.2	3 °C / 50 ppm / 6 s	Li, <i>et al.</i> , (2002)
		0.7	NR / 50 ppm / 5 s	Sinhamapatra, <i>et al.</i> , (2004)
	Coliformes totales	0.5	NR / 50 ppm / NR	Stopforth, <i>et al.</i> , (2007)
	<i>E. coli</i>	2	21-54 °C / 55 ppm / 6 s	Northcutt, <i>et al.</i> , (2005)
<i>Salmonella spp.</i>	1.4	22-54 °C / 55 ppm / 6 s	Northcutt, <i>et al.</i> , (2005)	
NaClO	Bacterias aerobias	2	18 °C / 1200 ppm / 15 min	Del Río, <i>et al.</i> , (2007)

		1.6	NR / 900 / 20 s	Sexton, <i>et al.</i> , (2007)
		1.1	20 °C / 1200 / 6 s	Sinhamapatra, <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Campylobacter spp.</i>	2.6	14-18 °C / 1100 / 6 s	Kemp, <i>et al.</i> , (2000)
	<i>Salmonella spp.</i>	1.1	22-54 °C / 55 ppm / 6 s	Northcutt, <i>et al.</i> , (2005)
	<i>E. coli</i>	2.3	13 °C / 500-1200 ppm / 6 s	Kemp, <i>et al.</i> , (2000)
		1.8	13 °C / 850-1200 ppm / 6 s	Kemp, <i>et al.</i> , (2000)
	Coliformes totales	1.4	18 °C / 1200 ppm / 15 min	Del Rio, <i>et al.</i> , (2007)
		1.4	20 °C / 1200 ppm / 6 s	Sinhamapatra, <i>et al.</i> , (2004)
		1.1	20 °C / 1200 ppm / 6 s	Sinhamapatra, <i>et al.</i> , (2004)
	Bacterias aerobias	2.2	35 °C / 5000 ppm / 20 s	Yang, <i>et al.</i> , (1998)
	<i>Campylobacter spp.</i>	1.8	20 °C / 5000 ppm / 30 s	
		>4.2	20 °C / 5000 ppm / 1 min	Riedel, <i>et al.</i> , (2009)
Cloruro de cetylpiridinio		2	35 °C / 5000 ppm / 20 s	Yang, <i>et al.</i> , (1998)
	<i>S. Typhimurium</i>	2	10 - 60 °C / 10 ppm / 30 s	Wang, <i>et al.</i> , (1997)
		1.7	20 °C / 100-500 ppm / 30 s	
		1.3	NR / 100 ppm / 1 min	Kim y Slavik, (1996)
AP	<i>S. Typhimurium</i>	5.7	NR / 25 ppm / 1 h	
		6.1	NR / 100 ppm / 1 h	Bauermeister <i>et al.</i> , (2008)
		6.3	NR / 200 ppm / 1 h	
AEA	<i>C. jejuni</i>	6	4-23 °C / 25-50 ppm / 10 s	Park, <i>et al.</i> , (2002)
	<i>S. Typhimurium</i>	1.5	22 °C / 38 ppm / 10 min	Al-Holy y Rasco (2015)
AEN	<i>C. jejuni</i>	0.9	NR / 50 ppm / 3 min	Rasschaert <i>et al.</i> , (2013)
	<i>L. monocytogenes</i>	1.5	22 °C / 10 ppm / 10 min	Rahman, <i>et al.</i> ,
	<i>S. Typhimurium</i>	2.3	22 °C / 10 ppm / 10 min	(2012)

NR: no reportado; AEA: agua electrolizada ácida; AEN: agua electrolizada neutra; AP: Ácido Peracético

Otro agente antimicrobiano empleado en la industria avícola en EUA, es el ácido peracético (AP) debido a su amplio espectro y se usa en combinación con peróxido de hidrógeno (FSIS, 2012). La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) (2014), reportó que usando 230 ppm por inmersión durante 2 h, se reducen hasta 3 log UFC/mL de coliformes totales y hasta 2 log UFC/mL de *Salmonella*. Por otro lado, el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, por sus siglas en inglés), indicó que no forma compuestos tóxicos, debido a que se descompone en presencia de materia orgánica formando ácido acético, acetato, oxígeno y agua (OMS, 2009).

2.2.1. Intervención antimicrobiana con hipoclorito de sodio

El NaClO es el principal agente de desinfección en México, empleado en materiales y equipos de la industria alimentaria debido a su amplio espectro bactericida y bajo costo. El cloro libre total (CLT) se presenta en forma de ácido hipocloroso, ion hipoclorito y cloro molecular disuelto y puede ser cuantificado indirectamente con el método de yodometría mediante una reacción de óxido-reducción entre yodo y tiosulfato de sodio (NMX-AA-100-SCFI-2001). También se ha reportado que puede ser detectado y cuantificado de una manera más selectiva y sensible (hasta ng) mediante voltametría clásica de barrido (Pathiratne *et al.*, 2008; Saputro *et al.*, 2010).

Badaoui y Meng (2009), indicaron que el NaClO es generado mediante electrólisis de cloruro de sodio (1 a 3 % p/v) disuelto en agua para producir cloro gas, hidróxido de sodio, e hidrógeno y con adición en exceso de hidróxido de sodio para favorecer la formación de NaClO en un medio alcalino. Algunas ventajas sobre otros antimicrobianos son: es una tecnología bien establecida, amplio espectro contra microorganismos patógenos, permite un control flexible en su dosificación. Sin embargo, presenta ciertas desventajas como es altamente irritante y tóxico para los manipuladores, y puede oxidar a la materia orgánica lo que generalmente se evidencia en decoloración o sabores indeseables en alimentos. Además, produce corrosión en equipos de acero, el costo de la cloración puede aumentarse de un 30 a 50 % por costos de la descloración para

disminuir los efectos provocados al ambiente y cuando es usado en concentraciones mayores a 100 ppm forma compuestos tóxicos como el pentanal, hexanal, heptanal, octanal, trans-2-octenal, nonanal, trans-2-nonenal, decanal, 2-2,nonadienal, trans-2-decenal, 2-4,decadienal, trans-2-undecenal y THMs por oxidación de materia orgánica (EPA, 1999; OMS, 2009).

Allen *et al.* (2000), observaron que con 50 ppm de NaClO a 5 y 15 °C, se eliminaba la población de coliformes totales, sin embargo, *Pseudomonas* prevaleció si la concentración se disminuía hasta 20 ppm. De igual forma, se ha reportado que carne tratada con NaClO incrementa el valor de pH (6.93) en la carne de pollo en comparación con otros agentes como ácido láctico y ácido peracético, alcanzando valores de 6 y 6.5, respectivamente (Moore, *et al.*, 2017).

2.2.2. Formación de Trihalometanos (THMs)

Los THMs son compuestos orgánicos volátiles que poseen en su estructura tres átomos halogenados. Son compuestos estables una vez formados ya que no se degradan fácilmente y pueden permanecer por varios días después de su formación, lo que pudiera explicar su ingesta diaria si se consume cualquier carne que haya sido expuesta a un exceso de cloro (FAO, 2009). Los THMs son considerados indicadores de compuestos tóxicos formados por reacción con el cloro. Se han estudiado principalmente el cloroformo (CHCl₃), bromodiclorometano (CHBrCl₂), dibromoclorometano (CHClBr₂) y bromoformo (CHBr₃) donde su detección y cuantificación ha sido poco estudiada en alimentos, por lo que la evidencia científica con la que se cuenta se refiere a la cloración de agua para consumo (OMS, 2009). La EPA (2006), publicó la metodología No.8260c para la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos volátiles mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

La EPA (1994), estableció el límite máximo de THMs en agua para consumo siendo de 80 µg/kg de peso (de un sólo trihalometano o combinación) mientras que la OMS (2008) estableció los siguientes límites permitidos para agua potable: 200, 60, 100 y 100 para CHCl₃, CHCl₂Br, CHClBr₂ y CHBr₃, respectivamente. La UE (2009) impuso como límite máximo permitido de ingesta

100 µg/kg de peso (de uno sólo o en combinación). Richardson *et al.* (2007), indicó que se considera como peligro químico de alto riesgo ya que la exposición o consumo es frecuente en agua y alimentos.

Robinson *et al.* (1981), mediante una extracción con éter de petróleo, cuantificaron CHCl_3 (447 µg/kg) en carne de pollo después de haberla tratado por inmersión en una solución de NaClO (50 ppm CLT) por 20 min. Posteriormente, Axtell *et al.* (2006), mediante una extracción con alcohol isopropílico, también cuantificaron CHCl_3 16 y 22 µg/kg en piel y grasas de pollo, respectivamente, después de un tratamiento de NaClO de 50 ppm sin especificar tiempo de contacto. Vizzier-Thaxton *et al.* (2010) mediante el método 8260c de la EPA, no pudieron detectar THMs en piernas de pollo tratadas con 50 ppm de NaClO durante 2 h. Sin embargo, al incrementar la concentración a 70 y 100 ppm, detectaron CHCl_3 sin poderlo cuantificarlo.

Sun *et al.* (2009) y Chu *et al.* (2013), propusieron un mecanismo de formación de los THMs que incluye disociación del cloro, formación de cloraminas, formación de ácido hipobromoso y formación de trihalometanos (Figura 3), sin embargo, no se ha confirmado dicho mecanismo de formación.

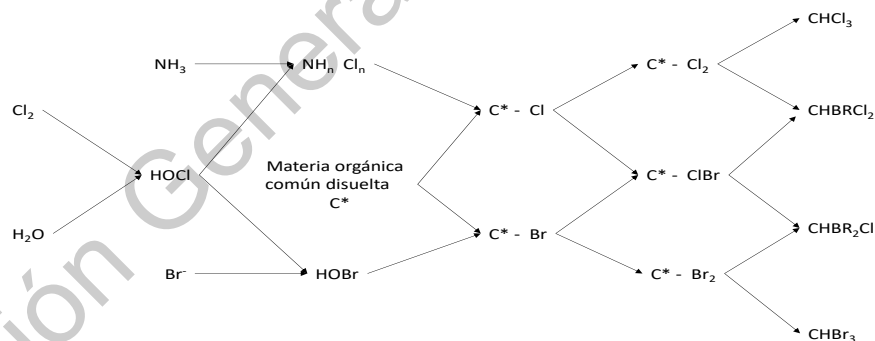


Figura 3.- Modelo de formación de trihalometanos. (Sun *et al.*, 2009)

2.3. Aplicación general del agua electrolizada

Demirci y Ngadi (2012) indicaron que la empresa Integrated Environmental Technologies (Little River, SC, USA) fue la primera marca de AE registrada ante la EPA. El Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria en Estados Unidos (FSIS, por sus siglas en inglés) (2012), reguló su uso para el procesamiento avícola a

una concentración de hasta 50 ppm, aplicándola por aspersión o inmersión, y no requiere mencionarse en etiquetado. En México, la legislación no contempla el uso de agua electrolizada (AE).

Hsu *et al.* (2005), describieron el proceso de producción de AE mediante electrólisis de una solución salina (1 a 3 % p/v). En la celda electrolítica con una membrana iónica, en el ánodo se llevan a cabo reacciones de oxidación produciendo agua electrolizada ácida (AEA) con pH de 2.3 – 2.7 y potencial redox de ~1000 mV mientras que, en el cátodo se genera agua electrolizada alcalina (AEB) con pH de 11 – 12.5 y un potencial redox -800 a -900 mV, donde se llevan a cabo reacciones de reducción (Figura 4). Cuando no se hace uso de la membrana iónica, el agua electrolizada neutra (AEN) se obtiene mezclando la fracción ácida y la alcalina alcanzando un pH de 6.5-8.5, y un potencial redox de 660 - 1080 mV (Yu-Ru *et al.*, 2008).

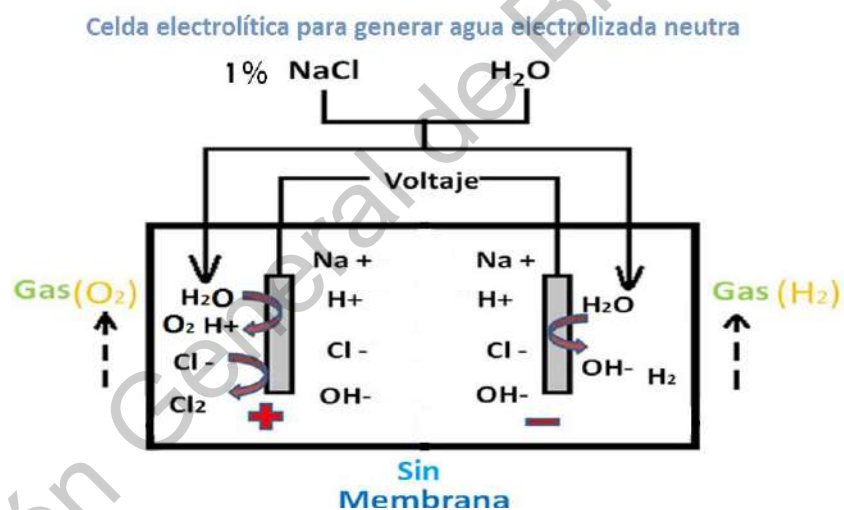


Figura 4.- Diagrama de una celda electrolítica productora de AEN.
(Rahman *et al.*, 2012).

La “activación” del AE se debe a un estado sin equilibrio termodinámico ya que las moléculas se encuentran agrupadas formando clusters (estado meta-estable de resonancia basado en la co-vibración de los dipolos moleculares) con un alto estado energético haciendo que los iones disueltos resulten más activos que los formados químicamente (Aider, 2012). Pastukhov y Morozov (2009), observaron

que las muestras de AE presentaban una mayor intensidad en sus espectros mostrando diferencia significativa con las formadas químicamente. Además, la intensidad de los espectros de AE disminuía drásticamente los primeros días después de haber sido generada y que tendían a la estabilidad con el tiempo. Al-Haq *et al.* (2005), señalaron que el costo de producción es bajo siendo de 34 centavos (en dólares) mientras que para el NaClO es de \$2.70, cloro gas licuado a presión \$1.60, hipoclorito de calcio \$2.87.

Waters *et al.* (2014), analizaron soluciones de NaClO y AEA (pH 2.5 a 4) con un gran potencial bactericida y con una alta corrosión a metales. Sin embargo, observaron que con ambos agentes con un mayor pH (6.5), la corrosión fue 10 veces menor sin perder su efectividad antimicrobiana.

2.3.1. Composición química del AEN

La composición química reportada de una marca comercial de AEN a pH neutro es ácido hipocloroso (HOCl) 75%, ion hipoclorito (ClO⁻) 15%, dióxido de cloro (ClO₂) 8% y O₃ 2%, sin embargo, puede variar la relación HOCl y ClO⁻ en función del pH (Figura 5), ya que el valor de pka del HOCl es (7.53) y por equilibrio químico la principal especie es HOCl en una proporción aproximada de (9:1) con el ClO⁻ a un pH de 6.5 (EPA, 1999; Al-Haq *et al.*, 2005).

Hsu y Kao (2004) reportaron que los parámetros fisicoquímicos de pH, ORP (potencial de oxido-reducción) y conductividad eléctrica se mantienen constantes durante su almacenamiento. Sin embargo, el CLT disminuye considerablemente si no se mantiene bajo condiciones de refrigeración.

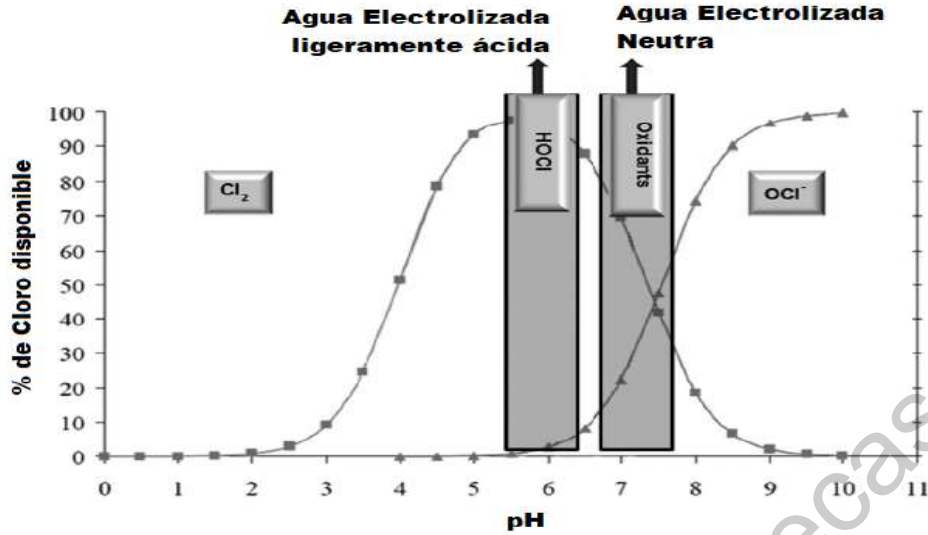


Figura 5.- Especies de cloro en función del pH. (Rahman *et al.*, 2016)

Al-Haq et al., (2005) reportaron las principales reacciones químicas que se llevan a cabo en la celda electrolítica (Cuadro 4):

Cuadro 4.- Reacciones químicas reportadas durante la obtención de AEN

Reacciones en el ánodo	Reacciones en el cátodo
$H_2O \rightarrow H^+ + OH^- + e^-$ $H_2O \rightarrow O^- + 2H^+ + 2e^-$ $O_2^- \rightarrow 2O + e^-$ Generación de radicales libres, oxígeno activo y peróxido de hidrógeno.	$2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2OH^-$ Generación de hidrógeno gas.
$3H_2O \rightarrow O_3 + 6H^+ + 6e^-$ $O^- + O_2 + O_3, O + O_2 \rightarrow O_3$ $O_2 + H_2O \rightarrow O_3 + 2H^+ + 2e^-$ Generación de ozono gas.	$2Na^+ + 2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2NaOH$ $Na^+ + OH^- \rightarrow NaOH$ Generación de hidrógeno e hidróxido de sodio.
$2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$ $4OH^- + O_2 + 2H_2O + 4e^-$ $H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$	$Na^+ + e^- \rightarrow Na$ $2OH^- + 2e^- \rightarrow 2OH^-$ $O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$

$2\text{Cl}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{Cl}^- + \text{O}_2$ <p>Generación de oxígeno gas.</p>	<p>Generación de ion hidróxido y separación del sodio</p>
$2\text{Cl}^- + \text{O}_3 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{Cl}_2 + \text{H}_2$ $2\text{Cl}^- + 2\text{O}_3 \rightarrow 3\text{O}_2 + \text{Cl}_2 + 2\text{e}^-$ <p>Generación de oxígeno gas y cloro gas.</p>	
$2\text{Cl}^- \rightarrow \text{Cl}_2(\text{g}) + 2\text{e}^-$ $2\text{HOCl} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{Cl}_2(\text{g}) \rightarrow \text{Cl}_2(\text{aq})$ <p>Generación de cloro gas y cloro disuelto.</p>	
$\text{Cl}_2(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCl} + \text{HOCl}$ $\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$ $2\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{HCl} + 2\text{e}^-$ $2\text{Cl}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HOCl} + 2\text{e}^-$ $\text{ClO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{OH}^-$ <p>Generación de ácido hipocloroso y ácido hipocloroso.</p>	
$\text{Cl}_2(\text{aq}) + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{ClO}^- + \text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}$ $\text{Cl}_2(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ClO}^- + \text{Cl}^- + 2\text{H}^+$ $\text{HOCl} \rightarrow \text{ClO}^- + \text{H}^+$ $2\text{HOCl} + \text{ClO}^- \rightarrow \text{ClO}_3 + 2\text{Cl}^- + 2\text{H}^+$ <p>Generación de ion hipoclorito.</p>	

Yu-Ru *et al.* (2008), reportaron la aplicación de AE en diversos alimentos resultando efectiva contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Enterobacter aerogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*.

LA EPA (1999) señaló que el HOCl es 80 veces más efectivo en comparación que el ClO⁻, ante *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *E. coli* y *Shigella dysenteriae*. La OMS (2009), recomendó que debe almacenarse sin exposición a la luz y en un lugar frío ya que se descompone en clorito y clorato. Cunningham and Lawrence (1977) y Fukuyama *et al.* (1986), coincidieron en que el HOCl oxida fácilmente los grupos sulfhidrilo expuestos de algunos aminoácidos, péptidos y proteínas; también rompe el anillo en los aminoácidos aromáticos por adición del cloro, sin embargo, los productos de la reacción no están definidos.

El ClO₂ presenta dos mecanismos de acción: a) altera el transporte de nutrientes en la pared celular y b) penetra en la célula e interrumpe la síntesis de proteínas. Presenta actividad antimicrobiana en rango de pH 2 – 10 y no forma cloraminas. Su principal ventaja es que no pierde su potencial antimicrobiano en presencia de materia orgánica y se emplea en concentraciones de 50 a 200 ppm (OMS, 2009). La EFSA (2005), no encontró evidencia científica sobre compuestos tóxicos formados por su uso. El ClO₂ se descompone rápidamente generando bajas concentraciones de clorito y clorato, los cuales se absorben en la carne para formar cloruros, sin presentar riesgo a la salud (OMS, 2009). Moretro *et al.* (2012), observaron que, a concentraciones de 5, 10 y 20 ppm sobre un pool de *S. enteritidis*, *S. Newport* y *S. Typhimurium* se inactivó una población de 6 log/mL con 5 min de tiempo de exposición.

El O₃ es un agente antimicrobiano permitido en Estados Unidos y Australia bajo buenas prácticas de fabricación. Se descompone fácilmente en presencia de luz, materia orgánica, nitratos, nitritos, peróxidos, metales, y óxidos de metales siendo su principal producto oxígeno. Disuelto en agua promueve la formación de HOCl y HBrO, los cuales en presencia de materia orgánica forma ion bromato y bromuro desencadenando la formación de CHBr₃ (OMS, 2009).

2.3.2. Mecanismo de acción del AEN

Aider (2012) reportó que el AEN presenta un efecto combinado actuando de forma sinérgica para la inactivación de bacterias y virus. Nachón *et al.* (2008), Leyer y Johnson (1997) y Marriott (1999), coinciden en que el mecanismo de

acción del AEN se debe a la oxidación de grupos sulfhidrilo (-SH) y aminoácidos en la pared celular afectando la respiración de las bacterias, además inhiben la síntesis de proteínas y alteran el metabolismo celular con disminución de la producción de adenosintrifosfato (ATP). Por otro lado, Wilson *et al.* (2001) y Veld *et al.*, (1983), coinciden en que el transporte activo de sustancias, mediante un gradiente electroquímico, se ve afectado por un cambio en el potencial de membrana causado por las especies actuando como donadores-receptores de electrones, así como provocando una ruptura de la membrana celular.

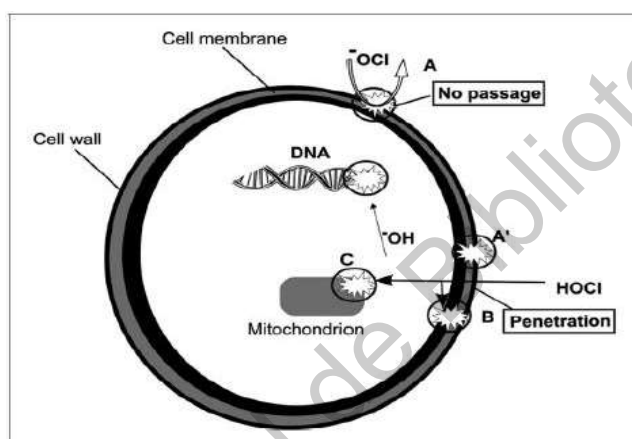


Figura 6.- Mecanismo de acción de AEN. (Fukusaki, 2006)

Fukusaki (2006) propuso un modelo (Figura 6) sobre el mecanismo de acción de AEN, explicando que el NaClO reacciona en la membrana celular oxidando proteínas estructurales, así como dedicadas al transporte pasivo. Por otro lado, el HOCl también tiene capacidad de desnaturalizar las proteínas a nivel membrana disminuyendo la capacidad de transportación pasiva, y con ellos inhibiendo el metabolismo celular, además, al ser una molécula neutra tiene capacidad de permear la membrana por lo que, al disociarse en el citoplasma reacciona con otras proteínas y enzimas vitales para los microorganismos.

2.3.3. Aplicación del agua electrolizada en carne

Aider *et al.* (2012), reportaron una reducción máxima de 1 log UFC/mL ante *Salmonella* al emplear 200 ppm de agua electrolizada ácida (AEA) en carne de

pollo. Sin embargo, también reportaron que al emplear AEA en forma de hielo no reduce significativamente la población microbiana. Fabrizio y Cutter (2004) compararon AEA (50 ppm), NaClO (25 ppm) y ácido láctico (2%) sin observar diferencia significativa en la reducción de tratamientos de NaClO y ácido láctico. El AEA atomizada por 15 s en carne de cerdo, resultó la más eficiente inactivando *Campylobacter spp.* y al aumentar los tiempos de contacto, se inactivaba también a *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Typhimurium*. Rahman *et al.* (2012), observaron una similar actividad antimicrobiana de AEN y AEA (ambos tratamientos: 50 ppm, 5, 15 y 25 °C, durante 10 min) sobre *S. Typhimurium* y bacterias mesófilas aerobias (BMA) en pechugas de pollo, alcanzando reducciones de 1.5 y 1.9 log UFC/mL, respectivamente. Por otro lado Reaschaert *et al.* (2015), observaron una reducción de 0.9 log UFC/mL de *C. jejuni* al emplear 50 ppm durante 3 min en canales de pollo.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, las legislaciones sobre producción avícola en el mundo están muy dispersas, ya que algunos países como México y Unión Europea, establecen que el lavado de canales de pollo durante su procesamiento debe hacerse con agua fría a presión, y en otros países como EUA se permiten múltiples agentes antimicrobianos que han sido y continúan estudiándose, bajo estatutos y códigos internacionales, con el fin de promover su uso y con ellos garantizar la seguridad e inocuidad alimentaria.

Dentro de los agentes antimicrobianos permitidos en EUA, el más usado es el NaClO debido a su bajo costo y amplio espectro. Referente a éste, existen algunos reportes científicos sobre cloración de agua para consumo humano y/o su aplicación como desinfectante en algunos alimentos como frutas y verduras. Sin embargo, es preocupante el uso y sobre todo el abuso de este agente antimicrobiano, ya que se ha establecido que al reaccionar con la materia orgánica genera compuestos tóxicos con alto potencial cancerígeno, lo que ha generado que se limite su uso a superficies inertes y prohibido directamente en alimentos.

Debido a lo anterior, es necesario estudiar nuevas alternativas de agentes antimicrobianos, que permitan garantizar la inocuidad alimentaria. Sobre AEN, existen algunos reportes científicos donde se demuestra su capacidad antimicrobiana debido al efecto combinado que generan los compuestos en su composición reportada. Dicha actividad antimicrobiana ha sido probada en superficies inertes como acero inoxidable comúnmente usado en la industria alimentaria e incluso en la desinfección de algunos frutos y verduras. Resulta interesante que estos reportes, indican que una de las tantas ventajas que presenta el AEN sobre el NaClO, es que no genera compuestos tóxicos al aplicarse en alimentos, pero ninguno de dichos reportes lo ha demostrado analíticamente. Además, los reportes previos han enfocado su estudio en la capacidad antimicrobiana retando a microorganismos patógenos, pero dejando de lado el análisis de microorganismos indicadores de la calidad sanitaria en la carne, como bacterias mesófilas y coliformes totales; y también han dejado de lado, el análisis fisicoquímico de la carne después del tratamiento con AEN.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el agua electrolizada neutra en aspectos como la composición química y estabilidad fisicoquímica, así como la formación de trihalometanos, su efectividad antimicrobiana y su impacto en la vida de anaquel de carne de pollo.

4.1. Objetivos Específicos

- 1) Determinar la composición química, así como las propiedades fisicoquímicas (pH, ORP y CLT) del AEN, y evaluar su estabilidad durante almacenamiento.
- 2) Comparar la actividad antimicrobiana de AEN y NaClO sobre *Salmonella* inoculada en canales de pollo, así como sobre la microbiota natural (BMAs y coliformes totales) en canales de pollo durante su vida de anaquel.
- 3) Comparar el efecto de AEN y NaClO sobre las propiedades fisicoquímicas (pH, NVT y color) de carne de pollo durante su vida de anaquel.
- 4) Detectar y cuantificar los trihalometanos generados por la intervención antimicrobiana de NaClO y AEN durante el procesamiento de carne de pollo.

5. HIPÓTESIS

El AEN presenta actividad antimicrobiana sobre un cultivo mixto de *S. Typhimurium* ATCC 14028 Na^+ y *S. Infantis* Na^+ así como sobre BMA's y coliformes totales presentes en carne de pollo. Además, el AEN debido a su pH neutro, no modifica las propiedades fisicoquímicas de la carne de pollo. Además, evita la formación de compuestos generados en su intervención antimicrobiana durante el procesamiento de carne de pollo.

Dirección General de Bibliotecas UFRQ

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Composición química de AEN

6.1.1. Elaboración de AEN en CIDETEQ

Se obtuvieron 3 muestras de AEN elaborada en el prototipo del CIDETEQ, elaboradas a una concentración de 20 g/L de NaCl. Se seleccionaron tres alícuotas de 1 L para su análisis con voltametría clásica para determinar las especies químicas presentes. De igual forma, se seleccionaron dos alícuotas cada una de 1 L y se almacenaron en frascos color ámbar uno en refrigeración (6 ± 2 °C) y el otro sin refrigeración (25 ± 2 °C). Se determinaron los parámetros pH, ORP, y concentración de CLT desde su recepción (d 0) y posteriormente se analizaron diariamente los primeros 10 días y espaciando los muestreos a 4 días durante un mes. Cada medición se determinó por triplicado expresando los resultados como el promedio \pm desviación estándar.

6.1.2. Determinación de composición química de AEN mediante voltametría

Se preparó una solución stock con NaClO de una marca comercial (Cloralex, Nuevo León, México) a una concentración de 0.005 M como estándar para la obtención de las señales del NaClO. Posteriormente, se prepararon diluciones a partir del stock (0.001, 0.002, 0.003 y 0.004 M). Se empleó un potenciostato (Princeton Applied Research 174 A Polarographic Analyzer, EUA) acoplado a un reproductor (Princeton Applied Research X-Y, RE 0074, EUA). Las condiciones empleadas en la técnica fueron: Dirección de barrido: anódico, velocidad de barrido: 2 mV / s, filtro de ruido: 0.3 mV, rango de barrido: 0 - 3 V, sensibilidad: 0.2 mA, electrodos: Trabajo: Pt, Contra-electrodo: C, y Referencia: Ag/AgCl, campo de barrido: -1000 a 3000 V y electrolito soporte: KNO₃ 0.1 M. Una vez que se obtuvo la señal del NaClO y se observó el efecto de la concentración sobre las señales obtenidas, se procedió a modificar el pH en las muestras para la obtención de las señales tanto del HOCl como del NaClO. Finalmente, ya que se

conocían ambas señales, se analizaron soluciones de AEN a las mismas concentraciones y bajo las mismas condiciones analíticas.

6.1.3. Determinación y composición química de AEN mediante voltametría cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Se preparó una solución stock de AEN a una concentración de 50 ppm y se hicieron diluciones de 40, 30, 20 y 10 ppm. El equipo empleado fue un cromatógrafo de gases (Agilent, 6850, EUA) con un inyector automático (Agilent, modelo 7683) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent, 5973 Network) y equipado con una columna capilar HP-5MS (Agilent, 30 m x 0.25 x 0.32 mm), empacada con 95% dimetil-5% difenilpolisiloxano, 1 μm del grosor de la película. Las condiciones empleadas en el proceso cromatográfico fueron: volumen de inyección 1 μL , con split 1:100, temperatura del inyector: 250°C, temperatura de la línea de transferencia: 50 °C iniciales, 1°C/min hasta alcanzar 55°C y mantener por dos minutos. El gas acarreador fue Helio 99% (v/v) ultrapuro. Posteriormente se compararon los espectros de masas obtenidos con la base de datos National Institute of Standards and Technology (NIST, por sus siglas en inglés) V8 para la identificación de los compuestos detectados.

6.2. Propiedades fisicoquímicas de AEN

6.2.1. Determinación del pH de AEN

Se procedió según Rahman *et al.* (2012b), mediante la técnica potenciométrica con un pHmetro (Hanna Instruments, 209.RI, EUA), con electrodo de platino con solución de referencia (Thermo Scientific, MA, USA) de Ag/AgCl. De cada muestra se tomó una alícuota de 20 mL para ser analizada. La muestra almacenada en refrigeración se dejó estabilizarse durante 15 minutos a temperatura ambiente. Previo a cada análisis, se calibró el equipo con soluciones estándares reguladores de pH 7 y pH 10 (J. T. Baker., Xalostoc, México). Con las muestras a temperatura ambiente, se introdujo el electrodo, en cada muestra, dejando estabilizarse la lectura en el equipo hasta que no presentó cambios en su

lectura (aproximadamente 5 minutos). Cada muestra se leyó por triplicado. Los resultados se expresan en el promedio \pm desviación estándar.

6.2.2. Determinación del Potencial de óxido-reducción de AEN

Se procedió según Rahman *et al.* (2012b). con un potenciómetro (Thermo Scientific modelo Orion Star A212, EUA), con un electrodo de platino con solución de referencia de Ag/AgCl con KCl 4M. De cada muestra se tomó una alícuota de 20 mL para ser analizada. La muestra almacenada en refrigeración se dejó estabilizarse durante 15 minutos a temperatura ambiente. Previo a cada análisis, se calibró el equipo con una solución de yoduro de potasio 0.1 M (Thermo Scientific) hasta estabilizarse en una lectura de 220 ± 3 mV. Una vez estabilizadas las muestras, se introdujo el electrodo en cada una de estas, dejando estabilizarse la lectura en el equipo hasta que no presentó cambios en su lectura (aproximadamente 20 minutos). A cada resultado se realizó un ajuste sumando 200 mV para normalizar de acuerdo con el electrodo normal de hidrógeno. Los resultados se expresan en unidades de mV, como promedio \pm desviación estándar de tres lecturas de cada muestra.

6.2.3. Determinación la concentración de Cloro total por método iodométrico

Se procedió según la NMX-100-1987 para determinar el cloro total por el método iodométrico. El cloro en solución ácida, oxida al ion yoduro a yodo, el cual se titula con solución patrón de tiosulfato de sodio, empleando almidón como agente indicador. La titulación se lleva a cabo a un pH 4, para que la reacción sea estequiométrica. Se llevaron a cabo diluciones de las muestras para estar dentro de la sensibilidad del método. Se colocaron 100 ml de muestra diluida para cada análisis en un matraz Erlenmeyer, se adicionó ácido acético concentrado (J. T. Baker) hasta obtener un pH 4. Se agregó 1 mL de yoduro de potasio (J. T. Baker) al 10% p/v. Se agitó la muestra y se dejó reposar por 5 min en la oscuridad. Finalmente, se tituló con tiosulfato de sodio 0.01 N (J. T. Baker) hasta llegar a un

color amarillo paja, y en ese momento se añadió 1 mL de almidón (J. T. Baker) y se continuó con la titulación hasta que desapareció la coloración azul formada.

$CLT \text{ (mg/L)} = ((A - B) \times N \times 35450 / \text{mL de muestra}) \times \text{factor de dilución}$

Donde:

A: volumen de tiosulfato gastado en titulación de la muestra

B: volumen de tiosulfato gastado en titulación del blanco

N: normalidad valorizada del tiosulfato de sodio

6.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de AEN y NaClO

6.3.1. Material biológico

Se obtuvieron las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Infantis* por medio del Departamento de Microbiología en la Facultad de Química, de la Universidad Autónoma de Querétaro.

6.3.1.1. Activación de cepas

Para la activación de cepas se procedió según Rahman *et al.* (2012a), donde las cepas estaban almacenadas en ultracongelación a -80 °C, en un matraz con 3 mL de Caldo Soya Trypticaseína (CST) (BD Bioxon Estado de México, México) y se incubó (Felisa, FE-132 A, México) a 37 °C por 24 hrs. Posteriormente, se tomaron 30 µL de cada tubo con su cepa desarrollada y se inoculó otro tubo con 10 mL de CST y se incubaron a 37 °C durante 5.5 horas repitiendo esta activación una vez más. Posteriormente, se llevó a cabo un doble lavado de cada cepa centrifugando a 6500 rpm durante 10 min a 4 °C. Se suspendió en 5 mL de solución salina (0.85%) para obtener una población cercana a 10⁹ UFC/mL. La población del inóculo se determinó por recuento en placa con Agar Soya Trypticaseína (AST) (Bioxon) incubándolas a 35 °C por 24 horas.

6.3.1.2. Generación de resistencia en cepas contra ácido nalidíxico

Se procedió mediante la técnica reportada por Chintagari *et al.*, (2015), donde a partir de las cepas previamente activadas, se creció cepa por separado en un tubo con 10 mL de CST adicionado con 5 mg/L de ácido nalidíxico (Nal⁺)

(Sigma-Aldrich, MO, EUA) durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, se tomó una alícuota de 200 µL y se colocaron en otros tubos con CST también adicionados con NaI⁺ en concentraciones cada vez mayores (10, 20, 30, 40 y 50 mg/L).

6.4. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de AEN y NaClO sobre *Salmonella*

Se procedió mediante la técnica reportada por Yang *et al.* (2013) donde se prepararán tubos con 9 mL de AEN y NaClO a diferentes concentraciones de cloro libre total (CLT) y un control con 9 mL de agua desionizada. Se contará con un inóculo inicial ajustado de 8 log UFC/mL de una mezcla de las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 NaI⁺ y *S. Infantis* NaI⁺. Todos los tubos de AEN y NaClO y agua desionizada se aclimatarán durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez acondicionados los tubos, se colocará 1 mL de inóculo a cada tubo de las soluciones de tratamiento y control. Se evaluará el efecto de las concentraciones de 5, 7, 9, 12, 14 ppm para AEN a los 1, 2 y 3 min de tiempo de exposición. Se evaluará el efecto de las concentraciones de 25, 50, 70, 90, 110 y 130 ppm para NaClO a los 2, 3, 4 y 5 min de tiempo de exposición. Transcurridos los tiempos de exposición se tomó 1 mL de cada tubo de tratamiento y se transfirió a 9 mL de solución de buffer neutralizante (BD Bioxon) durante 10 s para neutralizar el cloro total disponible del agua electrolizada y NaClO. Posteriormente, se realizaron diluciones seriales y se realizó un recuento en placas con agar AST + NaI.

6.5. Determinación del efecto de AEN en la estructura/superficie de células de *Salmonella* mediante microscopía de fluorescencia

Se procedió según Ercolini *et al.* (2005), donde en función de la concentración mínima bactericida, se tomó 1 mL del inóculo y se sometió en 9 mL de cada tratamiento (7 y 15 ppm de AEN, 50 y 130 ppm de NaClO) durante 2 minutos. Posteriormente, se tomó 1 mL de cada tratamiento y se filtró mediante una unidad Swinex en una membrana (Millipore Tipo HVLP, diámetro de poro 0.22

μm , color negro, MA, EUA) y se lavaron con 1 mL con solución salina (SS) 0.85 % y se dejaron secar las membranas por 3 minutos en la campana de flujo laminar.

Se tiñeron las membranas con el Kit Live/Dead BacLight™ (Life Technologies, Oregon, EUA) que contiene dos fluoróforos (Syto9 3.34 mM y Yoduro de Propidio [YP] 20 mM) mezclados en una proporción 1:1 (1.5 μL de SYTO 9 + 1.5 μL de YP) y disueltos en 97 μL de agua. Se dejaron reposar las membranas a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos. Se colocaron las membranas en un portaobjetos, y se cubrieron con un cubreobjetos para su observación en microscopio (Carl Zeiss, Axioskop 40, Alemania) a 500 nm de longitud de onda.

6.6. Determinación del efecto de AEN en la estructura/superficie de células de *Salmonella* mediante microscopía electrónica de barrido

Se procedió según Arnold y Yates (2009), donde en función de la concentración mínima bactericida, se tomó 1 mL del inóculo y se sometió en 9 mL de cada tratamiento (7 y 15 ppm de AEN; 50 y 130 ppm de NaClO) durante 2 minutos. Posteriormente, se tomó 1 mL de cada tratamiento y se filtró mediante una membrana (Millipore, diámetro de poro 0.45 μm). Se dejó secar cada membrana por 3 minutos en la campana de flujo laminar.

Se colocó cada membrana en una caja Petri pequeña, con 3 mL de formaldehído (J. T. Baker, 3%) y dejaron reposar durante 12 horas. Posteriormente, se lavaron las membranas con solución buffer de fosfatos (J. T. Baker, pH 7.2).

Se retiró la solución buffer, y adicionaron 3 mL de etanol (J. T. Baker, 15%) durante 5 minutos para cada membrana. Se repitió este procedimiento incrementando la concentración de etanol a 20, 40, 60, 85, 96 y 100%. Previo a la observación en el microscopio (Carl Zeiss, EVO 50, Alemania), debió hacerse un recubrimiento por ionización catódica (Denton Vacuum, Desk II, NJ, EUA) con oro/paladio a cada membrana.

6.7. Actividad antimicrobiana de AEN y NaClO ante *Salmonella* en medio semisólido

Se procedió mediante la técnica reportada por Hernández *et al.* (2013), donde se prepararon 200 μ L a diferentes concentraciones con AEN y NaClO. Se prepararon cajas con agar AST + NaI, y se inocularon mediante extensión en superficie con una mezcla de *S. Typhimurium* ATCC 14028 NaI⁺ y *S. Infantis* NaI⁺ con una población ajustada de 4 log UFC/mL y se incubó a 37 °C por 10 min. Posteriormente, cada caja se dividió simétricamente y se marcó para cada uno de los 6 tratamientos de AEN, y de NaClO que llevaría cada caja. Las concentraciones de los tratamientos de AEN y NaClO fueron: 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, y 150 ppm. Se tomaron 20 μ L de cada tratamiento iniciando con el de menor concentración, y se colocó la gota en el centro la cada sección correspondiente. Se continuó colocando las demás gotas de los tratamientos de mayor concentración y se dejó secar la caja en condiciones asépticas en campana de flujo laminar. Se inocularon dos cajas por cada agente antimicrobiano. Se incubaron a 37 °C, durante 24 horas. Una vez concluido el tiempo de incubación se observaron las cajas para ver si hubo o no actividad antimicrobiana contra las cepas empleadas. A las cajas que presentaron actividad antimicrobiana mediante un halo de inhibición, se les tomó una fotografía digital en un fotodocumentador ().

6.8. Actividad antimicrobiana de AEN y NaClO ante *Salmonella* en canales de pollo

6.8.1. Material biológico

Para el reto microbiológico con *Salmonella*, se emplearon 90 canales de pollo tipo rosticero con rango de peso 0.8 – 1.1 kg. Se adquirieron en un rastro de la marca Pollo Querétaro en el Estado de Querétaro, el mismo día en que se realizó cada experimento y se transportaron y almacenaron hasta su análisis, conservando una temperatura interna de la canal de 4 °C.

6.8.2. Reto microbiológico ante *Salmonella*

A partir de una mezcla de las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 NaI⁺ y *S. Infantis* NaI⁺, se procedió mediante la técnica reportada por Rahman *et al.*, (2012) donde se consiguieron 30 canales de pollo para cada experimento. Con una población inicial de 6.1 log UFC/mL, se inocularon 90 canales con 1 mL del inóculo en la cavidad celómica resbalándolo por las paredes de la cavidad y permitiendo un tiempo de adhesión de 10 min en condiciones asépticas en campana de flujo laminar. Posteriormente, se sometieron las canales a cada uno de los tratamientos de AEN y NaClO. A continuación de se sometieron a diferentes concentraciones (Cuadro 5):

Cuadro 5.- Tratamientos aplicados en las canales de pollo inoculadas con un cultivo mixto de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Infantis*

Tratamiento	CLT (ppm)
Control con agua	0
AEN (pH 6.5)	50
NaClO (pH 11.2)	50

n=90 canales de pollo

30 canales de pollo por tratamiento

Se realizaron 3 experimentos independientes

Los tratamientos se realizaron por inmersión durante 50 min, a una temperatura de 2±2 °C. Después de los tratamientos, se lavó cada canal completa en 100 mL de buffer neutralizante para detener la actividad de los agentes antimicrobianos y se realizaron diluciones seriales en SS y se inocularon cajas con agar AST + NaI por extensión en superficie para su recuento. Se estableció la población sobreviviente a cada tratamiento, y mediante una diferencia con el inóculo inicial, se reportó la reducción del inóculo alcanzada para cada tratamiento. El experimento se realizó por triplicado. Los resultados se expresarán en promedio ± desviación estándar y se analizará una comparación de medias mediante la prueba t-Student ($p \leq 0.05$).

6.9. Determinación de actividad antimicrobiana sobre BMAs y coliformes totales, así como parámetros fisicoquímicos

6.9.1. Material biológico

Para el estudio durante vida de anaquel, se emplearon 240 canales de pollo tipo rosticero con rango de peso 0.8 – 1.4 kg. Se adquirieron de la línea de producción de un rastro de la marca Pilgrim's en el Estado de Querétaro, con el fin de que las canales no tuvieran proceso de cloración previo a las determinaciones. Se transportaron y almacenaron hasta su análisis, conservando una temperatura interna de la canal de 4 a 6 °C. Además, se tuvo un grupo control sin intervención antimicrobiana únicamente con agua. Cada tratamiento fue de 100 litros (5 litros por pollo) 85 ± 5 min a una temperatura de 2-4 °C (Cuadro 6).

Cuadro 6.- Tratamientos aplicados en canales de pollo para estudio durante vida de anaquel sobre microbiota natural

Factor	Variables Respuesta					
	BMAs	Colif. Totales	Color	pH	NBVT	THMs
AEN (50 ppm)						
NaClO (50 ppm)			L*			(ppb)
Agua	Log UFC/mL	Log UFC/mL	a*	-log [H ⁺]	mg % de NVT	(sólo AEN y NaClO)
Ác. Peracético (140 ppm)			b*			

80 canales por tratamiento, tres experimentos independientes, n=240 canales

Posterior a los tratamientos, las canales se sacaron y se empacaron aséptica e individualmente en bolsas de plástico de polietileno de baja densidad (presión de vapor de agua=8 x 10⁻³ cm²/Pa*s; permeabilidad al oxígeno=2.2 x 10⁻³ cm²/Pa*s) para su almacenamiento en refrigeración (4±2 °C). Posteriormente se tomaron 5 canales de cada tratamiento y se cortaron en condiciones asépticas 5 gramos de grasa, 5 g de piel y 15 gramos de carne, para sus posteriores análisis de fisicoquímicos y se almacenaron en refrigeración en otras bolsas de plástico.

Finalmente, se midió color en tres puntos fisionómicos de las canales (pechuga frontal, pechuga lateral y rabadilla). Este muestreo corresponderá al día 0 de vida de anaquel y se repetirán los procedimientos los días 4, 8 y 10. Los resultados se expresarán en promedio \pm desviación estándar y se analizará una comparación de medias mediante la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) con todos los datos durante los 10 días de estudio, haciendo un bloqueo entre días de muestreo para discriminar las diferencias naturales que pudieran presentarse de manera natural.

6.9.2. Determinación de bacterias mesófilas aerobias por vaciado en placa

Las canales completas se sometieron a lavado en 100 mL de solución peptonada para la recuperación la población de BMA's presentes en cada canal. Conforme a la NOM-092-SSA1-1994, se determinó la población de bacterias mesófilas aerobias mediante la técnica de vaciado en placa en agar cuenta estándar. Se lavó cada canal después de su tratamiento, en 100 mL de solución peptonada (BD, Bioxon, 0.1%) para la recuperación la población en canales. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales seriadas en SS, y se inocularon cajas con Agar Cuenta Estándar (ACE) (BD, Bioxon) con 1 mL de la solución de lavado de los canales y 12 mL de agar estéril homogenizando. Se incubaron las cajas a 35 °C durante 24 – 48 horas. Se contaron las colonias observadas.

6.9.3. Determinación de coliformes totales por conteo en placa

Las canales completas se sometieron a lavado en 100 mL de solución peptonada para la recuperación la población de coliformes totales presentes en cada canal. Se determinó la población de coliformes totales mediante el método de conteo en placa establecido en la NOM-113-SSA1-1994, donde se lavó cada canal después de su tratamiento, en 100 mL de solución peptonada 0.1% para la recuperación de la población. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales seriadas en SS, y se inocularon las cajas con Agar Rojo Violeta Bilis (ARVB) (BD Bioxon) con 1 mL de la solución de lavado de los canales y 12 mL de agar estéril

homogenizando. Una vez gelificado, se vaciaron 4 mL más de agar fundido sobre el agar previamente gelificado en la caja Petri y se esperó a que la segunda capa gelificara. Se incubaron las cajas a 35 °C durante 24– 48 horas.

6.9.4. Determinación de color

Después de llevar a cabo el muestreo microbiológico, se le colocaron cada una de las canales en el colorímetro (Minolta, CM2002, Japón) en pechuga parte lateral, pechuga parte frontal y en el huacal. Los parámetros de color que se midieron son los establecidos por la *Commission Internationale l'Eclariage* siendo a^* , b^* y L^* y que son los utilizados comúnmente para pruebas de calidad en carne y se determinó el cambio de color (ΔE) por cada tratamiento durante 10 días de vida de anaquel mediante la siguiente ecuación (Braña *et al.*, 2011; Pérez y Ponce, 2013):

$$\Delta E = \sqrt{(L_b - L_a)^2 + (a_b - a_a)^2 + (b_b - b_a)^2}$$

6.9.5. Determinación de pH

Según la metodología 981.12 de A.O.A.C., se cortaron 10 g de carne y se homogenizaron en 100 mL de agua destilada durante 1 min en licuadora. Se filtró cada muestra en papel filtro y al filtrado se le midió el pH con ayuda de un pHmetro (Hanna Instruments) con electrodo de platino empleando Ag/AgCl como referencia.

6.9.6. Determinación de Nitrógeno Volátil Total

Se realizó mediante la técnica de micro difusión Conway (Min *et al.*, 2007), donde se agregaron 5 g de carne a un tubo de 50 mL, con 15 mL de agua destilada. La muestra se homogenizó en licuadora por 1 min y ajustando a 50 mL el volumen. Posteriormente, se precipitaron los sólidos insolubles por centrifugación durante 5 min a 8000 rpm, y se filtró usando papel filtro. Se colocó 1 mL del filtrado en el diámetro externo de la cámara Conway, mientras que en el diámetro interno se colocó 1 mL de ácido bórico 0.01 N y de 150 μ L de reactivo

Conway (verde de bromocresol [Sigma-Adrich] y naranja de metilo [Sigma Aldrich] en proporción 1:1). Se añadió 1 mL de K₂CO₃ (J. T. Baker) saturado al diámetro externo y se selló la celda con vaselina inmediatamente. Se agitó suavemente la celda y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Finalmente, se tituló con 0.02 N de H₂SO₄ (Sigma-Aldrich) en el diámetro interno. El contenido de nitrógeno básico volátil se expresa en la forma:

$$mg \% NBT \left(\frac{mg NBT}{100 g de muestra} \right) = \frac{(a-b) \cdot 0.02 \cdot 28.014}{S} \times 100$$

Donde:

a: mL de H₂SO₄ 0.02 N añadidos a la muestra

b: mL de H₂SO₄ 0.02 N añadidos al blanco

f: Normalidad del H₂SO₄

S: peso de la muestra de carne en gramos

6.9.7. Determinación de la técnica para la detección y cuantificación de los THMs

6.9.7.1. Material biológico

Para el experimento de detección de THMs, se adquirieron 36 piernas de pollo en el Mercado Escobedo en la ciudad de Querétaro, se transportaron y almacenaron hasta su análisis, conservando una temperatura 3 ± 2 °C.

6.9.7.2. Método cromatográfico

Se procedió según el método 8260c establecido por la EPA. Se adquirió una mezcla estándar (Supelco, Lote: XA11650V, ampolletas de 2000 µg/mL de cada trihalometano en metanol, Bellefonte, EUA) que contiene los trihalometanos a analizar (CHCl₃, CHBr₃, BrCHCl₂ y ClCHBr₂) como estándar de referencia ante la EPA. Las muestras se inyectaron al cromatógrafo de gases, donde se realizó mediante un análisis SCAN la identificación de los compuestos a partir de los principales iones de cada compuesto y se verificaron mediante comparación con la base de datos NIST V8. La columna que se empleó fue la HP-5MS para la

separación de compuestos orgánicos volátiles. Se preparó una solución stock de la mezcla de estándares a una concentración de 20 ppm de cada uno de los THMs. Las condiciones empleadas en el proceso cromatográfico fueron: temperatura del inyector: 280°C, temperatura de la línea de transferencia: 40 °C iniciales, rampa 1: 5°C/min hasta alcanzar 50°C, rampa 2:10°C/min hasta alcanzar 250°C. El gas acarreador fue Helio 99% (v/v) ultrapuro.

Con las condiciones cromatográficas encontradas con el equipo, se procedió a encontrar la sensibilidad del método para cada compuesto con el fin de conocer la concentración mínima detectable en el equipo. Para esto, se prepararon diluciones 5, 2.5, 1, 0.5, 0.05 y 0.01 ppm de la mezcla a partir de la solución stock (20 ppm) y se procedió a hacer una curva de calibración para cada compuesto, en función de las concentraciones y del área bajo la curva obtenida con el software Enhanced Chemstation V. D38 (2001). Se realizó una regresión lineal para conocer la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación, así como los límites de detección y cuantificación del método.

6.9.7.3. Detección y cuantificación de THMs

Únicamente se consideraron los tratamientos de AEN e NaClO (ambos a 50 ppm). De cada canal previamente se cortaron 5 g de piel, 5 g de grasa y 5 g de carne y se almacenaron en refrigeración. Cada muestra se lavó en 1^o mL de metanol durante 3 min, posteriormente se filtraron los tejidos en una membrana (Millipore) con poro 0.22 µm y se recuperó el metanol en viales cromatográficos con capacidad de 1.5 mL para finalmente inyectar las muestras al equipo. Se empleó un control sin tratamiento para ver que los THMs no estuvieran presentes antes del experimento. De igual forma, se analizaron muestras de agua de tratamiento filtrándolas e inyectando directamente al equipo. Del filtrado se inyectó 1 µL al cromatógrafo para detectar y cuantificar los THMs que pudieran haberse formado. De los compuestos detectados según los tiempos de retención, se procedió a integrar el área bajo la curva del pico obtenido, y se calculó su concentración mediante la ecuación de la recta obtenida en la curva de

calibración. Los resultados se expresarán en promedio \pm desviación estándar y se analizará una comparación de medias mediante la prueba t-Student ($p \leq 0.05$).

Posteriormente, se realizó un experimento con un diseño bifactorial completo 2×3 , teniendo como primer factor el agente antimicrobiano con dos niveles (AEN y NaClO), y el segundo factor la concentración con tres niveles (50, 100 y 150 ppm) con tres réplicas experimentales, teniéndose un total de 36 piernas de pollo. Los tratamientos tuvieron un tiempo de exposición de 50 min a una temperatura de 2 ± 2 °C. De cada pierna de pollo se cortaron 5 g entre piel, grasa y carne y se lavaron en un vial con 10 mL de metanol durante 3 min con agitación ligera. Posteriormente, se filtraron los tejidos en una membrana con poro $0.22 \mu\text{m}$ y se recuperó el metanol en viales cromatográficos con capacidad de 1.5 mL para finalmente inyectar las muestras al equipo. Los resultados se expresarán en promedio \pm desviación estándar y se analizarán los efectos de los factores, así como su interacción mediante una comparación de medias con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Determinación de la composición química de AEN

7.1.1. Voltametría

Mediante el uso de voltametría clásica de barrido a partir de una solución de 0.001 M de NaClO (pH 10) se obtuvo una señal correspondiente al ClO⁻; posteriormente al analizar concentraciones mayores, se obtuvieron señales con mayor intensidad. A continuación, se presenta en la Figura (7) el voltagrama con las señales del NaClO a diferentes concentraciones:

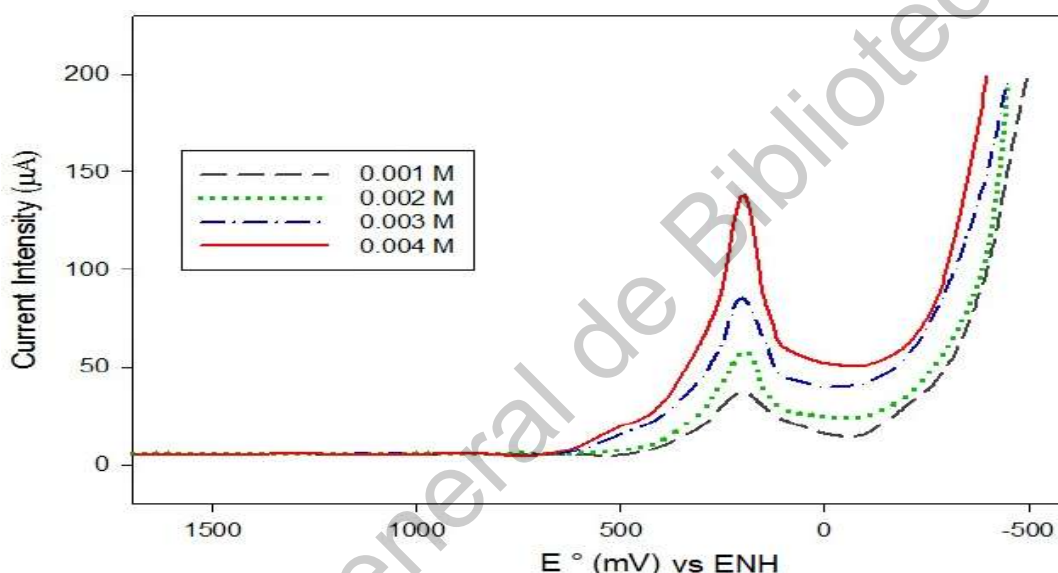


Figura 7.- Voltagrama de NaClO comercial a pH 10, mostrando el efecto de la concentración mediante el incremento en la señal del ClO⁻.

En la Figura anterior, se observa la señal del ClO⁻ alrededor de 250 mV. Tomando en cuenta el equilibrio químico en la Figura (4), a un pH de 10 predomina el ClO⁻. Al aplicar el valor de potencial estándar del ClO⁻ (Ecuación 1) en la ecuación de Nerst (Ecuación 2), se calcula un valor de 290 mV, que es muy cercano a lo obtenido experimentalmente (250 mV).



$$E^\circ_{\text{ClO}^-} = E^\circ_{\text{ClO}^-} + \left(\frac{RT}{nF} \right) \log \frac{[\text{Cl}^-]}{[\text{ClO}^-] [\text{H}^+]^2}$$

$$= 880 - (0.059 / 2) \log [H^+]^2 = 880 - (2/2) 0.059 \text{ pH} = 290 \text{ mV} \quad (2)$$

Posteriormente, a la solución de NaClO de 0.005 M se modificó el pH de 10 a 8, 6.5 y finalmente a 4, mediante la adición de H₂SO₄ 0.02 N. A continuación se presenta en la Figura (8) el voltagrama con el efecto de pH:

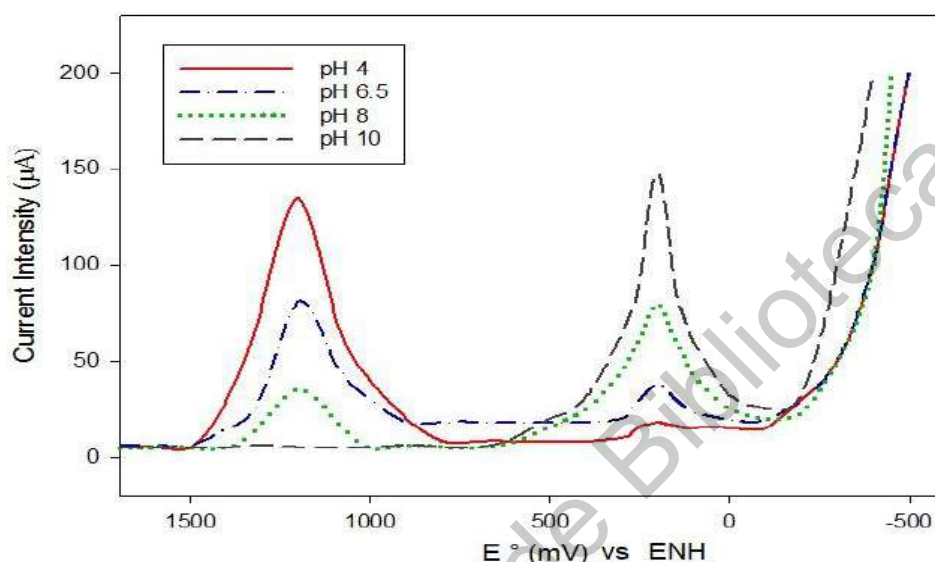
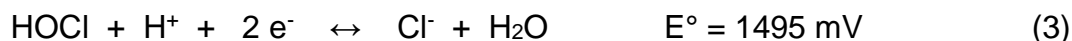


Figura 8.- Voltagrama mostrando el efecto de pH sobre una solución 0.005 M de NaClO comercial.

En la Figura anterior, se observa que a pH de 10 sólo hay una señal presente correspondiente a ClO⁻ a 250 mV, posteriormente al disminuir el pH a 8, se observa una disminución de esta señal y se presenta una segunda señal a 1250 mV probablemente por la generación de HOCl. Al disminuir el pH hasta 4, se puede ver que la señal del ClO⁻ prácticamente desapareció mientras que la única señal presente es a 1250 mV con la mayor intensidad. Al aplicar el valor de potencial estándar del HOCl (Ecuación 3) en la ecuación de Nerst (Ecuación 4) se obtuvo un valor teórico de potencial de electrodo 1195 mV muy cercano a lo obtenido experimentalmente (1250 mV).



$$E_{ClO} = E_{ClO}^0 + \frac{RT}{nF} \log \frac{[Cl^-]}{[ClO^-][H^+]^2} = 0.88 - \frac{0.059}{2} \log [H^+]^2 = 0.88 - \frac{2}{2} (0.0569) pH = 290 \text{ mV}$$

$$E^{\circ}_{HOCl} = E^{\circ}_{HOCl} + (R T / n F) \log [Cl^-] / [HOCl] [H^+] =$$

$$1495 - (0.059/2) \log [H^+] = 1495 - 0.029 \text{ pH} = 1195 \text{ mV} \quad (4)$$

Finalmente, al someter una muestra de AEN bajo las mismas condiciones, se obtuvo lo siguiente (Figura 9):

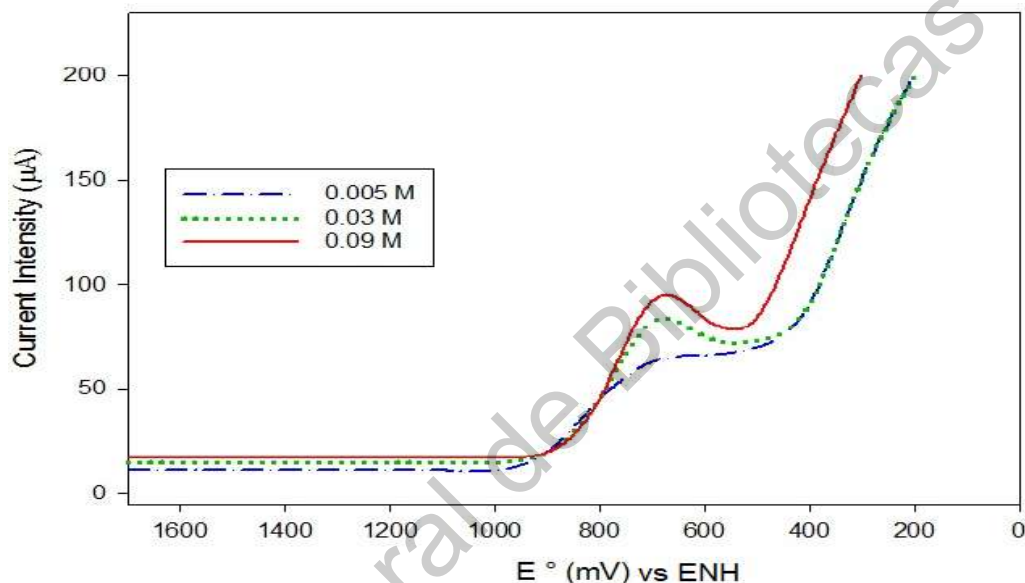


Figura 9.- Voltagrama mostrando la señal de AEN a diferentes concentraciones.

En la Figura anterior, se observa que a una concentración de 0.005 M y un pH de 6.5 (mismas condiciones usadas con NaClO) únicamente se observa una señal poco definida alrededor de 700 mV. Al incrementar la concentración a 0.03 M observa que la señal se define un poco más al mismo potencial electroquímico sin presencia de otra señal. Finalmente, al analizar AEN concentrada (0.09 M) se observa la señal más definida pero también se observa que el límite electroquímico del barrido de potencial también se recorre aproximadamente 100 mV probablemente por una saturación en la superficie del electrodo debido a la alta concentración de la solución oxidante. Resulta interesante, que al trabajar a un pH de 6.5 donde teóricamente se reportan dos especies principales, únicamente se obtiene una señal con AEN a diferencia del NaClO donde sí se

aprecian ambas, por lo que esta técnica no permite conocer las especies presentes en AEN.

7.1.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

De las muestras de AEN analizadas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se obtuvo lo siguiente (Figura 10):

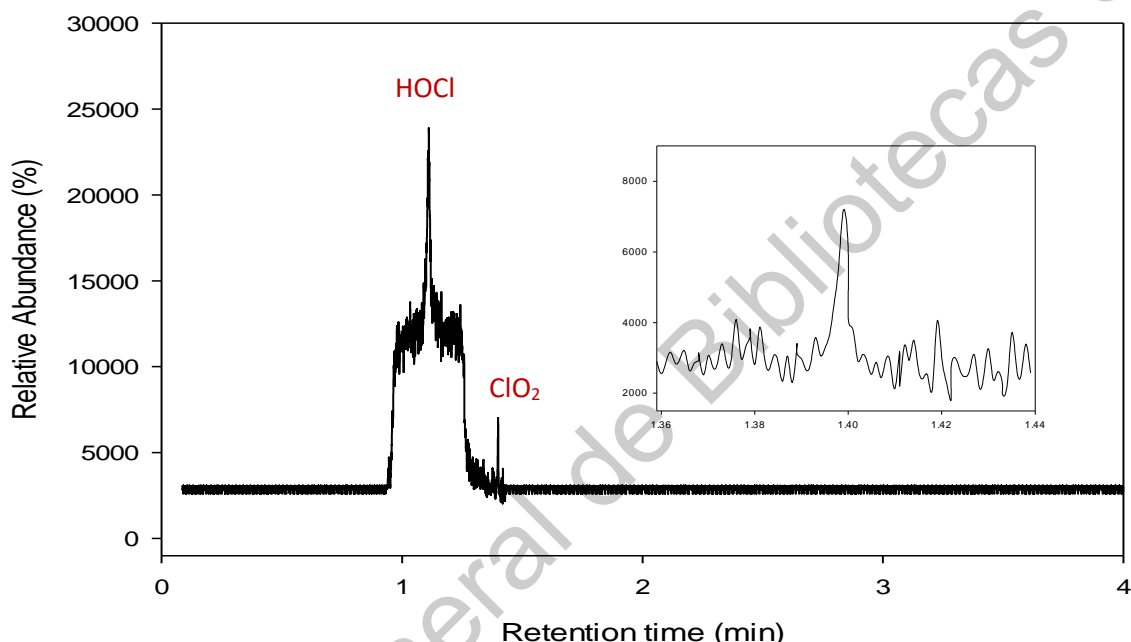


Figura 10.- Cromatograma de AEN mostrando las señales de HOCl/ClO⁻ y ClO₂, obtenidas mediante CG/EM.

En la Figura anterior, se observa la presencia de HOCl/ClO⁻ a 1.25 min de tiempo de retención donde aparece una señal para este equilibrio ya que la diferencia entre ambas especies es únicamente un protón resulta fácilmente ionizable quedando ClO⁻, por lo que no es posible diferenciar las dos especies mediante esta técnica. Sin embargo, al tiempo de retención 1.45 min se observa una segunda señal correspondiente al ClO₂ sin embargo, no pudo cuantificarse debido a que no se cuenta con un estándar cromatográfico debido a su inestabilidad química. Resultaría interesante continuar con estudios similares, (cromatografía iónica con detector amperométrico) para poder cuantificar todas las

especies presentes y con ello tener un mayor entendimiento sobre el comportamiento del AEN.

7.2. Determinación de la estabilidad fisicoquímica de AEN durante su almacenamiento

7.2.1. Determinación de la concentración de CLT

A continuación, se presenta en la Figura (11), la estabilidad en la concentración de CLT de AEN almacenada a 25 y 8 °C:

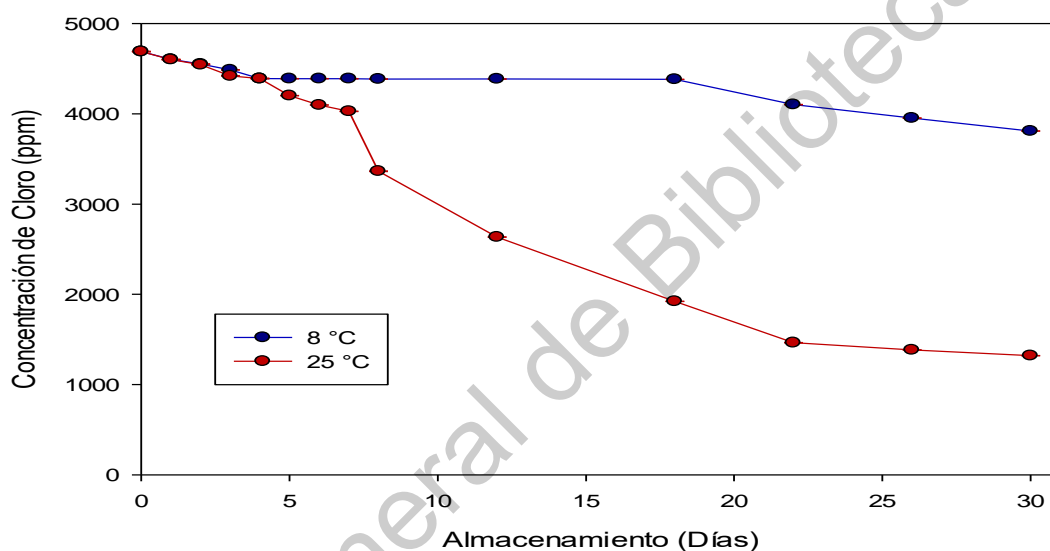


Figura 11.- Efecto de la temperatura sobre concentración de CLT del AEN almacenada durante un mes.

En la Figura anterior, se observa una disminución en la concentración de CLT tanto en refrigeración (19%) como a temperatura ambiente siendo mayor en esta última (72%) lo que indica que el AEN producida en CIDETEQ y almacenada en refrigeración presenta una mayor estabilidad de la concentración de CLT.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Rahman *et al.* (2012) y Soo-Voon *et al.* (2002), quienes observaron el mismo efecto de la temperatura sobre la concentración de CLT. Sin embargo, ellos emplearon dosificadores automatizados de AE a una baja concentración de CLT (10 a 50 ppm) por lo que la disminución de sus muestras aparenta ser mayor alcanzando la pérdida total. En

nuestro estudio, se empleó una celda electrolítica con capacidad de generar AE a una concentración hasta de 7000 ppm dependiendo del tiempo de electrólisis. El porcentaje de pérdida reportado por estos autores es de ~ 12 a 20 % que es equiparable al de AEN del CIDETEQ almacenada en refrigeración sin exposición a la luz.

Se ha reportado que la disminución de CLT puede deberse a cierta inestabilidad en los componentes del AE, ya que a evaporación de compuestos como Cl_2 almacenados a una mayor temperatura, se desfavorece el equilibrio entre la interface líquido-gas promoviendo su volatilización (Soo-Voon *et al.*, 2002). Es importante mencionar que la principal especie a un pH de 4 es el HOCl, y a un pH de 10 es el NaClO. A pH intermedios, existe un equilibrio entre ambas especies. Finalmente, la especie de Cl_2 gas disuelto únicamente se tiene a valores de pH de 1 a 2, por lo que el AEN del CIDETEQ no tendría esta especie. Además, en nuestro estudio únicamente se consideró un almacenamiento cerrado donde la volatilización se ve disminuida, por lo que la disminución en la concentración de CLT, se explica mejor mediante la autodegradación de sus especies químicas (White, 1999; Gordon 1998).

7.2.2. Determinación de pH

Se puede observar en la figura anterior, ambas muestras almacenadas tanto en refrigeración como a temperatura ambiente, presentan estabilidad durante su almacenamiento con una variación de 0.2 durante el estudio. Sin embargo, se puede observar que la muestra almacenada a temperatura ambiente presenta mayor variación hasta el día 8 y posteriormente se estabiliza hasta el final del estudio. De igual forma, se observa que la muestra en refrigeración presenta una mayor estabilidad desde el día 3 hasta el día 30.

En concordancia con nuestros resultados, Rahman *et al.* (2012) y Soo-Voon *et al.* (2002), reportaron que el parámetro de pH permanece constante durante el almacenamiento, incluso aún si se modifican otros factores, como emplear un contenedor abierto, o mantener la muestra en agitación durante el almacenamiento.

A continuación, se presenta en la Figura (12), la estabilidad de pH en el AEN del CIDETEQ almacenada a 25 y 8 °C:

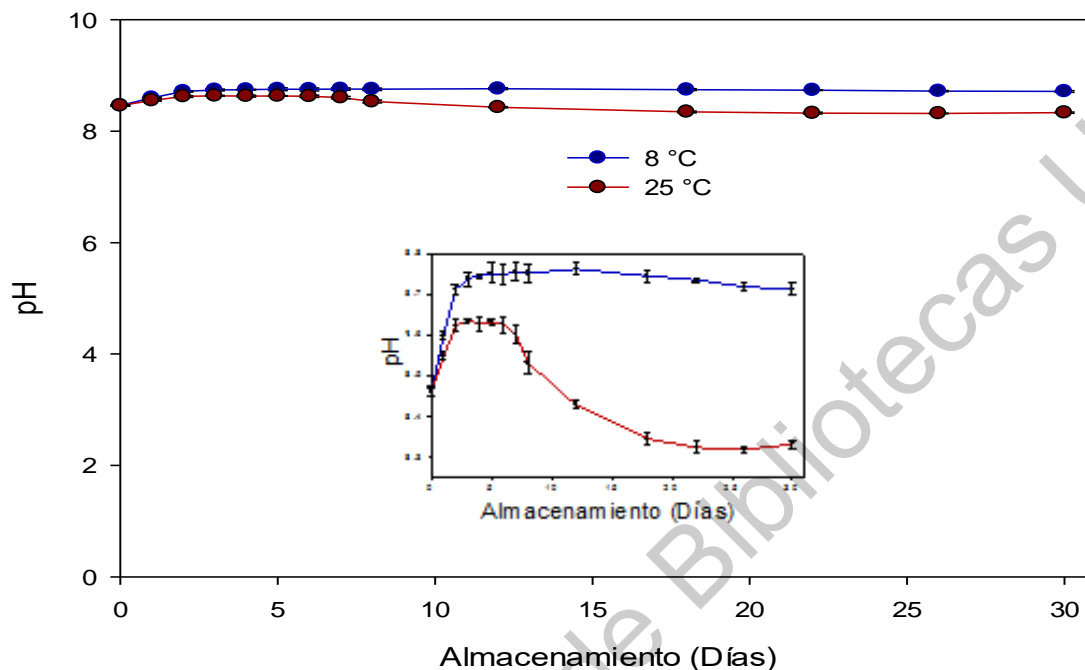


Figura 12.- Efecto de la temperatura sobre el pH de AEN almacenada durante un mes.

7.2.3. Determinación del Potencial de óxido-reducción

Se observa en la Figura (13), que las muestras almacenadas tanto en refrigeración como a temperatura ambiente, presentan estabilidad en su potencial de óxido reducción al igual que con el parámetro de pH. También se puede observar que la muestra almacenada en refrigeración alcanza su estabilidad a partir del día 3 y permanece prácticamente constante durante el estudio. Sin embargo, en la muestra almacenada a temperatura ambiente se observa una inestabilidad los primeros 6 días de estudio estabilizándose a partir del día 10. En concordancia, Soo-Voon *et al.*, (2002) reportaron valores similares de ORP de 1000 a 1100 mV manteniéndose constante durante el almacenamiento.

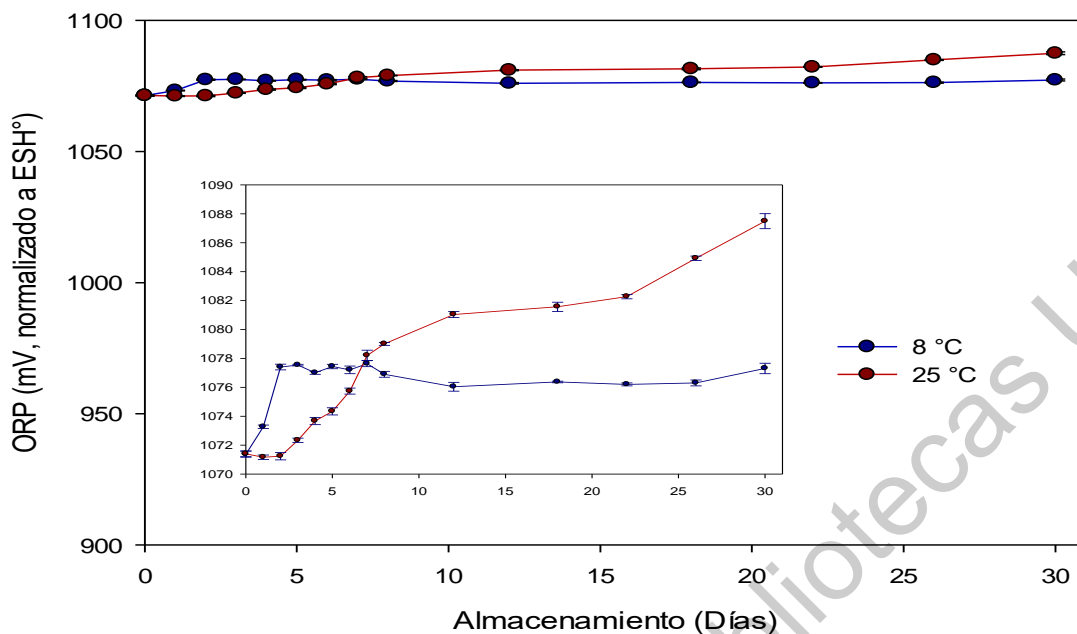


Figura 13.- Efecto de la temperatura sobre el potencial redox de AEN almacenada durante un mes.

Al comparar las gráficas de pH y ORP, resulta interesante que la muestra almacenada en refrigeración durante los primeros tres días de almacenamiento, sufren un ligero incremento y posteriormente se estabilizan hasta la conclusión del estudio, lo que sugiere que las reacciones químicas que se están llevando a cabo en el AE están en equilibrio. Sin embargo, para la muestra almacenada a temperatura ambiente, se observa como presenta inestabilidad en su ORP y pH, durante los primeros días de almacenamiento, lo cual indica que se pueden estar llevando a cabo reacciones químicas que no están en equilibrio provocando que el sentido de la reacción se invierta. También es posible que se produzcan compuestos secundarios o que los primeros compuestos formados durante la electrólisis se estén degradando en compuestos cuyos equilibrios son más estables (Al-Haq *et al.*, 2005).

Por todo lo anterior, se pudo observar que el pH y ORP del AEN permanecen prácticamente constantes durante su almacenamiento tanto en refrigeración como a temperatura ambiente. Sin embargo, la concentración de CLT

si se ve afectada, disminuyendo drásticamente, si no es almacenada en condiciones de refrigeración.

7.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de AEN y NaClO

7.3.1. Actividad antimicrobiana de AEN y NaClO sobre *Salmonella*

Se observó que conforme se incrementa el tiempo de exposición en cada tratamiento, la concentración requerida para inactivar a los microorganismos disminuye proporcionalmente. Se observa que para AEN a 5 ppm, el efecto durante los primeros dos minutos es limitado, sin embargo, al minuto 3 el efecto aumenta considerablemente disminuyendo la mitad de la población.

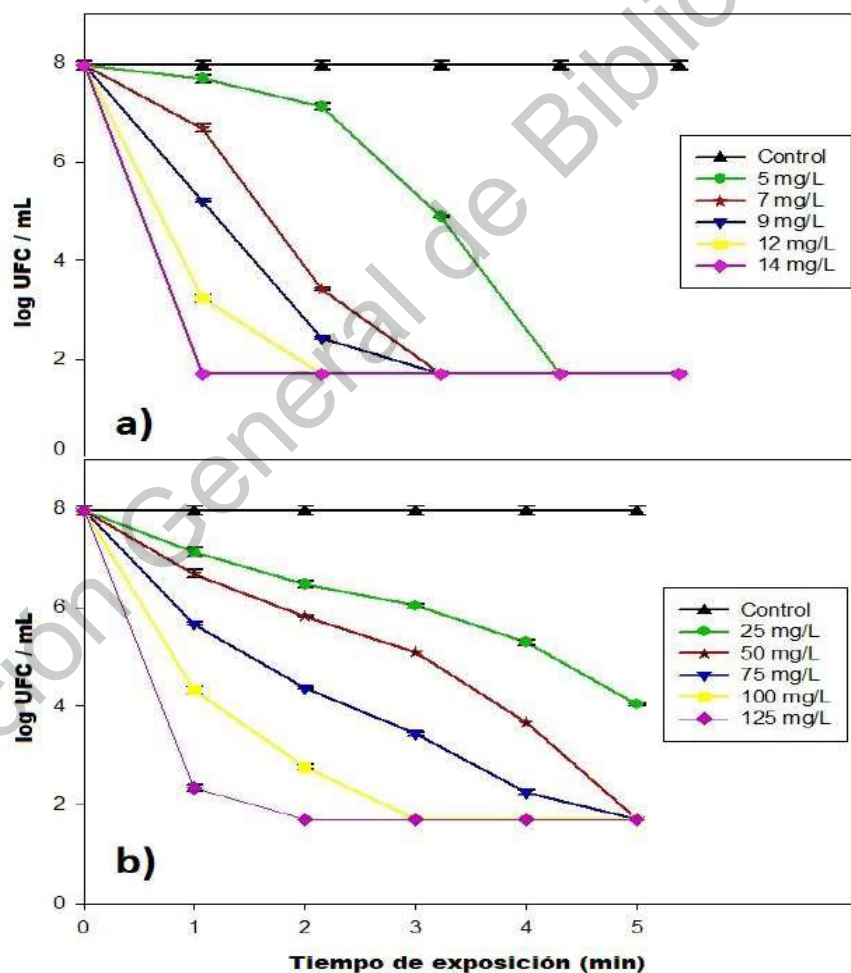


Figura 14.- Actividad antimicrobiana sobre células planctónicas de un cultivo mixto de *S. Typhimurium* ATCC 14028 Na^+ y *S. Infantis* Na^+ de: a) AEN y b) NaClO.

Al comparar la actividad antimicrobiana de ambos agentes, se observó que 1 minuto de tiempo de exposición 14 ppm de AEN (Figura 14a) son suficientes para la inactivación más de 8 log de UFC/mL de *Salmonella* mientras fueron necesarias 125 ppm de NaClO (Figura 14b). La sensibilidad del método Miles-Misra (50 células), por lo que su límite de detección es de 1.7 log UFC/mL. Las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) de AEN ante células planctónicas de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Infantis* son: 14 ppm a 1 min; 12 ppm para 2 min, y 7 ppm para 3 min y 5 ppm para 4 min de tiempo de exposición.

Para NaClO, se observa que, para 1 min de tiempo de exposición, 125 ppm no son suficientes para la inactivación del inóculo inicial. Las concentraciones mínimas bactericidas del NaClO son: 125 ppm para 2 min, 100 ppm para 3 min, 50 ppm para 5 min. De igual forma se observa que con 25 ppm a 5 min de tiempo de exposición no son suficientes para la completa inactivación de inóculo. Al comparar ambas gráficas, se puede observar que el AEN presenta una actividad antimicrobiana alrededor de 10 veces mayor que el NaClO. En concordancia, Cadena (2014) y Rahman *et al.* (2012), reportaron que el AEN presenta una mayor actividad que el NaClO ante células planctónicas de *Salmonella* logrando una reducción de >6 log de UFC/mL y concluyeron que su estabilidad fisicoquímica se ve favorecida si se almacena a 4 °C.

7.3.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de AEN y NaClO sobre *Salmonella* en medio semisólido

Se observa que para el NaClO se requieren 120 ppm para mostrar actividad antimicrobiana mediante un halo de inhibición en medio semisólido (Figura 14a). Sin embargo, se observa que el AEN presenta una mayor actividad antimicrobiana con un semejante halo de inhibición, pero empleando solamente 90 (Figura 14b).

A continuación, se presenta en la Figura (15), la actividad antimicrobiana de AEN y NaClO sobre un cultivo mixto de *S. Typhimurium* ATCC 14028 *Na⁺* y *S. Infantis Na⁺* en medio semisólido:

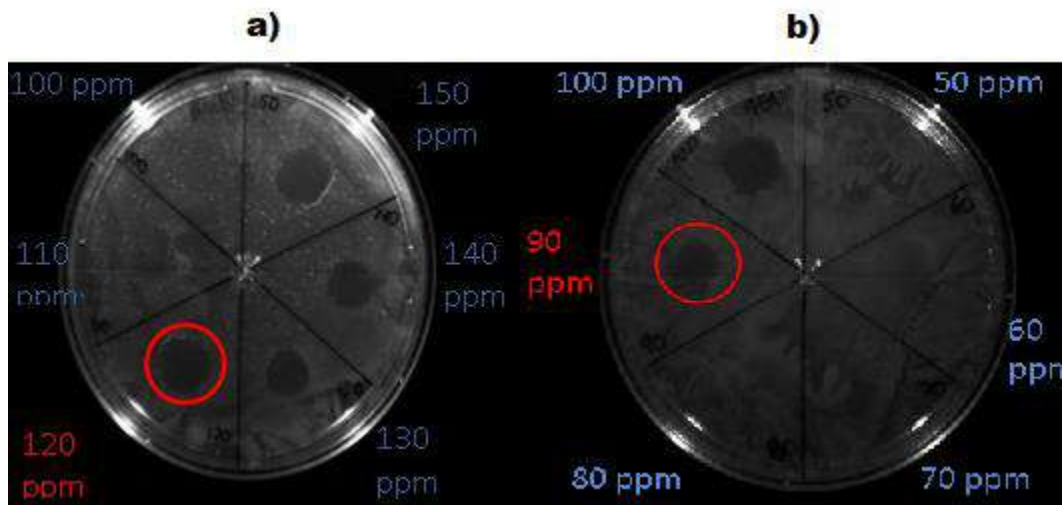


Figura 15.- Actividad antimicrobiana sobre un cultivo mixto de *S. Typhimurium* ATCC 14028 *NaI⁺* y *S. Infantis* *NaI⁺* en medio semisólido de: a) NaClO y b) AEN.

Al comparar esta prueba con la concentración mínima inhibitoria, se puede observar que se requiere una mayor cantidad de CLT de ambos agentes, éste fenómeno se puede explicar mediante la segunda Ley de Fick que se presenta con la ecuación (2):

$$\Delta C / \Delta t = D [\Delta^2 C / \Delta x^2] \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde, C es la concentración de la sustancia que se va a difundir, t es el tiempo en el que se difunde la sustancia, x es la superficie a través donde se llevará a cabo la difusión y D (cm^2/s) es el coeficiente de difusión. Esta fórmula se emplea cuando la difusión se lleva a cabo en una sola dirección y la concentración de la sustancia en difusión se modifica en función del tiempo. El coeficiente de difusión depende directamente de la concentración en y el tamaño de la superficie donde se difundirá la sustancia. Por lo tanto, con células planctónicas la difusión de las especies oxidantes se lleva a cabo en la membrana celular de las bacterias (superficie muy pequeña) por lo que se requiere una concentración pequeña para que se permee y difunda al interior de las células mostrando efecto antimicrobiano. Sin embargo, en medio semisólido, la difusión se lleva a cabo tanto en la membrana celular como en la superficie del agar, por lo que hay una transferencia más lenta, inactivándose algunas moléculas durante el transporte de las especies

oxidantes, lo que disminuye la actividad antimicrobiana en los agentes mientras éstos se difunden (Crank, 1975).

Se observa también, que el AEN presenta una mayor inactivación de sus especies por lo que la diferencia de concentración entre ambas pruebas (14 ppm contra 90 ppm) es mayor. Interesantemente, el NaClO también se ve afectado por la difusión, pero en menor grado siendo menor la diferencia entre ambas pruebas (125 ppm contra 130 ppm). Esto pudiera explicarse con la “electro-activación” del AEN dónde se establece que sus moléculas presentan una mayor vibración y estado energético reaccionando rápidamente con las moléculas orgánicas del medio semi sólido sufriendo inactivación mientras se difunden (Al-Haq *et al.*, 2005).

7.3.3. Visualización del efecto antimicrobiano de AEN mediante microscopía de fluorescencia

Se puede observar en la Figura (14a), que todas las células de *Salmonella* están teñidas con Syto 9 (fluorescencia verde) siendo el control sin tratamiento antimicrobiano. La población observada de *Salmonella* corresponde a 7.6 log de UFC/mL ya que se cuantificó en placa. En concordancia, Ercolini *et al.* (2005), observaron el mismo patrón sobre células de *L. monocytogenes* en su grupo control. Por el contrario, Fernández *et al.* (2016), presentaron una micrografía de su grupo control (*P. aeruginosa* y *E. coli*), donde no se distinguen claramente las células y se observa una mancha turbia de todo el campo. Similarmente, Thongbai *et al.* (2006), visualizaron tanto células vivas como muertas de *Salmonella*, después de un tratamiento con cloruro de cetilpiridinio con nisina.

Debido a la CMB de AEN observada en la Figura (13b), se decidió considerar un tratamiento sub letal con AEN (9 ppm) y con NaClO (50 ppm) ambos con un tiempo de exposición de 1 minuto, ante células planctónicas de *Salmonella* para visualizar el efecto antimicrobiano, mediante microscopía de fluorescencia. En la Figura (16b y 16c), observan células con fluorescencia verde (células vivas) pero también se observan células con fluorescencia roja (células dañadas, presuntamente muertas). Las poblaciones sobrevivientes observadas y

cuantificadas en placa para AEN y NaClO corresponden a 5.7 y 6.1 log UFC/mL, respectivamente.

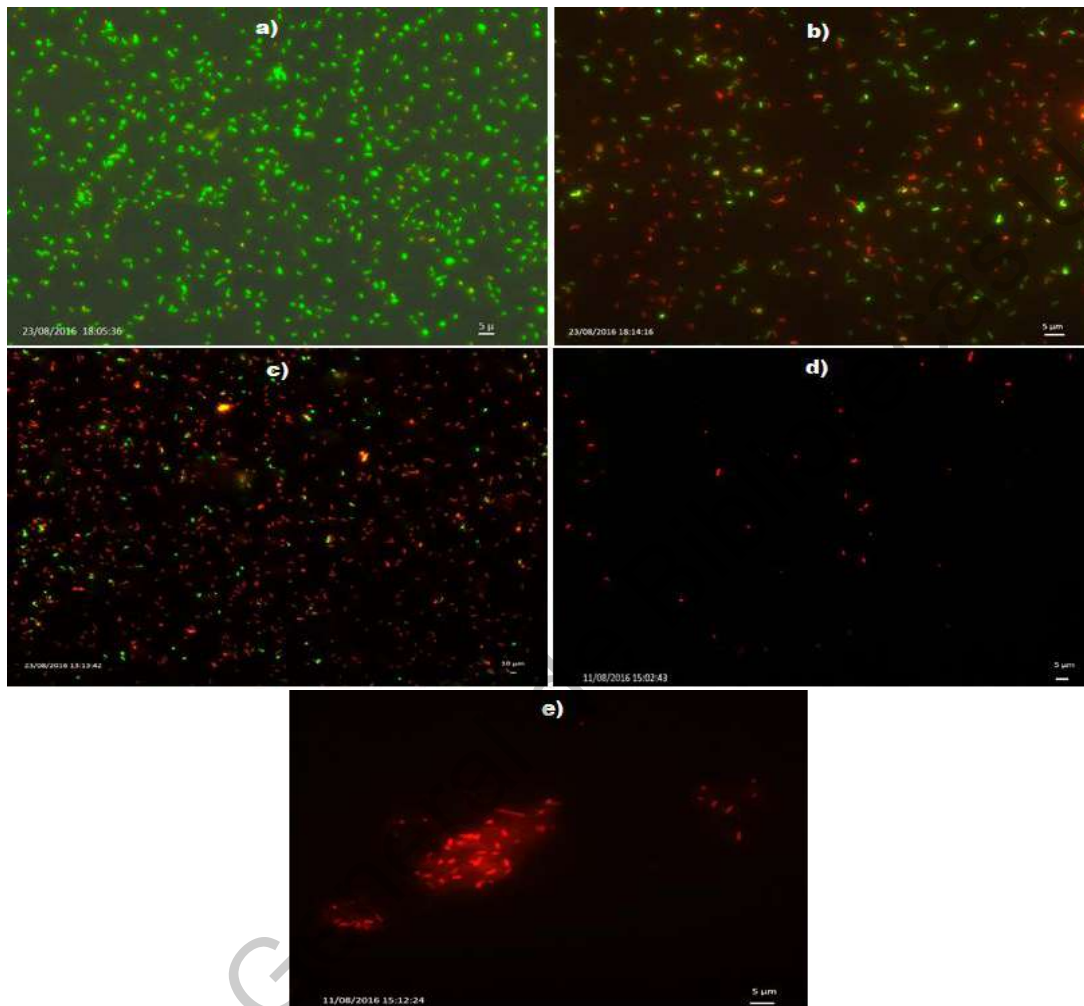


Figura 16.- Micrografías de células planctónicas de un cultivo mixto de *S. Typhimurium* ATCC 14028 Na^+ y *S. Infantis* Na^+ teñidas con el kit *BacLight Live and Death*[®]. a) Sin tratamiento, b) tratadas sub letalmente con NaClO (50 ppm), c) tratadas sub letalmente con AEN (7 ppm), d) tratadas letalmente con AEN (14 ppm), e) tratadas letalmente con AEN (14 ppm) mostrando lisis celular.

Debido a la CMB de AEN observada en la Figura (14a), se decidió considerar un tratamiento letal (14 ppm) con un tiempo de exposición de 1 minuto ante células planctónicas de *Salmonella* para visualizar el efecto antimicrobiano,

mediante microscopía de fluorescencia. En la Figura (16d) se observan todas las células de *Salmonella* con fluorescencia roja, debido al daño generado por el efecto antimicrobiano de AEN (14 ppm). También se observa que el número de células teñidas de rojo es considerablemente menor con respecto al grupo control, probablemente debido a que la mayoría de las células sufrieron lisis causada por el tratamiento letal. Así mismo, la Figura (16e) presenta fluorescencia roja amorfa en varias zonas de los campos observados, probablemente generado por los *debris* con fluorescencia roja causada por el DNA liberado durante la lisis (Ercolini, *et al.*, 2005). La población de *Salmonella* observada es menor a 1.7 log UFC/mL siendo el límite de detección del método empleado (Miles-Misra).

7.3.4. Visualización del efecto antimicrobiano de AEN mediante microscopía electrónica de barrido

Del mismo modo que en microscopía de fluorescencia se realizó un conteo en placa mediante la técnica de Miles-Misra para establecer la población tanto inicial como sobreviviente a cada tratamiento y determinar la población observada en cada micrografía. Se realizaron visualizaciones previas con el microscopio empleado y se determinó que de 6 a 7 log UFC/mL eran adecuados para lograr una visualización apropiada ya que, al incrementar el número de células, éstas se observaban encimadas dificultando su observación.

Las condiciones bajo las que se obtuvieron las micrografías por barrido electrónico fueron las siguientes: a) Aumento: Rango de 10000 a 50000x, b) Voltaje de aceleración 15 kV, c) Alto vacío: 1.4×10^{-4} mBa.

Se observan en la figura (17a), un gran número de células de *Salmonella* adheridas a la matriz soporte (membrana de celulosa 0.22 μ m) para este estudio correspondientes al grupo control sin tratamiento. La población observada corresponde a 7.1 log UFC/mL.

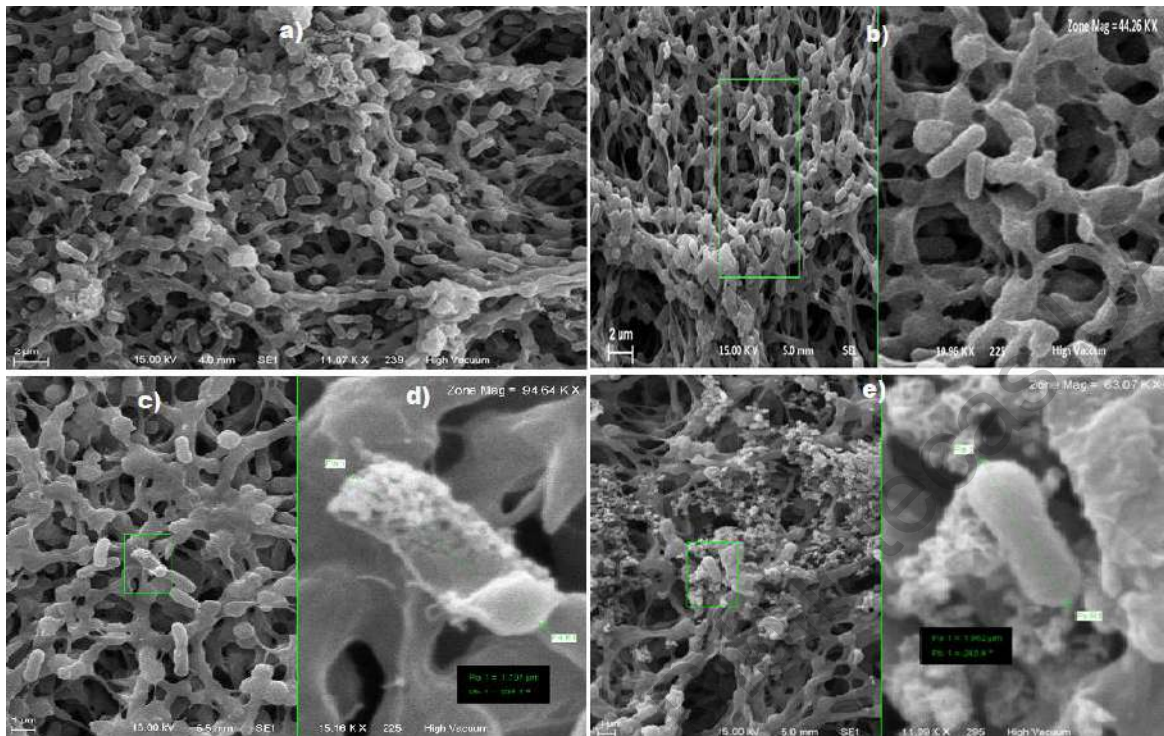


Figura 17.- Micrografías obtenidas por SEM de células planctónicas de un cultivo mixto de *S. Typhimurium* ATCC 14028 *Na^t* y *S. Infantis* *Na^t*. a) Sin tratamiento, b) tratadas sub letalmente con NaClO (50 ppm), c) tratadas sub letalmente con AEN (9 ppm), d) célula con engrosamiento en superficie, e) tratadas letalmente con AEN (50 ppm).

El tamaño de las bacterias observadas oscila entre 1.6 a 2.1 μm de longitud. Sheen *et al.* (2015), reportan una imagen similar de células de *Salmonella* en su grupo control, donde empleando un mayor aumento (100,000x) se puede observar con mejor definición la pared celular de la bacteria en un soporte más liso (vidrio) en comparación con nuestro estudio que presenta cavernosidades correspondientes a la membrana empleada como soporte. Similarmente, Su y D'Souza (2012) observaron la pared de las bacterias sin tratamiento empleando como soporte a láminas de silicón.

En las Figuras (17b y 17c), se observa que ambos agentes con una dosis sub letal (AEN 7 ppm y NaClO 50 ppm) reducen ligeramente la población de

Salmonella sin poder establecer diferencia entre las poblaciones únicamente con la micrografía, Sin embargo, se establecieron las poblaciones mediante un conteo en placa resultando en 5.9 y 6.2 log de UFC/mL, respectivamente. Resulta importante destacar que en las micrografías de las células tratadas con 50 ppm de NaClO no se logró visualizar aparente daño en la superficie de las células. No obstante, con el AEN a 9 ppm, se logró visualizar células con un engrosamiento de la superficie celular, lo que pudiera reflejar daño estructural causado por el AEN a ppm (Figura 17d). Cabe mencionar que fueron pocas las bacterias observadas con engrosamiento, lo que puede indicar que es un estado intermedio muy corto entre el daño estructural y la lisis.

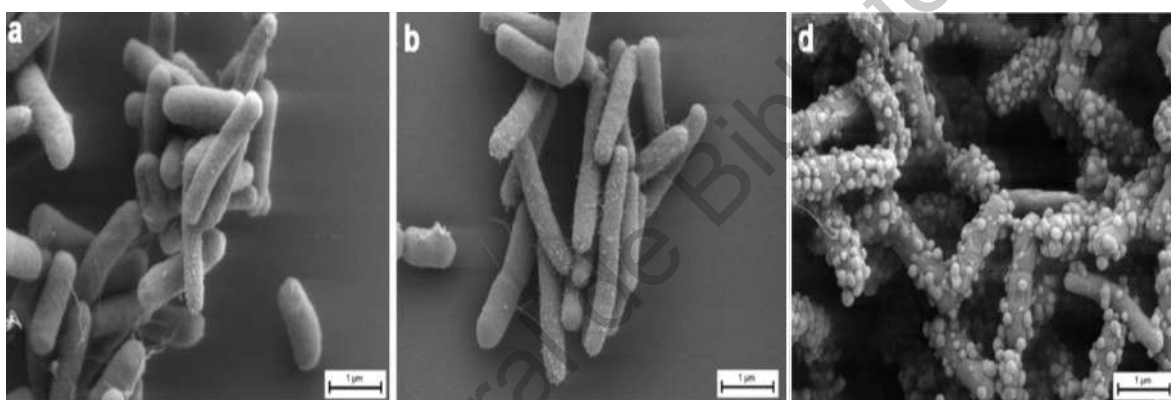


Figura 18.- Micrografías obtenidas por SEM de células planctónicas de *S. Typhimurium*. a) Sin tratamiento, b) tratadas con NaClO (200 ppm), d) tratadas con fosfato trisódico (50 ppm). (Obtenido de Su y D'Souza, 2012)

De igual forma, Su y D'Souza (2012), no lograron visualizar daño en la pared celular de *Salmonella* tratada con 200 ppm de NaClO, sin embargo, si observaron engrosamiento similar con un tratamiento de fosfato trisódico (Figura 18). Lee *et al.* (2014), reportaron que 200 ppm de NaClO reducen de manera no significativa la población de *Salmonella* en hendiduras y áreas plegadas en la piel de pollo. Dhayakaran *et al.* (2015), visualizaron *L. monocytogenes* con un engrosamiento similar en su superficie después de ser tratada con isoflavonas de soya. Similarmente, Sheen *et al.* (2015), observaron el mismo efecto en la estructura de *Salmonella* tras un tratamiento con altas presiones, además

observaron una mayor rugosidad en su superficie de células dañadas. En otro estudio, Thongbai *et al.* (2006), visualizaron (Figura 19) el daño en la estructura de *Salmonella* generado por diversos tratamientos (cloruro de cetil piridinio, nisina y tratamiento térmico).

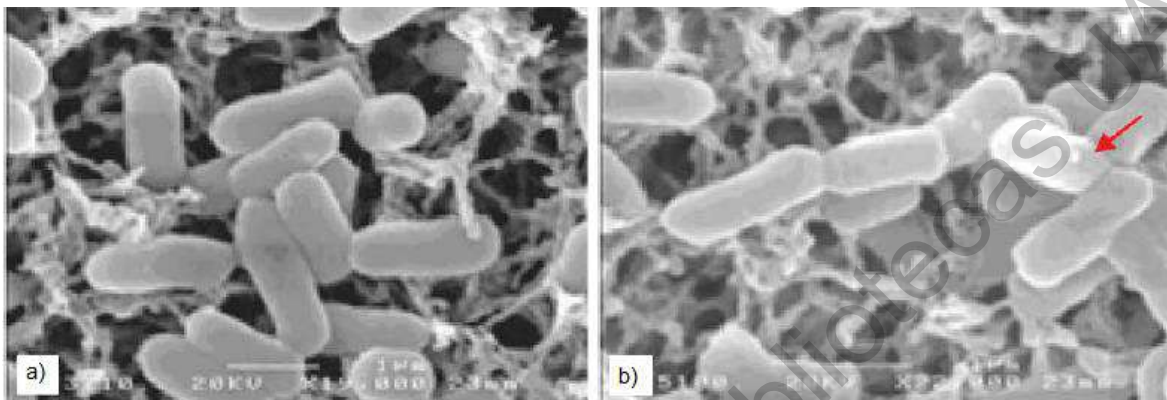


Figura 19.- Micrografías obtenidas por SEM de células planctónicas de *S. Typhimurium*. a) Sin tratamiento, b) tratadas con cetylpiridinio con nisina. (Obtenido de Thongbai *et al.*, 2006)

Finalmente, en la Figura (17e), se observa que prácticamente todas las células de *Salmonella* tratadas con 50 ppm de AEN sufrieron lisis, pudiéndose observar únicamente residuos de las células lisadas, presentándose en todos los campos observados en el microscopio. Resulta interesante comentar que fue realmente complicado visualizar células de *Salmonella* completas, ya que en su mayoría presentaban lisis. En concordancia el conteo en placa de la población a este tratamiento fue $<1.7 \log \text{ UFC/mL}$ ya que es el límite de detección por el método empleado lo que sugiere que, aunque se lograron visualizar escasas células completas, no necesariamente estaba vivas, pudiendo estar muertas sin lisis, o vivas, pero en estado no cultivable. Arnold y Yates (2009), observaron el mismo efecto lítico sobre células de *Salmonella* inoculadas en dedos de plástico empleados comúnmente en la industria avícola (desplumadoras) donde en su grupo control (sin tratamiento) visualizaron células enteras y posterior a su tratamiento no se observaban células remanentes. Similarmente, Koseki e Iso

(2007), observaron el mismo patrón de visualización en bacterias mesofílicas aerobias mediante MEB, después de un tratamiento con agua electrolizada ácida en hojas de lechuga.

En general, se observó que con 50 ppm de NaClO (tratamiento sub letal) contra células planctónicas de *Salmonella* no resultó efectivo, más aún, se ha demostrado que los agentes antimicrobianos pierden eficiencia en presencia de materia orgánica por lo que para que sea eficiente ante una población de 7 log UFC/mL (células planctónicas), es necesario usar una dosis mayor a 50 ppm, que recordemos en la máxima concentración permitida en EUA para el procesamiento avícola. Tomando en cuenta el AEN, es factible emplear mayores dosis a 9 ppm (permitida hasta 50 ppm) para intentar controlar una población como la estudiada.

7.3.5. Actividad antimicrobiana de AEN y NaClO sobre *Salmonella* en canales de pollo.

A continuación, se presenta en la Figura (20), algunos de los pasos realizados durante el experimento con las canales de pollo:



Figura 20.- a) Canales empleadas por tratamiento, b) Inóculo en el interior de la cavidad gastrointestinal, c) Tratamiento por inmersión, d) Lavado de cada canal completa para recuperación de población sobreviviente a cada tratamiento.

A continuación, se presenta el Cuadro (7), con los resultados obtenidos del reto de AEN y NaClO sobre *Salmonella* en canales de pollo expresando a población sobreviviente a cada tratamiento:

Cuadro 7.- Población sobreviviente de un cultivo mixto de *S. Typhimurium* ATCC 14028 *NaI*⁺ y *S. Infantis* *NaI*⁺ después de tratamientos con AEN y NaClO en canales de pollo

Tratamiento	Población (log UFC/mL)
Agua potable	4.69 ^B
AEN	3.62 ^A
NaClO	3.63 ^A

n= 90 canales

AEN: 50 ppm, pH = 6.5 ± 0.1

NaClO: 50 ppm, pH=8.5 ± 0.3

Condiciones de los tratamientos: 50 min, 2 - 4 °C

^{A, B} superíndices diferentes representan diferencia estadística (Tukey $p \leq 0.05$)

Se observa en el cuadro anterior, que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con AEN y NaClO ambos a 50 ppm, por lo que se puede concluir que la actividad antimicrobiana de ambos agentes resulta igual aplicada en canales de pollo. También se observa que existe un efecto por arrastre con agua potable, existiendo una remoción de 1.41 log UFC/mL en la población con respecto al inóculo. Es importante resaltar que existe una mayor reducción con ambos agentes antimicrobianos (2.48 y 2.47 log UFC/mL) en comparación con el control, lo que indica que el hecho de lavar las canales de pollo únicamente con agua potable fría (como se indica en la NOM-194-2004) pudiera no resultar suficiente para garantizar la inocuidad de la carne de pollo. Sin embargo, cabe mencionar que la carne de pollo es un alimento crudo que presenta cierta microbiota natural, sin embargo, es indispensable la eliminación de microorganismos patógenos. Northcutt *et al.* (2005), reportaron una reducción de 0.7 a 1.1 log UFC/mL de *Salmonella* en canales de pollo por la intervención antimicrobiana de NaClO. En concordancia con nuestro estudio, al restar el efecto

de arrastre por el agua (tratamiento control) se observó una reducción final de 1.06 log UFC/mL con NaClO. La reducción alcanzada por el tratamiento de AEN fue de 1.07 log UFC/mL. No existen reportes donde se haya evaluado la actividad antimicrobiana del AEN en canales de pollo ante *Salmonella*, por lo que nuestros resultados no pueden ser comparados con reportes científicos del mismo tipo. Cabe mencionar, que el hecho de que haya resultado una actividad antimicrobiana similar del AEN con la del NaClO resulta interesante, ya que el AEN pudiera ser una alternativa para ser empleada durante las intervenciones antimicrobianas en la industria avícola.

7.3.6. Actividad antimicrobiana de AEN y NaClO sobre bacterias mesófilas y coliformes totales

Es importante evaluar no sólo la capacidad bactericida del AEN sobre una mezcla de dos cepas de *Salmonella* en canales de pollo, sino que además resulta necesario determinar su actividad antimicrobiana ante la microbiota presente de manera natural en las canales. En la Figura (21), se observa que los tratamientos AEN y AP no presentan diferencia estadísticamente significativa ante BMAs presentes en carne de pollo. Sin embargo, si presentan diferencia con el tratamiento de NaClO el cual mostró una actividad antimicrobiana reducida y un comportamiento similar al grupo control con agua. Se observó que la carga inicial de BMAs fue aproximadamente mayor 1 log UFC/mL en el grupo control con relación a los agentes antimicrobianos al día 0 del estudio. Posteriormente, se observa un incremento en la población en todos los tratamientos, sin embargo, se observó que el tratamiento de NaClO y C presentan una carga microbiana superior a 6 log UFC/mL a día 4, mientras que AP y AEN alcanzan esa población hasta el día 8.

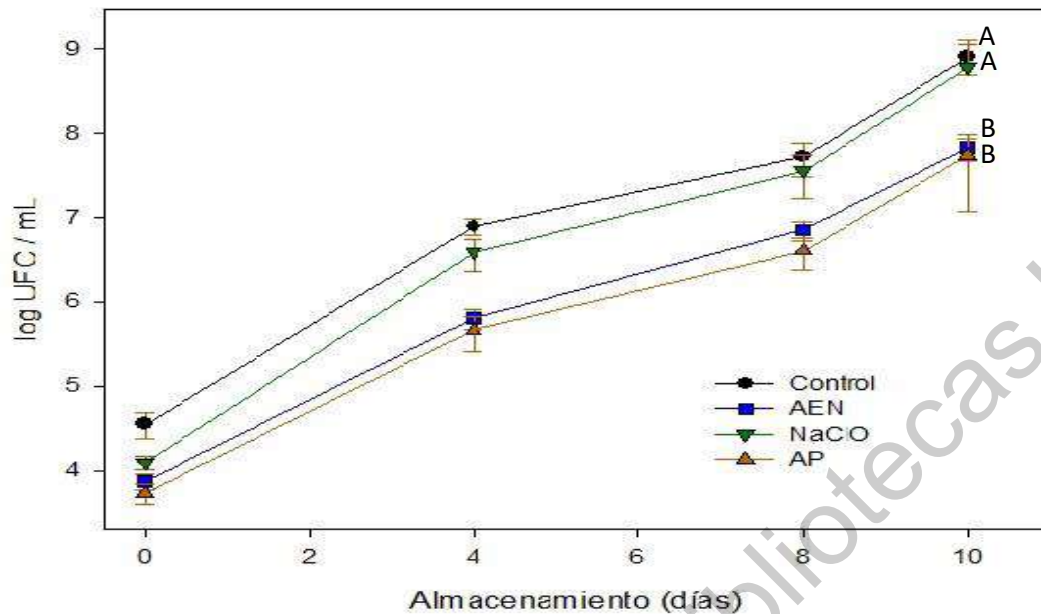


Figura 21.- Crecimiento de la población sobreviviente de BMAs en canales de pollo tratadas durante 90 min a 2-4 °C con AEN (50 ppm de CLT), NaClO (50 ppm de CLT) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel. ^{A, B} superíndices diferentes representan diferencia estadística (Tukey $p \leq 0.05$)

Para el día 4 se observó presencia de un aroma desagradable indicativo de inicio de deterioro en tratamientos NaClO y C mientras que con los tratamientos de AEN y AP no hubo presencia de estos aromas hasta el día 8. Para el día 8 de vida de anaquel, los tratamientos C y NaClO presentan una carga microbiana similar (7.6 log UFC/mL) mientras que los tratamientos AEN y AP presentan esa población hasta finalizar el estudio. Los pollos de los tratamientos NaClO y C presentan aromas desagradables intensos además de una textura menos firme y presencia de limo (sustancia viscosa verdosa) mientras que los pollos de los tratamientos AEN y AP apenas presentan aroma desagradable sin presencia de limo y aún con una textura firme.

Finalmente, en el día 10 de vida de anaquel se observa que los tratamientos de NaClO y C muestran similar población microbiana de BMAs cercana a 9 log UFC/mL. Para este día, todos los pollos presentan aromas

desagradables, aunque los aromas de los pollos de tratamientos NaClO y control son más intensos y presentan una coloración verdosa, y una textura blanda.

Jay *et al.* (2005), establecieron que con una población microbiana cercana a 7.2 log UFC/mL aparecen aromas específicos de deterioro, mientras que con una población mayor cercana a 7.8 log UFC/mL aparece el limo y el deterioro es inminente. Se puede observar que para el día 4 los tratamientos de AEN y AP están por debajo de dicho límite, sin embargo, experimentalmente las canales del tratamiento con AP mostraban ligero aroma a descomposición mientras que las canales con AEN no mostraban aroma aún. Contrariamente, los tratamientos con NaClO y C aún no superaban dicho límite, pero experimentalmente mostraban aroma desagradable intenso.

Tuncer y Sireli (2008), encontraron resultados similares donde con una población inicial de BMAs de 2.9 log UFC/mL en carne de pollo alcanzaban una población de 7.64 log UFC/mL en 10 días de almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, otros autores reportan una mayor población inicial de BMAs (4.9 log UFC/mL) argumentando que la carga inicial de microorganismos depende de las condiciones de procesamiento de las canales (Li *et al.*, 2002).

Bauermeister *et al.* (2008), encontraron un comportamiento similar de NaClO y AP, alcanzando 6.29 y 6.85 log UFC/mL, respectivamente, durante 10 días de vida de anaquel.

Los indicadores sanitarios reportados en la NOM-213-SSA1-2002 únicamente refieren los límites de BMAs para productos cárnicos cocidos por lo que actualmente no existe un límite establecido en carne cruda. Sin embargo, en un muestreo nacional realizado en plantas tipo TIF para carne de pollo, se encontró un rango de población de 4 a 5 log UFC/mL de BMAs coincidiendo con nuestros resultados. Además, establece la vida de anaquel de carne de pollo de 1 a 2 días en refrigeración (4°C) manteniendo su frescura., y pudiendo llegar de 8 hasta 10 días manteniéndose en refrigeración y un empaque adecuado (Castañeda *et al.*, 2013).

Además de las bacterias aerobias totales, también se cuantificaron bacterias coliformes totales en carne de pollo. A continuación, se presenta la

Figura (22) con las poblaciones de coliformes totales encontradas en carne de pollo durante su vida de anaquel:

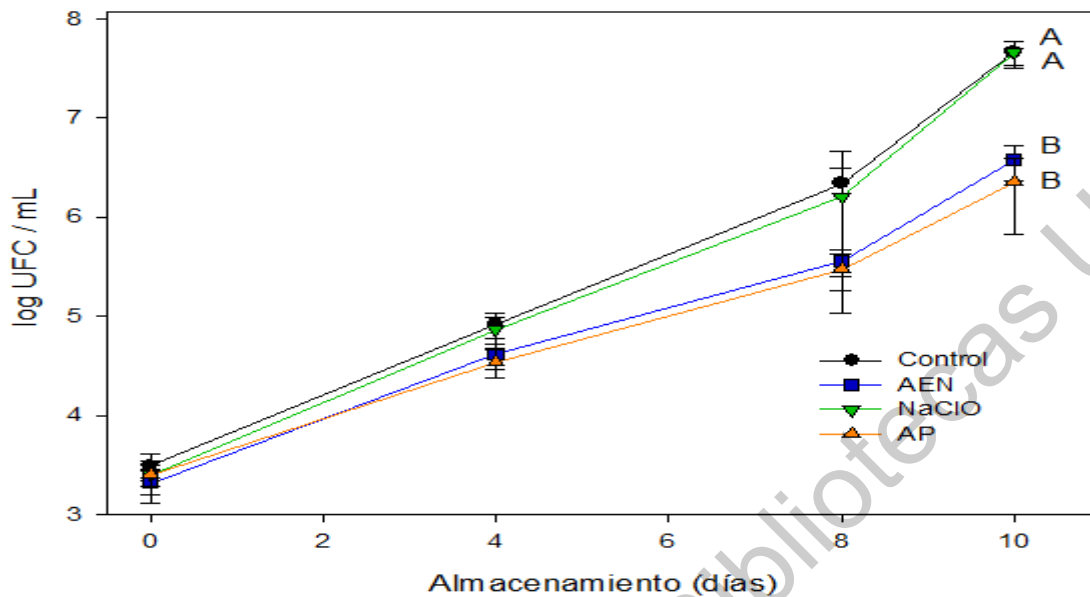


Figura 22.- Crecimiento de la población sobreviviente de coliformes totales en carne de pollo tratada durante 90 min a 2-4 °C con AEN (50 ppm de CLT), NaClO (50 ppm de CLT) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel. A, B superíndices diferentes representan diferencia estadística (Tukey $p \leq 0.05$)

Se observa en la figura anterior, que todos los tratamientos tienen una población inicial de <4 log UFC/mL en el día 0. Los tratamientos NaClO y control alcanzan una población de 7.6 log UFC/mL mientras que AEN y AP alcanzan una población menor 6.3 log UFC al final del estudio. Los tratamientos C y NaClO no mostraron diferencia estadísticamente significativa. Los tratamientos AEN y AP tampoco mostraron diferencia significativa entre sí, resultando más eficientes para el control de coliformes totales. Hablando únicamente de agentes antimicrobianos, sólo el NaClO resultó estadísticamente diferente siendo menos eficiente.

Bauermeister *et al.* (2008), reportaron que al tratar canales de pollo con AP y NaClO obtenían al día 0 de vida de anaquel 2.64 y 3.54 log UFC/mL, respectivamente. En concordancia Smith *et al.* (2007) y Cason *et al.* (2006), reportaron una población de coliformes totales de 3 a 3.7 log UFC/mL después del enfriamiento de canales en proceso. Es importante mencionar, que tampoco existe

un indicador sanitario respecto a este grupo de microorganismos en carne cruda de pollo. La NOM-1994-SSA1-2004, únicamente refiere como indicador sanitario a *E. coli* como microorganismo indicador.

7.4. Determinación de parámetros fisicoquímicos en carne de pollo durante vida de anaquel

7.4.1. Determinación de pH

Se observa en la Figura (23), que la carne de pollo tratada con NaClO a 50 ppm presenta el valor más alto de pH, mientras que la carne tratada con AP es la que presenta el valor más bajo. La carne tratada con AEN muestra un pH inicial similar al grupo control con agua, sin embargo, al día 10 resulta ser el de menor pH. Resulta interesante ver como la carne tratada con AP muestra el pH más bajo debido al pH propio del ácido peracético, no obstante, aproximadamente al día 6 de cruza invierte con el tratamiento de AEN siendo el que presentó el valor de pH más bajo a final del estudio.

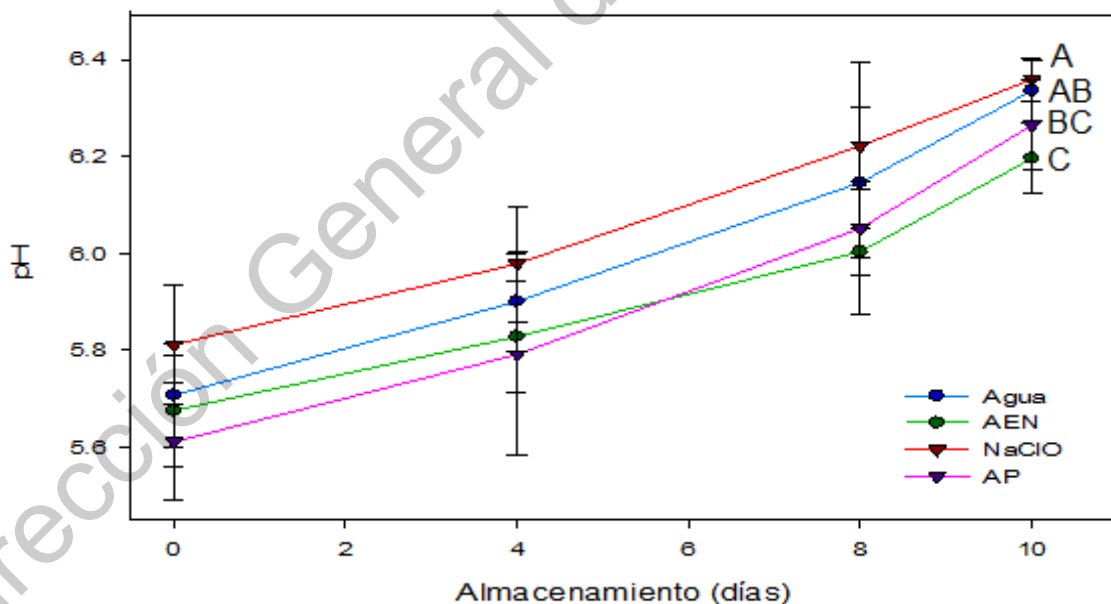


Figura 23.- Comportamiento del pH en carne de pollo tratada con AEN (50 ppm), NaClO (50 ppm) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel. ^{A, B} superíndices diferentes representan diferencia estadística (Tukey $p \leq 0.05$)

En general, los valores se incrementaron durante la vida de anaquel hasta alcanzar valores superiores a 6, sin embargo, resalta que El pH de la carne de pollo tratada con AP se incrementa moderadamente mientras que los tratamientos NaClO y control de incrementa en mayor medida, probablemente debido a la descarboxilación de los aminoácidos presentes en las proteínas a causa del metabolismo microbiano de las bacterias presentes en la carne así como por la degradación proteica de la carne a causa de las enzimas endógenas (Zhang *et al.*, 2016).

El tratamiento con AEN empezó siendo similar al grupo control con agua, y finalizó la vida de anaquel con el pH más bajo (6.2) dentro de todos los tratamientos. De igual forma, se observa que los tratamientos AP y control no presentan diferencia significativa, así como los tratamientos AEN y AP. Sin embargo, la carne tratada con NaClO muestra diferencia significativa con los tratamientos AEN y AP. Fletcher *et al.* (2000), encontraron valores similares con valores de pH entre 5.5 y 6.

7.4.2. Determinación de NBVT

El tratamiento AP presenta la mayor cantidad de NBVT para el día 0 de vida de anaquel, lo que puede indicar que las proteínas presentan un mayor grado de desnaturalización debido a su bajo pH en comparación con los demás tratamientos. Por otro lado, los tratamientos de NaClO y control muestran un valor final de NBVT semejante al AP, ya que al no haber tenido eficiencia antimicrobiana las enzimas microbianas y endógenas produjeron aminos volátiles en mayor cantidad. En general, se observó (Figura 24), un incremento de NBVT en todos los tratamientos para el día 4, no obstante, todos los tratamientos permanecieron dentro del límite máximo permitido (15 mg % NBVT / 100 g muestra) considerado como límite de frescura en China (NSPRC, 2015).

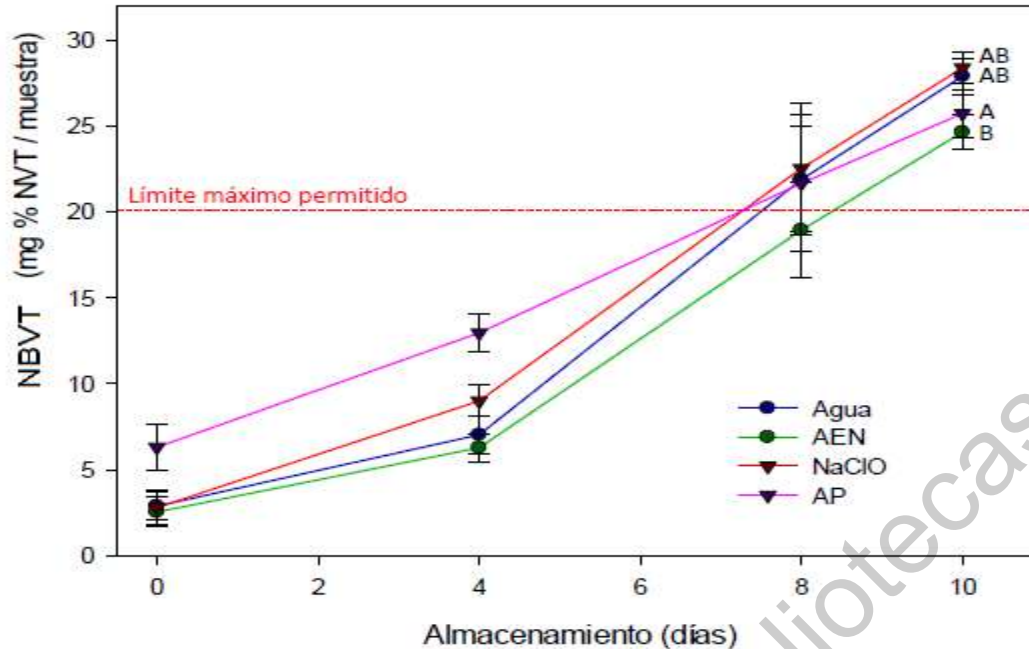


Figura 24.- Cuantificación de nitrógeno básico volátil total en carne de pollo tratada durante 90 min a 2-4 °C con AEN (50 ppm de CLT), NaClO (50 ppm de CLT) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel. ^{A, B} superíndices diferentes representan diferencia estadística (Tukey $p \leq 0.05$)

Se observa en la figura anterior, que los tratamientos AP y AEN son los únicos que presentan diferencia estadísticamente significativa. Para el día 8 de vida de anaquel, los tratamientos C, NaClO y AP presentan prácticamente el mismo valor (22.5 mg % de NBVT/100 g muestra) siendo el tratamiento de AEN el que presenta el valor más bajo (18 mg % NVT/muestra) superando todo el límite establecido en China. Sin embargo, considerando el límite establecido en Korea (20 mg % de NBVT/100 g muestra) la carne tratada con AEN aún estaría por debajo del límite de frescura. Finalmente, se observa para el día 10, que todos los tratamientos superan los límites máximos permitidos. Khulal *et al.* (2016), reportaron valores similares durante la vida de anaquel de pechugas de pollo almacenadas durante 9 días, donde al día 0 los valores oscilaban los 5 a 10 mg NVT y al día 5 ya mostraban valores entre 15 a 20 mg NVT y para el día 9 los valores superaban los 20 mg de NVT. Es importante mencionar que si se elimina

el tratamiento de AP para una comparación entre NaClO y AEN si existe una diferencia significativa entre ambos agentes para esta prueba.

7.4.3. Determinación de color

A continuación, se presenta la Figura (25) con el cambio de color total (ΔE) en las canales de pollo analizadas durante 10 días de vida de anaquel:

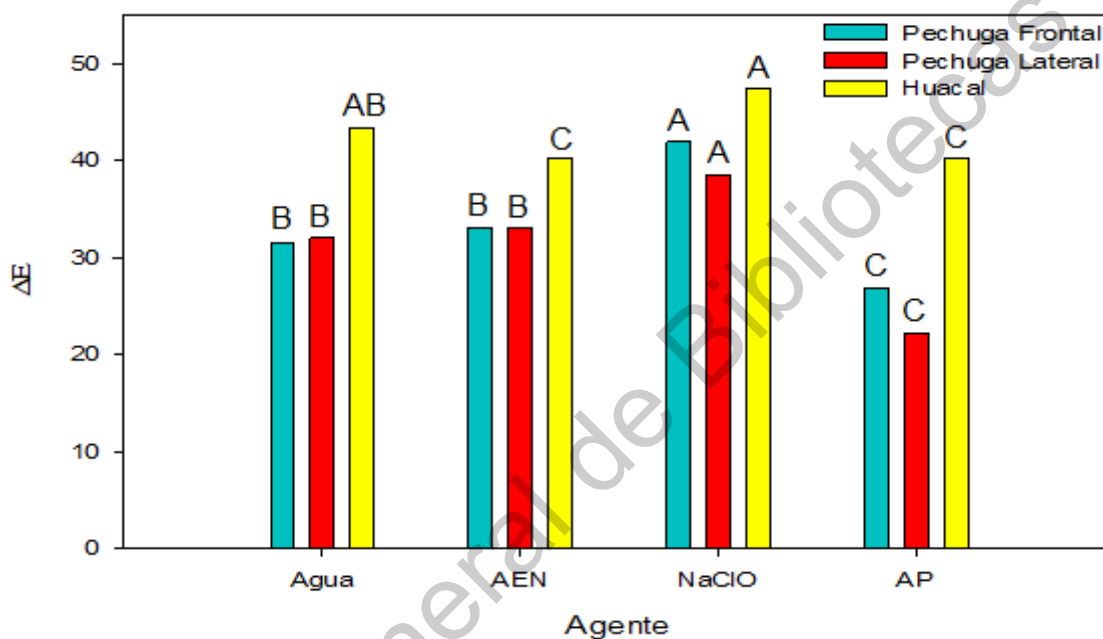


Figura 25.- Determinación del cambio de color total (ΔE) en canales de pollo tratadas durante 90 min a 2-4 °C con AEN (50 ppm de CLT), NaClO (50 ppm de CLT) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel. ^{A, B} superíndices diferentes representan diferencia estadística (Tukey $p \leq 0.05$)

Se observó que los tratamientos AP y NaClO fueron los que mostraron diferencia significativa debido a que el tratamiento NaClO era el que más perdía el color mientras que el tratamiento AP mantenía más el color. Se observó en las tres zonas de las canales donde se midió color, que el tratamiento con NaClO fue el que presentó una mayor decoloración mientras que el tratamiento con AP fue el que presentó el menor cambio de color. De igual forma, se observa que el tratamiento con AEN presentó valores muy parecidos al grupo control con agua.

A continuación, se presenta la Figura (26) con fotografías de las canales al día 0, 4 y 8 de vida de anaquel donde se observa el cambio de color entre los diferentes tratamientos:



Figura 26.- Fotografías donde se evidencia el cambio de color de canales de pollo tratadas durante 90 min a 2-4 °C con AEN (50 ppm de CLT), NaClO (50 ppm de CLT) y AP (140 ppm) y almacenada a 5 °C durante 10 días de vida de anaquel.

En la figura anterior, se muestran fotografías de las canales de pollo donde se aprecia el cambio de color durante la vida de anaquel, perdiéndose la coloración y adquiriendo un tono pálido para el día 4 y una coloración prácticamente blanca para el día 8 de vida de anaquel. También se puede apreciar como los tratamientos con AEN y AP mantienen un mayor tiempo la coloración ya que al día 4 únicamente presentan un ligero cambio de coloración en algunas partes de las canales, mientras que el tratamiento con NaClO y el grupo control

con agua presentan una notable decoloración en la mayor parte de las canales, lo cual se pudo observar analíticamente en los parámetros medidos L^* , a^* y b^* .

A continuación, se presenta la Figura (27), donde se puede apreciar un cambio de color en las canales tratadas con AP:



Figura 27.- Fotografías donde se evidencia una coloración morada dónde hay hematomas o presencia de sangre en las canales de pollo tratadas durante 90 min a 2-4 °C con AP (140 ppm).

En la figura anterior, se muestran diversas fotografías con cambios de color en las canales de pollo tratadas con AP y donde se observan lesiones causadas probablemente durante la matanza generándose un oscurecimiento notable en zonas con sangre. Resulta importante, que los tratamientos con AEN y NaClO así como el grupo control con agua no mostraron estos oscurecimientos en dichas lesiones, lo cual representa otra desventaja para el tratamiento con AP ya que disminuye la calidad visual de las canales de pollo. Además, el AEN no representa un peligro (por contacto en piel e inhalación) para las personas que manipulan los agentes antimicrobianos en la planta.

7.4.4. Detección y cuantificación de los THMs

Con el estándar cromatográfico que contenía a los 4 THMs de interés se realizó un primer análisis tipo Single Ion Monitoring (SIM, por sus siglas en inglés) ya que se conocían los iones en cada compuesto. Posteriormente, se verificaron mediante una comparación con la base de datos NIST V8 para comprobar que las señales obtenidas pertenecían a cada uno de los compuestos. Las condiciones cromatográficas empleadas fueron: temperatura de inyección: 250 °C, línea de transferencia: $T_0 = 50$ °C durante 1 min, se incrementó 10 °C / min hasta alcanzar $T_f = 100$ °C durante 1 min, y split 1:100. A continuación, se enlistan los principales iones encontrados y verificados con la base de datos NIST para cada compuesto:

- Cloroformo (CHCl_3): 119, 118, 87, 85, 83, 49, 48, 47 y 35.
- Bromoformo (CHBr_3): 254, 252, 251, 175, 173, 171, 158, 93 y 91.
- Bromodiclorometano (CHBrCl_2): 163, 162, 128, 127, 123, 48 y 47.
- Clorodibromometano (CHClBr_2): 208, 207, 206, 129.

En la Figura (28), se muestra el cromatograma con las señales de cada compuesto presente en el estándar cromatográfico y sus respectivos tiempos de retención.

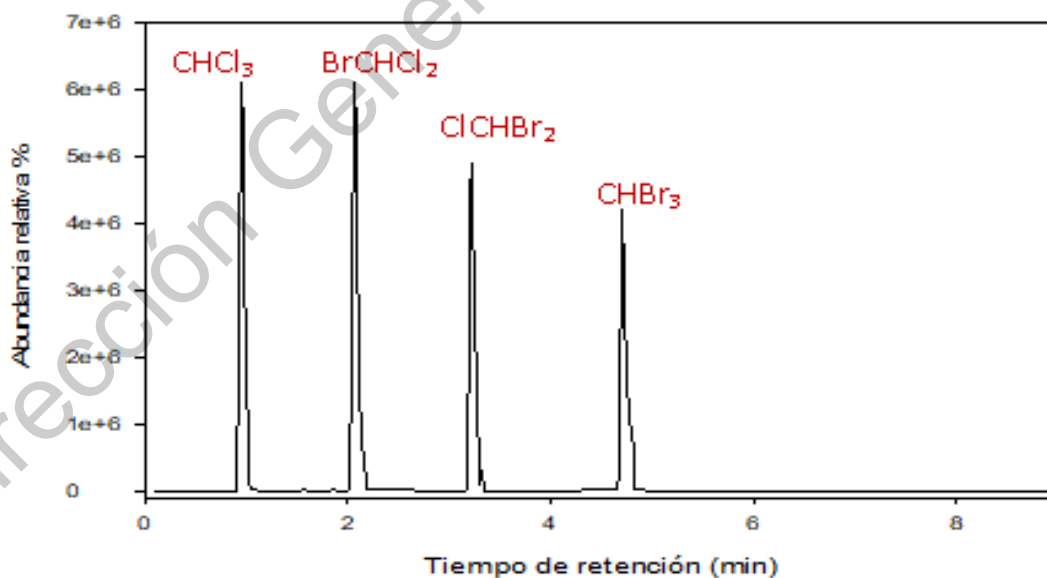


Figura 28.- Cromatograma con las señales detectadas de los estándares (CHCl_3 , CHBrCH_3 , CHClBr_2 y CHBr_3) y sus tiempos de retención mediante CG/EM.

En la Figura (29), Se puede observar que la primera señal corresponde al CHCl_3 con un tiempo de retención de 0.95 min, la segunda señal corresponde al BrCHCl_2 con un tiempo de retención de 2.05 min, la tercera señal corresponde al ClCHBr_2 con un tiempo de retención de 3.4 min y finalmente la última señal corresponde al CHBr_3 con un tiempo de retención de 4.7 minutos.

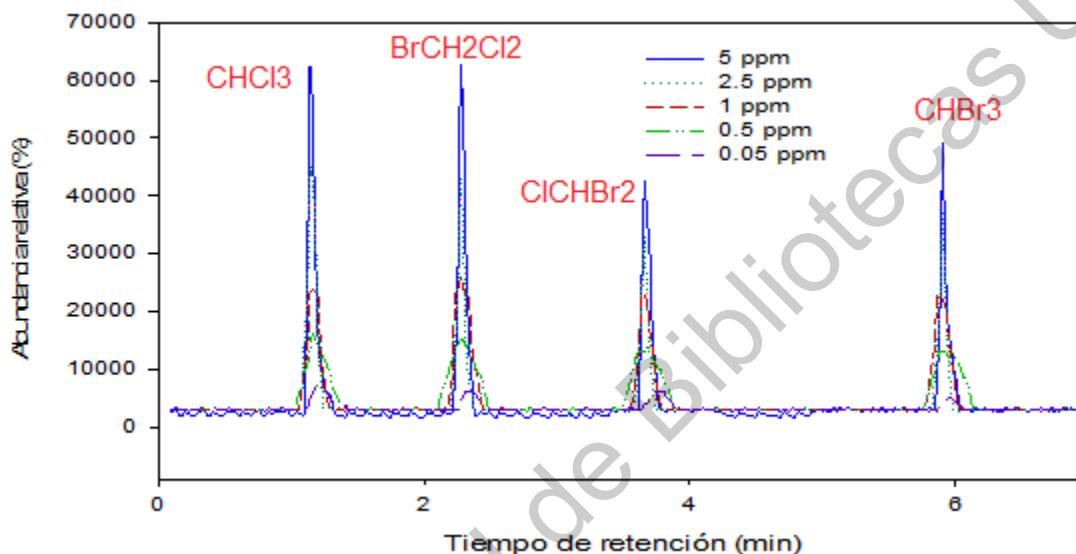


Figura 29.- Cromatograma que muestra el efecto de la concentración en la intensidad de las señales obtenidas del estándar cromatográfico a diferentes concentraciones (20 ppm, 5 ppm, 1 ppm, 0.5 ppm y 0.05 ppm).

Posteriormente, se analizaron cada una de las diluciones preparadas para establecer la sensibilidad del método con el equipo empleado. Con la sensibilidad encontrada se alcanza a detectar a un nivel de sensibilidad suficiente para detectar la concentración de trihalometanos máxima permitida y establecida por la EPA en agua para consumo humano siendo de 0.08 ppm, mientras que en la Unión Europea es de 0.1 ppm. Cabe mencionar que se analizó la concentración de 0.005 ppm pero tanto ClCHBr_2 como CHBr_3 no presentaban señal. Además, la señal obtenida del CHCl_3 y el BrCHCl_2 eran muy pequeñas, por lo que 0.05 ppm fue la menor concentración que se analizó donde se obtenían señales adecuadas

para su posterior cuantificación. A continuación, se presenta la Figura (30) con las curvas de calibración de los THMs estudiados y contenidos en el estándar, así como su coeficiente de correlación y límites de detección y cuantificación en cada caso:

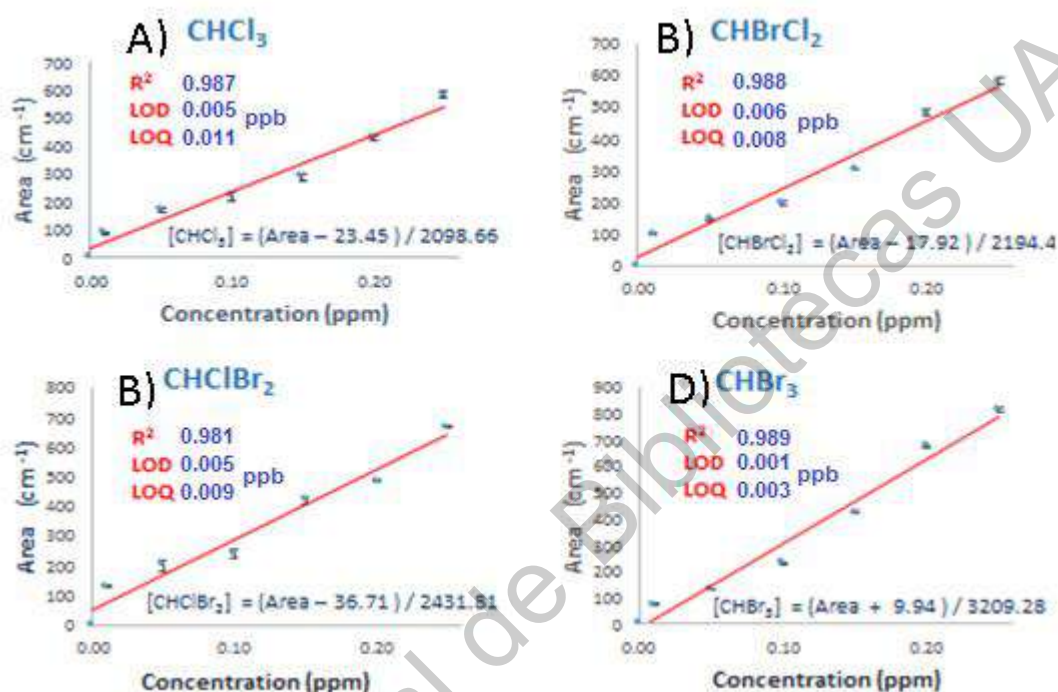


Figura 30.- Curvas de calibración de cada THM contenido en el estándar cromatográfico donde se presentan los coeficientes de correlación, límites de detección y límites de cuantificación del método empelado.

Ya teniendo establecida la técnica para la cuantificación de THMs, se procedió a detectarlos y cuantificarlos en carne de pollo. No se detectaron THMs en canales de pollo en ninguno de los tejidos analizados (carne, piel y grasa) después de tratarlas con 50 ppm CLT de AEN y NaClO.

El análisis en los diferentes tejidos se realizó para ver si existía posibilidad de que los THMs se pudieran formar en un tejido específico de las canales (Cuadro 8). De igual forma, no se detectaron en el grupo control donde las canales se sometieron únicamente a enfriamiento con agua fría. Finalmente, observamos un porcentaje de recuperación cercano al 99% lo que nos sugiere que los THMs

que no fueron detectados durante los tratamientos, no fue debido a una limitación del método.

Cuadro 8.- Detección de THMs en canales de pollo

Agente	Tejido cárnico	Trihalometanos ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)			
		CHCl_3	CHBrCl_2	CHClBr_2	CHBr_3
AEN	Fibra muscular	< 0.011	< 0.008	< 0.009	< 0.003
	Grasa	< 0.011	< 0.008	< 0.009	< 0.003
	Piel	< 0.011	< 0.008	< 0.009	< 0.003
NaClO	Fibra muscular	< 0.011	< 0.008	< 0.009	< 0.003
	Grasa	< 0.011	< 0.008	< 0.009	< 0.003
	Piel	< 0.011	< 0.008	< 0.009	< 0.003
Recuperación (%)		99.3	99.0	98.8	99.7

AEN y NaClO a 50 ppm CLT, 2-4 °C por 90 min. Valores promedio \pm desviación estándar

Al no encontrar THMs en canales de pollo después de tratamientos de 50 ppm de CLT de AEN y NaClO (límite máximo permitido en procesamiento avícola), se procedió a analizar la formación de THMs empleando mayores concentraciones de NaClO y AEN en piernas de pollo. Se emplearon tratamientos de 100 y 150 ppm, lográndose detectar CHCl_3 , CHBrCl_2 y CHBr_3 con el NaClO mientras que con AEN únicamente se pudo detectar CHCl_3 (Figura 29):

Es importante mencionar que se decidió emplear la concentración de 100 de NaClO ya que, en reportes previos, se observó la formación del CHCl_3 y del diclorometano a partir de concentraciones de 100 ppm de NaClO, por lo que se buscó asegurar la formación de compuestos THMs (Masri, 1985; Robinso *et al.*, 1981; Vizzier-Thaxton *et al.*, 2010). Más aún, la concentración de 150 ppm para conocer el comportamiento en la formación de los THMs como consecuencia de una sobre cloración accidental en durante el proceso avícola.

A continuación, se presentan los cromatogramas donde se identifican los THMs en piernas de pollo (Figura 31):

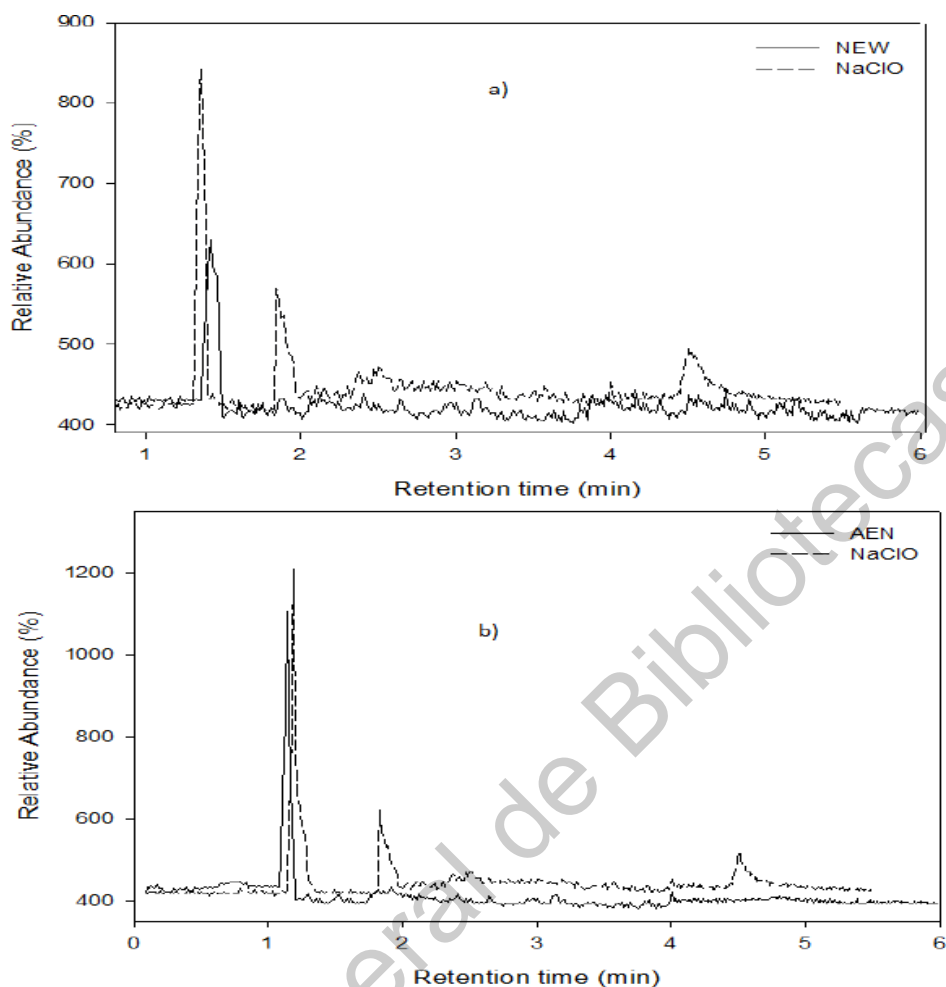


Figura 31.- Detección de THMs presentes en piernas de pollo tratadas durante 50 min a 4-5 °C con: a) 100 ppm de CLT y b) 150 ppm de CLT de ambos agentes.

Mediante el análisis estadístico, se observó que el factor agente es significativo para la formación de CHCl_3 mientras que para BrCHCl_2 y CHBr_3 el factor concentración fue significativo. De igual forma, se observó que el efecto de la interacción de los factores en el diseño empleado es significativo. Mediante a comparación de medias se observó que para CHCl_3 , 50 ppm de ambos agentes son estadísticamente iguales, pero muestran diferencia significativa con los tratamientos de mayor concentración de CLT. El tratamiento de 150 ppm de AEN no mostro diferencia significativa con 100 ppm de NaClO.

Cuadro 9.- Cuantificación de THMs en piernas de pollo

Agente	Concentración (ppm)	THMs ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)		
		CHCl_3	CHBrCl_2	CHBr_3
AEN	50	< 0.011 ^D	< 0.008 ^C	< 0.003 ^C
	100	0.037 \pm 0.001 ^C	< 0.008 ^C	< 0.003 ^C
	150	0.043 \pm 0.001 ^B	< 0.008 ^C	< 0.003 ^C
NaClO	50	< 0.011 ^D	< 0.008 ^C	< 0.003 ^C
	100	0.039 \pm 0.001 ^B	0.026 \pm 0.001 ^B	0.020 \pm 0.001 ^B
	150	0.044 \pm 0.001 ^A	0.031 \pm 0.001 ^A	0.023 \pm 0.001 ^A

^{A, B} medias con superíndice diferente presenta diferencia (Prueba de Tukey, $P \leq 0.05$). Valores promedio \pm desviación estándar. n=36 piernas de pollo

Masri (1985), detectó en carne de pollo lavada con 100 ppm de NaClO hasta 4.4 mg/Kg diclorometano mediante extracción con etanol. Robinson *et al.* (1981), logró cuantificar 0.030, 0.146 y 0.017 mg/Kg de CHCl_3 en piel, grasa y carne de pollo lavadas con 50 ppm de NaClO mediante una extracción con éter de petróleo. Axtell *et al.* (2006), mediante una modificación al A.O.A.C, con alcohol isopropílico detectó CHCl_3 en piel con grasa (0.22 mg/Kg) y en carne de pollo (0.06 ppm). Finalmente, Vizzier–Thaxton *et al.* (2010), mediante el método oficial 8260b cuantificaron CHCl_3 (0.016 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) en piernas de pollo.

8. CONCLUSIONES

El AEN producida en el CIDETEQ presenta mayor estabilidad en cuanto a la concentración de CLT, cuando es almacenada en condiciones de refrigeración, teniendo una pérdida de 20% por cada mes de almacenamiento. Además, el pH y ORP se mantienen constantes.

La técnica de voltametría de barrido no permitió detectar las especies químicas presentes en AEN, sin embargo, para el NaClO comercial si permitió detectar tanto el HOCl como el ClO⁻. No obstante, mediante CG/EM si se pudo detectar HOCl/ClO⁻, así como al ClO₂.

El AEN presenta una mayor actividad antimicrobiana (~10 veces) ante células planctónicas de *Salmonella* en comparación que el NaClO. Además, se logró visualizar el daño en la estructura celular causado por AEN como mecanismo de acción. Por otro lado, el AEN presentó una mayor actividad antimicrobiana ante *Salmonella* en medio semisólido, mostrando actividad a 90 ppm, mientras que el NaClO presentó actividad hasta 120 ppm. Adicionalmente, no existió diferencia estadísticamente significativa en la actividad antimicrobiana de ambos agentes ante *Salmonella* en canales de pollo.

El AEN y AP no mostraron diferencia significativa en la reducción de BMA's (0.9 log UFC/mL) y coliformes totales (1.3 log UFC/mL). Sin embargo, NaClO si mostró diferencia significativa frente a AEN y AP en el control de estos grupos microbianos.

En la determinación de pH, carne tratada con AEN mostró diferencia significativa con el control durante los 10 días de estudio, mostrando los valores más bajos, mientras que el NaClO mostró los valores más elevados. En la determinación de NBVT, tratamientos de AEN, AP y NaClO no mostraron diferencia significativa con el control. Sin embargo, AP y AEN mostraron diferencia significativa entre ellos. AEN estuvo por debajo del límite máximo establecido hasta el día 8 de vida de anaquel mientras que los demás tratamientos lo superaron desde el día 4. En la determinación de color, carne tratada con AP mostró el menor cambio de color durante la vida de anaquel mientras que el mayor

cambio de color lo presentó NaClO, mostrando diferencia significativa. Por otro lado, AEN y el control, no mostraron diferencia significativa.

Se estableció la metodología para identificar CHCl_3 , BrCHCl_2 , ClCHBr_2 y CHBr_3 con una sensibilidad del método de $0.005 \mu\text{g/Kg}$ estando por debajo del límite máximo permitido tanto por la EPA ($80 \mu\text{g/Kg}$) como por la Unión Europea ($100 \mu\text{g/Kg}$). No se detectaron trihalometanos en carne de pollo al emplear 50 ppm de AEN o NaClO durante la intervención antimicrobiana. Sin embargo, se logró detectar CHCl_3 (0.037 y $0.039 \mu\text{g/Kg}$) presente en piernas de pollo que fueron tratadas desde 100 ppm de CLT de NaClO y AEN, respectivamente; para este trihalometano no existió diferencia significativa entre ambos agentes antimicrobianos. Además, se logró detectar CHBrCl_2 y CHBr_3 en tratamientos de 100 y 150 ppm de CLT únicamente con NaClO.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Aider M.**, Gnatko E., Benali M., Plutakhin G., Kastyuchik A. **2012**. Electro-activated aqueous solutions: Theory and application in the food industry and biotechnology. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 15: 38-49.
- Al-Haq M. I.**, Sugiyama J., Isobe S. **2005**. Applications of electrolyzed water in Agriculture and food industries. *Food Sci. Tech.* 11:135-150.
- Al-Holy M. A.**, Rasco B. A. **2015**. The bactericidal activity of acidic electrolyzed water against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on raw fish, chicken and beef surfaces. *Food Control.* 54:317-321.
- Allen V. A.**, Corry J. E. L., Burton C. H., Whyte R. T., Mead G. C. **2000**. Hygiene aspects of modern poultry chilling. *Int. J. Food Microbiol.* 58:39–48.
- Arnold, J. W.**, & Yates, I. E. **2009**. Interventions for control of Salmonella: clearance of microbial growth from rubber picker fingers. *Poultry Sci.* 88(6):1292-1298.
- Axtell S. P.**, Russell S. M., Berman E. **2006**. Effect of immersion chilling of broiler chicken carcasses in monochloramine on lipid oxidation and halogenated residual compound formation. *J. Food Protect.* 69:907-911.
- Badaoui M. N.**, Meng J. **2006**. Risk assessment of disinfection by products in poultry chilled in chlorinated water. Research report. Joint Institute for Food Safety and Nutrition. P 7.
- Badui D. S.** **2006**. Capítulo 1 El agua en Química de los Alimentos. Pearson Education, México. 4^{ta} Edición. ISBN: 970-26-0670-5.
- Balamatsia, C. C.**, Paleologos, E. K., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. **2006**. Correlation between microbial flora, sensory changes and biogenic amines formation in fresh chicken meat stored aerobically or under modified atmosphere packaging at 4 C: Possible role of biogenic amines as spoilage indicators. *Antonie van Leeuwenhoek Journal*, 89:9–17.
- Bauermeister, L. J.**, Bowers, J. W. J., Townsend, J. C., & McKee, S. R. **2008**. The microbial and quality properties of poultry carcasses treated with peracetic acid as an antimicrobial treatment. *Poultry Sci.* 87(11):2390-2398.

- Bekhit, A. E. D. 2010.** Fermentation of fish roe. In: Heldman, D. R., Hoover, D. G., Wheeler, M. B. (Eds.). The Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food. Vol. 1. Taylor and Francis Group. USA p. 251-256.
- Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H. U., & Egli, T. 2007.** Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. Appl. Env. Microbiol. 73(10):3283-3290.
- Braña V. D., Ramírez R. E., Rubio L. M., Sánchez E. A., Torrescano U. G., Arenas M. M., Partida P. J., Ponce A. E., Ríos R. F. 2011.** Manual de análisis de Calidad en muestras de carne. Folleto Técnico No. 11. INIFAP. 1ª Edición.
- Cadena M. E. 2014.** Estudio de la aplicación de agua electrolizada neutra en la desinfección de frutas y hortalizas frescas. Tesis de Maestría. P 90.
- Carvalho, R. H., Soarez, A. L., Grespan, M., Spurio, R. S., Coró, F. A. G., Oba, A., et al. 2015.** The effects of the dark house system on growth performance and meat quality of broiler chicken. Anim. Sci. J. 86: 189-193.
- Chan, J. T. Y., Omana, D. A., Betti, M. 2011.** Effect of ultimate pH and freezing on the biochemical properties of proteins in turkey breast meat. Food. Chem. 127:109-117.
- Cason, J. A., & Hinton Jr, A. 2006.** Coliforms, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Salmonella* in a counterflow poultry scalding tank with a dip tank. Int. J. Poultry Sci. 5:846-849.
- Castañeda S. M., Braña V. D., Martínez V. W. 2013.** Carne de pollo mexicana. Publicación del Macroproyecto "Indicadores de calidad en la cadena de producción de carne fresca en México" SAGARPA-CONACYT en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM y por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. ISBN: 978-607-37-0090-0.
- CDC.** Centro de Control de Enfermedades. Reports of selected *Salmonella* Outbreak Investigations. Última revisión de página febrero 2018. Obtenido de: <http://www.cdc.gov>

- Chintagari S., Hung Y. C., Hamanaka D. 2015.** Resistance of various STEC strains and serogroups to UV radiation and effect of nalidixic acid adaptation. *Food Control.* 50: 313-319.
- Chu W., Gao N., Yin D. Krasner S. W. 2013.** Formation and speciation of nine haloacetamides, an emerging class of nitrogenous DBP's, during chlorination or chloramination. *J. Hazard Mater.* 260:806-812.
- Crank J. 1975.** Mathematics of diffusion. Clarendon Press. 2^{da} edición. P 5.
- Cunningham H. M., Lawrence G. A. 1977.** Effect of exposure of meat and poultry to chlorinated water on the retention of chlorinated compounds and water. *J. Food Sci.* 42:1504-1509.
- Dhayakaran, R. P. A., Neethirajan, S., Xue, J., & Shi, J. 2015.** Characterization of antimicrobial efficacy of soy isoflavones against pathogenic biofilms. *LWT-Food Sci. Tech.* 63(2):859-865.
- Del Río E., Panio-Morán M., Prieto M., Alonso-Calleja C., Capita R. 2007.** Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International J. Food Microbiol.* 115:268–280.
- Demirci A., Ngadi M. O. Microbial decontamination in food industry. 2012.** Woodhead Publishing Limited. Oxford-Cambridge-Philadelphia-New Delhi. 563-592.
- EPA. Environmental Protection Agency. 1999.** Manual de orientación sobre desinfectantes alternativos y oxidantes. P 54.
- EPA. Environmental Protection Agency. 2006.** Volatile Organic compounds by gas chromatography / mass spectrometry 8260c.
- EPA. Environmental Protection Agency. 1999.** Folleto informativo sobre tecnología de aguas residuales – Desinfección con cloro. P 9.
- EPA. Environmental Protection Agency. 1994.** Drinking water criteria document for chloramines. P 12.
- Ercolini D., La Stora A., Villani F., Mauriello G. 2005.** Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. *J. Appl. Microbiol.* 100:765-772.

- EFSA.** European Food Safety Authority. **2005.** Scientific opinion: Treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids. *EFSA Journal.* 297:1-27.
- EFSA.** European Food Safety Authority. **2014.** Scientific opinion: Safety and efficacy of peroxyacetic acid solutions for reduction of pathogens in poultry carcasses and meat. BIOHAZ Panel. Parma, Italy. *EFSA Journal.* 12:3599.
- Fabrizio K. A., Cutter C. N. 2004.** Comparison of electrolyzed oxidizing water with other antimicrobial interventions to reduce pathogens on fresh pork. *Meat Sci.* 68:463-468.
- Fernández E. E.** Microbiología e inocuidad de los alimentos. 2^{da} edición **2008.** Editorial Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. P 270.
- Filgueras, R. S., Gatellier, P., Zambiasa, R. C., Sant-Lhoutellier, V. 2011.** Effect of frozen storage duration and cooking on physical and oxydative changes in *M. Gastrnecmius pars interna* and *M. Iliofiburalis f rhea americana*. *Meat Sci.* 88:645.681.
- Fletcher, D. L., Qiao, M., & Smith, D. P. 2000.** The relationship of raw broiler breast meat color and pH to cooked meat color and pH. *Poultry Sci.* 79(5):784-788.
- FSIS.** Food Safety and Inspection Service. Directive. USDA/FSIS, Washington, DC: Last Review December 21th **2012.** Safe and Suitable ingredients used in the production of meat, poultry and egg products.
- Fukuyama M. Y., Tan H., Wheeler W. B., Wei C. I. 1986.** Reactions of aqueous chlorine and chlorine dioxide with model food compounds. *Environ. Health Persp.* 69:267–274.
- Fukuzaki S. 2006.** Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci* 11(4):147–57.
- Gálvez, M. A. 2006.** Proteínas. Capítulo No. 3 en: Química de los Alimentos. Editorial Pearson Addison Wesley. Cuarta edición. México. P 119
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H. Q., Wei, W., Cong, J. Y. 2003.** The calpain system. *Physiol. Rev.* 83: 731-801.

- Gordon G.**, Cooper W. J., Rice R. G., Pacey G. E., **1992**. Chlorine, chloramines and the oxy-chlorine species. In Disinfectant residual measurement methods. 2nd edition. Awwa Research foundation and American water works. P 62.
- Hernández-Hernández Elvia**, Carlos Regalado-González, Pedro Vázquez-Landaverde, Isabel Guerrero-Legarreta, and Blanca E. García-Almendárez. **2014**. Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and european (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. Scientific World J. vol. 2014, Article ID 641814, 12 pages, 2014.
- Hsu S.Y.** **2005**. Effects of flow rate, temperature and concentration on chemical and physical properties, of electrolyzed oxidizing water. J. Food Eng. 66:71-176.
- Hsu S. Y.**, Kao H. Y. **2004**. Effects of storage conditions on chemical and physical properties of electrolyzed water. J. Food Eng. 65:465-471.
- Huang J. Y.**, Henao L. O., Vugia D. J., Hurd S., Ryan P., Cronquist A., Tobin-D'Angelo M., Smith K., Lathrop S., Zansky S., Cieslak P., Dunn J., Holt G. K., Wolpert V. J., Griffin P., Patrick M. E. **2011**. Infections with pathogens transmitted commonly through food and the effect of increasing use of culture-independent diagnostic tests on surveillance: Foodborne diseases active surveillance network 10 U. S. sites 2012-2015. Morbidity and Mortality weekly report. 60:749-755.
- Jay J. M.**, Loessner M. J., Golden D. A. **2005**. Microbiología moderna de los alimentos. Capítulo 3. Editorial Acirbia. Zaragoza, España. P 42.
- Karuiki S.**, Onsare R., Mwituria R., Ng'etich R., Nafula C., Karimi K., Karimi P., Njeruh F., Irungu P., Mitea E. **2013**. Improving food safety in meat value chains in Kenya. FAO / WHO Project Report.
- Kralik**, Gordana & Djurkin Kušec, Ivona & Kralik, Zlata & Skrtic, Zoran & Radisic, Zarko. **2014**. Quality indicators of broiler breast meat in relation to colour. Anim. Sci. 32:173-178.
- Kemp G. K.**, Aldrich M. L., Waldroup A. L. **2000**. Acidified sodium chlorite antimicrobial treatment of broiler carcasses. J. Food Protect. 63:1087-1092.

- Kim C., Hung Y.C., Russel S. M. 2005.** Efficacy of electrolyzed water in the prevention and removal of fecal material attachment and its microbicide effectiveness during simulated industrial poultry processing. *Poultry Sci.* 84:1778-1784.
- Kim J.-W., Slavik M. F. 1996.** Cetylpyridinium chloride (CPC) treatment on poultry skin to reduce attached *Salmonella*. *J. Food Protect.* 59:322-326.
- Koseki, S., & Isobe, S. 2007.** Microbial control of fresh produce using electrolyzed water. *Jpn Agric. Res. Quart.* 41(4):273-282.
- Lee-Shin T., Schade J. E., Molineux B. T. 1991.** Chlorination of poultry chiller water: Chlorine demand and disinfection efficacy. *Poultry Sci.* 71:188-196.
- Len, S. V., Hung, Y. C., Chung, D., Anderson, J. L., Erickson, M. C., & Morita, K. 2002.** Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing water. *J. Agric. Food Chem.* 50:209-212.
- Leyer G. J., Johnson E. A. 1997.** Acid adaptation sensitizes *Salmonella* Typhimurium to hypochlorous acid. *Appl. Environ Microbiol.* 63:461-467.
- Li Y., Yang H., Swem B. L. 2002.** Effect of high temperature inside-outside spray on survival of *Campylobacter jejuni* attached to prechilled chicken carcass. *Poultry Sci.* 81:1371-1377.
- Madigan T. M., Martinko M. J., Dunlap P. V., Clark P. D.** *Biología de los microorganismos.* 12ª Edición. Editorial Pearson-Addison Wesley. **2009.** P 95.
- Marriott N. G. 1999.** Principles of food sanitization. 4th edition. Gaithersburg. MD: Aspen Publishers.
- Masri M. S. 1985.** Chlorinating Poultry Chiller Water: The generation of mutagens and water re-use. *Food Chem. Toxicol.* 24:923-930.
- Min J. S., Lee S. O., Jang A., Jo C., Park C. S., Lee M. 2007.** Relationship between the concentration of biogenic amines and volatile basic nitrogen in fresh beef, pork, and chicken meat. *The Asian Australasian Association of animal production societies.* 20:1278-1284.
- Moore, A., Nannapaneni, R., Kiess, A., Sharma, C. S. 2017.** Evaluation of USDA approved antimicrobials on the reduction of *Salmonella* and *Campylobacter* in

ground chicken frames and their effect on meat quality. *Poult. Sci.* (96)7: 2385-2392.

Moretro T., Heir E., Neisse L. L., Vestby L. K., Langsrud S. **2012**. Control of Salmonella in food related environments by chemical disinfection. *Food Research Int.* 45:532:544.

Nachón-García F. J., Díaz-Téllez J., Rivas-Espinoza V., González S. J., Nachón-García G., García-García F., García-Santiago J. **2008**. Esterilización por inmersión. Estudio comparativo entre glutaraldehído al 2%, agua electrolizada superoxidada con pH neutro y solución electrolizada por selectividad iónica con pH neutro. *Rev Med UV* 8:6-10.

NSPRC. National Standards of People's Republic of China. **2015**. *National Standards applicable to meat category. GBT 16869-2005 Fresh and frozen poultry products*. Accessed January 30, 2018 www.mpi.govt.nz/document-vault/14392

Norma Mexicana **NMX-AA-100-SCFI-2001**; Calidad del agua. Determinación de cloro libre y cloro total. Método de yodometría.

Norma Oficial Mexicana **NOM-092-SSA1-1994**. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Norma Oficial Mexicana **NOM-113-SSA1-1994**. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Norma Oficial Mexicana **NOM-194-SSA1-2004**. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado para animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.

Norma Oficial Mexicana **NOM-213-SSA1-2002**. Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

Northcutt J. K., Smith D. P., Musgrove M. T., Ingram K. D., Hinton A. Jr. **2005**. Microbiological impact of spray washing broiler carcasses using different chlorine concentrations and water temperatures. *Poultry Sci.* 84:1648–1652.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Manual de buenas prácticas de higiene para la industria de la carne. Roma, **2007**.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. **2009**. Revisión de página web: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html>

OMS. Organización Mundial de la Salud. **2008**. Guidelines for Drinking water. 3th edition, Volume 3. Revisión de página web: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/fulltext.pdf?ua=1

OMS. Organización Mundial de la Salud. **2009**. Benefits and risks of the use of chlorine-containing disinfectants in food production and food processing. WHO-Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, Switerland.

Park H., Hung Y.-C. Brackett R. E. 2002. Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. International J. Food Microbiol. 72:77–83.

Pastukhov V. L., Morozov, V. P. 2000. Raman scattering of light by the electroactivated water. Opt Spectrosc. 88:41-44.

Pathiratne K. A. S., Skandaraja S. S., Jayasena E. M. C. M. 2008. Linear weep voltammetric determination of free chlorine in waters using graphite working electrodes. J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka. 36:25-31.

Rahman, S. M. E., Park, J., Song, K. B., Al-Harbi, N. A., & Oh, D. H. 2012a. Effects of slightly acidic low concentration electrolyzed water on microbiological, physicochemical, and sensory quality of fresh chicken breast meat. Journal of Food Sci. 71:35-41.

Rahman, S. M. E., Park, J. H., Wang, J., & Oh, D. H. 2012b. Stability of low concentration electrolyzed water and its sanitization potential against foodborne pathogens. J. Food Eng. 113:548-553.

Rahman, S. M. E., Khan, I., & Oh, D. H. 2016. Electrolyzed water as a novel sanitizer in the food industry: Current trends and futures perspectives. Comp. Rev. Food Sci. Food Safety. 15:471-491.

- Rasschaert** G., Piessens V., Scheldeman P., Leleu S., Stals A., Herman L., Heyndrickx M., Messens W. **2013**. Efficacy of electrolyzed oxidizing water and lactic acid on the reduction of *Campylobacter* on naturally contaminated broiler carcasses during processing. *Poult. Sci.* 92:1077-1084.
- Richardson** S. D., Postigo C. **2009**. Drinking water disinfection by-products. In *Emerging Organic Contaminants and Human Health*. Springer. P 23.
- Riedel** C. T., Bronsted L., Rosenquist H., Haxgart S. N., Christensen B. B. **2009**. Chemical decontamination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin and meat. *J. Food Protec.* 72:1173-1180.
- Robinson** D., Mead G. C., Barnes K. A. **1981**. Detection of chloroform in tissues of freshly eviscerated poultry carcasses exposed to water containing added chlorine and chlorine dioxide. *Environ. Contam. Toxicol.* 27: 145-150.
- Sams** R. Alan. *Poultry Meat Processing*. CRC Press. Boca Raton Fl. Estados Unidos. **2001**. P 31.
- Saputro** S., Takehara K., Yoshimura K., Matsuoka S. y Narsito. **2010**. Differential pulse Voltammetric determination of free chlorine for water disinfection process. *Electroanal.* 23:2765-2768.
- Sexton** M., Raven G., Hold G., Pointon A., Klermeier A., Sunner J. **2007**. Effect of acidified sodium chlorite treatment on chicken carcasses processed in South Australia. *Int. J. Food Microbiol.* 115:252-255.
- Sheen** S., Cassidy J., Scullen B., Uknalis J., Sommers C. **2015**. Inactivation of *Salmonella* spp. in ground chicken using high pressure processing. *Food Control.* 57:41-47.
- Sinhamapatra** M., Biswas S., Das A. K., Bhattacharyya D. **2004**. Comparative study of different surface decontaminants on chicken quality. *Brit. Poultry Sci.* 45:624-630.
- Smith**, D. P., Northcutt, J. K., Cason, J. A., Hinton Jr, A., Buhr, R. J., & Ingram, K. D. **2007**. Effect of external or internal fecal contamination on numbers of bacteria on prechilled broiler carcasses. *Poultry Sci.* 86(6):1241-1244.
- Stopforth** J. D., O'Connor R., Lopes M., Kottapalli B., Hill W. E., Samadpour M. **2007**. Validation of individual and multiple sequential interventions for reduction

- of microbial populations during processing of poultry carcasses and parts. *J. Food Protect.* 70:1393-1401.
- Su, X., & D'Souza, D. H. 2012.** Reduction of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* on produce by trisodium phosphate. *LWT-Food Sci. Tech.* 45(2):221-225.
- Sun F., Chen J., Tong Q., Zeng S. 2009.** Development and identification of an integrated waterworks model for trihalomethanes simulation. *Sci. Total Environ.* 407:2077-2086.
- Thongbai, B., Gasaluck, P., & Waites, W. M. 2006.** Morphological changes of temperature-and pH-stressed *Salmonella* following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin. *LWT-Food Sci. Tech.* 39(10):1180-1188.
- Tuncer, B., & Sireli, U. T. 2008.** Microbial growth on broiler carcasses stored at different temperatures after air-or water-chilling. *Poultry Sci.* 87(4):793-799.
- Unal, R., Yousef, A. E., & Dunne, C. P. 2002.** Spectrofluorimetric assessment of bacterial cell membrane damage by pulsed electric field. *Innov. Food Sci. Emerg.* 3(3):247-254.
- UE. Unión Europea. 2009.** European Union Standards. CSN EN 937 Chemicals used for treatment of water intended for human consumption.
- UNA. Unión Nacional de Avicultores. Última revisión 7 de febrero de 2018.**
<http://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos>
- USDA. United States Department of Agriculture. 1999.** Food Safety and Inspection Service. Generic model HACCP model for slaughter. 20-34.
- Veld G. I. T., Driessen A. J. M., Konings W. N. 1993.** Bacterial solute transport proteins in their lipid environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:293-314.
- Vizzier-Thaxton Y., Ewing M. L., Bonner C. M. 2010.** Generation and detection of trihalomethanes in chicken tissue from chlorinated water. *Poultry Sci.* 19:169-173.
- Wang, X. F., Zhu, X. D., Li, Y. J., Liu Y., Li, J. L., Gao, F. L., et al., 2015.** Effect of dietary creatinine monohydrate supplementation on muscle lipid peroxidation

and antioxidant capacity of transported broilers in summer. *Poultry Sci.* 94: 2797-2804.

Wang W.-C., Li Y., Slavik M. F., Xoing H. **1997**. Trisodium phosphate and cetylpyridinium chloride spraying on chicken skin to reduce attached *Salmonella Typhimurium*. *J. Food Protect.* 60:992–994.

Waters W. B., Tatum J. M., Yen-Con Hung. **2014**. Effect of chlorine based sanitizer properties on corrosion of metals commonly found in food processing environment. *J. Food Eng.* 121:159-165.

White G. C. **1999**. Chemistry of chlorination. In *Handbook of chlorination and alternative disinfectants*. 4th edition. John Wiley and Sons. P 272.

Wilson W. W., Wade M. M., Holman S. C., Champlin F. R. **2001**. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *J. Microbiol. Meth.* 43:153-164.

Yang H., Feirtag J., Diez-González F. **2013**. Sanitizing effectiveness of commercial “active water” technologies on *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 33:232-238.

Yang Z., Li Y., Slavik M. F. **1998**. Use of antimicrobial spray applied with an inside-outside birdwasher to reduce bacterial contamination on prechilled chicken carcasses. *J. Food Protect.* 61:829-832.

Yu-Ru H., Yen-Con H., Shun Y. H., Yao-Wen H., Deng-Fwu H. **2008**. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control.* 19:329-345.

Zhang, H., Wu, J., & Guo, X. **2016**. Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. *Food Sci. Human Well.* 5(1):39-48.

Zouaghi F. Cantalejo M. **2016**. Study of modified atmosphere packaging on the quality of ozonated freeze-dried chicken meat. *Meat Sci.* 119:123-131.