



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Evaluación de la Solución Electrolizada de  
Superoxidación con pH neutro en huevo para  
plato y huevo embrionado contaminados con  
*Listeria monocytogenes*.**

**TESIS**

Que para obtener el título de:  
**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

**Andrés Rivera García**



Ciudad de México

2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Olga del Carmen Velázquez Madrazo

**VOCAL:** Miguel Ángel Hidalgo Torres

**SECRETARIO:** José Alberto Cano Buendía

**1er. SUPLENTE:** Norma Angélica Camacho de la Rosa

**2° SUPLENTE:** Hiram Fernando Ramírez Cahero

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio de Constatación-Vacunología y Laboratorio de Toxicología,  
dependientes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Con dirección en Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510.

### **ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. José Alberto Cano Buendía**

---

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**M. en C. Juan Carlos Ramírez Orejel**

---

### **SUSTENTANTE:**

**Andrés Rivera García**

---

## ÍNDICE

1. Introducción .....	1
1.1 Objetivo General .....	3
2. Antecedentes .....	4
2.1 Industria del huevo en México .....	4
2.1.1 Situación económica de la industria avícola .....	4
2.1.2 Contaminación asociada al huevo .....	6
2.2 Listeriosis .....	9
2.2.1 Impacto en la salud animal .....	10
2.2.2 Impacto en la industria agroalimentaria .....	10
2.2.3 Agentes desinfectantes contra <i>L. monocytogenes</i> .....	12
2.3 Solución Electrolizada de Superoxidación (SES) .....	14
2.3.1 Generalidades .....	14
2.3.2 Mecanismo de acción del ácido hipocloroso .....	16
2.3.3 Usos de la SES con pH neutro en alimentos .....	17
3. Materiales y métodos .....	19
3.1 Huevo embrionado .....	19
3.1.1 Obtención y mantenimiento de la cepa bacteriana .....	19
3.1.2 Verificación de las propiedades fisicoquímicas de la SES .....	20
3.1.3 Determinación del título bacteriano .....	20
3.1.4 Determinación del poder desinfectante <i>in vitro</i> .....	21
3.1.5 Obtención y preparación de los huevos embrionados .....	21
3.1.6 Simulación de la contaminación de los huevos embrionados .....	22
3.1.7 Aplicación de tratamientos .....	23

3.1.8	Conteo bacteriano y determinación del porcentaje de reducción	23
3.1.9	Monitoreo de viabilidad	24
3.1.10	Análisis estadístico	24
3.2	Huevo para plato	25
3.2.1	Obtención y preparación de los huevos para plato	25
3.2.2	Aplicación de tratamientos	26
3.2.3	Evaluación de la cutícula por tinción y colorimetría	26
3.2.4	Determinación de frescura por medición de unidades Haugh	27
3.2.5	Cuantificación de minerales	28
3.2.6	Análisis estadístico	31
4.	Resultados y discusión	32
4.1	Identificación de <i>L. monocytogenes</i>	32
4.2	Propiedades fisicoquímicas de la SES	32
4.3	Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	33
4.4	Actividad antimicrobiana en huevo embrionado	34
4.5	Efecto sobre la supervivencia embrionaria	37
4.6	Efecto sobre la cutícula	38
4.7	Efecto sobre el cascarón	42
4.8	Efecto sobre la calidad interna del huevo para plato	45
5.	Conclusiones	51
5.1	Proyección experimental	52
6.	Referencias	53
7.	Apéndices	66

## INTRODUCCIÓN

Uno de los alimentos más consumidos en México es el huevo y desde 2013 nuestro país es el primer consumidor a nivel internacional. La Unión Nacional de Avicultores (UNA) reporta que México ocupa el quinto lugar en producción de huevo en el mundo, remarcando un crecimiento de 10.16 % en el periodo de 2012 a 2015. Como todos los alimentos, el huevo, es susceptible de contaminación microbiológica y uno de los microorganismos patógenos que puede estar presente es *Listeria monocytogenes*, que es responsable de zoonosis de aves, peces, crustáceos y seres humanos con aparición esporádica en todo el mundo y que puede dar lugar a daños graves durante un brote. (Dhama *et al*, 2015). Aunado a ello, en algunos estudios se sugiere determinar la efectividad de tecnologías para la eliminación de esta bacteria en la superficie del cascarón de huevo (Jones and Musgrove, 2007), en los ovoproductos derivados como huevo líquido pasteurizado, en plantas procesadoras (Rivoal *et al*, 2013) así como en alimentos listos para consumir (RTE, por sus siglas en inglés) como huevos cocidos (Fang y Huang, 2014).

En la industria alimentaria, actualmente la estrategia general de prevención de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) requiere de un Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés) en la cadena de producción de alimentos, así como la aplicación de sistemas de información y vigilancia (Hassanain *et al*, 2013). Por esta razón, se han utilizado distintos desinfectantes que reduzcan el riesgo de alguna ETA o bien, de alguna infección animal (Delves, 2014).

En 2011, debido a un brote de influenza aviar, SENASICA recomendó el uso de algunos desinfectantes que pueden emplearse en el lavado y desinfección de huevo. Aquí se encuentran el formaldehído, el hipoclorito de sodio y el ácido cítrico; todos a una concentración mínima de 2 %. Sin embargo, se sabe que el primero es un compuesto cancerígeno por inhalación (Gehan, 2009; Starr and Swenberg, 2013), mientras que el segundo causa irritación nasal y generar subproductos clorados clasificados como posibles mutágenos (Shusterman, 2014; Meireles *et al*,

2016). Después del 2011, el precio del huevo aumentó por el factor interno de la presencia del agente biológico en los lugares donde se manipulaba el huevo y del factor externo que es su alto consumo (SNIM, 2015). Por ello, en los últimos años, se han propuesto nuevas estrategias para la desinfección del huevo como el uso de soluciones electrolizadas que se obtienen fácilmente y que son muy accesibles (Bialka *et al*, 2004; Fasenکو *et al*, 2009; Ni *et al*, 2014).

El objetivo del presente trabajo se enfoca en el huevo como alimento y en la importancia de los huevos embrionados ya que, en las incubadoras industriales, un solo huevo contaminado puede propagar las bacterias a los huevos limpios (Wineland, 2007; Archer and Cartwright, 2012). Por lo anterior, se requiere conservar la calidad e inocuidad de este producto con la desinfección de los huevos que pudieran “explotar” durante la incubación y con ello, lograr tener un producto destinado como aves de engorda o de repuesto (Nowaczewski *et al*, 2013).

En este trabajo se determinó el efecto bactericida de una Solución Electrolizada de Superoxidación (Esteripharma México S.A. de C.V.) con pH neutro contra *L. monocytogenes* en huevo embrionado y huevo para plato, comparándolo con el de una solución de Ácido Cítrico (AC) al 2 %.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antimicrobiana de la Solución Electrolizada de Superoxidación con pH neutro contra *L. monocytogenes* en huevo para plato y en huevo embrionado para determinar el efecto que tiene sobre la cutícula e impacto en la calidad del mismo.



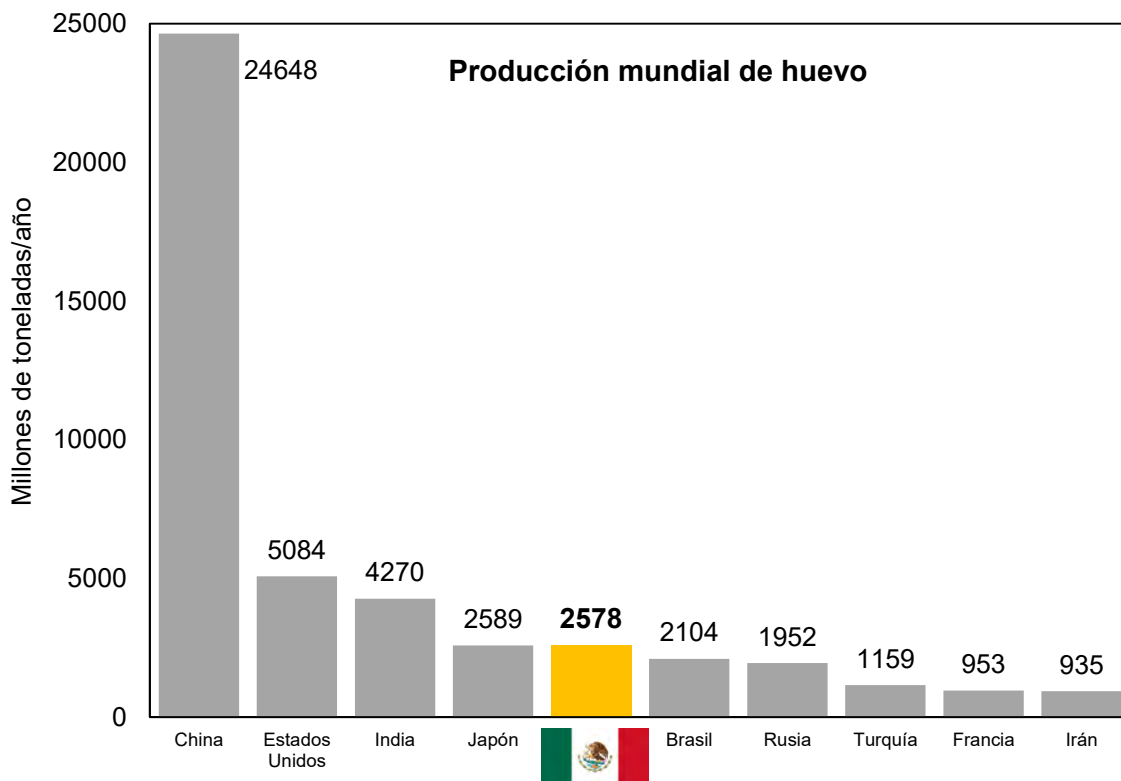
## ANTECEDENTES

### 2.1 Industria del huevo en México

Una de las actividades más dinámicas del sector pecuario en México es la avicultura. Junto a la leche y la carne, el huevo es de los principales productos de consumo por su alto valor nutritivo, versatilidad gastronómica y excelente relación calidad-precio (Carbajal, 2006; PROFECO, 2012).

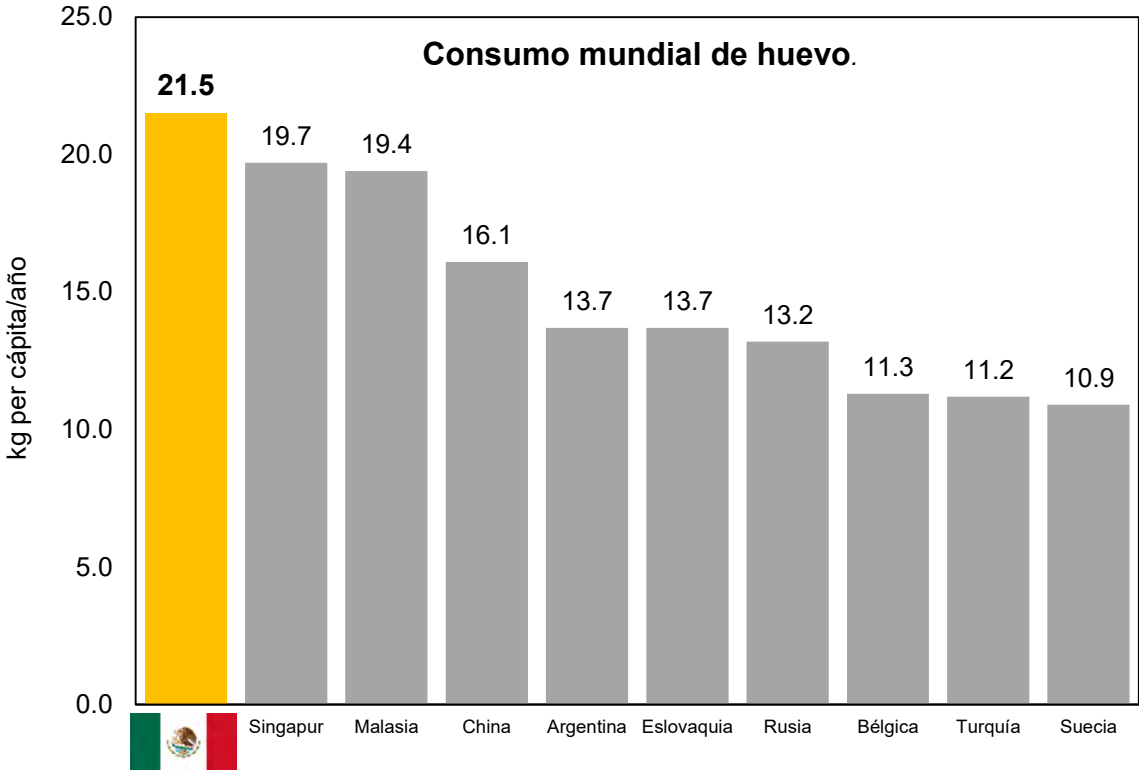
#### 2.1.1 *Situación económica de la industria avícola*

De acuerdo con la Unión Nacional de Avicultores (UNA, 2014), el sector avícola representa el 63 % de la producción pecuaria, siendo el pollo el que tiene una mayor participación. Sin embargo, el 29 % asociado a la producción de huevo, representa alrededor de 2,578 millones de toneladas lo que tiene un valor aproximado de 55,792 millones de pesos.



**Figura 1.** Principales países productores de huevo entero en 2013.  
Modificado de: Indicadores Económicos del Sector Avícola (UNA, 2014).

México ocupa el quinto lugar en producción mundial de huevo y corresponde con cerca de 2.6 mil millones de toneladas anuales (Figura 1). Sin embargo, nuestro país es el mayor consumidor de este producto en todo el mundo, y se debe al consumo per cápita de la población mexicana que en promedio es de 21.5 kg anuales, a pesar de no ser el principal productor de este insumo (Figura 2).



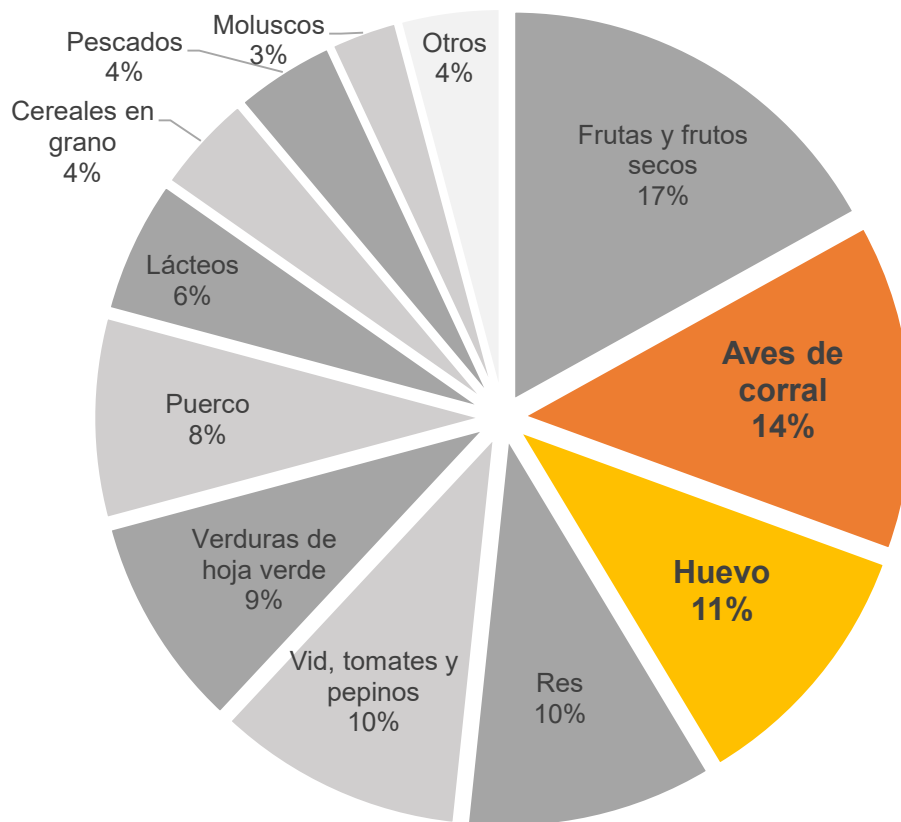
**Figura 2.** Principales países consumidores de huevo entero en 2013. Modificado de: Indicadores Económicos del Sector Avícola (UNA, 2014).

Además, se ha registrado un aumento en la producción de huevo lo que conduce a un impacto favorable al sector avícola nacional y, puntualmente, entre los años de 2012 y 2015 incrementó de 2,391 a 2,685 millones de toneladas lo que representa un aumento de 10.16 %. El periodo destacado para este crecimiento en la producción, coincide con los años en los que se ha registrado uno de los consumos más bajos en nuestro país (menor a 21 kg per cápita) y el más alto (casi 23 kg per cápita), respectivamente.

### 2.1.2 Contaminación asociada al huevo

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) reportaron que entre 2008 y 2012 existieron 915 brotes de **ETA's** asociados a diferentes grupos de alimentos. En la Figura 3, se muestran los porcentajes de brotes de acuerdo al tipo de alimento, y dentro de los tres más significativos se encuentran las aves de corral y el huevo, lo cual representa un interés creciente para la vigilancia en materia de inocuidad de estos productos alimenticios.

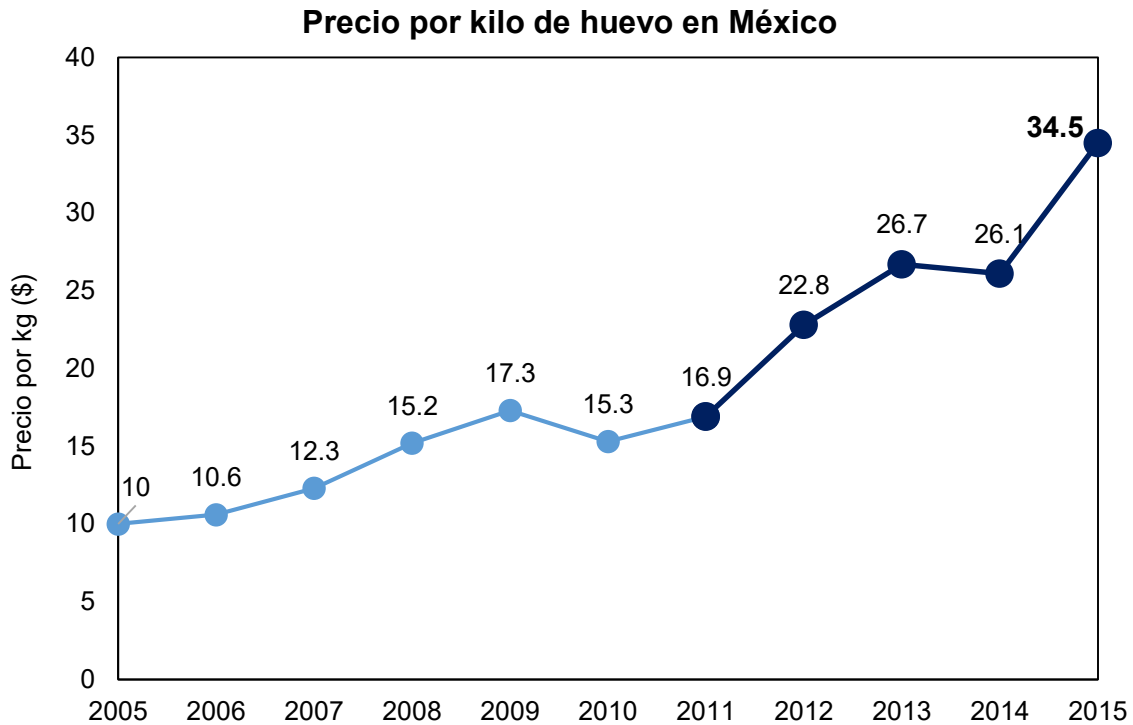
**Principales grupos de alimentos asociados a ETAs**



**Figura 3.** Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en EUA (2008-2012).  
Modificado de: Sistema Nacional de Información de Brotes (CDC, 2015).

En general, los brotes de enfermedades transmitidas por el huevo influyen sobre los precios y el consumo del mismo (PROFECO, 2012; Rodríguez *et al*, 2013).

En la Figura 4, se muestra la fuerte alza del precio del huevo que se desarrolló a partir del año 2011 y que coincide con un brote de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP) en huevo fresco obtenido en granjas ubicadas en zonas donde se reportó la presencia del virus (SENASICA, 2011).



**Figura 4.** Precio del huevo blanco en México entre 2005 y 2015.  
Modificado de: Mercados Nacionales Pecuarios-Huevo (SNIM, 2015)

El huevo es estéril justo después de la puesta, sin embargo, puede ser un vector de algún microorganismo de la microbiota que incluye microorganismos causantes de deterioro y bacterias patógenas. (Baron and Jan, 2011).

Existen dos tipos de contaminación bacteriana en el huevo: horizontal y vertical. La **transmisión vertical** tiene lugar en la ruta transovárica donde se contaminan directamente las partes internas del huevo (yema, albúmina, membranas) como resultado de una infección en los órganos reproductivos de la gallina y que tiene lugar antes de que el cascarón cubra a los huevos (De Reu *et al*, 2008; Turtoi and Borda, 2014), sin embargo, este tipo de contaminación sigue siendo esporádica.

La **contaminación horizontal** comienza después de que el huevo atraviesa la cloaca y que entra en contacto con cualquier superficie contaminada, además, los huevos cuentan con la temperatura corporal de la gallina y se propician las condiciones para que crezcan bacterias del ambiente en la superficie del cascarón (Patterson *et al*, 2008, Baron and Jan, 2011).

La contaminación de los huevos depende de diferentes factores como la salud de las gallinas y el estado sanitario de crianza que influyen en las especies de bacterias que puedan desarrollarse, así como la carga de microorganismos. Este fenómeno también puede ocurrir durante el transporte del producto, en el embalaje dentro de las granjas o en el centro de envasado. La fuente de contaminación puede ser el ambiente, o bien, otro huevo. La presencia de grietas aumenta el riesgo de contaminación por lo que el control de los factores que influyen en ésta es esencial para prevenir la propagación de microorganismos (Wales *et al*, 2007; Baron and Jan, 2011).

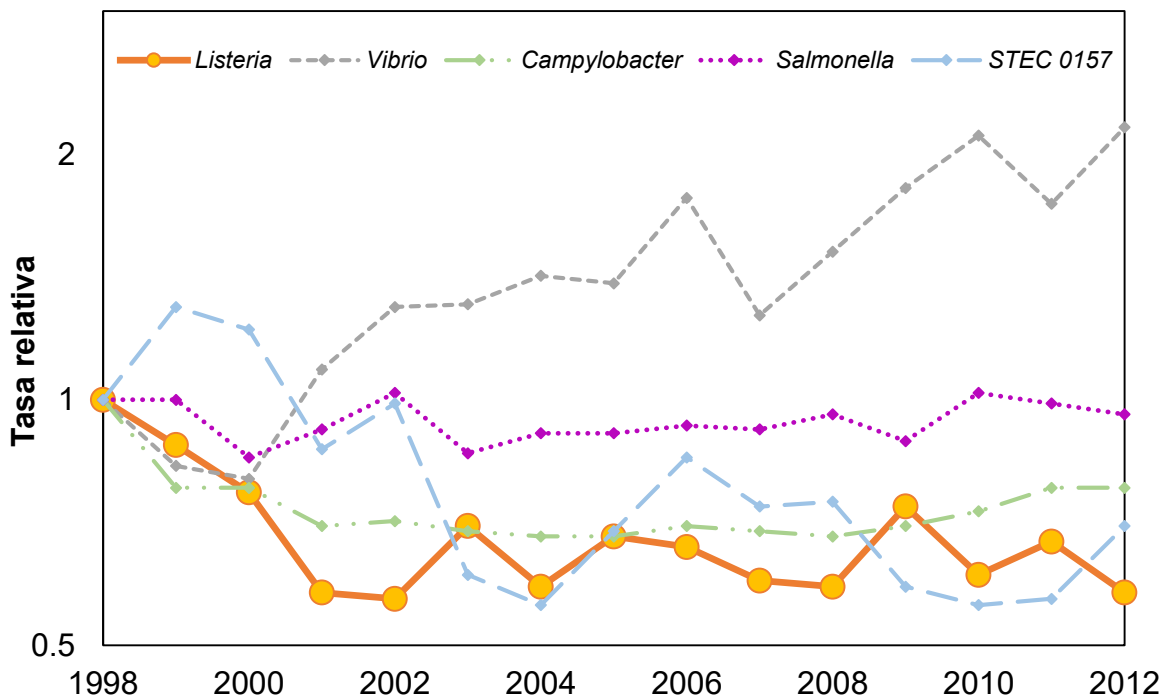
Una de las estructuras que juega un papel esencial como barrera eficaz ante la entrada de microorganismos al huevo es la **cutícula**, que es una membrana externa del cascarón compuesta de mucoproteínas. Es resistente al agua y a la penetración de microorganismos, sin embargo, la efectividad de esta capa protectora es limitada, ya que se rompe rápidamente con el tiempo durante la manipulación de los huevos (Vadehra *et al*, 1970; De Reu, 2006). Una vez que el huevo comienza a almacenarse y va aumentando la humedad en la superficie, esta película proteica va disminuyendo el grosor y aumenta la porosidad del cascarón. Éste se compone principalmente de minerales; el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) representa el 93.6 %, el carbonato de magnesio ( $\text{MgCO}_3$ ) un 0.8 % y el fosfato de calcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) un 0.7 %. Entonces, el cascarón es una barrera física bastante ineficaz debido al posible paso de microorganismos a través de sus poros (Hincke *et al*, 2000; Hunton, 2005). Leleu *et al* (2011) y Turtoi and Borda (2014), reportaron que, durante el lavado o aplicación de desinfectantes químicos en los huevos, la cutícula puede perderse lo que aumenta el riesgo de contaminación del producto.

Cuando los huevos se someten a un lavado durante su procesamiento, el entorno donde se trabaja requiere una limpieza total porque pueden estar presentes algunas bacterias patógenas de gran importancia como las de la familia *Enterobacteriaceae*, o bien, las de los géneros *Campylobacter* y *Listeria* (Jones *et al*, 2006, Jones and Musgrove, 2007).

## 2.2 Listeriosis

*Listeria monocytogenes* es una bacteria pequeña de forma bacilar, Gram positiva, anaerobia facultativa, psicrótrofa, no formadora de esporas, capaz de producir biopelículas y que utiliza flagelos para su movilidad; puede crecer en suelo, cuerpos de agua y alimentos, resistiendo una variedad de condiciones de temperatura (de 0 a 40 °C), altas concentraciones de sal (más de 20 %) y en un intervalo de pH de 4.4 a 9.6 (Milillo *et al*, 2012; Castañeda *et al*, 2014). De acuerdo con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, este patógeno es uno de los principales asociados a ETA's (Figura 5).

### Principales bacterias asociadas a ETAs



**Figura 5.** Incidencias de ETA's asociadas con bacterias patógenas hasta 2012. Modificado de: Tendencias en ETA's en EUA (CDC, 2013).

La listeriosis humana es una enfermedad con tasa de mortalidad del 20 a 30 %, que incluye entre los síntomas meningitis, septicemias y aborto; principalmente, afecta a personas inmunocomprometidas, así como a embarazadas, ancianos y niños (Zunabovic *et al*, 2011). Aunque *L. monocytogenes* se transmite por diferentes vías, la principal son los alimentos contaminados y la dosis infectiva se estima de 10<sup>2</sup> UFC/g de alimento ingerido, pero puede ser menor (0.3 UFC/g) en personas más susceptibles (Posfay and Wald, 2009).

### 2.2.1 Impacto en la salud animal

La listeriosis clínica es poco común en aves y la mayoría de los casos aparecen en animales jóvenes siendo la septicemia el síndrome más común, caracterizado por depresión, diarrea, aletargamiento y pérdida de peso (CFSPH, 2007). Sin embargo, en un estudio reciente, Andersson *et al* (2015), indica que el uso de huevos fértiles como modelo para evaluar la virulencia de *L. monocytogenes*, es un método eficaz, confiable y de fácil acceso.

### 2.2.2 Impacto en la industria agroalimentaria

La listeriosis es un problema emergente para la industria alimentaria como consecuencia del aumento de la incidencia en los países desarrollados. Este microorganismo supone un problema grave ya que su control en plantas de procesado conlleva gran dificultad porque posee características de resistencia a diferentes condiciones de pH y temperatura (González y Suárez, 2009). Su importancia también se debe al impacto clínico y el efecto económico derivado de los brotes, resultado de eventos simultáneos que se presentan en varios puntos de la cadena de producción: a) tipo de alimento, b) fuentes de contaminación ambiental y c) falta de buenas prácticas de higiene y programas de monitoreo (Castañeda *et al*, 2014).

La identificación precoz de los casos de listeriosis animal, así como la detección de *L. monocytogenes* como agente de infección primario y secundario en los alimentos de muy diversos orígenes, son los dos elementos clave para que la lucha contra esta bacteria sea efectiva. Por esta razón, la profesión veterinaria y de tecnólogos

en alimentos, representan los pilares principales en la detección y control de esta patología (González y Suárez, 2009).

Los alimentos que se relacionan con brotes de listeriosis son, principalmente, alimentos listos para consumir (RTE, por sus siglas en inglés) que incluyen productos lácteos, derivados cárnicos, pescado y vegetales; sin embargo, los huevos y subproductos no habían estado involucrados en casos esporádicos de listeriosis (Rivoal *et al*, 2013). Recientemente, se ha reportado la contaminación del huevo, producto de este microorganismo, por detección de patógenos y alteraciones en la matriz líquida de huevos (Protais *et al*, 2007) y, también, se ha encontrado que puede estar en el 17.4 % de los productos que utilizan huevo entero como materia prima y en el 2.1 % de productos del huevo pasteurizados (Rivoal *et al*, 2010).

La contaminación de los ovoproductos podría explicarse por el uso de huevos que fueron contaminados con *L. monocytogenes* en el ambiente de crianza de las gallinas. En 2008, Chemaly *et al*, encontraron a este patógeno en 15.5 % de las muestras de polvo en explotaciones de gallinas ponedoras. Parece entonces que *L. monocytogenes* muestra gran resistencia a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los huevos para plato, incluso, es capaz de sobrevivir a los procedimientos de limpieza del cascarón del huevo y puede estar presente en el agua utilizada para este fin (Laird *et al*, 1991; Brackett and Beuchat, 1992; Jones *et al*, 2006).

Por otra parte, como mencionan Gudbjörnsdóttir *et al* (2004), esta bacteria se ha encontrado con frecuencia en los entornos de la industria alimentaria y, específicamente, en plantas quebradoras de huevo. También, Fang y Huang (2014) demostraron que este microorganismo puede resistir el tratamiento térmico que se aplica para obtener huevos cocidos. Estas son algunas de las razones por lo que es importante eliminar la posible contaminación de *L. monocytogenes* en este alimento.



### 2.2.3 Agentes desinfectantes contra *L. monocytogenes*

Algunos agentes antimicrobianos han sido evaluados en diferentes alimentos para eliminar la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos. A continuación, se resumen algunos de los agentes desinfectantes empleados en gran variedad de matrices alimentarias, y se muestran los porcentajes de reducción bacteriana logrados.

**Tabla 1.** Aplicación de agentes químicos en alimentos para el control de *Listeria monocytogenes*.

Agente(s) químico(s)	Alimento	Reducción bacteriana (%)	Referencia
Solución de Ácido Láctico (1.5 %) y Peróxido de Hidrógeno (1.5 %)	Manzana, naranja y tomates	> 99.99	Venkitanarayann <i>et al</i> , 2002
Ozono (3 ppm), Ácido peroxiacético (80 ppm)	Lechuga, fresa	> 99.99	Rodgers <i>et al</i> , 2004
Arginato láurico (9090 ppm)	Jamón	99.93-99.99	Taormina and Dorsa, 2009
Hipoclorito de sodio (200 ppm)	Coco verde	99.80	Walter <i>et al</i> , 2009
Solución de ácido acético (0.8 %), cítrico (0.8 %) y propiónico (0.8 %)	Piel de pollo	99.86	Menconi <i>et al</i> , 2013
Nanopartículas de ZnO (5-8 mM) y Ácido Cítrico (0.3-2 %)	Jugo de mango	99.98-99.99	Barzegari <i>et al</i> , 2014
Etanol al 70 % con 0.02 % de Sales Cuaternarias de Amonio	Cacahuete y pistache	> 99.99	McEgan and Danyluk, 2015

En la Tabla 1, se observa que con el uso de ácidos orgánicos se logra reducir satisfactoriamente la carga de *L. monocytogenes*. No obstante, la normatividad mexicana (NOM-159-SSA1-1996) determinó que el huevo no puede lavarse a menos que sea procesado y, en ese caso, deberá lavarse con agua y detergente antes de la ruptura del cascarón. Por otra parte, en 2011 el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) redactó el Manual de Procedimientos para la Prevención, Control y Erradicación de la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP) donde determinó medidas sanitarias de control de la enfermedad dentro de las que destaca la limpieza y desinfección en granjas avícolas y los agentes que se pueden utilizar para este fin (Tabla 2).

**Tabla 2.** Desinfectantes para IAAP y concentraciones recomendadas.

<b>Desinfectante</b>	<b>Concentración</b>	<b>Desinfectante</b>	<b>Concentración</b>
Hipoclorito de sodio y calcio	2 % de cloro activo	Ácido cítrico	1 al 10 %
Hidróxido de sodio (70-80 °C)	2 al 5 %	Orto-fenilfenol	1 al 2 %
Cresoles	4 al 10 %	Formaldehído	2 al 4 %
Yodo	2 %	Glutaraldehído (pH alcalinos)	2 %

Modificado de: Manual de Procedimientos para la Prevención, Control y Erradicación de la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (SENASICA, 2011).

Algunos agentes mencionados en la Tabla 1 y en la Tabla 2, pueden ser muy corrosivos o tóxicos como el hipoclorito de sodio, el peróxido de hidrógeno y el formaldehído. El hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrógeno son agentes oxidantes fuertes que pueden llegar a irritar la piel, los ojos y las membranas mucosas (Samberg and Meroz, 1995; Shusterman, 2014). Por otra parte, el formaldehído es un gas generado por la mezcla de formol y permanganato de potasio; la exposición a este gas es muy peligrosa para los trabajadores ya que una vez inhalado genera aductos en el ADN que son pro-mutagénicos y se consideran iniciadores de la carcinogénesis (Sheldon and Brake, 1991; Gehan, 2009; Starr and

Swenberg, 2013). Otros compuestos como las sales cuaternarias de amonio y el ozono resultan ser muy inestables, además, el primero es afectado por la presencia de materia orgánica y el segundo afecta el tracto respiratorio y causa irritación de los ojos y la garganta (Artés *et al*, 2009; Holah, 2014; Meireles *et al*, 2016).

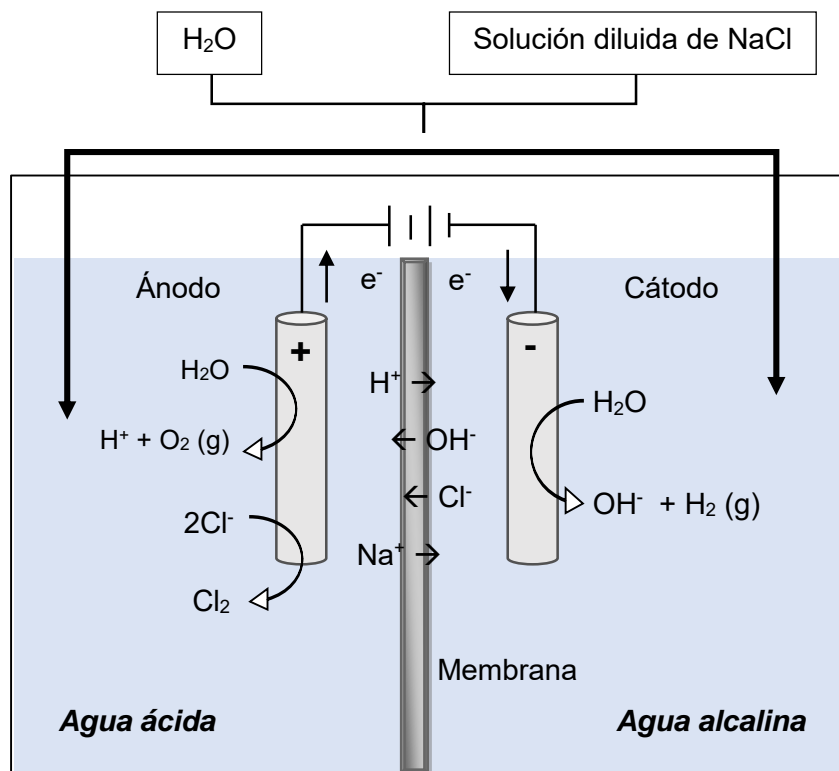
El Ácido Cítrico al 2 % está recomendado por las autoridades como desinfectante y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) lo reconoce como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés). Sus posibles desventajas podrían ser que influya sensorialmente en el sabor y que el agua residual del lavado llegaría a presentar valores elevados en cuanto a la demanda química de oxígeno (COD, por sus siglas en inglés). Otras desventajas de su uso es que actúa como agente ligador de metales iónicos lo que afecta el nivel de reducción bacteriana (Ölmez and Kretzschmar, 2009; Gurtler and Mai, 2014).

## 2.3 Solución Electrolizada de Superoxidación (SES)

### *2.3.1 Generalidades*

Tradicionalmente, las técnicas de desinfección de alimentos emplean agentes químicos como el hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos que, si bien ejercen un efecto antimicrobiano, presentan algunas desventajas sobre el daño potencial a la salud o modificaciones del alimento (CFSPH, 2007). En los últimos años, ha aumentado la preocupación sobre la seguridad alimentaria especialmente los productos frescos y ligeramente cocidos, por lo tanto, es importante el desarrollo de un método eficaz para eliminar patógenos de alimentos y productos agrícolas (Issa *et al*, 2010).

Las Soluciones Electrolizadas de Superoxidación (SES) son conocidas por su eficiencia como desinfectantes con alto espectro antimicrobiano además de no ser tóxicas. En general, estas soluciones se preparan con una solución diluida de NaCl y agua, sometidas a un proceso de electrólisis y generan especies derivadas de cloro, hidrógeno y oxígeno (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema representativo de la generación de SES con pH neutro Modificado de: Inactivación *in vitro* de *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* spp. utilizando Agua Electrolizada Ligeramente Ácida (Issa *et al*, 2010).

De acuerdo con Duran *et al* (2010), Zhao *et al* (2014) y Xing *et al* (2015), el cloruro de sodio es disociado en  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  y el agua se electroliza en dos formas: en el ánodo forma iones  $\text{H}^+$  y  $\text{O}_2$ , en el cátodo forma iones  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}_2$ . Posteriormente, los iones  $\text{Cl}^-$  son absorbidos por el ánodo, mientras liberan un electrón para transformarse en radicales cloro que se combinan formando  $\text{Cl}_2$ . La membrana que se encuentra en el interior de la cámara permite la migración de los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{Na}^+$  hacia el cátodo donde se forma una solución fuertemente alcalina ( $\text{NaOH}$ ), y la migración de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{OH}^-$  hacia el ánodo en el que se forma una solución ácida ( $\text{HClO}$  y  $\text{HCl}$ ). Al final, el agua ácida y alcalina se concentran en volúmenes para llegar a la neutralidad del pH.

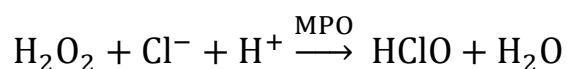
La variante ácida de este tipo de soluciones tiene un pH menor a 3 por lo que su uso se ve limitado ya que, a ese pH, el  $\text{Cl}_2$  disuelto se puede perder por volatilización y repercute negativamente en un decremento de la efectividad bactericida de la

solución (Len *et al*, 2000). Las ventajas de las soluciones neutras es que poseen un pH entre 6.4 y 7.5, un potencial de óxido-reducción de 800 a 900 mV y gran estabilidad a condiciones ambientales diversas (Cabello *et al*, 2009; Durán *et al*, 2010). Además. El uso de éstas minimiza los riesgos a la salud o por liberación de Cl<sub>2</sub> y, consecuentemente, la corrosión de superficies y efectos fitotóxicos secundarios (Guentzel *et al*, 2008).

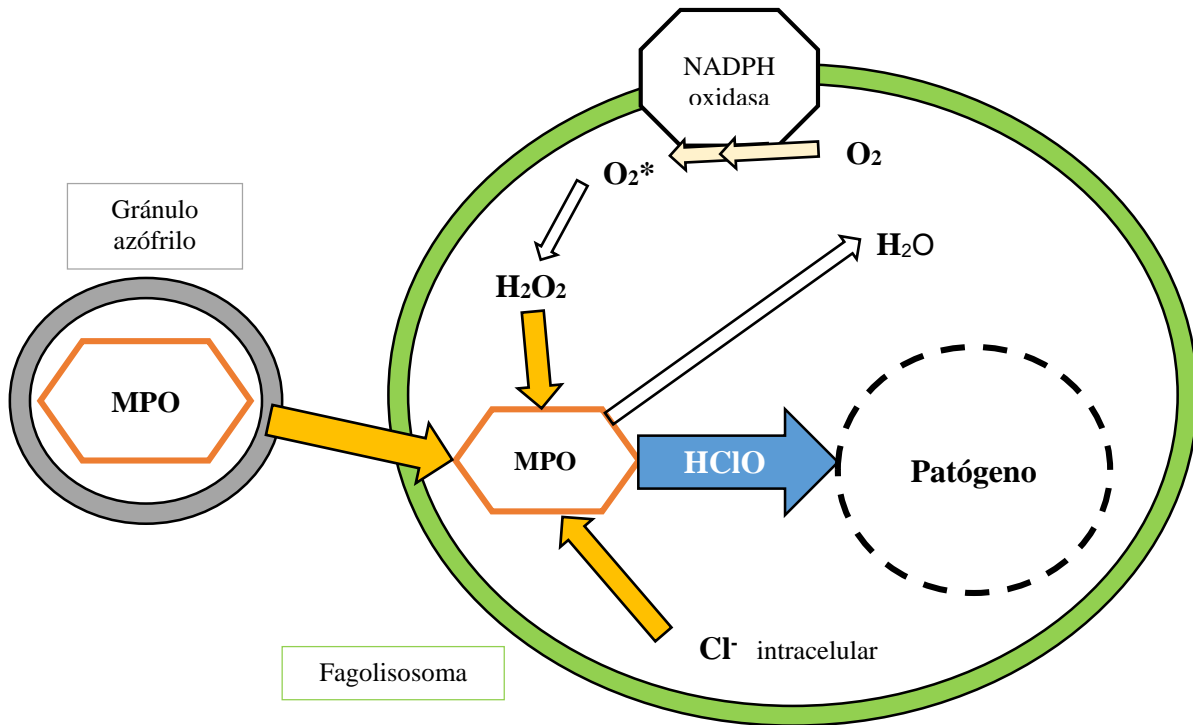
### 2.3.2 Mecanismo de acción del ácido hipocloroso

La SES posee características que actúan sinérgicamente para ejercer su efecto bactericida. El alto potencial redox induce la modificación de las vías metabólicas e influye en la producción de ATP (McPherson, 1993; Colangelo *et al*, 2015). Por otra parte, el ácido hipocloroso es el componente activo mayoritario de la SES (95 %) y oxida los grupos sulfhidrilo así como a los aminoácidos de la pared celular con lo que se afecta la respiración, la nutrición (por inhibición de la oxidación de la glucosa), la síntesis de proteínas y la obtención de energía (Marriott and Gravani, 2006; Cabello *et al*, 2009).

De acuerdo con Wang *et al* (2007), la respuesta del sistema inmune ante la invasión de patógenos es similar a la acción de la SES ya que se lleva a cabo por el despliegue de moléculas altamente reactivas como halógenos oxidados o radicales oxidantes. En la Figura 7, se observa que el radical O<sub>2</sub><sup>\*</sup> es el precursor de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y que es generado por células del sistema inmune especializadas – neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos La principal enzima responsable de la producción de ROS es una enzima mitocondrial unida a la membrana conocida como NADPH oxidasa. Cuando se altera el ciclo respiratorio, los neutrófilos producen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que es convertido a HClO por acción de la enzima mieloperoxidasa (MPO):



Después de que el ácido hipocloroso se empieza a acumular dentro del fagosoma, el ambiente que se genera comienza a ser más ácido y deja a la bacteria dentro de una vacuola (fagolisosoma) que contiene la enzima mieloperoxidasa y, por acción oxidante del HClO, se lleva a la muerte del patógeno.



**Figura 7.** Esquema de la producción de HClO por acción de la MPO.  
Modificado de: Ácido hipocloroso como agente potencial del cuidado de heridas  
(Wang, et al, 2007).

### 2.3.3 Usos de la SES con pH neutro en alimentos

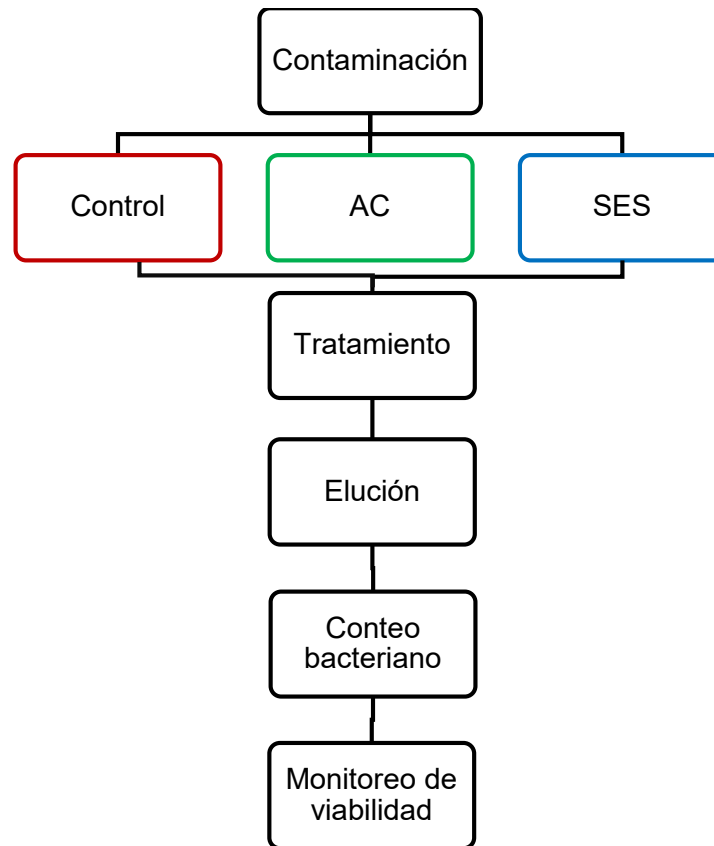
La SES ha tenido aplicación en el área de alimentos como desinfectante al reducir la carga bacteriana de mesófilos aerobios y de bacterias patógenas como *E. coli* O157 H7, *S. aureus*, *Salmonella* y *L. monocytogenes*. (Kim et al, 2000; Abadias et al, 2008; Issa et al, 2011; Cheng et al, 2012). A continuación, se resumen algunos estudios donde se ha probado la eficiencia de la SES con pH neutro en diferentes alimentos para eliminar la presencia de *L. monocytogenes* y por ello, resulta evidente que esta solución puede ser empleada en la desinfección del huevo.

**Tabla 3.** Aplicaciones de la SES con pH neutro contra *L. monocytogenes* en alimentos.

<b>Alimento</b>	<b>Reducción bacteriana (%)</b>	<b>Referencia</b>
Tomate	> 99.99	Deza <i>et al</i> , 2003
Lechuga y espinaca	99.88-99.90	Guentzel <i>et al</i> , 2008
Seta de ostra	99.31	Ding <i>et al</i> , 2011
Manzana mínimamente procesada	92.06	Graça <i>et al</i> , 2011
Aguacate	99.98-99.99	Rodríguez <i>et al</i> , 2011
Pollo fresco	99.52	Rahman <i>et al</i> , 2012
Carne de cerdo fresca	82.21-93.69	Mansur <i>et al</i> , 2015
Pimiento	> 96.83	Luo and Oh, 2016

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 HUEVO EMBRIONADO



**Figura 8.** Metodología para las determinaciones en huevo embrionado (Control: SSFE, AC: Ácido Cítrico al 2 %, SES: Solución Electrolizada de Superoxidación con pH neutro).

#### 3.1.1 *Obtención y mantenimiento de la cepa bacteriana*

La cepa de *L. monocytogenes* liofilizada (ATCC 19115) se obtuvo del American Type Culture Collection (ATCC). La cepa se recuperó en un tubo de ensayo con agar BHI en pico de flauta. Después de su crecimiento, se resembró en una caja Petri con agar BHI y se incubó a 37 °C por 24 h (Bue M Electric Co. 100). También, se realizó la tinción de Gram (NOM-143-SSA1-1995) correspondiente y se observó al microscopio para identificar la morfología celular. Finalmente, la confirmación se llevó a cabo con el equipo Vitek 2 (Apéndice A).



### 3.1.2 Verificación de las propiedades fisicoquímicas de la SES

La Solución Electrolizada de Superoxidación fue proporcionada por Esteripharma México S.A. de C.V. y para verificar sus propiedades fisicoquímicas, se vertió un volumen de SES en un vaso de precipitados manteniéndose en agitación constante, se introdujo un electrodo portátil impermeable (Hanna Instruments HI98121 Combo pH & ORP) y se registraron los valores de pH y ORP. Después, se utilizó un fotómetro portátil (Hanna Instruments HI96771) cuyo intervalo de sensibilidad es de 0 a 500 ppm de cloro activo o de ultra alto rango (UHR Cl\*) y, empleando un blanco con los reactivos A (Hanna Instruments HI95771AB-0) y B (Hanna Instruments 95771B-0) en la fotocelda de reacción, se calibró el equipo por 1 min. Finalmente, se introdujo un volumen de SES en otra fotocelda y se adicionaron los reactivos A y B, se homogeneizó y registró la lectura del equipo.

### 3.1.3 Determinación del título bacteriano

A partir de la caja Petri con agar BHI, se tomó una colonia y suspendió en un matraz Erlenmeyer con Caldo Trypticaseína Soya (CTS) y se incubó por 16 h a 37 °C y 150 rpm (Incubator Shaker LabLine 3525). Después, se realizaron diluciones décuples seriadas en tubos con Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE) y se sembraron 100 µL de las diluciones 1, 3, 5 y 6 en cajas Petri con Agar Trypticaseína Soya (TSA); se incubaron a 37 °C por 24 h (Bue M Electric Co. 100).

Después de la incubación, se determinó la cuenta viable conforme a la NOM-092-SSA1-1994 para ello, se contaron aquellas cajas Petri que contenían de 25 a 250 colonias de *L. monocytogenes* y, en caso de que la caja Petri de la dilución donde hubo menor crecimiento contuviera menos de 25 colonias, se contó el número de colonias presentes y multiplicó por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Por otro lado, si la caja Petri de la menor dilución excedía de 250, se contaron las colonias en aquellas porciones de la caja que fueran representativas de la distribución de las mismas; se contó por ejemplo, la octava o cuarta parte o una mitad del área de la caja y se multiplicó el valor obtenido por 8, 4 o 2, respectivamente y, después, se multiplicó por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa.

### 3.1.4 Determinación del poder desinfectante in vitro

De acuerdo con el procedimiento descrito en la NMX-BB-040-SCFI-1999, se determinó el porcentaje de reducción de la cuenta viable de *L. monocytogenes*.

Se midió por triplicado 9.9 mL del producto (SSFE, AC o SES) y se transfirió ese volumen a tubos de ensaye con tapón de rosca estériles. A continuación se agitó y se inoculó de forma individual cada tubo con 100 µL del inóculo y se agitó exactamente 30 s después de la inoculación. Se transfirieron 100 µL a cajas Petri con agar TSA y realizaron diluciones hasta obtener placas con 25 a 250 colonias.

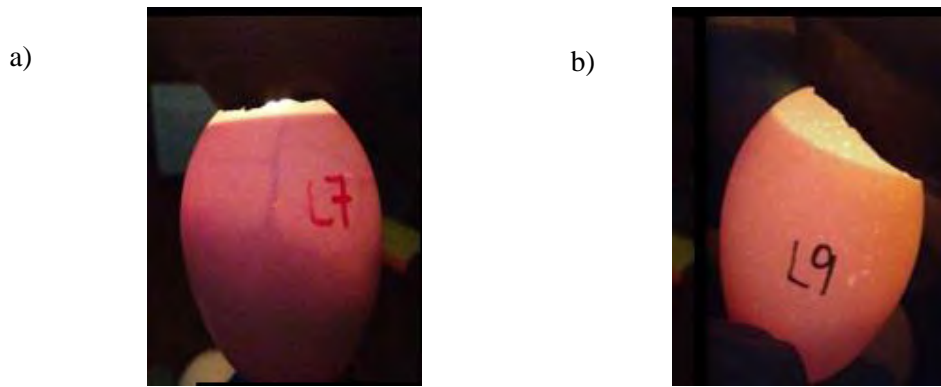
Después de 24 h de incubación a 37 °C, se contó el número de UFC en las placas y promediaron los resultados de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes. El porcentaje de reducción se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{\text{Sobrevivientes (UFC/mL)} * 100}{\text{Cuenta viable inicial}}$$

### 3.1.5 Obtención y preparación de los huevos embrionados

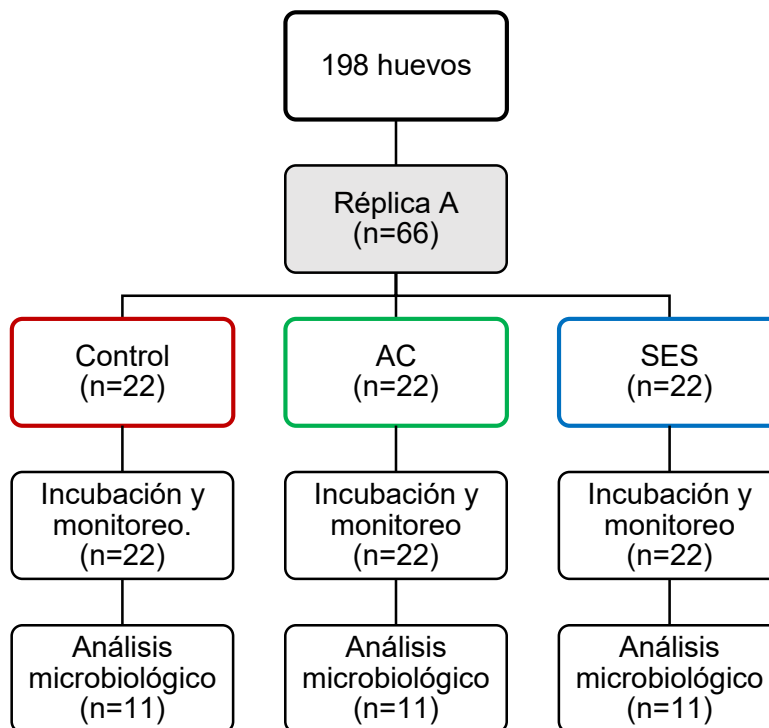
Se adquirieron 200 huevos embrionados de 4 días de edad, a través de Aves Libres de Patógenos Específicos S.A. de C.V. (ALPES) junto con los resultados del control de calidad (Apéndice B). Se empleó un ovoscopio para determinar la viabilidad de los embriones como se describe a continuación:

- I. Colocar los huevos embrionados en una habitación oscura. Tomar cada uno y colocar el ovoscopio en la parte superior de tal forma que se observe la cámara de aire iluminada.
- II. Realizar movimientos adecuados para confirmar que las irrigaciones de los vasos sanguíneos están presentes y no presentan anomalías, o bien, que el embrión se encuentra en desarrollo normal y se observa en movimiento. En caso de no observar irrigaciones o desarrollo embrionario, considerarlo como no viable.



**Figura 9.** Ejemplo del ovoscopiado de los huevos. a) Embrión en desarrollo, b) Embrión muerto.

Los huevos ovoscopiados fueron separados y rotulados de acuerdo al siguiente esquema y se realizó por triplicado (A, B y C):



**Figura 10.** Distribución de los huevos embrionados de acuerdo a los diferentes tratamientos (Control: SSFE, AC: Ácido Cítrico al 2 %, SES: Solución Electrolizada de Superoxidación con pH neutro).

### 3.1.6 Simulación de la contaminación de los huevos embrionados

De acuerdo con lo descrito por Bialka *et al* (2004) y Fassenko *et al* (2009), se prepararon tres camas de contaminación, dentro de una campana de flujo laminar (NUAIRE NU-440-400), utilizando Agua Peptonada al 0.1 % (AP) y se ajustó la

concentración a  $10^6$  UFC/mL de *L. monocytogenes* en cada una. A continuación, se homogeneizó el volumen de AP y el inóculo, y se agregó a cada una 66 g de cama avícola de granja estéril, se homogeneizaron y se sumergieron para contaminar los 22 huevos embrionados de cada grupo a cada una de las camas de contaminación. Se realizó la simulación de la contaminación horizontal de la forma más homogénea durante 10 min y después se pasaron los huevos a charolas plásticas para su secado por 26 min.

### 3.1.7 Aplicación de tratamientos

A cada grupo de 22 huevos, se le aplicó por aspersión (60 veces = 30 mL) la solución correspondiente: Grupo 1 = Control (SSFE), Grupo 2 = AC al 2 % y Grupo 3 = SES con pH neutro. Se dejó actuar por 1 min, se transfirieron 11 huevos de cada grupo a bolsas plásticas individuales con 10 mL de AP y se homogeneizó el contenido de éstas por 1 min; después, los huevos embrionados se mantuvieron en una incubadora (Farm Master 300742) a 37 °C con humedad relativa de 60 % aprox. Posteriormente, se homogeneizó el contenido de las bolsas y se tomaron 1000  $\mu$ L para transferirlos a un tubo de ensaye con 9 mL de SSFE. Se realizaron cinco diluciones décuples seriadas y de las diluciones 1, 3 y 5, se tomaron 100  $\mu$ L de cada una para sembrar en cajas Petri con TSA y se incubaron a 37 °C por 24 h (Bue M Electric Co. 100).

### 3.1.8 Conteo bacteriano y determinación del porcentaje de reducción

Se contaron las colonias para cada dilución, para cada huevo por tratamiento y para las tres réplicas, determinando así el número de bacterias supervivientes después del tratamiento con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{huevo}} = \frac{\text{UFC en placa}}{100 \mu\text{L}} * \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} * \text{Factor de dilución} * \frac{10 \text{ mL elución}}{1 \text{ huevo}}$$

Para determinar el porcentaje de reducción logrado se usó el siguiente algoritmo:

$$\% \text{ reducción} = \frac{\text{Carga bacteriana CONTROL} - \text{Carga bacteriana AC o SES}}{\text{Carga bacteriana CONTROL}} * 100$$

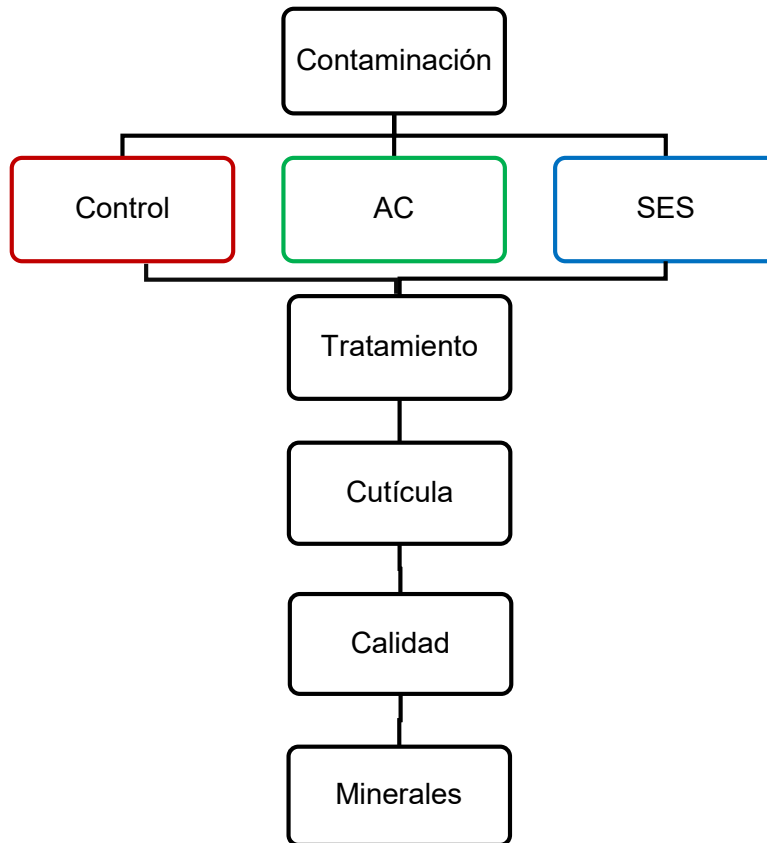
### 3.1.9 Monitoreo de viabilidad

Se realizó un ovoscopiado de los huevos, a los días 8, 11, 15, 18 y 21 días de edad de los embriones y se contabilizó el número de embriones vivos hasta el nacimiento.

### 3.1.10 Análisis estadístico

Para determinar diferencias entre los tratamientos se realizaron Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor y una prueba *a posteriori* de Diferencia de Medias Significativa (DMS). También se empleó la prueba de logrank para encontrar diferencia entre las curvas de supervivencia de los embriones. El programa utilizado fue IBM SPSS Statistics 22 con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  (95 % de confianza).

### 3.2 HUEVO PARA PLATO

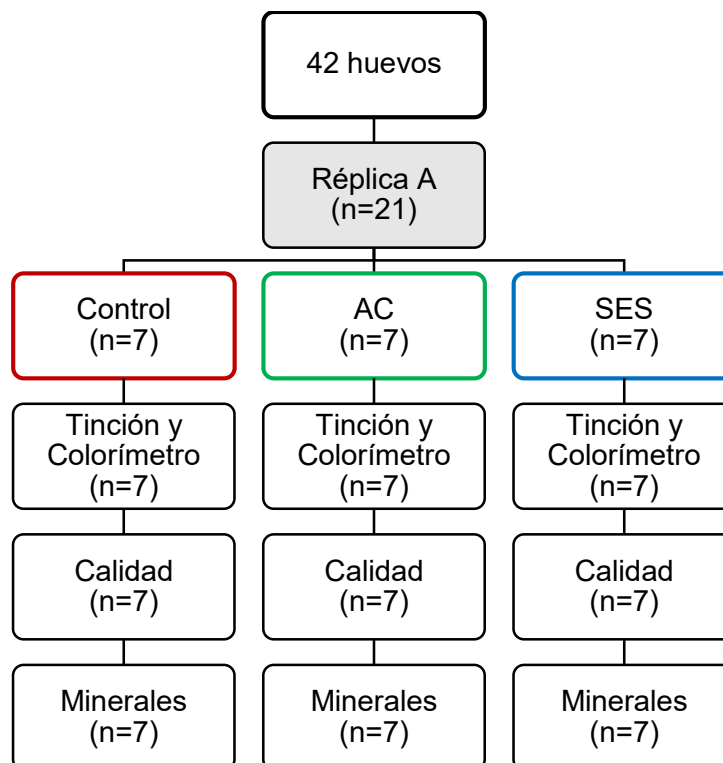


**Figura 11.** Metodología para las determinaciones en huevo para plato (Control: SSFE, AC: Ácido Cítrico al 2 %, SES: Solución Electrolizada de Superoxidación con pH neutro).

#### 3.2.1 Obtención y preparación de los huevos para plato

Se recibieron 42 huevos frescos del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv), dependiente de la FMVZ, y se realizó la simulación de la contaminación horizontal por duplicado (A y B), sin utilizar cama avícola de granja.

Los huevos fueron separados y rotulados de acuerdo al siguiente esquema:



**Figura 12.** Distribución de los huevos para plato de acuerdo a los diferentes tratamientos (Control: SSFE, AC: Ácido Cítrico al 2 %, SES: Solución Electrolizada de Superoxidación con pH neutro).

### 3.2.2 Aplicación de tratamientos

A cada grupo de 7 huevos, se aplicó por aspersión (60 veces = 30 mL), la solución correspondiente: Grupo 1 = Control (SSFE), Grupo 2 = AC al 2 % y Grupo 3 = SES con pH neutro, y se dejaron actuar por 1 min.

### 3.2.3 Evaluación de la cutícula por tinción y colorimetría

Los huevos fueron evaluados en el laboratorio de Toxicología del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, dependiente de la FMVZ. Con un colorímetro (Konika Minolta CM-600d) se obtuvieron los parámetros L, a y b iniciales y, para ello, se siguió este procedimiento:

- I. Calibrar el colorímetro con el uso de un patrón blanco y, después, colocar el huevo en posición transversal al instrumento asegurándose que se cubre la totalidad del espacio hueco del mismo (Figura 13).

- II. Realizar un disparo teniendo cuidado de no quitar el huevo hasta que la lectura aparezca en la pantalla del instrumento. Después, registrar los valores de L, a y b y repetir en las zonas aleatorias necesarias establecidas para la medición.

Posteriormente, se realizó la tinción de los huevos con Azul de Tripán al 0.1 % (AT) por inmersión durante 1 min; a continuación, se enjuagaron por 3 s con agua destilada y se dejaron secar por 20 min en campana de flujo laminar. Después, se obtuvo la diferencia de color al medir los parámetros L, a y b finales y, al terminar, los huevos se almacenaron por 40 días a temperatura ambiente. Se utilizó el parámetro  $\Delta E$  y éste se calculó de la siguiente forma:

$$\Delta E = \sqrt{(L_{final} - L_{inicial})^2 + (a_{final} - a_{inicial})^2 + (b_{final} - b_{inicial})^2}$$

### 3.2.4 Determinación de frescura por medición de unidades Haugh

Al final del tiempo de almacenamiento, los huevos fueron pesados en una balanza analítica (Ohaus V02130) quebrados individualmente sobre una superficie plana, cuidando de no romper la yema. Se colocó el micrometro de Haugh (Baxlo), en zonas aleatorias del albumen denso (normalmente a 1 cm de la yema), cuidando de no hacerlo en las fracciones de las chalazas, y se bajó cuidadosamente el émbolo de medida hasta que el palpador entrara en contacto con la clara (Figura 14).



**Figura 13** Medición de color.



**Figura 14.** Medición de altura de albumen denso



El cálculo para obtener las Unidades Haugh de cada huevo, se realizó a partir de su peso inicial (p) en gramos, y la altura de albumen denso (h):

$$100 * \log(h - 1.7 * p^{0.37} + 7.57)$$

Para determinar el color de la yema se midieron con los parámetros L, a y b con el colorímetro Konica Minolta CM-600d. Posteriormente, los cascarones fueron secados en una estufa (Lindberg/Blue M Go 1390A-1) a 50 °C por 24 h.

### 3.2.5 Cuantificación de minerales

Los cascarones fueron triturados y se incineraron en una mufla (Lindberg TZAST) hasta obtener las cenizas. Se realizaron las digestiones ácidas correspondientes para obtener las soluciones madre como a continuación se describe:

- I. Pesar los cascarones para cada tratamiento utilizando una balanza analítica y registrar peso.
- II. Colocar nueve crisoles en la estufa a 50 °C por 3 h hasta obtener peso constante. Guardar en un desecador para evitar que la humedad del ambiente altere su peso.
- III. Trasvasar los 7 cascarones de cada tratamiento y réplica a un vaso de licuadora y moler por aproximadamente 20 s hasta que el tamaño de partícula sea homogéneo.
- IV. Pesar en los crisoles, por triplicado, aproximadamente 2.5 g del cascarón molido. Esto se realizará para los tres tratamientos y para cada réplica.
- V. Calcinar todas las muestras hasta que no desprendan humo.
- VI. Colocar todos los crisoles en una mufla a 500 °C por 3 h y, transcurrido el tiempo, guardar en un desecador para que lleguen a temperatura ambiente y puedan ser pesados.
- VII. Pesar cada crisol utilizando una balanza analítica y registrar los valores. Calcular el porcentaje de cenizas para cada tratamiento y réplica.
- VIII. Trasvasar las cenizas a vasos de precipitados de 100 mL y adicionar a cada uno entre 15 mL de HCl 25 %. Disolver hasta la ausencia de partículas en el fondo del vaso.

IX. Filtrar cada solución a un matraz volumétrico de 50.0 mL utilizando un embudo y papel filtro Whatman #1. Enjuagar los restos de la solución en cada vaso así como el papel filtro mismo con una piceta con agua desionizada.

X. Agregar agua desionizada c.s.p. completar el volumen hasta la marca de aforo del matraz. Homogeneizar por inversión y verter el contenido a frascos de plástico previamente identificados. Almacenar las soluciones madre en refrigeración hasta su uso.

Después, se determinó el contenido de magnesio y calcio con un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 3110) y el contenido de fósforo fue cuantificado con un espectrofotómetro UV-Visible (Perkin Elmer Lambda 2S). Las técnicas completas se llevaron a cabo de acuerdo a lo siguiente:

*- Preparación de la curva patrón de Ca*

I. Transferir a matraces volumétricos, alícuotas de 25.0 mL de la solución estándar de calcio (10 mg de Ca/L) que correspondan a 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 mL de la solución.

II. Agregar agua desionizada c.s.p. completar el volumen hasta la marca de aforo del matraz. Homogeneizar por inversión y determinar la absorbancia a 422.7 nm.

III. Obtener la ecuación de regresión lineal que describa el comportamiento de la curva patrón.

*- Preparación de la muestra*

I. Transferir a un matraz volumétrico de 100.0 mL una alícuota de 2.5 mL de la solución madre y agregar agua desionizada c.s.p. completar el volumen hasta la marca de aforo del matraz. Homogeneizar por inversión.

II. Transferir a un matraz volumétrico de 25.0 mL una alícuota de 0.25 mL de la dilución anterior y agregar agua desionizada c.s.p. completar el volumen hasta la marca de aforo del matraz. Homogeneizar por inversión. Esta dilución corresponde a 1:4000.

III. Determinar por duplicado la absorbancia a 422.7 nm y por interpolación en la curva patrón, obtener la concentración de calcio. Considerar el factor de dilución y

el peso de la muestra antes de obtener las cenizas, para calcular las ppm de Ca en el cascarón de huevo.

*- Preparación de la curva patrón de Mg*

I. Transferir a matraces volumétricos de 25.0 mL alícuotas de la solución estándar de calcio (10 mg de Mg/L) que correspondan a 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 y 1.25 mL de la solución.

II. Agregar agua desionizada c.s.p. completar el volumen hasta la marca de aforo del matraz. Homogeneizar por inversión y determinar la absorbancia a 285.2 nm.

III. Obtener la ecuación de regresión lineal que describa el comportamiento de la curva patrón.

*- Preparación de la muestra*

I. Transferir a un matraz volumétrico de 100.0 mL una alícuota de 2.5 mL de la solución madre y agregar agua desionizada c.s.p. completar el volumen hasta la marca de aforo del matraz. Homogeneizar por inversión.

II. Transferir a un matraz volumétrico de 25.0 mL una alícuota de 1.0 mL de la dilución anterior y agregar agua desionizada c.s.p. completar el volumen hasta la marca de aforo del matraz. Homogeneizar por inversión. Esta dilución corresponde a 1:1000.

III. Determinar por duplicado la absorbancia a 285.2 nm y, por interpolación en la curva patrón, obtener la concentración de magnesio. Considerar el factor de dilución y el peso de la muestra antes de obtener las cenizas, para calcular las ppm de Mg en el cascarón de huevo.

*- Preparación de la curva patrón de P*

I. Transferir a matraces volumétricos de 50.0 mL alícuotas de la solución estándar de fósforo (0.01 mg de P/mL) que correspondan a 0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 mL de la solución.

II. Añadir 10.0 mL de solución de molibdovanadato y agregar agua desionizada c.s.p. completar el volumen hasta la marca de aforo del matraz. Homogeneizar por inversión.

III. Dejar reposar 10 min y determinar la absorbancia a 400 nm.

IV. Obtener la ecuación de regresión lineal que describa el comportamiento de la curva patrón.

*- Preparación de la muestra*

I. Transferir a un matraz volumétrico de 50.0 mL una alícuota de 0.5 mL de la solución madre y añadir 10.0 mL de molibdovanadato y agregar agua desionizada c.s.p. completar el volumen hasta la marca de aforo del matraz. Homogeneizar por inversión.

II. Dejar reposar 10 min y determinar la absorbancia a 400 nm.

III. Por interpolación en la curva patrón, obtener la concentración de fósforo. Considerar los factores de dilución y el peso de la muestra antes de obtener las cenizas, para calcular el porcentaje de fósforo en el cascarón de huevo.

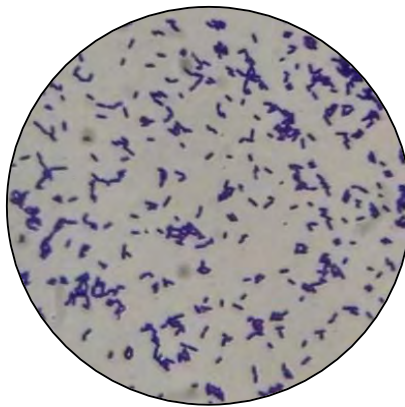
### 3.2.6 Análisis estadístico

Para determinar diferencias entre los tratamientos se realizaron Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor y una prueba *a posteriori* de Diferencia de Medias Significativa (DMS). El programa utilizado fue IBM SPSS Statistics 22 con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  (95 % de confianza).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Identificación de *Listeria monocytogenes*

La identificación de la bacteria (ATCC 19115) que se utilizó para contaminar los huevos se realizó por tinción de Gram y en la Figura 15 se observa, que es un bacilo corto Gram positivo. La confirmación de la misma, por medio del Vitek 2, demostró con un nivel de confianza del 95 % que se trataba de *Listeria monocytogenes*.



**Figura 15.** Morfología microscópica de la cepa de *Listeria monocytogenes*.

### 4.2 Propiedades fisicoquímicas de la SES

El análisis fisicoquímico de la solución demostró que el pH y Potencial de Óxido-Reducción (ORP, por sus siglas en inglés) fueron 6.86 y 872 mV, respectivamente (Figura 16). Estos valores se encuentran dentro de los intervalos típicos para este tipo de soluciones electrolizadas: 6.4-7.5 para el pH y 800-900 mV para el ORP (Durán, 2010). Además, como indican Len *et al* (2000), Abadias *et al* (2008), Cabello *et al* (2009) y Cheng *et al* (2012), estas características son los que le otorgan a la solución una mayor estabilidad y efectividad desinfectante ante diversas condiciones ambientales como la temperatura.

Respecto a la concentración de cloro libre, resultó ser de 46 ppm lo que indica que es una concentración aceptable para evaluar el efecto antimicrobiano de una Solución Electrolizada de Superoxidación (Kim *et al*, 2000; Deza *et al*, 2003; Issa *et al*, 2010).

a)



b)



**Figura 16.** Verificación de las propiedades de la SES: a) Medición de pH y ORP, b) Medición de cloro libre o cloro de ultra alto rango (UHR, por sus siglas en inglés) por espectrofotometría.

#### 4.3 Actividad antimicrobiana *in vitro*

Como establece la NMX-BB-040-SCFI-1999, un producto bactericida debe lograr 99.999 % de reducción bacteriana en 30 s de contacto. En la siguiente tabla se resumen los resultados de la cuenta inicial, así como los porcentajes de reducción logrados por cada desinfectante.

**Tabla 4.** Resultados de la evaluación *in vitro* en la reducción de *L. monocytogenes*.

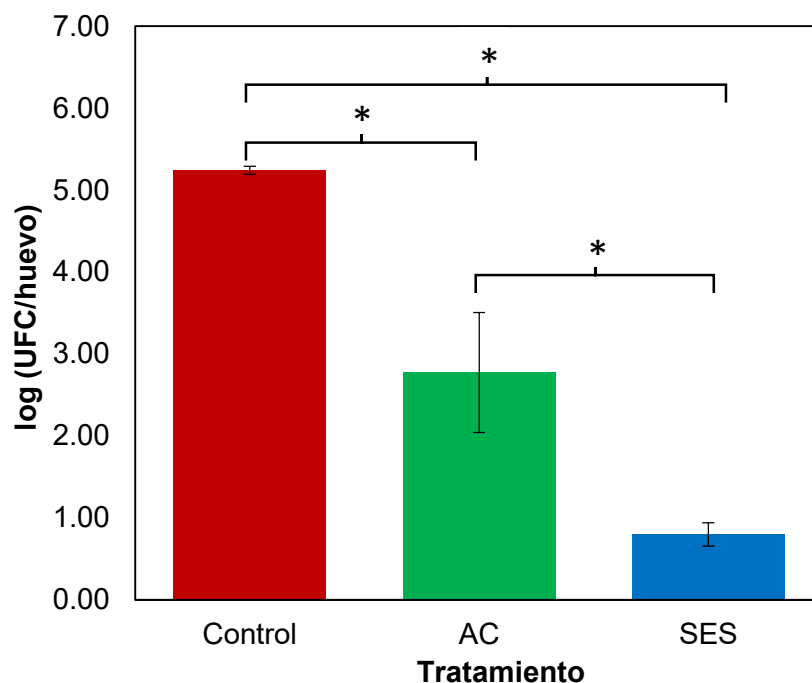
Tratamiento	Cuenta viable log(UFC/mL)	Reducción bacteriana (%)
Control (SSFE)	9.10 ± 0.07	No aplica
AC	8.04 ± 0.17	91.03
SES	< 3.00 ± 0.00	> 99.99

Este experimento se realizó para determinar el efecto antimicrobiano *in vitro*. Estos resultados no se pueden comparar con otros estudios donde se evalúa la reducción *in vitro* de *L. monocytogenes* con el uso de SES con pH neutro. Por ejemplo, Deza

*et al* (2003) y Guentzel *et al* (2008) publicaron que se puede lograr una disminución de más del 99.99 % de la carga inicial tras aplicar el tratamiento por 5 y 10 min, respectivamente. Sin embargo, haber logrado el mismo porcentaje de reducción en 30 s, utilizando este desinfectante, permite conocer el tiempo mínimo de acción requerido para tener una desinfección satisfactoria de este patógeno.

#### 4.4 Actividad antimicrobiana en huevo embrionado

Para determinar el poder desinfectante de la SES con pH neutro y el AC en el huevo, se usó una concentración inicial de  $10^6$  UFC/mL, como lo refieren Bialka *et al* (2004) en su evaluación. Este análisis se puede extrapolar para el caso de la contaminación de huevo fresco. Se obtuvo un título bacteriano que demostró que existe diferencia significativa entre los huevos que fueron desinfectados con alguna de las dos soluciones (SES o AC) comparándolos contra el grupo control, además de que el tipo de desinfectante empleado también repercute en el nivel de reducción logrado.

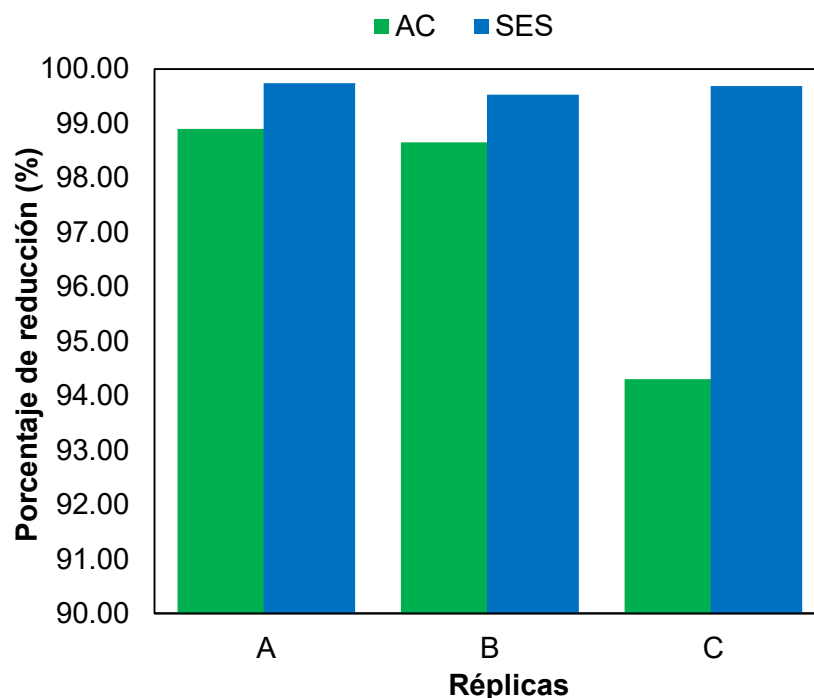


**Figura 17.** Efecto de los tratamientos sobre la cuenta bacteriana en huevo embrionado.  
\* Diferencia significativa con ( $p < 0.05$ ).

Como se observa en la Figura 17, la cuenta bacteriana del tratamiento control fue de 5.24 log(UFC/huevo), con AC se llegó a una cuenta de 2.77 log(UFC/huevo) y 0.80 log(UFC/huevo) con el uso de la SES con pH neutro.

Los datos obtenidos indicaron que la SES con pH neutro logró disminuir más la carga de *L. monocytogenes* logrando una reducción de 4.44 log(UFC/huevo) respecto a la que se obtuvo por el uso de AC como desinfectante que fue de 2.47 log(UFC/huevo) y esto se debe a la acción conjunta del poder oxidante del HClO y el alto ORP de la SES. Pero, al graficar el promedio de las tres réplicas del uso de AC, se obtiene 97.80 % de reducción que, estadísticamente, no es diferente al 99.65 % que se obtiene al utilizar SES como desinfectante.

En la Figura 18, se aprecia que en la Réplica C fue en la que se logró un menor porcentaje de reducción (94.30 %) comparado con los obtenidos en las Réplicas A (98.90 %) y B (98.65 %). Esto quiere decir que, en la última réplica, intervino un factor externo al experimento que repercutió negativamente en el análisis estadístico.



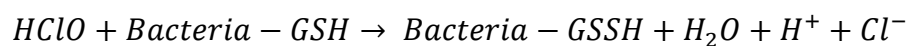
**Figura 18.** Porcentaje de reducción microbiana del AC y de la SES en huevo embrionado.



Anteriormente, el efecto bactericida del AC contra *L. monocytogenes* sólo ha sido probado en una solución compuesta de la mezcla de ácidos cítrico, acético y propiónico en concentraciones iguales al 0.8 % en piel de pollo (Menconi *et al*, 2013), y en jugo de mango con suspensiones de nanopartículas de ZnO que contenían 0.3 % de ácido cítrico en la superficie (Barzegari *et al*, 2014). Al no existir estudios donde se demuestre su efecto inhibitorio en huevo, los resultados obtenidos no pueden ser comparados con los de las investigaciones citadas. Solo como referencia, en estos estudios se logró reducir la contaminación bacteriana en 1.85-2.87 log(UFC/piel de pollo) y 3.69-3.94 log(UFC/mL), respectivamente.

Las Soluciones Electrolizadas de Superoxidación han sido evaluadas en huevo para la eliminación de otros patógenos distintos a *L. monocytogenes*. Ni *et al* (2014) demostró que una solución con pH 5.74, 902 de ORP y 60 mg/L cloro libre, logró reducir 2.2 log(UFC/g) para *Salmonella* Enteritidis y *Staphylococcus aureus*, y 1.5 log (UFC/g) para *E. coli* O157:H7. No obstante, la comparación entre los resultados obtenidos y los de este estudio no puede ser total ya que las propiedades fisicoquímicas de las SES empleadas son ligeramente distintas.

También, Deza *et al.* (2003), Guentzel *et al.* (2008) y Rahman *et al.* (2012) reportaron que los tomates, lechuga y espinaca, y la carne de pollo, pueden ser descontaminados de *L. monocytogenes* con el uso de SES con pH neutro, reduciendo la carga bacteriana 4.7 log (UFC/cm<sup>2</sup>), 2.5-4.5 log (UFC/mL) y 2.3 log (UFC/g pollo), respectivamente. Lo anterior sugiere que esta tecnología puede ser empleada en la desinfección de huevo ante diferentes tipos de contaminación y con alta efectividad para distintos microorganismos lo que ayudaría a conservar la inocuidad del alimento. Además, tiene la ventaja de que no genera contaminantes o sustancias químicas reactivas, tal como lo indican Liao, *et al* (2007):



Entonces, se resalta el interés de esta investigación para colocarse como el primer reporte en el que se demuestre el efecto antimicrobiano de este nuevo desinfectante con pH neutro, contra este microorganismo patógeno.

#### 4.5 Efecto sobre la supervivencia embrionaria

En la Figura 19, se representan las curvas de supervivencia de los embriones después del tratamiento, y se ve que la mayor mortalidad la tiene el grupo de huevos control (90.9 %), después los tratados con AC (87.9 %), y los que menor mortalidad tuvieron fueron los que se desinfectaron con SES con pH neutro (78.8 %).

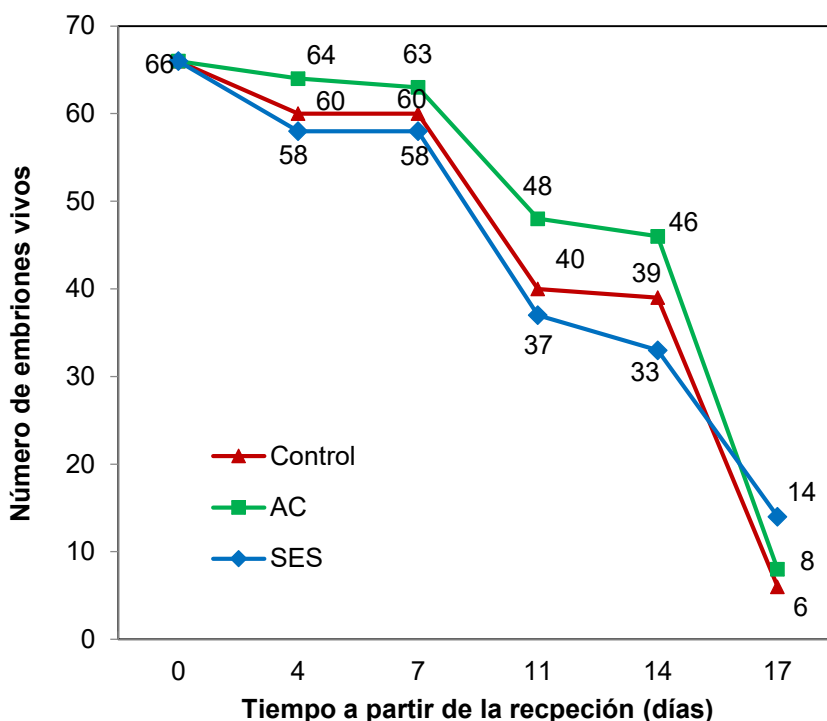


Figura 19. Curvas de supervivencia en huevo embrionado infectado con *L. monocytogenes*

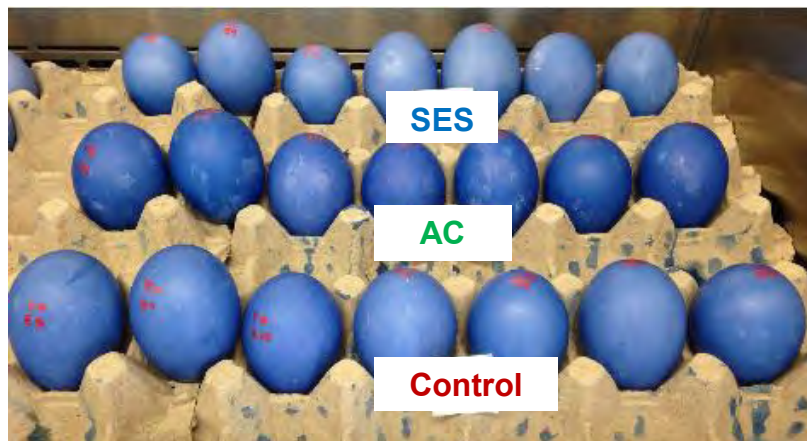
Los altos porcentajes de mortalidad no corresponden con lo que Fasenko *et al* (2009) reporta. En ese estudio, se demostró que la supervivencia embrionaria no se ve afectada por el uso o no de algún desinfectante. Se encontró que la mortalidad fue de 11.3-11.9 % y que la SES con pH ácido no influye negativamente en este parámetro de producción avícola. No obstante, para analizar las curvas de supervivencia, se realizó un análisis en función de las pérdidas observadas y esperadas, utilizando la prueba de logrank. Se encontró que el grupo Control es 1.8 veces más susceptible al riesgo de mortalidad que el grupo SES, también, el grupo AC fue 1.4 veces más propenso de muerte que el grupo SES. Este análisis es muy

importante ya que aporta información útil para saber el impacto en el costo/beneficio del uso de la SES con pH neutro como desinfectante en incubadoras industriales.

Es importante mencionar que el tratamiento aplicado no fue el único factor que intervino en la muerte de los embriones; la temperatura de incubación (37 °C) presentó variaciones a lo largo del experimento. Específicamente entre el día 11 y 15 de edad de los embriones, se presentó una situación de falla eléctrica que repercutió en una disminución de la temperatura. Ante estas situaciones de emergencia, se puede notar que los huevos embrionados que son tratados con SES con pH neutro pueden sobrevivir más que los que no hayan recibido tratamiento de desinfección.

#### 4.6 Efectos sobre la cutícula

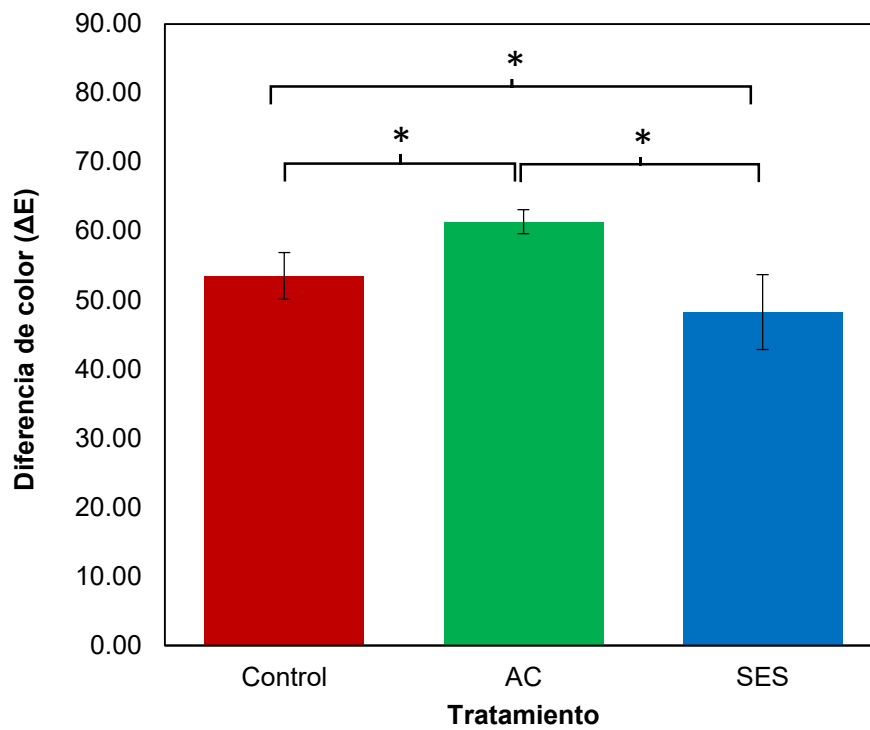
En la Figura 20 se aprecian las coloraciones que tuvieron los huevos después de realizado la contaminación, el tratamiento y la tinción con azul de tripán 0.1 %.



**Figura 20.** Efecto de los tratamientos en la tinción con azul de tripán de huevo para plato.

A simple vista no se podía determinar si existía o no diferencia entre los tratamientos por lo que se calculó un parámetro denominado  $\Delta E$  (diferencia de color) y, según el fabricante del colorímetro (Konica Minolta, 2014), se pueden encontrar diferencias ínfimas entre dos muestras con color similar. Se tomó en cuenta que el estándar o el punto de referencia era la coloración inicial del huevo y que el punto de comparación para cada tratamiento era la coloración dada después de la tinción. La Figura 21 muestra que existe diferencia significativa entre los tratamientos lo que

indica que la interacción del colorante con la cutícula en cada caso difiere uno de otro.



**Figura 21.** Efecto de los tratamientos en la diferencia de color para evaluar la presencia de la cutícula en huevo para plato. \* Diferencia significativa con  $p < 0.05$ .

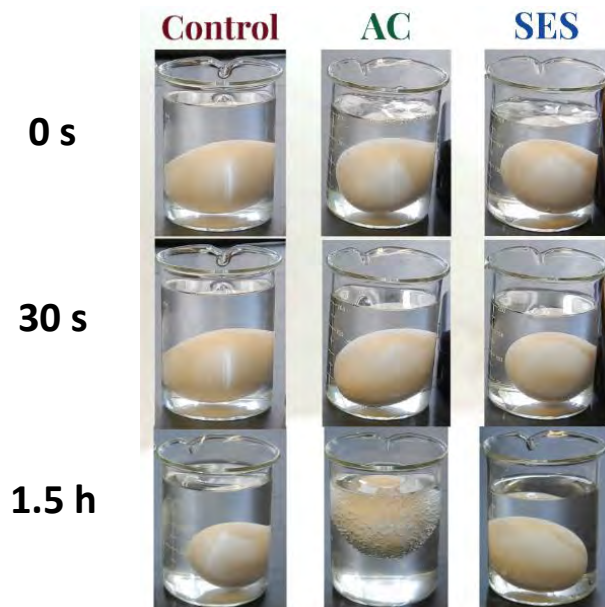
Si en el grupo Control los huevos permanecen con la cutícula intacta, la diferencia de color de 53.5 es la que se esperaría en aquellos huevos que no sufrieran daño en esta membrana proteica. Como se observa, para el caso del grupo AC, la  $\Delta E$  es mayor (61.4) y esto se explica porque el ácido cítrico reaccionó con las proteínas de la cutícula y permitió la penetración del colorante interactuando más fuertemente con las moléculas inorgánicas del cascarón y por ello se aprecia una tonalidad más intensa.

López *et al* (2012) demostraron que los ácidos orgánicos son agentes oxidantes de materia orgánica y, por lo tanto, tienen repercusión negativa sobre la cutícula de huevo generando mayor porosidad en el cascarón. Esto indica que las bacterias supervivientes presentes en la superficie pueden entrar más fácilmente al ya no contar con la esta barrera física. Para el caso del grupo SES en el que se obtuvo un valor de 48.3 en diferencia de color, se puede creer que la solución desinfectante

no afecta a la cutícula porque es estadísticamente diferente al grupo AC. Bialka *et al* (2004) hizo notar que la destrucción de la cutícula es debida a la aplicación de SES ácida y alcalina. además, Leleu *et al* (2011) menciona que si el lavado del huevo se hace correctamente, la integridad de la cutícula no se ve afectada, lo que permite inferir que el uso correcto de la SES con pH neutro no tendría impacto negativo alguno sobre la cutícula.

En la industria es necesario conocer que el grado de alteración sobre la cutícula varía con el tipo de máquina lavadora y clase de solución desinfectante. Según Alba y cols. (2008) la desinfección a base de HClO al 1 % reduce la alteracion de los huevos lavados y esto proporciona información más real sobre el efecto de esta etapa en su manipulación.

A continuación, se muestran los resultados complementarios en los que se ve el efecto directo sobre el huevo (Figura 22). Con la SES con pH neutro no se observó efecto de efervescencia por lo que no tuvo efecto alguno sobre la integridad del huevo después de 1.5 h de estar en contacto con él. Por el contrario, con AC, se observa efervescencia desde los 30 s que se hace más notoria a 1.5 h de contacto.



**Figura 22.** Efecto de los tratamientos por inmersión de huevos para plato.

Para que el ácido cítrico pueda reaccionar con el cascarón del huevo y, consecuentemente, generar CO<sub>2</sub>, es necesario que primero reaccione con las proteínas de la cutícula desintegrando esta membrana protectora. Con esto se encuentra una desventaja importante sucedida de la aplicación de este desinfectante en la superficie del huevo, no así en el caso de usar la SES

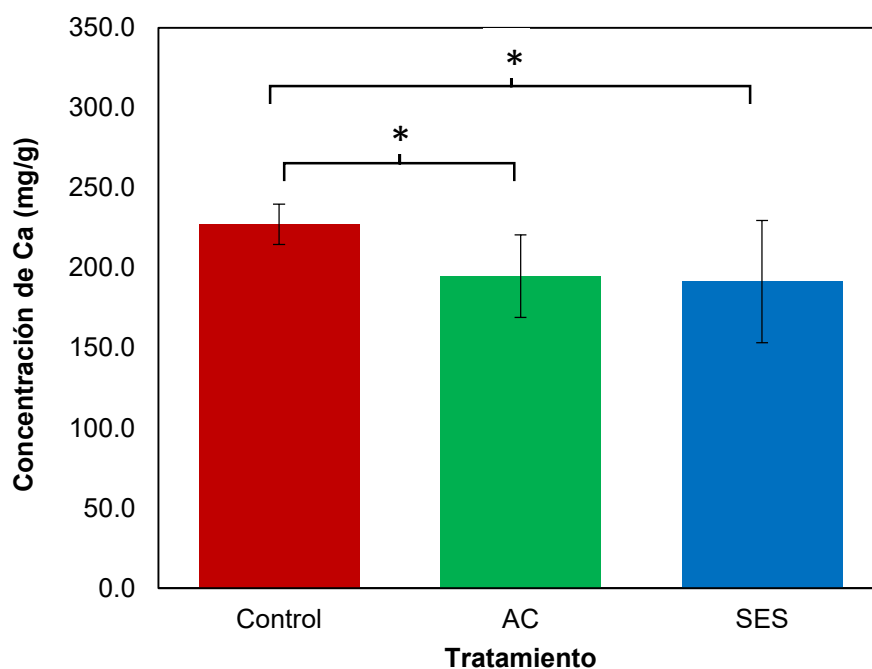
Los resultados se podrían complementar con la implementación de microscopía electrónica para hacer evidente el aumento en la porosidad del cascarón de huevo si se emplea AC y ver si, efectivamente, la SES con pH neutro no afecta la integridad de la cutícula. De acuerdo con Rodríguez *et al* (2013), cuando la cutícula se encuentra en buen estado esta membrana tiene un espesor mayor que cuando está dañada. También, se hace hincapié en que la descalcificación del cascarón es producida por el efecto de la calidad del huevo, incluyendo así el factor tiempo. Se podría usar espectroscopía infrarrojo para contrastar las bandas características de las proteínas y polisacáridos presentes en la cutícula y diferenciar un huevo sin cutícula por la visualización exclusiva de bandas pertenecientes a grupos funcionales de carbonato. Esto haría evidente que con el uso de AC, las bandas que determinan la presencia de la cutícula, no estarían presentes y permitiría saber si se observan para el caso de la desinfección de huevo con la SES con pH neutro.

Adicionalmente, el estudio de la degradación de la cutícula, en términos de estructura, se ve afectado por la glicosilación de las proteínas y las propiedades de esta membrana. Cuando la glicosilación es baja, la resistencia de la cutícula disminuye para la penetración de las bacterias lo que magnifica el riesgo de contaminación (Wellman *et al*, 2010). Es por esta razón que cuando la cutícula se encuentra en un estado de deterioro, este se compensa con el uso específico de estrategias de recubrimientos del huevo con aceite mineral o películas de quitosán, de esta forma se provee de una protección adicional ante la contaminación microbiológica (NOM-143-SSA1-1995, Hutchison *et al*, 2003; Caner and Cansiz, 2008).

#### 4.7 Efecto sobre el cascarón

Como se mencionó con anterioridad, el efecto de la SES con pH neutro sobre la cutícula no se ha determinado con claridad. Por esta razón, la determinación de los minerales en el cascarón de huevo es una herramienta más para conocer si es que ocurre algún efecto de desmineralización como con el uso de AC.

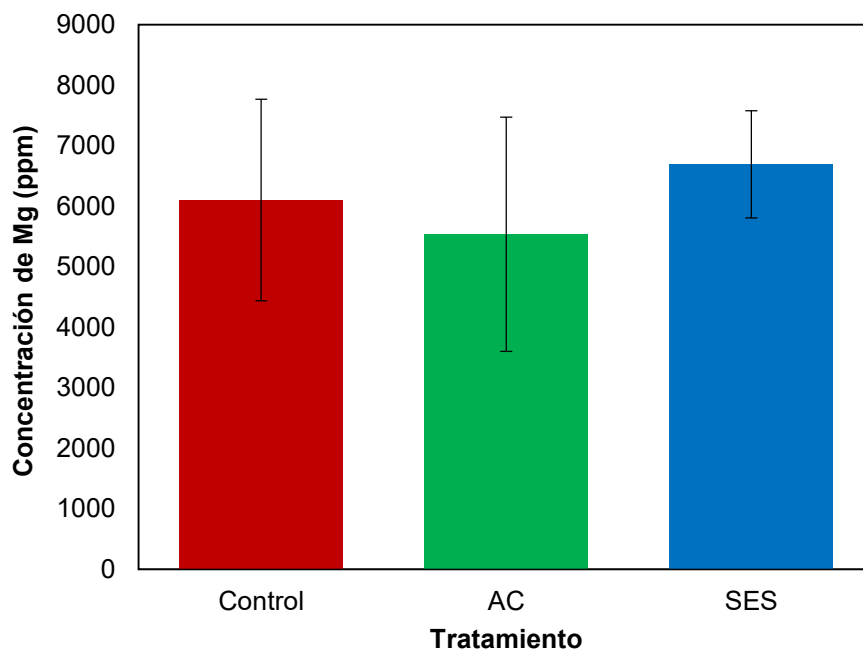
En las Figuras 23-25 se encuentran los valores obtenidos de la cuantificación de calcio, magnesio y fósforo en cascarón de huevo, respectivamente. Como valores de referencia del contenido de estos minerales en huevo de gallina, se encontró que Schaafsma *et al* (2000) reporta un intervalo de concentración de 385 a 400 mg de Ca/g de cascarón, 3500 a 4000 ppm de Mg y 1000 a 2000 ppm de P. Se sabe que las diferencias en el contenido de minerales se debe principalmente a la alimentación, la variabilidad genética de las gallinas y la edad de las mismas (Jones *et al*, 2002; Travel *et al*, 2011).



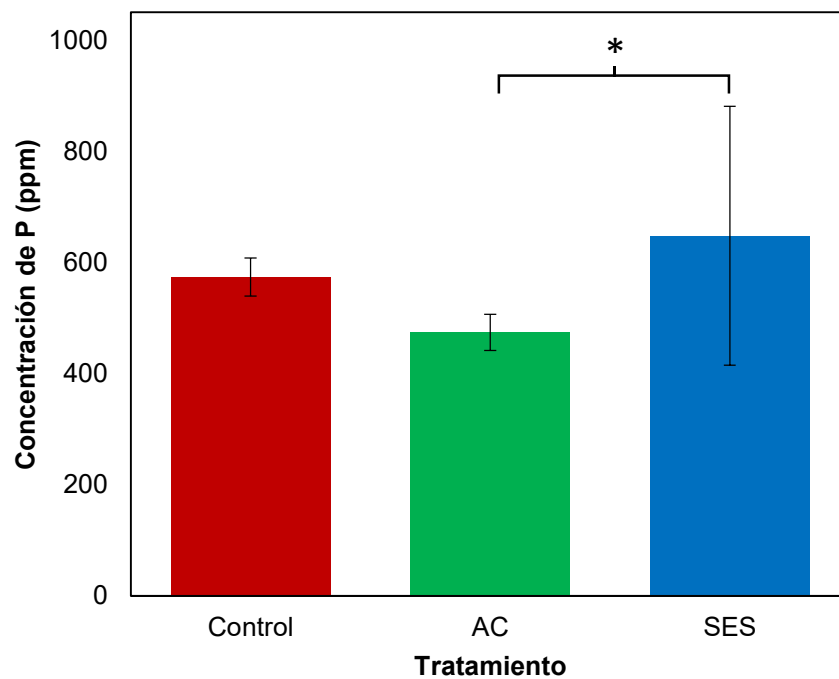
**Figura 23.** Efecto de los tratamientos sobre el contenido de Ca en cascarón de huevo.  
\* Diferencia significativa con  $p < 0.05$ .

En el caso del calcio y el fósforo, resulta claro que el AC tuvo repercusión en la disminución de estos minerales respecto al control, mientras que la SES con pH neutro sólo redujo significativamente la cantidad de calcio presente en el cascarón

del huevo. Para la concentración de magnesio no se encontró diferencia significativa entre el uso o no de alguna solución desinfectante.



**Figura 24.** Efecto de los tratamientos sobre el contenido de Mg en cascarón de huevo.  
\* Diferencia significativa con  $p < 0.05$ .



**Figura 25.** Efecto de los tratamientos sobre el contenido de P en cascarón de huevo.  
\* Diferencia significativa con  $p < 0.05$ .



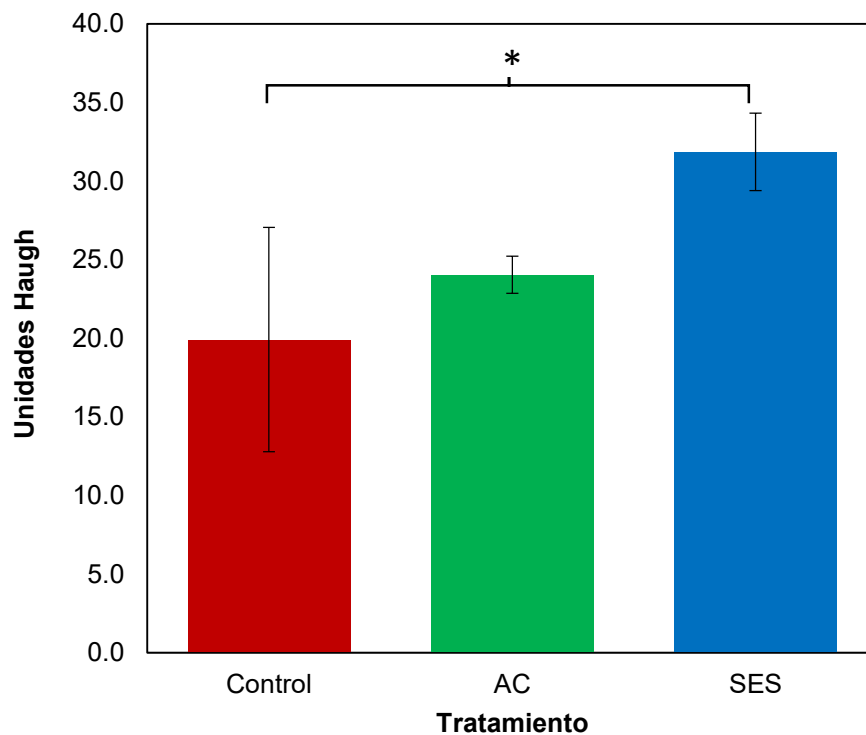
Cusack *et al* (2003) refiere en su estudio que la cantidad de magnesio y fósforo presentes en el cascarón se ven significativamente disminuídos cuando la integridad de la cutícula está afectada negativamente. Aunado a ello, se reitera la importancia de implementar el uso de espectroscopia infrarrojo para complementar el análisis de la concentración de fosfatos que va en función del tamaño de la membrana proteíca; cuando aparecen las bandas que indican la presencia de fósforo, la cutícula es mucho más delgada. Al observar que existe diferencia significativa en la concentrtración de este mineral cuando se comparan los huevos del grupo Control y AC, se hace evidente la disminución de la cutícula y la desmineralización del cascarón cuando se emplea ácido cítrico en la desinfección. No ocurre este efecto cuando se trata de los huevos desinfectados con SES con pH neutro por lo que la interacción de esta solución con la cutícula y con el cascarón es diferente que con el AC, y no presenta este inconveniente por lo que no daña la calidad externa del alimento.

De manera integrativa, la deisnfección de los huevos debería sólo emplear el atomizado de la solución desinfectante ya que, en la siguiente operación (lavado), puede hacerse uso de cepillos, que si bien facilitan la sanitización presentan un gran inconveniente. El cepillado de los huevos trae consigo la exposición del cascarón por remoción de la cutícula lo que no es favorable al aumentar el riesgo de ocntaminación a través de los poros (Hutchison *et al*, 2006). Otros factores a tomar en cuenta en esta operación son el pH y la temperatura de la solución desinfectante. Como mencionan Leclair *et al* (1994) y Messens *et al* (2011), la eficacia del desinfectante se ve influenciada cuando estos parámetroitros no son los óptimos para lograr la descontaminación. Para el caso de *L. monocytogenes* se ha encontrado que la temperatura debe incrementarse de 42 hasta 47.4 °C y que el pH debe ser cercano a 10.8. El uso de la SES con pH neutro no presenta estos inconvenientes por lo que, nuevamente, se reitera la aplicación potencial de este nuevo desinfectante en el huevo.

#### 4.8 Efecto sobre la calidad interna del huevo para plato

Los huevos con buena calidad interna, y cuya frescura se mantiene, ayudan a obtener ovocproductos de calidad. El primer punto depende de factores como la edad de la gallina y el segundo depende de las condiciones de conservación, pues la temperatura es uno de los factores que mayor influye en la calidad; pueden apreciarse cambios en las características y propiedades funcionales de los componentes del huevo (Cepero, 2002; Guedes *et al*, 2016).

En este estudio, los huevos para plato se almacenaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 40 días por lo que los efectos antes mencionados se percibieron visualmente. Se ha demostrado que la calidad del huevo va en función directa con la altura del albumen denso, que es la parte que rodea a la yema. Sin embargo, en la industria del huevo, el parámetro internacionalesmente aceptado para esta determinación es la unidad Haugh que también considera el peso del huevo (Silversides, 1993; Fuentes, 2002).



**Figura 26.** Efecto de los tratamientos sobre las unidades Haugh en huevo para plato.  
\* Diferencia significativa con  $p < 0.05$ .

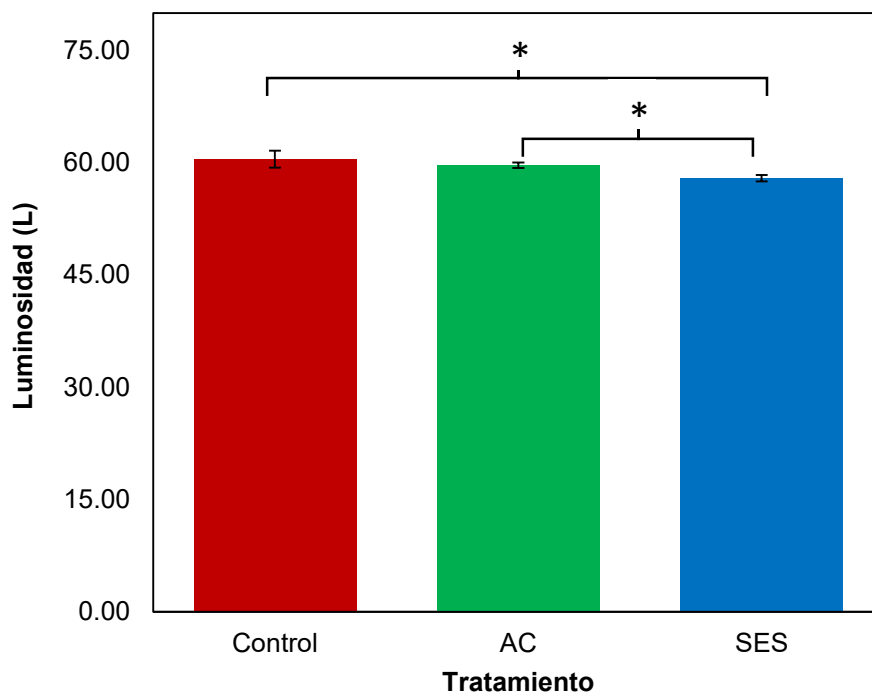
La Figura 26, muestra la gráfica comparativa de los valores de unidades Haugh dependiendo del tratamiento que recibieron los huevos. Para el grupo Control se obtuvo un valor de 19.9 y que es estadísticamente diferente al que tiene el grupo SES (31.9). Para el caso del tratamiento con la solución de referencia (AC), se encontró que tuvo 24.0 unidades Haugh.

Los huevos no tratados presentaron valores de altura de albúmen denso menores que las de aquellos desinfectados con la SES con pH neutro y, tal como aclaran Juárez *et al* (2010), Terčič *et al* (2012) y Santos *et al* (2016), a medida que la altura del albúmen denso se mantiene en los valores típicos (6-7 cm) las unidades Haugh también lo harán (45-95).

Adicionalmente, la NMX-FF-079-SCFI-2004 establece una escala que contemplan las unidades Haugh para determinar un grado de calidad del huevo para plato. En ella indica que el huevo puede ser clasificado como México extra si tiene más de 70 unidades Haugh, México 1 si tiene de 61 a 70, y México 2 si tiene de 31 a 60. Para este caso, sólo los huevos que fueron tratados con SES con pH neutro podrían considerarse aptos para consumo.

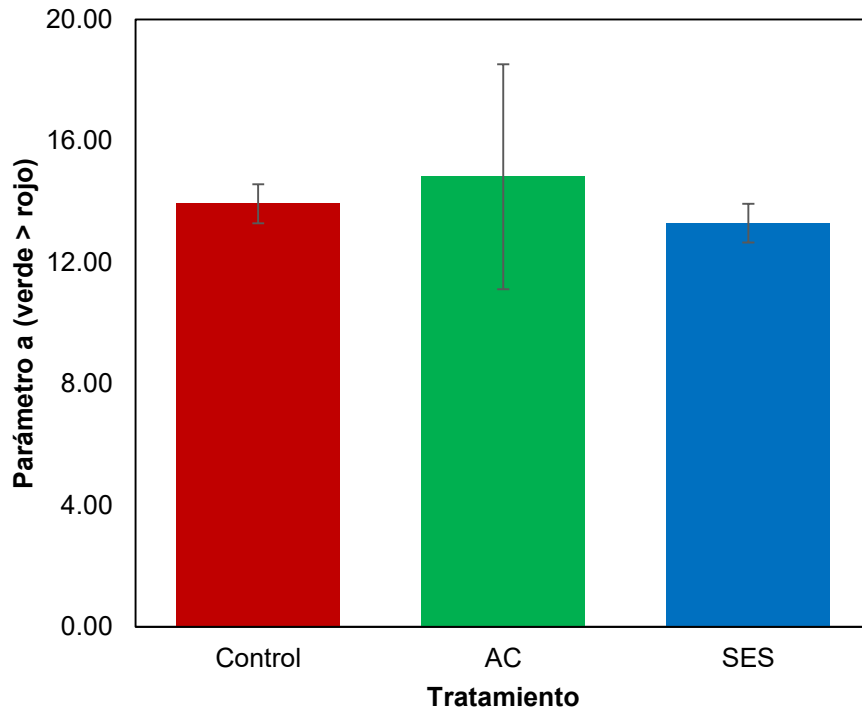
Dentro de los factores que afectan la altura del albumen se encuentran la edad de la gallina, la variabilidad genética, el sistema de producción, la alimentación y las infecciones asociadas (Fuentes, 2002). Con los resultados obtenidos se propone que otro factor que interviene en la altura del albumen tiene que ver con el uso o no de alguna solución desinfectante. Emplear la SES con pH neutro favorece a conservar por más tiempo, e incluso a temperaturas mayores a las de refrigeración, la calidad interna del huevo (medida en términos de unidades Haugh).

Por otra parte, la evaluación de la calidad interna también se realizó por medición del color de la yema. En las Figuras 27-29, se encuentran los valores de los parámetros colorimétricos de la yema: L (luminosidad), a (verde-rojo) y b (azul-amarillo), respectivamente. Para la luminosidad, se establece diferencia significativa entre los huevos del grupo Control (60.48) y los desinfectados con SES con pH neutro (57.93), de igual forma para el tipo de desinfectante empleado: AC (59.66) y SES.

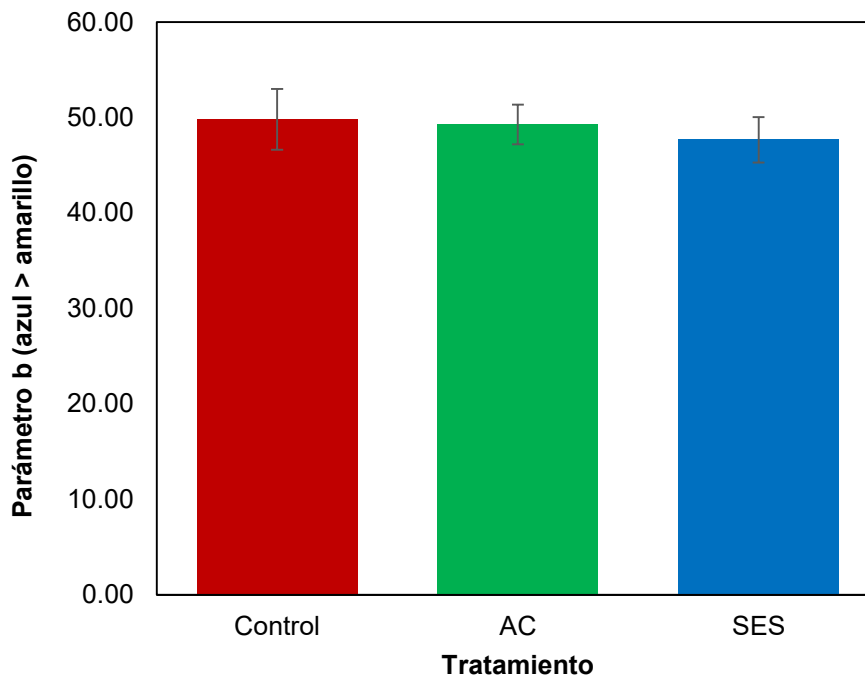


**Figura 27.** Efecto de los tratamientos sobre la luminosidad de la yema en huevo para plato. \* Diferencia significativa con  $p < 0.05$ .

Estas diferencias supondrían que el almacenamiento que se les dio a los huevos fue diferente, sin embargo, el tiempo de almacenamiento no fue una variable que cambiara entre tratamientos. En el caso del parámetro a, se aprecia que el valor para el grupo AC es de 14.82 y que corresponde con un tono más rojo, en contraparte, para los huevos no tratados y tratados con SES con pH neutro, los valores fueron de 13.93 y 13.29, respectivamente y que corresponden con un tono menos rojo. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa alguna al comparar los tratamientos. El parámetro b, indica la variación del tono amarillo y resulta ser más útil para ver los cambios en la yema debidos al tratamiento. Los valores para cada grupo de huevos (Control, AC y SES) son similares (49.81, 49.28 y 47.67) lo que supone que el tratamiento aplicado no influye sobre la coloración amarilla percibida. Además, se afirma que el método por el que se obtuvieron los huevos es el convencional ya que los valores de luminosidad (L), a y b, se encuentran dentro de los normales ( $L = 60$ ,  $a = 10$  y  $b = 55$ ) y no corresponden a los de un huevo orgánico con valores de 60, 3 y 67, respectivamente (Terčič *et al*, 2012).



**Figura 28.** Efecto de los tratamientos sobre el parámetro a de la yema en huevo para plato.  
 \* Diferencia significativa con  $p < 0.05$ .



**Figura 29.** Efecto de los tratamientos sobre el parámetro b de la yema en huevo para plato.  
 \* Diferencia significativa con  $p < 0.05$ .

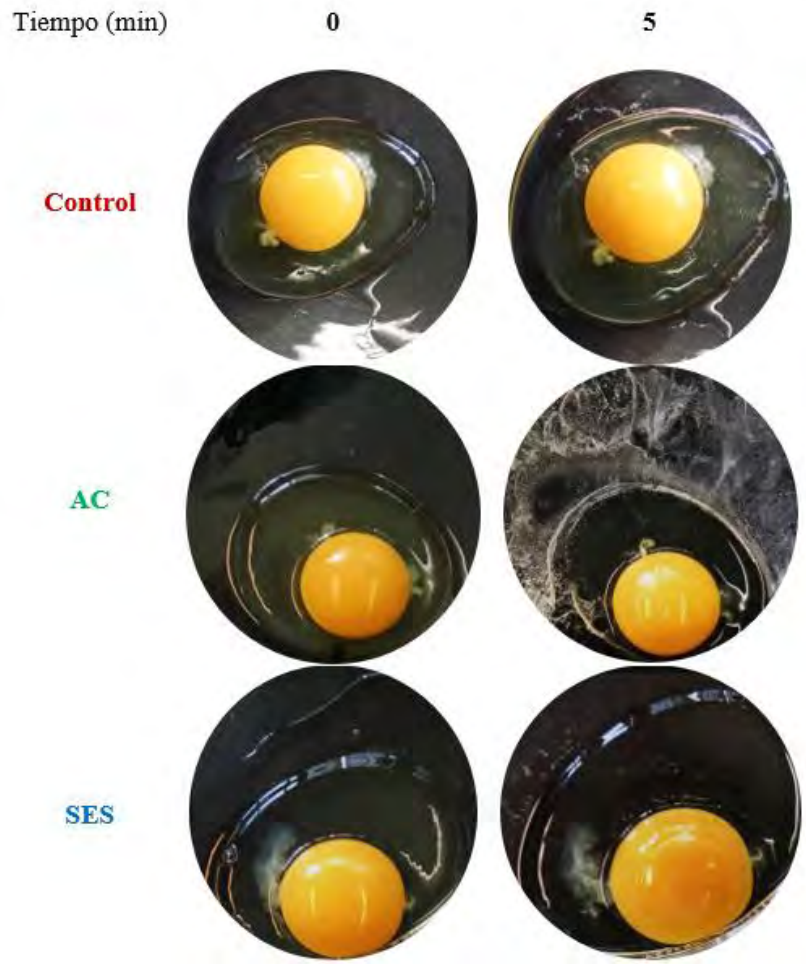
La diferencia entre huevos tratados con SES con pH neutro y no tratados, sugiere la posibilidad de que la solución evaluada protege al huevo contra el daño potencial

que podrían causar otras bacterias de deterioro en el almacenamiento del huevo. Es por ello que el hecho de que algunos huevos después de 40 días de almacenados resultaran estar podridos, no se puede atribuir a la contaminación con *L. monocytogenes* ya que no es una bacteria que pueda causar deterioro como lo es *Salmonella* o *Pseudomonas*, y reflejarse como cambio de coloración en la yema o coagulación proteica (Baron and Jan, 2011; Rossi and De Reu, 2011).

En la NMX-FF-079-SCFI-2004 se indica que el color de la yema de huevo debe encontrarse entre valores de 9 y 13 del abanico colorimétrico de Roche. También, Morsy *et al* (2015) y Santos *et al* (2016) indican que este parámetro lo pueden medir con el índice de yema y que este disminuye si la temperatura es mayor a la de refrigeración. Tomando esto como referencia y haciendo una correlación con el parámetro b, se nota que los valores son menores a los que Terčič *et al* (2012) reporta como normales. Esto supone que la influencia de la temperatura permite conservar la pigmentación característica de la yema.

La temperatura es un factor importante a considerar cuando se emplea una tecnología de desinfección del huevo. Alkaya *et al* (2016) encontró que empleando radiación infrarroja para descontaminar la superficie de huevos, la temperatura influye directamente en la calidad, específicamente en la desnaturalización proteica de la albúmina. Por ello, el experimento que se realizó por contacto directo de las soluciones con el interior del huevo, también muestra el efecto que tienen sobre las características internas del mismo.

En la Figura 30, se observa que cuando se aplicó la SES con pH neutro, no se observa alguna distinción visual respecto al huevo que fue tratado con SSFE (Control). Este efecto sólo se evaluó por un tiempo corto de aplicación (5 min) y en este periodo de tiempo se observó que el AC repercutió negativamente en la clara del huevo, desnaturalizando las proteínas presentes en el albúmen. Estos resultados, posicionan a la SES con pH neutro como una alternativa que no cambia las propiedades internas ni funcionales del huevo.



**Figura 30.** Efecto de los tratamientos por aspersión sobre la yema y albúmen del huevo.

## CONCLUSIONES

- La Solución Electrolizada de Superoxidación con pH neutro logró una reducción *in vitro* mayor a 6 ciclos logarítmicos de la población de *L. monocytogenes* y, al aplicarlo en la superficie del huevo embrionado, resultó ser una alternativa altamente eficaz como desinfectante ya que logró reducir 4.44 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes*. Esta reducción es significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a la que se obtuvo al utilizar la solución de referencia (Ácido Cítrico al 2 %) con la que sólo se logró reducir 2.47 ciclos logarítmicos.
- Se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el uso o no de SES con pH neutro sobre el riesgo de mortalidad de los embriones. Se prefiere el uso de esta tecnología de desinfección porque al emplearla, la supervivencia resulta ser 1.8 veces más que la observada en el grupo control.
- El uso de la SES con pH neutro favorece la conservación de la calidad del huevo para plato. Existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el valor de unidades Haugh entre el grupo de huevos desinfectados con SES con pH neutro y los del grupo control.
- La SES con pH neutro resulta ser una alternativa eficaz y ecológica a considerar como potente antimicrobiano en la desinfección del huevo, evitando la contaminación con *L. monocytogenes* y favoreciendo la conservación de la calidad interna del alimento. Con esto se puede extrapolar su uso en el caso de ovoproductos y plantas procesadoras de huevos, además de que podría disminuir la incidencia de la ETA's.



## PROYECCIÓN EXPERIMENTAL

- Determinar el efecto que tiene la SES con pH neutro en la cutícula, por metodologías como la microscopía electrónica y/o la espectrofotometría infrarrojo.
- Determinar los efectos tóxicos (formación de cloraminas) y repercusiones o cambios sensoriales en el producto final debido a la aplicación de la SES con pH neutro.

## REFERENCIAS

1. Abadias, M., Usall, J., Oliveira, M., Alegre, I., Viñas, I. (2008). Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally-processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, **123** (1–2): 151–158.
2. Alba, N. y cols..2008. *Ciencia, tecnología e industria de alimentos*. Colombia: Grupo Latino Editores. 1191 p.
3. Alkaya, G., Erdogdu, F., Halkman, A., Ekiz, H. (2016). Surface decontamination of whole-shell eggs using far-infrared radiation. *Food and Bioproducts Processing*, **98**: 275-282.
4. Andersson, C., Gripenland, J., Jörgen, J. (2015). Using the chicken embryo to assess virulence of *Listeria monocytogenes* and to model other microbial infections. *Nature Protocols*, 10 (8): 1155-1164.
5. Archer G., Cartwright, L. (2012). *Incubating and hatching eggs*. Texas A&M Agrilife Extension. 13 p. Disponible en:  
<http://posc.tamu.edu/wp-content/uploads/sites/20/2012/08/EPS-001-Incubating-and-Hatching-Eggs1.pdf>
6. Artés, F., Gómez, P., Aguayo, E., Escalona, V., Artés, F. (2009). Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biology and Technology*, **51** (3): 287-296.
7. Baron, F., Jan, S. (2011). Egg and egg product microbiology. In Y. Nys, M. Bain and F. Van Immerseel (Eds.) *Improving the safety and egg quality of eggs and egg products. Volume 1: Egg chemistry, production and consumption*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
8. Barzegari, F., Noori, M., Edalatpanah, Y., Mirhosseini, M. (2014). ZnO nanoparticle suspensions containing citric acid as antimicrobial to control *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in mango juice. *Food Control*, **42**: 310-314.

9. Bialka, K., Demirci, A., Knabel, S., Patterson, P., Puri, V. (2004). Efficacy of Electrolyzed Oxidizing Water for the Microbial Safety and Quality of Eggs. *Poultry Science*, **83** (12): 2071-2078.
10. Brackett, R., Beuchat, L. (1992). Survival of *Listeria monocytogenes* on the surface of egg shells and during frying of whole and scrambled eggs. *Journal of Food Protection* **55**: 862–865.
11. Cabello, C., Rosete, D., Manjarrez, M. (2009). Efecto de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro sobre la infección del virus de influenza A en células MDCK. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, **22** (4): 280-287.
12. Caner, C., Cansiz, O. (2008). Chitosan coating minimises eggshell breakage and improves egg quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **88** (1): 56-61
13. Carbajal, A. (2006). Calidad nutricional de los huevos y relación con la salud. *Revista de Nutrición Práctica*, **10**: 73-76.
14. Castañeda, G., Eslava, C., Castro, N., León, J., Chaidez, C. 2014. Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud pública en México*, **56** (6): 654-659.
15. CDC (2013). Trends in Foodborne Illness in the United States, 2012. Disponible en: <http://www.cdc.gov/features/dsfoodnet2012/index.html>
16. CDC (2015). CDC and Food Safety. Disponible en: <http://www.cdc.gov/foodsafety/cdc-and-food-safety.html>
17. Cepero, R. (2002). Producción de huevos: Situación actual y nueva normativa comunitaria En Instituto de Estudios del Huevo (Ed) *Lecciones sobre el huevo*. Madrid: Torreangulo Arte Gráfico. págs. 8-26.
18. CFSPH. (2007). Listeriosis. [en línea] (28 de agosto de 2007). Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/listeriosis.pdf> [Último acceso: 16/11/15].
19. Chemaly, M., Toquin, M., Le Nôtre, Y., Fravallo, P. (2008). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry production. *Journal of Food Protection*, **71** (10): 1996–2000.

20. Cheng, K, Dev, S., Bialka, K., Demirci, A. (2012). Electrolyzed oxidizing water for microbial decontamination of food. In A. Demirci, & M. O. Ngadi (Eds.) *Microbial decontamination in the food industry*. Woodhead Publishing. pp. 563–591.
21. Colangelo, M., Caruso, M., Favati, F., Scarpa, T., Condelli, N., Galgano, F. (2015). Electrolysed Water in the Food Industry as Supporting of Environmental Sustainability. In A. Vastola (Ed.) *The Sustainability of Agro-Food and Natural Resource Systems in the Mediterranean Basin*. Switzerland: Springer International Publishing. pp. 385-397
22. Costa, M., Canniatti, S., Arthur, V. (2007). Avaliação quantitativa por colorímetro digital da cor do ovo de galinhas poedeiras alimentadas com urucum (*Bixa Orellana*). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **102**: 339-342.
23. Cusack, M., Fraser, A., Stachel, T. (2003). Magnesium and phosphorus distribution in the avian eggshell. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, **134** (1): 63-69.
24. De Reu, K., Grijspeerd, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. (2006). Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, **112**: 253-260.
25. De Reu, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Rodenburg, T., Uyttendaele, M., Herman, L. (2008). Bacterial contamination of table eggs and the influence of housing systems. *World's Poultry Science Journal*, **64**: 5-19.
26. Delves, J. (2014). Microbiology of Egg Products. *Encyclopedia of Food Microbiology*, **1**: 617-621.
27. Deza, M., Araujo, M., Garrido, M. (2003). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes by neutral electrolyzed water. *Letters in Applied Microbiology*, **37**: 482-487.
28. Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M., Barbuddhe, S., Malik, S., Singh, R. (2015). Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis)

and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, **35** (1): 1-25.

29. Ding, T., Rahman, S., Oh, D. (2011). Inhibitory effects of low concentration electrolyzed water and the other sanitizers against foodborne pathogens on oyster mushroom. *Food Control*, **22**: 318-322.
30. Diario Oficial de la Federación. (1994). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.
31. Diario Oficial de la Federación. (1994). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.
32. Diario Oficial de la Federación. (1995). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-143-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS. METODO DE PRUEBA MICROBIOLÓGICO PARA ALIMENTOS. DETERMINACION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*.
33. Diario Oficial de la Federación. (1996). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-159-SSA1-1996, BIENES Y SERVICIOS. HUEVO, SUS PRODUCTOS Y CERIVADOS. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS.
34. Dirección General de Normas (1999). NMX-BB-040-SCFI-1999. MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS – DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS GERMICIDAS.
35. Dirección General de Normas. (2004). NMX-FF-079-SCFI-2004. PRODUCTOS AVÍCOLAS – HUEVO FRESCO DE GALLINA – ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA.
36. Dr. Jones. (2007). Egg functionality and quality during long-term storage. *International Journal of Poultry Science*, **6** (3): 157-162.
37. Durán, H. (2010). Soluciones de superoxidación y su evolución tecnológica *Dolor*, **3**: 4-8.
38. Fang, T., Huang, L. (2014). Growth and survival kinetics of *Listeria monocytogenes* in cooked egg whites. *Food Control*, **36**: 191-198.

39. Fasenko, G., O'Dea, C., McMullen, L. (2009). Spraying hatching eggs with electrolyzed oxidizing water reduces eggshell microbial load without compromising broiler production parameters. *Poultry Science*, **88** (5): 1121-1127.
40. Fernández, M., Arias, I. 2000. La cascara de huevo: un modelo de biomineralización, *Monografías de Medicina Veterinaria*. **20** (2): Disponible en: [http://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon\\_vet\\_seccion/0,1419,SCID%253D18364%2526ISID%253D452,00.html](http://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_seccion/0,1419,SCID%253D18364%2526ISID%253D452,00.html)
41. Fuentes, P. (2002). Calidad interna del huevo y su conservación. En Instituto de Estudios del Huevo (Ed) *Lecciones sobre el huevo*. Madrid: Torreangulo Arte Gráfico. págs. 57-72.
42. Gao, H., Zhao, J. (2003). Interaction of Trypan Blue with Protein and Application. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **50** (2): 329-334.
43. Gehan, Z. (2009). A new approach to evaluate the hygienic condition of commercial hatcheries. *International Journal of Poultry Science*, **8** (11): 1047-1051.
44. González, B. y Suárez, M. (2009). Listeria y Listeriosis. *Profesión Veterinaria*, **71**: 58-67.
45. Graça, A., Nunes, C., Salazar, M. (2010) Efficacy of neutral and acid electrolyzed water for reducing microbial contamination on fresh-cut fruits. *Acta Horti*, **87**:649–656.
46. Graça, A., Abadias, M., Nunes, C., Salazar, M. (2011) The use of electrolyzed water as a disinfectant for minimally processed apples. *Postharvest Biology and Technology*, **61**: 172-177.
47. Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg, A., Niclasen, O., Bredholt, S. (2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, **21**: 217–225.
48. Guedes, L., Menezes, C., de Oliveira, A., de Faria, D., Suckeveris, D., Emygdio, D. (2016). Internal quality of laying hens' commercial eggs according to storage time, temperature and packaging. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, **39** (1): 87-90.

49. Guentzel, J., Liang, K., Callan, M., Emmons, S., Dunham, V. (2008). Reduction of bacteria on spinach, lettuce and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. *Food Microbiology*, **25** (1): 36-41.
50. Guentzel, J., Liang, K., Callan, M., Emmons, S., Dunham, V. (2010). Postharvest management of gray mold and brown rot on surfaces of peaches and grapes using electrolyzed oxidizing water. *Internacional Journal of Food Microbiology*, **143** (1): 54-60.
51. Gurtler, J., Mai, T. (2014). Preservatives – Traditional preservatives – Organic acids. In C. Batt & M. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology*, 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Academic Press. pp. 119-130.
52. Hassanain, N., Hassanain, M., Ahmed, W., Shapaan, R., Barakat, A., El Fadaly, H. (2013). Public health importance of foodborne pathogens. *World Journal of Medical Sciences*, **9** (4): 208-222.
53. Hincke, M., Gautron, J., Panheleux, M., García, J., Mckee, M., Nys, Y. (2000). Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. *Matrix Biology*, **19** (5): 443-453.
54. Holah, J. (2014). Cleaning and disinfection practices in food processing. In H. Lelieved, J. Holah & D. Napper (Eds.), *Hygiene in food processing*, 2<sup>nd</sup> ed. Woodhead Publishing. pp. 259-304.
55. Hunton, P. 2005. Research on eggshell structure and quality: An historical overview. *Brazilian Journal of Poultry Science*. **5** (2): 67-71
56. Hutchison, M., Gittins, J., Walker, A., Moore, A., Burton, C. (2003). Washing table eggs: A review of the scientific and engineering issues. *World's Poultry Science Journal*, **59**: 233-248.
57. Instituto de Estudios del Huevo. (2009). *El gran libro del huevo*. Madrid: Everest.
58. Issa, A., Kamitani, Y., Tiisekwa, A., Morita, K., Iwasaki, K. (2010). *In vitro* inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. using slightly acidic electrolyzed water. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **110** (3): 308-313.

59. Issa, A., Kamitani, Y., Miwa, N., Muchimbula, H., Iwasaki, K. (2011). Application of slightly acidic electrolyzed water as a potential non-thermal food sanitizer for decontamination of fresh ready-to-eat vegetables and sprouts. *Food Control*, **22** (3): 601-607.
60. Jamali, H., Chai, L., Thong, K. (2013). Detection and isolation of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. *Food Control*, **32** (4): 19-24.
61. Jones, D., Anderson, K., Curtis, P., Jones, F. (2002). Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. *Poultry Science*, **81**: 715-720.
62. Jones, D., Musgrove, M., Caudill, A., Curtis, P. (2006). Frequency of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, and Enterobacteriaceae detection in commercially cool water-washed shell eggs. *Journal of Food Safety*, **26**: 264-274.
63. Jones, D., Musgrove, M. (2007). Pathogen Prevalence and Microbial Levels Associated with Restricted Shell Eggs. *Journal of Food Protection*, **9** (4); 2004-2007.
64. Juárez, A., Gutiérrez, E., Segura, J., Santos, R. (2010). Calidad de huevo de gallinas criollas criadas en traspatio en Michoacán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, **12** (1): 109-115.
65. Kim, C., Hung, Y., Brackett, R. (2000). Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemical modified water on different types of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, **61**: 199-207.
66. Konica Minolta. (2014). Entendiendo el espacio de color CIE Lab.. Disponible en: <http://www.sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab> [Consultado por última vez: 11/04/16]
67. Laird, J., Bartlett, F., McKellar, R. (1991). Survival of *Listeria monocytogenes* in eggwashwater. *International Journal of Food Microbiology*, **12**: 115–122.
68. Leclair, K., Heggart, H., Oggel, M., Bartlett, F., McKellar, R. (1994). Modeling the inactivation on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in simulated egg wash water. *Food Microbiology*, **11** (4): 345-353.



69. Leleu, S., Messens, W., De Reu, K., De Ppreter, S., Herman, L., Heyndrickx, M., De Baerdemaeker, J., Michielis, C., Bain, M. (2011) Effect of Egg Washing on the Cuticle Quality of Brown and White Table Eggs. *Journal of Food Protection*, **10**: 1649-1654.
70. Len, S., Hung, Y., Erickson, M., Kim, C. (2000). Ultraviolet spectrophotometric characterizations and bacterial properties of electrolyzed oxidizing water as influenced by amperage and pH. *Journal of Food Protection*, **63** (11): 1534-1537.
71. Liao, L., Chen, W., Xiao, X. (2007). The generation and inactivation mechanism of oxidation-reduction potential of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering*, **78**: 1326-1332
72. López, E., García, H., López, A. (2012). Organic acids as antimicrobial to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, **45**: 713-721.
73. Luo, K., Oh, D. (2016). Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on fresh-cut bell pepper treated with slightly acidic electrolyzed water combined with ultrasound and mild heat. *Food Microbiology*, **53**: 165-171.
74. Marriott, N., Gravani, R. (2006). Principles of food sanitation. 5<sup>th</sup> ed. New York: Springer International Publishing. pp. 25-30.
75. Mansur, A., Tango, C., Kim, G., Oh, D. (2015). Combined effects of slightly acidic electrolyzed water and fumaric acid on the reduction of foodborne pathogens and shelf life extension of fresh pork. *Food Control*, **47**: 277-284.
76. McEgan, R., Danyluk, M. (2015). Evaluation of aqueous and alcohol-based quaternary ammonium sanitizers for inactivating *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on peanut and pistachio shells. *Food Microbiology*, **47**: 93-98.
77. McPherson, L. (1993). Understanding ORP's role in the disinfection process. *Water Engineering & Management*, **140** (8): 29-31.
78. Meireles, A., Giaouris, E., Simões, M. (2016). Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. A review of *Food Research International*, **82**: 71-85.

79. Menconi, A., Shivaramaiah, S., Huff, G., Prado, O., Morales, J., Pumford, N., Morgan, M., Wolfenden, A., Bielke, L., Hargis, B., Tellez, G. (2013). Effect of different concentrations of acetic, citric and propionic acid dipping solutions on bacterial contamination of raw chicken skin. *Poultry Science*, **92** (8): 2216-2220.
80. Messens, W., Leleu, S., Sparks, N. (2011). Egg decontamination by washing. In Y. Nys, M. Bain and F. Van Immerseel (Eds.) *Improving the safety and egg quality of eggs and egg products. Volume 1: Egg chemistry, production and consumption*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. p. 163-180.
81. Milillo, S., Friedly, E., Saldivar, J., Mythaiyan, A., O'Bryan, C., Crandall, P., Johnson, M., Ricke, S. (2012). A review of the ecology, genomics and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Food Science and Nutrition*, **52** (8): 712-725.
82. Morsy, M., Sharoba, A., Khalaf, H., El-Tanahy, H., Cutter, C. (2015). Efficacy of antimicrobial pullulan-based coating to improve internal quality and shelf-life of chicken eggs during storage. *Journal of Food Science*, **80** (5): 1066-1074.
83. Muñoz, A., Domínguez, N., Jimenez, C., Rodríguez A. (2015). Importance of eggshell cuticle composition and maturity for avoiding trans-shell *Salmonella* contamination in chicken egg. *Food Control*, **55**: 31-38.
84. Ni, L., Cao, W., Zheng, W., Chen, H., Li, B. (2014). Efficacy of Slightly Acidic Electrolyzed Water for Reduction of Foodborne Pathogens and Natural Microflora on Shell Eggs. *Food Science and Technology Research*, **20** (1): 93-100.
85. Nowaczewski, S., Szablewski, T., Cegielska, R., Kontecka, E. (2013). Microbiological Response of Japanese Quail Eggs to Disinfection and Location in the Setter During Incubation. *Folia Biologica*, **61** (2): 119-124.
86. Ölmez, H., Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT – Food Science and Technology*, **42** (3): 686-693.

87. Patterson, P., Koelkebeck, K., Anderson, K., Darre, M., Carey, J., Ahn, D., Ernst, R., Kunej, D., Jones, D. (2008). Temperature sequence of eggs from oviposition through distribution: Production – Part 1. *Poultry Science*, **87**: 1182-1186
88. Posfay, M., Wald, E. (2009). Listeriosis *Semin. Fetal Neonatal Med*, **14**: 228-233.
89. PROFECO. (2012). ¿Qué fue primero, el sabor o la nutrición? *Revista del Consumidor* 44-53
90. Protais, J., Quéguiner, S., Boscher, E., Chidaine, B., Ernel, G., G rault, P., Salvat, G., Federighi, M., Jugiau, F. (2007). *Campylobacter* sp. et *Listeria monocytogenes* dans l'ceuf entier liquide. *7e Journées de la Recherche Avicole*: 532-535.
91. Rahman, S., Park, J., Song, K., Al, N., Oh, D. (2012). Effect of slightly acidic low concentration electrolyzed water on microbiological, physicochemical, and sensory quality of fresh chicken breast meat. *Journal of Food Science*, **71** (1): 35–41.
92. Rivoal, K., Qu guiner, S., Boscher, E., Bougeard, S., Ernel, G., Salvat, G., Federighi, M., Jugiau, F., Protais, J. (2010). Detection of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurized liquid whole eggs and cacracterization by PFGE. *International Journal of Food Microbiology*, **138**: 56-62.
93. Rivoal, K., Fablet, A., Courtillon, C., Bougeard, S., Chemaly, M., Protais, J., (2013). Detection of *Listeria* spp. in liquid egg products and in the egg breaking plants environment and tracking of *Listeria monocytogenes* by PFGE. *International Journal of Food Microbiology*, **166**: 109-116.
94. Rodgers, S., Cash, J., Siddiq, M., Ryser, E. (2004). A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries and cantaloupe. *Journal of Food Protection*, **4** (11): 721-731.
95. Rodríguez, A., Domínguez, N., Muñoz, A., Ortega, M. (2013). Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness. *Poultry Science*, **92**: 3026-3035.
96. Rodríguez, G., Vergara, R., Almonte, L. (2013). Comportamiento del precio del huevo y su incidencia en la inflación de México 2011-2013. *Rev. trimestral de análisis de coyuntura económica*, **6** (2): 29-34.

97. Rodríguez, M., González, V., Fernández, E. (2011). Reduction of *Salmonella entérica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* with Electrolyzed Oxidizing Water on inoculated Hass Avocados (*Persea Americana* var. Hass). *Journal of Food Protection*, **9** (6): 1552-1557.
98. Rossi, M., De Reu, K. (2011). Alternative hen housing systems and egg quality. In Y. Nys, M. Bain and F. Van Immerseel (Eds.) *Improving the safety and egg quality of eggs and egg products. Volume 1: Egg chemistry, production and consumption*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited
99. Ryser, E., Marth, E. (2007). *Listeria, listeriosis and food safety*. 3<sup>rd</sup> ed. USA: CRC Press.
100. Samberg, Y., Meroz, M. (1995). Application of disinfectants in poultry hatcheries. *Revue Scientifique et Technique*, **14** (2): 365-380.
101. Santos, D., Schneider, A., Yuri, M., Machado, B., Gewehr, C. (2016). Egg shell treatment methods effect on comercial eggs quality. *Ciência Rural*, **46** (2): 336-341.
102. Schaafsma, A., Pakan, I., Hofstede, G., Muskiet, F., Van Der Veer E., De Vries, P. 2000. Mineral, aminoacid and hormonal composition of chicken eggshell poder and the evaluation of its use in human nutrition. *Poultry Science* 79 (12): 1833-1838.
103. SENASICA. (2011). *Manual de procedimientos para la prevención, control y erradicación de la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP)*. México: CPA.
104. Sheldon, B., Brake, J. (1991). Hydrogen peroxide as an alternative hatching egg disinfectant. *Poultry Science*, **70**: 1092-1098.
105. Shusterman, D. (2014). Occupational Irritant and Allergic Rhinitis. *Current Allergy Asthma Reports*, **14** (4): 425 (8 p).
106. Silversides, F. (1993). A study relating to the validity of the Haugh unit correction for egg weight in fresh eggs. *Poultry Science*
107. Siulapwa, N., Mwambungu, A., Mubbunu, L. 2014. Comparison of mineral composition of comercial hen egg shells to fresh wáter crocodile egg shells. *International Journal of Research in Agriculture and Food Sciences*. 2 (7): 16-18.

108. Sistema Nacional de Integración de Mercados. (2015). Mercados Nacionales Pecuarios: Huevo. Disponible en: <http://www.economia-sniim.gob.mx/nuevo/>
109. Starr, T., Swenberg, J. (2013). A novel bottom-up approach to bounding low-dose human cancer risks from chemical exposures. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65: 311-315.
110. Taormina, P., Dorsa, W. (2009). Inactivation of *Listeria monocytogenes* on hams shortly after vacuum packaging by spray application of lauric arginate. *Journal of Food Protection*, **72** (12): 2517-2523.
111. Terčič, D., Žlender, B., Holcman, A. (2012). External, internal and sensory qualities of table eggs as influenced by two different production systems. *Agroznanje*, **13** (4): 555-562.
112. Travel, A., Nys, Y., Bain, M. (2011). Effect of hen age, moult, laying environment and egg storage on egg quality. In Y. Nys, M. Bain and F. Van Immerseel (Eds.) *Improving the safety and egg quality of eggs and egg products. Volume 1: Egg chemistry, production and consumption*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited
113. Turtoi, M., Borda, D. (2014). Decontamination of egg shells using ultraviolet light treatment. *World's Poultry Science Journal*, **70**: 265-277.
114. Unión Nacional de Avicultores. (2014). Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola. Disponible en: <http://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos> [Consultado por última vez: 30/04/16]
115. Vadehra, D., Baker, R., Naylor, H. (1970). Role of cuticle in spoilage of chicken eggs. *Journal of Food Science*, **35**: 5-6.
116. Venkitanarayann, K., Lin, C., Bailey, H., Doyle, M. (2002). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on apples, oranges and tomatoes by lactic acid and hydrogen peroxide. *Journal of Food Protection*, **65** (1): 100-105.

117. Wales, A., Breslin, M., Carter, B., Sayers, R., Davies, R. (2007). A longitudinal study of environmental *Salmonella* contamination in caged and free-range layers flocks. *Avian Pathology*, **36** (3): 187-197.
118. Walter, E., Nascimento, M., Kuaye, A. (2009). Efficacy of sodium hypochlorite and peracetic acid in sanitizing green coconuts. *Letters in Applied Microbiology*, **49**: 366-371.
119. Wellman, O., Picman, J., Hincke, M. (2008). Antimicrobial activity of cuticle and outer eggshell protein extracts from three species of domestic birds. *British Poultry Science*, **49** (2): 133-143.
120. Wineland, M., Christopher, C. (2007). Contamination of Hatching Eggs. *College of Agriculture & Life Sciences*. Disponible en: [https://www.ces.ncsu.edu/depts/poulsci/tech\\_manuals/contamination\\_hatching\\_eggs.html](https://www.ces.ncsu.edu/depts/poulsci/tech_manuals/contamination_hatching_eggs.html)
121. Xin, C., Zhao, Y., Yao, L., Wang, W., Wang, W. (2015). Stability and oxidizing effect of membraneless electrolyzed water. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **92**: 371-381.
122. Zhao, Y., Xin, H., Zhao, D., Zheng, W., Tian, W., Ma, H., Liu, K., Hu, H., Wang, T., Soupir, M. (2014). Free chlorine loss during spraying of membraneless acidic electrolyzed water and its antimicrobial effect on airborne bacteria from poultry house. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **21** (2): 249-255.
123. Zunabovic, M., Doming, K., Kneifel, W. (2011). Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments. A review of *LWT Food Science Technology*, **44**: 351-362.

## APÉNDICES

### Preparación de soluciones de trabajo y medios de cultivo.

a) Caldo Trypticasa Soya (CTS)

Se pesaron 3 g del medio en polvo que contienen 56.7 % de digerido pancreático de caseína, 10 % de digerido enzimático de soya, 16.7 % de cloruro de sodio, 8.3 % de fosfato ácido dipotásico y 8.3 % de glucosa. Se homogenizó con 100 mL de agua destilada.

b) Agar Trypticasa Soya (TSA)

Se pesaron 30 g del medio en polvo que contienen 56.7 % de digerido pancreático de caseína, 10 % de digerido enzimático de soya, 16.7 % de cloruro de sodio, 8.3 % de fosfato ácido dipotásico y 8.3 % de glucosa. Se adicionaron 1000 mL de agua destilada y, después de homogeneizó este volumen con 15 g de agar bacteriológico.

c) Agua Peptonada (AP) al 0.1 %

Se pesó 1 g peptona de carne y 8.5 g de cloruro de sodio. Se homogeneizaron con 1000 mL de agua destilada.

d) Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE)

Se pesaron 8.5 g de cloruro de sodio y se homogeneizaron con 1000 mL de agua destilada.

e) Ácido Cítrico (AC) al 2 %

Se pesaron 20 g de ácido cítrico y se homogeneizaron con 1000 mL de agua destilada.

f) Azul de Tripán al 0.1 %

Se pesó 1 g de azul de tripán en polvo y se homogeneizó con 1000 mL de agua destilada.

## APÉNDICE A: Certificados de análisis de identificación de la bacteria.



### CERTIFICATE OF ANALYSIS

**ATCC® Number:** 19115™  
**Lot Number:** 62451280  
**Organism:** *Listeria monocytogenes* serotype 4b  
**Product Format:** Bacterial cells suspended in an appropriate cryoprotectant  
**Expiration Date:** Not applicable  
**Storage Conditions:** 2°C to 8°C for freeze-dried cultures; -80°C or colder for frozen cultures

**Note:** Do not store frozen vials in freezers with a defrost cycle, as this will expose the vials to increased temperatures.

Test / Method	Specification	Result
<b>Gram stain and cell morphology</b> (Visual observation method)	Gram stain and cell morphology are consistent with the organism being tested.	Gram-positive, motile rods arranged singly, in pairs and in short chains.
<b>Colony description</b> (Visual observation method)	Colony description is consistent with the organism being tested.	Small, entire, smooth, convex, glistening and translucent
<b>Purity</b> (Visual observation method)	Sample material is inoculated onto non-selective media. Cultures are examined macroscopically and microscopically after incubation. Cultures show no evidence of aberrant growth.	No evidence of aberrant growth
<b>Viability</b> (Titer or visual observation method)	Sample material is viable.	Confluent growth on dilution plate, >10 <sup>4</sup> cfu/vial
<b>Phenotypic testing</b>	Sample material is evaluated with a defined battery of phenotypic tests including evaluation by bioMérieux API®. Results are consistent with the organism being tested.	Catalase: positive Oxidase: negative B hemolysis on #260: positive  98.6% identification to <i>Listeria monocytogenes</i> using bioMérieux API®.
<b>Genotypic testing</b>	Sample material is evaluated by 16S ribosomal gene sequencing. Results are consistent with the organism being tested.	Identification is consistent with the organism being tested



LABORATORIO BIOTEST

Nº de cliente: 7277  
Equipo Nº:

Informe de examen

Editado 11-sep-2015 08:25 CST  
Editado por: AREYES

Nombre del paciente: CEPARIO GENERAL  
Examen: CEPARIO-3-1

Nº paciente: C-15

Bionúmero: 340200220733621  
Organismo seleccionado: *Listeria monocytogenes*

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GP	Nº de lote: 242351310	Fecha caduc.: 27-jul-2016 12:00 CST
	Finalizado: 18-jun-2015 16:13 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 6,00 horas
Organismo seleccionado	98% Probabilidad <i>Listeria monocytogenes</i>		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 340200220733621		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Patógeno grave, comprobar el test Camp y beta hemólisis.			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) <i>Listeria monocytogenes</i> CDEX(98).			

Detalles bioquímicos																	
2	AMY	+	4	PIPLC	+	5	dXYL	-	8	ADH1	-	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	+	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	-
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	-	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Acción	Nombre (ID de usuario)	Fecha/Hora	Comentario
Revisado por:	(Lmendoza)	30-jun-2015 08:22 CST	

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 04.02  
Guía de interpretación de CMI:  
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:  
Última modificación de parámetros de AES:

## APÉNDICE B: Resultados de Control de calidad de los huevos embrionados.

OFICINA  
7 NORTE 416  
TEHUACAN, PUE.  
MEXICO  
TEL: (238) 3803840  
FAX: (238) 3803842



HUEVOS ALPES II

LABORATORIO  
INVESTIGACION APLICADA  
S.A. DE C.V.  
7 NORTE 602  
TEHUACAN, PUE.  
MEXICO  
TEL: (238) 383-52-04

### RESULTADOS DE CONTROL DE CALIDAD

PARVADA ALBOCH-I-26 MUESTREO MAS RECIENTE 26-jun-15 FECHA DE NACIMIENTO 04-jul-14

AGENTE	CEPA	ENSAYO
SINDROME DE BAJA POSTURA	McFerran	HI
LEUCOSIS LINFOIDE	A,B,C,D,E <sub>r</sub>	ELISA
MYCOPLASMA SINOVIAE	Comercial	PCR
MYCOPLASMA GALLISEPTICUM	Comercial	ARP
SALMONELLA PUL-GALL	Comercial	ARP
BRONQUITIS INFECCIOSA	MASS	ELISA (MG)
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE	SOTA	HI (MG)
INFLUENZA AVIAR		AISLAMIENTO VIRAL

TITULO / RESULTADO	MUESTREO
(-)	26-jun-15
(-)	18-jun-15
(-)	18-jun-15
(-)	22-jun-15
(-)	22-jun-15
MG. 7443	11-jun-15
MG. 160	25-jun-15
(-)	09-jun-15

ARP = Aglutinación Rápida en Placa  
ELISA = Inmuno Ensayo Enzimático  
HI = Inhibición de la Hemoaglutinación  
PCR = Reacción de Polimerasa en Cadena

\* Investigación Aplicada, S.A. de C.V.  
Laboratorio Auxiliar de Constatación, Licencia Zoonosanitaria 02659  
ante la Secretaría de Agricultura y Recursos Hídricos  
(exp.6410)

  
MVZ MÓNICA VERGARA LLERENA  
GERENTE DE VENTAS Y SERVICIO TÉCNICO

10-jul-15  
FECHA

**Ciente:** UNAM, DEPTO. MICROBIOLOGÍA, DR. JOSÉ A. CANO  
**Cantidad entregada:** 200  
**Producto:** Embrión ALPES II, 4 días  
**Fecha de Entrega:** 27 de julio de 2015

## Resultados completos para determinar actividad antimicrobiana *in vitro*.

Tabla 1. Conteo bacteriano del Grupo Control

Réplica	D1	D3	D5	D7	Cuenta (UFC/mL)	log(UFC/huevo)
A	Incontables	Incontables	11	0	1.10x10 <sup>9</sup>	9.04
B	Incontables	Incontables	12	0	1.20x10 <sup>9</sup>	9.08
C	Incontables	Incontables	15	0	1.50x10 <sup>9</sup>	9.18
					<b>Promedio</b>	9.10
					<b>DE</b>	0.07

Tabla 2. Conteo bacteriano del Grupo AC

Réplica	D0	D1	D3	D5	Cuenta (UFC/mL)	log(UFC/huevo)
A	Incontables	Incontables	70	0	7.00x10 <sup>7</sup>	7.85
B	Incontables	Incontables	148	0	1.48x10 <sup>8</sup>	8.17
C	Incontables	Incontables	123	0	1.23x10 <sup>8</sup>	8.09
					<b>Promedio</b>	8.04
					<b>DE</b>	0.17

Tabla 3. Conteo bacteriano del Grupo SES

Réplica	D0	D1	D3	D5	Cuenta (UFC/mL)	log(UFC/huevo)
A	0	0	0	0	< 1000	< 3.00
B	0	0	0	0	< 1000	< 3.00
C	0	0	0	0	< 1000	< 3.00
					<b>Promedio</b>	3.00
					<b>DE</b>	0.00

Tabla 4. ANOVA de un factor entre tratamientos

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Probabilidad (p)
Tratamiento	63.680	2	31.840	2850.18	1.16E-09
Error	0.067	6	0.011		
Total	63.747	8			

Tabla 5. Prueba *a posteriori* de DMS (comparaciones múltiples)

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Probabilidad (p)	95% de intervalo de confianza (IC)	
					Límite inferior	Límite superior
Control	AC	1.0638	0.0863	1.70E-05	0.8526	1.2750
	SES	6.0989	0.0863	5.40E-10	5.8877	6.3101
AC	SES	5.0351	0.0863	1.70E-09	4.8239	5.2463

**Resultados completos para determinar actividad antimicrobiana *in vivo*.**

Tabla 6. Conteo bacteriano del Grupo Control

Réplica	Huevo	D1	D3	D5	UFC/huevo	Log(UFC/huevo)
A	1	155	1	0	1.00E+05	5.00
	2	158	1	0	1.00E+05	5.00
	3	176	1	0	1.00E+05	5.00
	4	102	0	0	1.02E+05	5.01
	5	199	3	0	3.00E+05	5.48
	6	167	2	0	2.00E+05	5.30
	7	231	2	0	2.00E+05	5.30
	8	126	3	0	3.00E+05	5.48
	9	100	1	0	1.00E+05	5.00
	10	324	3	0	3.00E+05	5.48
	11	42	1	0	1.00E+05	5.00
	<b>Promedio</b>					
<b>DE</b>						<b>0.22</b>
B	1	87	0	0	8.70E+04	4.94
	2	124	1	0	1.00E+05	5.00
	3	175	2	0	2.00E+05	5.30
	4	156	2	0	2.00E+05	5.30
	5	180	3	0	3.00E+05	5.48
	6	233	8	0	8.00E+05	5.90
	7	229	2	0	2.00E+05	5.30
	8	93	1	0	1.00E+05	5.00
	9	110	0	0	1.10E+05	5.04
	10	166	2	0	2.00E+05	5.30
	11	245	3	0	3.00E+05	5.48
	<b>Promedio</b>					
<b>DE</b>						<b>0.28</b>
C	1	132	0	0	1.32E+05	5.12
	2	228	4	0	4.00E+05	5.60
	3	177	3	0	3.00E+05	5.48
	4	203	3	0	3.00E+05	5.48
	5	94	1	0	1.00E+05	5.00
	6	169	2	0	2.00E+05	5.30
	7	243	4	0	4.00E+05	5.60
	8	108	1	0	1.00E+05	5.00
	9	152	2	0	2.00E+05	5.30
	10	188	1	0	1.00E+05	5.00
	11	75	1	0	1.00E+05	5.00
	<b>Promedio</b>					
<b>DE</b>						<b>0.25</b>

Tabla 7. Conteo bacteriano del Grupo AC

Réplica	Huevo	D1	D3	D5	UFC/huevo	Log(UFC/huevo)	
A	1	3	0	0	3.00E+03	3.48	
	2	1	0	0	1.00E+03	3.00	
	3	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	4	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	5	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	6	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	7	2	0	0	2.00E+03	3.30	
	8	2	0	0	2.00E+03	3.30	
	9	3	0	0	3.00E+03	3.48	
	10	5	0	0	5.00E+03	3.70	
	11	5	0	0	5.00E+03	3.70	
	<b>Promedio</b>						<b>2.18</b>
	<b>DE</b>						<b>1.74</b>
B	1	4	0	0	4.00E+03	3.60	
	2	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	3	1	0	0	1.00E+03	3.00	
	4	6	0	0	6.00E+03	3.78	
	5	1	0	0	1.00E+03	3.00	
	6	8	0	0	8.00E+03	3.90	
	7	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	8	3	0	0	3.00E+03	3.48	
	9	2	0	0	2.00E+03	3.30	
	10	10	0	0	1.00E+04	4.00	
	11	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	<b>Promedio</b>						<b>2.55</b>
	<b>DE</b>						<b>1.67</b>
C	1	1	0	0	1.00E+03	3.00	
	2	7	0	0	7.00E+03	3.85	
	3	31	0	0	3.10E+04	4.49	
	4	12	0	0	1.20E+04	4.08	
	5	10	0	0	1.00E+04	4.00	
	6	1	0	0	1.00E+03	3.00	
	7	13	0	0	1.30E+04	4.11	
	8	10	0	0	1.00E+04	4.00	
	9	38	0	0	3.80E+04	4.58	
	10	25	0	0	2.50E+04	4.40	
	11	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	<b>Promedio</b>						<b>3.59</b>
	<b>DE</b>						<b>1.30</b>

Tabla 8. Conteo bacteriano del Grupo SES

Réplica	Huevo	D1	D3	D5	UFC/huevo	Log(UFC/huevo)	
A	1	1	0	0	1.00E+03	3.00	
	2	1	0	0	1.00E+03	3.00	
	3	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	4	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	5	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	6	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	7	3	0	0	3.00E+03	3.48	
	8	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	9	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	10	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	11	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	<b>Promedio</b>						<b>0.86</b>
	<b>DE</b>						<b>1.48</b>
B	1	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	2	1	0	0	1.00E+03	3.00	
	3	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	4	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	5	1	0	0	1.00E+03	3.00	
	6	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	7	7	0	0	7.00E+03	3.85	
	8	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	9	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	10	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	11	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	<b>Promedio</b>						<b>0.90</b>
	<b>DE</b>						<b>1.55</b>
C	1	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	2	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	3	3	0	0	3.00E+03	3.48	
	4	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	5	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	6	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	7	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	8	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	9	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	10	0	0	0	0.00E+00	0.00	
	11	3	0	0	3.00E+03	3.48	
	<b>Promedio</b>						<b>0.63</b>
	<b>DE</b>						<b>1.41</b>

Tabla 9. ANOVA de un factor entre tratamientos

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Probabilidad (p)
Tratamiento	327.350	2	163.675	101.43	2.12E-24
Error	154.905	96	1.614		
Total	482.254	98			

Tabla 10. Prueba *a posteriori* de DMS (comparaciones múltiples)

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Probabilidad (p)	95% de intervalo de confianza (IC)	
					Límite inferior	Límite superior
Control	AC	2.4680	0.3127	4.81E-12	1.8472	3.0887
	SES	4.4451	0.3127	2.37E-25	3.8244	5.0659
AC	SES	1.9772	0.3127	8.10E-09	1.3564	2.5979



## Resultados para determinar el efecto sobre supervivencia embrionaria.

Tabla 11. Monitoreo de la supervivencia de embriones hasta los 21 días de vida

Edad (d)	Réplica A			Réplica B			Réplica C			Total		
	Control	AC	SES	Control	AC	SES	Control	AC	SES	Control	AC	SES
4	22	22	22	22	22	22	22	22	22	<b>66</b>	<b>66</b>	<b>66</b>
8	20	22	17	22	22	22	18	20	19	<b>60</b>	<b>64</b>	<b>58</b>
11	20	22	17	22	22	22	18	19	19	<b>60</b>	<b>63</b>	<b>58</b>
15	13	14	3	14	15	15	13	19	19	<b>40</b>	<b>48</b>	<b>37</b>
18	12	14	3	14	13	11	13	19	19	<b>39</b>	<b>46</b>	<b>33</b>
21	1	1	0	2	3	5	3	4	9	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>14</b>

Tabla 12. Prueba logrank comparando curvas de supervivencia

Edad (d)	Riesgo				Pérdidas observadas				Pérdidas esperadas			
	Control	AC	SES	Total	Control	AC	SES	Total	Control	AC	SES	Total
4	66	66	66	198	0	0	0	0	0	0	0	0
8	60	64	58	182	6	2	8	16	5.27	5.63	5.10	16
11	60	63	58	181	0	1	0	1	0.33	0.35	0.32	1
15	40	48	37	125	20	15	21	56	17.92	21.50	16.58	56
18	39	46	33	118	1	2	4	7	2.31	2.73	1.96	7
21	6	8	14	28	33	38	19	90	19.29	25.71	45.00	90
Total					60	58	52	170	45.13	55.92	68.95	170

Tabla 13. Análisis de riesgo de muerte entre tratamientos

Comparación	X <sup>2</sup>	Conclusión	Riesgo de muerte	Probabilidad
Control-AC	4.9803	Rechazar H0	1.3:1	0.0256
Control-SES	9.0711	Rechazar H0	1.8:1	0.0026
AC-SES	4.2454	Rechazar H0	1.4:1	0.0394
X <sup>2</sup> tablas	3.8415			

## Resultados completos para determinar los efectos en cutícula.

Tabla 14. Color de cutícula antes y después de la tinción (Grupo Control)

Huevo	RÉPLICA A						RÉPLICA B					
	Inicial			Final			Inicial			Final		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
1	93.75	-1.03	4.63	50.78	-3.23	-31.93	93.50	-0.71	3.29	55.65	-3.57	-30.05
	93.64	-0.71	2.82	52.60	-2.94	-32.20	92.50	-0.69	3.93	52.22	-2.94	-32.27
	94.13	-1.09	4.18	52.13	-3.22	-31.93	91.67	-0.62	3.31	54.76	-3.44	-31.00
	93.94	-0.91	3.73	53.17	-3.36	-32.26	92.96	-0.65	3.28	53.55	-2.93	-31.50
	93.50	-1.02	3.88	52.59	-3.19	-31.78	92.41	-0.71	4.11	55.61	-3.54	-30.34
2	93.99	-0.72	3.67	49.43	-2.64	-33.29	92.97	-0.59	1.74	57.22	-1.79	-29.99
	93.82	-0.67	3.54	49.22	-1.43	-32.35	91.53	-0.70	2.09	56.07	-1.84	-30.94
	93.55	-0.70	3.52	50.40	-2.05	-32.41	91.95	-0.65	1.51	53.52	-1.44	-31.84
	94.27	-0.63	3.18	50.38	-1.48	-32.56	91.69	-0.66	2.12	55.42	-2.22	-29.71
	93.82	-0.61	3.57	48.58	-1.52	-33.32	90.46	-0.59	1.62	52.92	-1.62	-32.23
3	95.31	-0.55	2.59	48.53	-1.70	-35.04	94.47	-0.76	2.09	54.69	-3.15	-31.79
	94.64	-0.76	2.36	38.55	2.95	-34.37	94.36	-0.63	2.28	54.71	-3.13	-31.59
	94.67	-0.75	2.88	51.12	-1.48	-34.02	93.92	-0.79	3.06	51.88	-2.38	-32.85
	95.13	-0.58	1.92	50.93	-1.48	-33.48	93.92	-0.71	2.01	50.56	-1.56	-32.67
	95.13	-0.56	2.07	52.50	-1.67	-33.83	94.18	-0.61	2.24	53.04	-2.62	-32.03
4	92.33	-0.65	3.54	53.73	-3.49	-31.97	92.94	-0.62	3.23	57.47	-2.93	-28.75
	92.86	-0.59	2.98	48.92	-1.53	-34.65	90.77	-0.58	3.35	58.87	-2.28	-27.51
	94.68	-0.64	3.14	51.25	-2.72	-33.71	92.44	-0.56	3.64	55.72	-2.19	-29.73
	94.24	-0.56	3.09	54.39	-3.12	-33.31	92.75	-0.64	2.77	55.36	-2.12	-29.94
	93.93	-0.59	2.99	53.80	-2.92	-32.47	92.35	-0.65	2.97	56.38	-2.88	-29.31
5	92.57	-0.78	2.86	49.96	-3.25	-33.65	93.74	-0.57	3.47	58.56	-2.79	-28.47
	92.53	-0.71	2.36	45.20	-2.98	-34.72	92.66	-0.67	3.88	58.31	-2.38	-28.56
	92.70	-0.76	2.58	50.75	-3.23	-33.27	93.91	-0.48	3.31	56.90	-2.10	-29.82
	92.59	-0.77	2.55	51.91	-3.04	-32.73	93.92	-0.57	3.70	56.71	-2.06	-28.61
	92.39	-0.79	2.59	49.63	-2.77	-33.79	93.39	-0.63	3.04	56.15	-1.09	-30.22
6	92.49	-0.69	2.36	52.38	-3.11	-32.07	94.55	-0.41	3.89	60.61	-3.19	-27.99
	90.55	-0.66	3.45	50.53	-1.29	-33.61	93.33	-0.62	3.80	57.42	-2.17	-29.04
	92.68	-0.68	2.23	51.98	-1.97	-32.82	94.89	-0.53	3.06	55.78	-2.05	-30.80
	92.82	-0.70	2.04	50.80	-1.99	-33.45	94.96	-0.51	3.05	53.44	-1.44	-31.96
	93.12	-0.54	2.34	54.19	-2.98	-31.95	94.52	-0.40	3.03	55.48	-1.71	-31.06
7	92.97	-0.58	1.70	50.64	-2.84	-33.82	94.03	-0.96	3.80	52.97	-1.94	-32.40
	93.53	-0.56	1.05	49.10	-1.24	-34.83	90.40	-0.81	3.52	52.19	-2.73	-32.56
	94.08	-0.64	1.92	49.49	-1.91	-35.04	94.00	-0.82	3.68	52.35	-1.50	-33.41
	93.64	-0.57	1.91	52.30	-2.92	-34.09	93.70	-0.63	2.51	50.08	-1.54	-33.57
	93.67	-0.56	1.89	54.59	-2.96	-32.55	93.62	-0.85	3.37	50.41	-1.59	-33.57
<b>Promedio</b>	<b>93.53</b>	<b>-0.69</b>	<b>2.80</b>	<b>50.76</b>	<b>-2.31</b>	<b>-33.23</b>	<b>93.12</b>	<b>-0.65</b>	<b>3.02</b>	<b>54.94</b>	<b>-2.31</b>	<b>-30.80</b>
<b>DE</b>	<b>0.88</b>	<b>0.13</b>	<b>0.74</b>	<b>1.61</b>	<b>0.86</b>	<b>0.77</b>	<b>1.00</b>	<b>0.10</b>	<b>0.67</b>	<b>2.12</b>	<b>0.52</b>	<b>1.50</b>

Tabla 15. Color de cutícula antes y después de la tinción (Grupo AC)

Huevo	RÉPLICA A						RÉPLICA B					
	Inicial			Final			Inicial			Final		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
1	92.64	-0.59	4.58	44.62	-1.34	-36.27	93.32	-0.90	4.97	45.59	-2.87	-35.28
	90.86	-0.90	4.70	45.99	-2.54	-34.06	93.25	-0.98	3.54	45.36	-2.64	-35.43
	92.37	-0.80	5.09	45.31	-1.99	-35.16	92.79	-1.21	4.43	48.28	-2.21	-34.58
	92.68	-0.64	4.41	46.24	-0.56	-35.13	93.90	-0.78	3.67	47.47	-1.94	-34.49
	92.31	-0.75	5.07	44.87	-1.36	-34.93	93.71	-0.62	4.40	46.83	-1.14	-34.25
2	93.33	-1.17	4.09	43.56	-2.02	-35.29	93.60	-0.60	3.82	44.77	-2.21	-35.56
	92.84	-1.20	3.28	44.41	-1.41	-35.55	91.92	-0.69	2.81	44.98	-2.27	-35.65
	93.63	-1.32	4.39	45.89	-2.81	-35.16	92.71	-0.80	4.26	45.75	-1.84	-36.30
	93.54	-1.06	4.07	44.73	-2.27	-35.33	93.45	-0.49	3.03	45.56	-0.06	-34.76
	93.51	-1.23	4.02	44.03	-1.89	-35.59	93.33	-0.57	3.19	46.42	-0.74	-35.18
3	93.24	-0.40	4.07	46.58	-1.82	-35.42	92.80	-0.54	2.84	42.23	-1.21	-36.12
	92.30	-0.46	4.56	49.39	-1.48	-34.36	89.77	-1.11	1.78	43.59	-0.73	-35.10
	92.99	-0.38	4.23	49.61	-0.19	-33.17	92.40	-0.55	2.62	42.23	-0.33	-36.20
	92.95	-0.36	4.19	50.90	-1.07	-32.21	91.96	-0.62	2.36	47.69	-1.49	-34.57
	92.91	-0.40	4.37	48.62	-1.61	-34.87	92.50	-0.57	2.51	43.60	-1.06	-34.99
4	92.93	-0.65	3.49	45.64	-0.43	-35.35	91.72	-0.52	1.42	43.16	-0.87	-35.54
	91.92	-0.80	3.58	39.76	0.47	-39.13	87.07	-1.24	1.19	41.56	1.00	-35.48
	93.26	-0.61	3.86	46.79	0.44	-33.92	87.00	-0.93	0.73	44.38	0.35	-34.95
	93.08	-0.65	3.74	44.16	-0.33	-36.57	90.56	-0.57	1.58	43.12	0.11	-35.40
	93.42	-0.70	3.97	43.80	-0.23	-36.38	90.40	-0.73	1.20	44.29	1.66	-37.82
5	94.50	-0.38	3.16	44.46	-1.31	-36.66	94.03	-0.63	2.14	49.20	-1.71	-36.36
	93.60	-0.84	2.40	44.65	-0.66	-36.79	93.53	-0.69	1.63	49.82	-1.23	-35.65
	94.54	-0.54	2.98	46.09	-1.53	-34.67	92.86	-0.64	1.69	46.96	-0.98	-35.60
	94.02	-0.60	2.94	45.19	-1.29	-35.83	93.47	-0.62	1.56	48.26	-1.27	-35.00
	93.82	-0.52	2.85	45.63	-0.79	-35.59	93.42	-0.69	2.07	49.75	-1.28	-34.60
6	93.81	-0.68	4.46	44.23	-1.34	-34.91	93.80	-0.95	4.20	45.52	-2.66	-34.87
	94.04	-0.63	4.42	45.25	0.24	-35.00	91.43	-1.48	3.92	43.65	-1.90	-35.66
	94.40	-0.70	4.62	45.07	-0.81	-34.77	93.79	-0.79	3.95	43.98	-2.39	-35.08
	93.77	-0.62	4.69	44.49	-0.86	-35.96	93.14	-1.50	4.22	43.93	-1.68	-35.58
	93.66	-0.75	4.28	44.78	-1.02	-35.92	93.23	-1.07	4.27	43.11	-1.81	-35.59
7	92.86	-0.49	1.99	43.64	-0.61	-36.01	93.54	-0.77	3.13	44.38	-1.21	-35.89
	92.31	-0.68	1.34	44.97	3.03	-38.73	89.59	-1.11	2.59	43.55	-0.47	-35.75
	93.14	-0.52	1.36	45.32	0.05	-36.24	93.21	-0.89	3.37	43.83	-0.44	-36.04
	92.63	-0.51	1.70	44.76	1.07	-36.94	93.40	-0.81	2.74	42.90	0.36	-36.01
	93.05	-0.61	1.60	45.08	0.09	-36.93	93.52	-0.85	3.02	43.70	0.46	-35.92
<b>Promedio</b>	<b>93.17</b>	<b>-0.69</b>	<b>3.67</b>	<b>45.39</b>	<b>-0.86</b>	<b>-35.56</b>	<b>92.40</b>	<b>-0.81</b>	<b>2.88</b>	<b>45.13</b>	<b>-1.11</b>	<b>-35.46</b>
<b>DE</b>	<b>0.68</b>	<b>0.25</b>	<b>1.10</b>	<b>1.66</b>	<b>0.95</b>	<b>0.94</b>	<b>1.45</b>	<b>0.19</b>	<b>1.13</b>	<b>2.01</b>	<b>0.95</b>	<b>0.37</b>

Tabla 16. Color de cutícula antes y después de la tinción (Grupo SES)

Huevo	RÉPLICA A						RÉPLICA B					
	Inicial			Final			Inicial			Final		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
1	93.93	-0.84	3.06	54.50	-4.26	-31.59	95.02	-0.70	2.41	62.80	-2.07	-26.08
	92.32	-0.80	4.02	45.01	-4.26	-37.65	92.99	-0.77	3.02	64.11	-2.59	-26.46
	94.55	-0.87	3.62	50.02	-3.63	-34.79	95.10	-0.65	2.20	59.87	-2.85	-28.90
	94.55	-0.84	3.45	52.73	-4.15	-33.07	93.95	-0.75	2.41	60.78	-2.33	-27.75
	94.63	-0.88	3.51	56.92	-3.64	-30.18	94.31	-0.73	2.09	57.95	-2.24	-31.06
2	92.54	-0.82	4.02	56.40	-3.43	-28.51	93.58	-0.64	3.82	64.64	-2.45	-23.66
	91.06	-0.89	3.88	48.53	-1.55	-32.96	93.65	-0.58	3.14	63.17	-2.94	-25.60
	93.85	-0.71	3.99	50.50	-3.03	-32.75	94.25	-0.67	3.20	56.69	-2.99	-29.98
	93.77	-0.89	4.37	51.78	-2.95	-32.03	94.64	-0.74	3.26	53.82	-3.87	-30.93
	93.76	-0.84	4.36	54.33	-3.24	-30.71	94.50	-0.71	3.05	60.11	-3.88	-26.49
3	94.11	-0.87	4.40	60.80	-3.82	-26.17	95.14	-1.01	3.44	61.00	-3.24	-27.95
	92.87	-0.73	5.01	47.76	-3.30	-32.69	94.17	-0.75	3.59	61.80	-3.28	-27.94
	94.13	-0.75	4.72	53.23	-3.73	-31.61	94.54	-0.75	2.33	61.88	-3.49	-27.83
	93.84	-0.79	4.50	53.12	-3.88	-31.14	94.96	-0.78	2.36	56.05	-3.52	-31.37
	93.96	-0.75	4.32	54.43	-4.52	-29.91	95.07	-0.66	2.38	56.95	-3.77	-30.59
4	93.72	-0.60	4.00	57.13	-4.18	-28.71	94.36	-1.11	4.05	71.26	-2.79	-18.89
	93.28	-0.45	4.53	52.72	-1.49	-32.73	94.70	-0.91	4.86	72.38	-2.72	-18.38
	93.45	-0.45	3.26	57.85	-3.56	-29.51	94.64	-1.14	4.42	71.97	-1.18	-19.04
	94.07	-0.66	4.04	53.72	-2.41	-31.66	94.68	-1.00	4.32	62.30	-2.32	-26.43
	93.22	-0.55	3.81	52.20	-2.60	-32.39	94.68	-1.15	4.14	61.69	-2.41	-27.08
5	90.93	-0.90	5.01	55.63	-4.33	-27.57	93.69	-0.70	2.61	69.12	-1.42	-20.66
	92.50	-0.48	6.34	48.13	-3.37	-32.84	92.50	-0.66	2.65	67.31	-1.37	-21.88
	91.71	-0.95	6.67	56.29	-4.84	-28.96	94.14	-0.68	2.74	68.39	-1.60	-22.04
	92.42	-0.94	6.07	53.05	-5.00	-30.16	94.66	-0.69	2.83	61.77	-1.85	-27.40
	92.77	-0.99	6.47	58.72	-4.45	-26.02	94.40	-0.60	2.98	59.62	-2.31	-28.72
6	93.33	-0.99	3.91	57.51	-3.90	-28.80	93.65	-0.60	3.46	55.84	-3.47	-30.79
	91.48	-0.83	3.74	55.85	-2.47	-29.47	91.47	-0.81	4.01	63.81	-2.46	-26.34
	93.85	-0.79	3.57	57.61	-3.58	-29.88	94.55	-0.48	3.02	51.12	-3.13	-34.07
	93.38	-0.77	4.87	56.93	-3.20	-29.33	94.49	-0.48	2.82	66.14	-1.74	-24.79
	93.89	-0.84	3.72	53.98	-3.36	-31.56	94.02	-0.50	2.83	64.81	-2.43	-25.48
7	94.19	-1.06	4.07	55.83	-3.48	-30.71	94.88	-0.65	1.99	63.91	-2.06	-26.40
	94.63	-0.77	4.14	47.57	-2.94	-35.17	93.02	-0.85	3.03	59.42	-2.29	-29.23
	94.58	-0.77	3.71	55.04	-3.87	-31.96	94.03	-0.69	1.67	54.99	-2.65	-32.40
	94.07	-0.71	4.26	55.15	-3.97	-31.48	93.95	-0.60	1.49	57.10	-2.63	-30.93
	94.16	-0.67	4.02	55.40	-3.59	-31.60	94.68	-0.55	1.50	63.2	-2.24	-26.89
<b>Promedio</b>	<b>93.41</b>	<b>-0.78</b>	<b>4.32</b>	<b>53.90</b>	<b>-3.54</b>	<b>-31.03</b>	<b>94.20</b>	<b>-0.74</b>	<b>2.97</b>	<b>61.94</b>	<b>-2.59</b>	<b>-26.86</b>
<b>DE</b>	<b>0.75</b>	<b>0.11</b>	<b>0.85</b>	<b>1.52</b>	<b>0.59</b>	<b>1.48</b>	<b>0.40</b>	<b>0.16</b>	<b>0.77</b>	<b>3.31</b>	<b>0.59</b>	<b>2.76</b>

Tabla 17. Diferencia de color ( $\Delta E$ ) entre tratamientos

Huevo	Tratamientos		
	Control	AC	SES
A1	54.92	61.46	56.17
A2	57.26	62.73	54.04
A3	59.23	58.22	53.10
A4	54.98	63.17	52.27
A5	56.31	62.40	51.71
A6	53.61	63.26	50.01
A7	55.45	61.62	50.01
B1	51.65	60.85	45.07
B2	49.19	61.41	46.15
B3	53.77	61.12	47.64
B4	47.98	59.12	37.50
B5	48.74	58.16	39.30
B6	50.63	62.95	45.89
B7	55.29	62.54	46.39
<b>Promedio</b>	<b>53.50</b>	<b>61.36</b>	<b>48.23</b>
<b>DE</b>	<b>3.39</b>	<b>1.74</b>	<b>5.36</b>

Tabla 18. ANOVA de un factor entre tratamientos

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Probabilidad (p)
Tratamiento	1221.626	2	610.813	42.35	1.68E-10
Error	562.493	39	14.423		
Total	1784.119	41			

Tabla 19. Prueba *a posteriori* de DMS (comparaciones múltiples)

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Probabilidad (p)	95% de intervalo de confianza (IC)	
					Límite inferior	Límite superior
Control	AC	7.8571	1.4354	3.00E-06	4.9537	10.7605
	SES	5.2686	1.4354	7.23E-04	2.3652	8.1720
AC	SES	13.1257	1.4354	3.03E-11	10.2223	16.0291

## Resultados completos para determinar los efectos sobre el casarón.

Tabla 20. Cantidad de minerales en cascarón de huevos del Grupo Control

Muestra	RÉPLICA A			RÉPLICA B		
	Ca (mg/g)	Mg (ppm)	P (ppm)	Ca (mg/g)	Mg (ppm)	P (ppm)
1	271.4	4978.5	618.9	199.2	4798.9	616.9
1'	271.4	5033.2	594.0	199.2	4853.4	592.1
2	191.5	4931.4	551.6	225.3	6853.0	466.9
2'	189.4	4984.4	527.5	225.3	6798.6	442.2
3	248.0	4837.6	646.9	231.9	10555.5	576.6
3'	245.7	4782.6	646.9	229.6	9812.1	601.7
<b>Promedio</b>	<b>236.2</b>	<b>4924.6</b>	<b>597.6</b>	<b>218.4</b>	<b>7278.6</b>	<b>549.4</b>
<b>DE</b>	<b>37.1</b>	<b>96.0</b>	<b>49.7</b>	<b>15.1</b>	<b>2433.1</b>	<b>75.1</b>

Tabla 21. Cantidad de minerales en cascarón de huevos del Grupo AC

Muestra	RÉPLICA A			RÉPLICA B		
	Ca (mg/g)	Mg (ppm)	P (ppm)	Ca (mg/g)	Mg (ppm)	P (ppm)
1	234.8	4938.3	498.8	183.8	7754.5	419.1
1'	234.8	4780.6	498.8	181.6	7754.5	443.9
2	235.0	3492.2	394.1	161.3	5147.6	359.1
2'	232.8	3109.9	369.3	159.2	5253.8	359.1
3	171.8	4291.1	472.3	187.0	7702.0	687.4
3'	169.5	4401.2	472.3	187.0	7810.5	712.0
<b>Promedio</b>	<b>213.1</b>	<b>4168.9</b>	<b>450.9</b>	<b>176.7</b>	<b>6903.8</b>	<b>496.8</b>
<b>DE</b>	<b>32.9</b>	<b>723.1</b>	<b>55.5</b>	<b>12.9</b>	<b>1320.1</b>	<b>160.9</b>

Tabla 22. Cantidad de minerales en cascarón de huevos del Grupo SES

Muestra	RÉPLICA A			RÉPLICA B		
	Ca (mg/g)	Mg (ppm)	P (ppm)	Ca (mg/g)	Mg (ppm)	P (ppm)
1	273.4	7864.8	514.9	154.3	6385.4	875.1
1'	277.8	7702.0	514.9	152.2	6546.4	850.8
2	157.2	1362.9	536.1	159.4	8176.0	867.4
2'	157.2	1555.0	536.1	157.3	8279.5	890.9
3	223.8	8987.4	410.5	182.7	7258.1	671.6
3'	221.6	8933.9	386.2	180.6	7258.1	719.8
<b>Promedio</b>	<b>218.5</b>	<b>6067.7</b>	<b>483.1</b>	<b>164.4</b>	<b>7317.3</b>	<b>812.6</b>
<b>DE</b>	<b>53.1</b>	<b>3609.4</b>	<b>66.8</b>	<b>13.6</b>	<b>791.6</b>	<b>92.7</b>

Tabla 23. ANOVA de un factor entre tratamientos (Ca)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Probabilidad (p)
Tratamiento	9402.44	2	4701.22	3.61	0.038
Error	43006.15	33	1303.22		
Total	52408.59	35			

Tabla 24. ANOVA de un factor entre tratamientos (Mg)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Probabilidad (p)
Tratamiento	8020830.444	2	4010415.22	0.865	0.430
Error	152992815.32	33	4636145.92		
Total	161013645.76	36			

Tabla 25. ANOVA de un factor entre tratamientos (P)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Probabilidad (p)
Tratamiento	182956.112	2	91478.056	5.12	0.012
Error	589549.956	33	17865.150		
Total	772506.068	35			

Tabla 26. Prueba *a posteriori* de DMS (comparaciones múltiples) - Ca

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Probabilidad (p)	95% de intervalo de confianza (IC)	
					Límite inferior	Límite superior
Control	AC	32.4417	14.7378	0.035	2.457	62.426
	SES	35.8667	14.7378	0.021	5.882	65.851
AC	SES	3.4250	14.7378	0.818	-26.559	33.409

Tabla 27. Prueba *a posteriori* de DMS (comparaciones múltiples) - Mg

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Probabilidad (p)	95% de intervalo de confianza (IC)	
					Límite inferior	Límite superior
Control	AC	565.25	879.028	0.525	-1223.147	2353.647
	SES	590.86	879.028	0.506	-1197.538	2379.255
AC	SES	1156.11	879.028	0.198	-632.288	2944.505

Tabla 28. Prueba *a posteriori* de DMS (comparaciones múltiples) - P

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Probabilidad (p)	95% de intervalo de confianza (IC)	
					Límite inferior	Límite superior
Control	AC	99.6667	54.5667	0.077	-11.350	210.683
	SES	74.3417	54.5667	0.182	-36.675	185.358
AC	SES	174.0083	54.5667	0.003	62.992	285.025

**Resultados completos de la determinación de calidad interna del huevo.**

Tabla 29. Unidades Haugh del Grupo Control

RÉPLICA A				RÉPLICA B			
Huevo	Peso (g)	Altura de albúmen (mm)	Unidades Haugh	Huevo	Peso (g)	Altura de albúmen (mm)	Unidades Haugh
1	58.574	1.3	8.11	1	52.748	Huevo podrido	
		1.7	20.55	2	51.972	1.2	15.74
		1.8	23.18			1.4	21.40
2	53.606	Huevo con yema pegada				1.2	15.74
3	50.32	1.2	18.30	3	52.749	1.7	27.80
		1.3	21.06			1.9	32.15
		1.4	23.66			1.9	32.15
4	55.453	1.2	10.00	4	59.371	Huevo podrido	
		1.4	16.40	5	57.974	Huevo podrido	
		1.1	6.41	6	51.398	1.9	33.59
1.3	14.18	2.0	35.55				
5	54.911	1.2	10.93			1.9	33.59
		1.2	10.93	7	49.552	0.9	10.22
6	56.823	Huevo con yema pegada				1.3	22.15
7	55.419	1.4	16.45			1.2	19.46
		1.4	16.45	<b>Promedio</b>		<b>24.96</b>	
		1.1	6.47	<b>DE</b>		<b>8.79</b>	
<b>Promedio</b>			<b>14.87</b>				
<b>DE</b>			<b>4.19</b>				



Tabla 30. Unidades Haugh del Grupo AC

RÉPLICA A				RÉPLICA B			
Huevo	Peso (g)	Altura de albúmen (mm)	Unidades Haugh	Huevo	Peso (g)	Altura de albúmen (mm)	Unidades Haugh
1	55.937	3.2	50.98	1	52.318	2.1	36.53
		3.3	52.31			1.5	23.53
		2.8	45.25			2	34.61
2	57.453	2.8	44.09	2	55.745	Huevo con yema rota	
		2.6	40.82	3	59.55	1.5	13.30
		1	-1.78			1.8	21.96
3	58.394	1.3	8.42	4	50.173	1.9	24.51
		1.2	4.69			3	52.27
		1.5	15.04			3.1	53.55
4	53.663	Huevo podrido				2.6	46.72
5	60.737	2.8	41.53	5	58.781	1.5	14.46
		2.6	38.05			1.5	14.46
		1.0	-9.60			1.6	17.47
6	55.293	1.3	13.58	6	61.073	1.2	-0.62
		1.2	10.28			0.9	-16.38
		1.5	19.51			0.8	-23.22
7	55.788	Huevo podrido		7	53.509	1.7	26.89
<b>Promedio</b>		<b>24.88</b>	2.1			35.36	
<b>DE</b>		<b>15.54</b>	2.5			42.45	
				<b>Promedio</b>			<b>23.21</b>
				<b>DE</b>			<b>21.83</b>

Tabla 31. Unidades Haugh del Grupo SES

RÉPLICA A				RÉPLICA B			
Huevo	Peso (g)	Altura de albúmen (mm)	Unidades Haugh	Huevo	Peso (g)	Altura de albúmen (mm)	Unidades Haugh
1	48.685	Huevo con yema rota		1	63.589	1.7	13.63
2	52.428	Huevo podrido				2	22.24
3	53.215	2.4	41.04	2	71.368	1.6	10.33
		2.4	41.04			Huevo podrido	
		2.2	37.52	3	53.785	Huevo podrido	
4	61.643	Huevo podrido		4	39.978	2.1	47.93
5	72.647	2.3	19.58			2.2	49.35
		2.2	16.72	2	46.47		
		2.5	24.79	1.6	30.52		
6	55.697	Huevo con yema rota		5	48.553	2.2	41.82
7	53.324	Huevo podrido				2.1	40.13
<b>Promedio</b>			<b>30.11</b>	6	58.464	Huevo podrido	
<b>DE</b>			<b>13.79</b>	7	58.81	Huevo podrido	
				<b>Promedio</b>			<b>33.60</b>
				<b>DE</b>			<b>16.60</b>

Tabla 32. ANOVA de un factor entre tratamientos

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Probabilidad (p)
Tratamiento	1592.521	2	796.260	3.16	0.0485
Error	18157.341	72	252.785		
Total	19749.862	74			

Tabla 33. Prueba *a posteriori* de DMS (comparaciones múltiples)

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Probabilidad (p)	95% de intervalo de confianza (IC)	
					Límite inferior	Límite superior
Control	AC	4.6140	4.1209	0.2666	-3.6009	12.8290
	SES	12.8510	5.1140	0.0142	2.6566	23.0455
AC	SES	8.2370	4.9451	0.1001	1.6209	18.0950

Tabla 34. Color de yema de los huevos del Grupo Control

RÉPLICA A				RÉPLICA B			
Huevo	L	a	b	Huevo	L	a	b
1	62.11	13.75	37.44	1	Huevo podrido		
	61.05	12.85	38.88	2	57.65	14.78	51.61
	63.01	13.84	39.84		54.96	14.95	47.35
2	Huevo con yema pegada				60.94	14.72	60.94
3	61.05	12.85	38.88	3	59.10	13.34	54.00
	61.80	13.75	37.44		59.40	11.52	53.39
	53.95	18.14	43.74		64.90	10.58	39.47
4	62.67	13.48	55.26	4	Huevo podrido		
	59.18	12.39	55.42	5	Huevo podrido		
	60.07	13.72	53.21	6	57.12	15.96	52.39
5	65.77	13.74	50.69		59.66	14.65	54.03
	64.17	13.30	51.75		61.61	15.56	53.19
	60.27	14.05	55.59	7	61.12	15.68	53.49
6	Huevo con yema pegada				59.04	15.58	59.04
7	59.92	11.78	48.10		60.49	15.28	58.95
	64.25	12.15	54.82	<b>Promedio</b>	<b>59.67</b>	<b>14.38</b>	<b>52.05</b>
	60.00	12.35	52.51	<b>DE</b>	<b>1.39</b>	<b>1.74</b>	<b>2.96</b>
<b>Promedio</b>	<b>61.28</b>	<b>13.48</b>	<b>47.57</b>				
<b>DE</b>	<b>1.66</b>	<b>1.01</b>	<b>7.57</b>				

Tabla 35. Color de yema de los huevos del Grupo AC

RÉPLICA A				RÉPLICA B			
Huevo	L	a	b	Huevo	L	a	b
1	56.05	15.98	42.34	1	62.80	12.56	49.54
	59.47	15.74	42.22		62.81	13.14	58.28
	61.92	16.72	46.32		58.03	13.52	51.67
2	58.06	21.37	49.46	2	Huevo con yema rota		
	59.79	21.37	49.46	3	60.53	12.42	48.91
	57.74	21.51	50.54		61.49	12.46	52.40
3	55.33	24.18	48.12	4	57.11	13.08	49.65
	58.60	23.19	47.55		57.85	12.36	48.95
	57.39	22.50	45.48		57.54	12.59	49.81
4	Huevo podrido				58.85	12.21	58.85
5	56.19	13.51	46.38	5	58.95	13.74	51.78
	57.50	14.03	49.45		59.57	13.09	47.99
	57.95	13.76	50.89		57.76	13.94	50.22
6	65.42	12.43	51.46	6	61.24	12.55	53.18
	64.31	11.96	42.03		59.73	11.92	49.01
	65.36	13.32	55.43		64.14	11.52	52.97
7	Huevo podrido			7	63.62	9.14	63.62
<b>Promedio</b>	<b>59.41</b>	<b>17.44</b>	<b>47.80</b>		57.41	9.59	46.38
<b>DE</b>	<b>3.26</b>	<b>4.71</b>	<b>2.58</b>		59.17	9.80	48.41
				<b>Promedio</b>	<b>59.92</b>	<b>12.20</b>	<b>50.75</b>
				<b>DE</b>	<b>1.39</b>	<b>1.43</b>	<b>1.40</b>

Tabla 36. Color de yema de los huevos del Grupo SES

RÉPLICA A				RÉPLICA B			
Huevo	L	a	b	Huevo	L	a	b
1	Huevo con yema rota			1	55.61	9.79	42.06
2	Huevo podrido				53.13	10.19	39.56
3	56.69	12.92	44.79		56.70	11.32	46.99
	58.39	14.13	56.48	2	Huevo podrido		
	54.17	14.38	51.16	3	Huevo podrido		
4	Huevo podrido			4	59.11	16.09	40.58
5	56.3	11.96	58.77		58.77	17.61	43.54
	62.94	11.79	58.12	58.12	16.81	40.80	
	60.96	11.83	46.84	5	59.5	14.50	55.62
6	Huevo con yema pegada				59.71	13.76	51.99
7	Huevo podrido			57.97	13.61	52.78	
<b>Promedio</b>	<b>58.24</b>	<b>12.84</b>	<b>49.35</b>	6	Huevo podrido		
<b>DE</b>	<b>2.58</b>	<b>1.38</b>	<b>2.06</b>	7	Huevo podrido		
				<b>Promedio</b>	<b>57.62</b>	<b>13.74</b>	<b>45.99</b>
				<b>DE</b>	<b>2.15</b>	<b>3.21</b>	<b>6.50</b>

Tabla 37. ANOVA de un factor entre tratamientos (L)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Probabilidad (p)
Tratamiento	70.108	2	35.054	4.762	0.0114
Error	529.961	72	7.361		
Total	600.068	74			

Tabla 38. ANOVA de un factor entre tratamientos (Parámetro a)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Probabilidad (p)
Tratamiento	16.757	2	8.378	0.901	0.4106
Error	669.327	72	9.296		
Total	686.083	74			

Tabla 39. ANOVA de un factor entre tratamientos (Parámetro b)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Probabilidad (p)
Tratamiento	55.761	2	27.880	2.021	0.3653
Error	1965.384	72	27.297		
Total	2021.144	74			

Tabla 40. Prueba *a posteriori* de DMS (comparaciones múltiples) - L

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Probabilidad (p)	95% de intervalo de confianza (IC)	
					Límite inferior	Límite superior
Control	AC	0.8779	0.7040	0.2164	-0.5255	2.2814
	SES	2.6939	0.8737	0.0029	0.9522	4.4355
AC	SES	1.8159	0.8448	0.0350	0.1318	3.5001

Tabla 41. Prueba *a posteriori* de DMS (comparaciones múltiples) - a

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Probabilidad (p)	95% de intervalo de confianza (IC)	
					Límite inferior	Límite superior
Control	AC	0.7026	0.7912	0.3775	-0.8747	2.2798
	SES	0.4999	0.9819	0.6122	-1.4574	2.4572
AC	SES	1.2025	0.9495	0.2094	-0.6902	3.0952

Tabla 42. Prueba *a posteriori* de DMS (comparaciones múltiples) - b

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Probabilidad (p)	95% de intervalo de confianza (IC)	
					Límite inferior	Límite superior
Control	AC	0.1499	1.3558	0.9123	-2.5529	2.8526
	SES	2.2316	1.6825	0.1889	-1.1224	5.5856
AC	SES	2.0817	1.6270	0.2048	-1.1615	5.3250