

SOLUCIÓN ELECTROLIZADA DE SUPEROXIDACIÓN CON PH NEUTRO (SoluVet[®]) COMO NUEVA TECNOLOGÍA EN LA DESINFECCIÓN DE HUEVO PARA PLATO Y EMBRIONADO CONTAMINADOS CON *Listeria monocytogenes*

A. Rivera-García^a, L. Santos-Ferro^a, J. Medina-Gudiño^a, J. C. Ramírez-Orejuel^b, P. Ochoa-Galván^c, D. Páez-Esquilano^d, E. Andrade-Esquivel^e y J. A. Cano-Buendía^{a*}

^a Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). ^b Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, FMVZ-UNAM. ^c Departamento de Genética y Bioestadística, FMVZ-UNAM. ^d Departamento de Fisiología y Farmacología, FMVZ-UNAM. ^e Instituto Tecnológico de Celaya; Departamento de Ingeniería Bioquímica; 38010; Guanajuato, México. * jcano@unam.mx

RESUMEN:

El huevo es un alimento de excelente relación calidad-precio con alto valor nutritivo, sin embargo, es susceptible de contaminación microbiológica. Actualmente se evalúan nuevos desinfectantes contra patógenos como *L. monocytogenes*. En el presente trabajo, se evaluó el efecto bactericida de la Solución Electrolizada de Superoxidación (SES) con pH neutro (SoluVet[®]) en huevo para plato y huevo embrionado contaminados con *L. monocytogenes*. Los resultados obtenidos fueron comparados con Ácido Cítrico (AC) al 2 %. Además, se determinaron los efectos sobre la supervivencia embrionaria, integridad de la cutícula y características de calidad del huevo para plato. Los resultados demostraron que la SES con pH neutro logró reducir la carga bacteriana 4.5 log(UFC/huevo) y que tiene un impacto favorable en la conservación de la calidad del huevo para plato. También, esta solución ayudó a que los huevos embrionados tratados tuvieran menor riesgo de muerte en una incubadora. Los resultados indican que la SES con pH neutro (SoluVet[®]) es una alternativa eficaz a considerar en la desinfección del huevo con alto impacto en la industria alimentaria y en el sector avícola, pudiendo disminuir la incidencia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) y prolongar la vida de anaquel del huevo.

ABSTRACT:

Egg is a food with an excellent quality-price relation, it has a high nutritional value however, and it is susceptible to microbiological contamination. Actually, new disinfectants are evaluated against foodborne pathogens such as *L. monocytogenes*. In this work, we evaluated the anti-bacterial effect of the Neutral Electrolyzed Water (NEW) (SoluVet[™]) on table eggs and embrionated eggs contaminated with *L. monocytogenes*. Obtained data were compared against 2 % Citric Acid (AC). Furthermore, the effects on embryonic survival, integrity of the cuticle and characteristics of egg quality were determined. The results showed that NEW reduced bacterial load 4.5 log (UFC/egg) and treated eggs showed favorable impact on the egg quality's conservation. Also, the use of this solution allowed to fertile eggs had lower risk of death in an incubator. Results support that NEW (SoluVet[™]) is an effective alternative to consider in egg disinfection with high impact on the food industry and the poultry sector, it may reduce the incidence of Foodborne Diseases and prolong table egg life shelf.

Palabras clave: desinfección, huevo, Solución Electrolizada de Superoxidación con pH neutro

Keywords: disinfection, egg, Neutral Electrolyzed Water

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

Uno de los alimentos más consumidos en México es el huevo ya que representa una fuente económica con alto valor nutritivo y desde 2013, México es el mayor consumidor a nivel internacional (21.5 kg *per capita*) a pesar de ocupar el 5to lugar en producción a nivel mundial (PROFECO, 2012; UNA, 2014). Entre los años 2012 y 2015, se registró una fuerte alza del precio que coincide con el periodo posterior al brote de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP) y SAGARPA (2011) redactó un manual para su control y erradicación.

En este manual sugiere desinfectar el huevo con Ácido Cítrico al 2% (AC) que representa el agente más “inocuo” para los trabajadores porque otros desinfectantes como el formaldehído y el hipoclorito de sodio resultan ser cancerígenos e irritantes de mucosas, respectivamente (Gehan, 2009; Meireles *et al.*, 2016). Recientemente, se han propuesto nuevas tecnologías para la desinfección del huevo como el uso de luz ultravioleta (Turtoi and Borda, 2014) o soluciones electrolizadas (Bialka *et al.*, 2004; Fassenko *et al.*, 2009; Ni *et al.*, 2014). Esta operación de lavado, representa un Punto Crítico de Control (PCC) dentro del procesamiento del huevo porque la aplicación de algunos desinfectantes puede desgastar la cutícula y, por lo tanto, aumentar el riesgo de contaminación horizontal del producto (Leleu *et al.*, 2011).

Uno de los principales microorganismos patógenos responsable de una Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA) es *Listeria monocytogenes*. Esta bacteria representa un problema grave en la industria alimentaria ya que su control conlleva una gran dificultad porque tiene alta resistencia a diferentes condiciones de pH, temperatura y, a pesar de ser poco común en aves, puede producir un impacto negativo en la producción avícola. En algunos estudios se sugiere determinar la efectividad de tecnologías para la eliminación de *L. monocytogenes* en la superficie del cascarón de huevo (Jones and Musgrove, 2007), en los ovoproductos derivados como huevo líquido pasteurizado y en plantas procesadoras (Rivoal *et al.*, 2013) y, en alimentos listos para consumir (RTE, por sus siglas en inglés) como huevos cocidos (Fang y Huang, 2014).

La Solución Electrolizada de Superoxidación (SES) con pH neutro es conocida por su eficiencia como desinfectante con alto espectro antimicrobiano además de no ser tóxica (Duran *et al.*, 2010). Se ha evaluado en distintas matrices alimenticias para eliminar la presencia de *L. monocytogenes*, por ejemplo, Deza *et al.* (2003), reportó la reducción del 99.99 % en tomates; Guentzel *et al.* (2008), demostró que se puede eliminar el 99.90 % de la contaminación en lechuga y espinaca y, Rahman *et al.* (2012) publicó un estudio en el que se logró disminuir la contaminación de *L. monocytogenes* en carne pollo en 99.52 %.

El objetivo de esta investigación fue determinar la capacidad antimicrobiana de la SES con pH neutro (SoluVet®) contra *L. monocytogenes* y evaluar los efectos sobre la supervivencia embrionaria, integridad de la cutícula y la calidad del huevo. La SES con pH neutro redujo 4.4 log (UFC/huevo) la carga de *L. monocytogenes* y ayudó a

disminuir 1.8 veces más el riesgo de muerte en huevos embrionados. En relación a la calidad del huevo, los tratados con SES obtuvieron valores más altos en la Unidades Haugh en comparación con los tratados con AC o sin tatar. La SES puede usarse también en huevo líquido. En conclusión, la SES con pH neutro (SoluVet®) resultó ser efectiva en la desinfección del huevo y tiene gran potencial de uso en la industria de alimentos, así como en el sector avícola, con lo que se puede reducir la incidencia de la listeriosis sin comprometer la calidad del huevo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Huevo embrionado

- a) Preparación de los huevos embrionados: Se ovoscopiaron 66 huevos de 4 días de edad y se dividieron en tres grupos de 22 (Grupo 1: Control, Grupo 2: AC y Grupo 3: SES). Después, se contaminaron con 10^6 UFC/mL por 10 min y se secaron por 26 min.
- b) Aplicación de tratamientos y obtención de muestras: Se aplicaron por aspersion (60 veces = 30 mL) la solución correspondiente a cada grupo de huevos durante 1 min. Se eluyeron las bacterias de la superficie de 11 huevos en bolsas con 10 mL de agua peptonada al 0.1 % y se realizaron cinco diluciones décuples seriadas para sembrar 100 μ L, de las diluciones 1, 3 y 5, en cajas Petri con Agar Trypticaseína Soya (TSA).
- c) Conteo bacteriano: Después de la incubación por 24 h a 37°C, se contaron las colonias obtenidas y se determinó la reducción lograda en cada tratamiento.
- d) Monitoreo de viabilidad: Se ovoscopiaron los huevos después de 4, 7 y 14 días de recibidos y se contabilizó el número de embriones vivos hasta el nacimiento.

*Los experimentos se realizaron por triplicado y, para determinar diferencias entre los tratamientos, se realizó con $\alpha=0.05$ un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba *a posteriori* de diferencia media significativa (DMS). También se empleó la prueba logrank para analizar las curvas de supervivencia embrionaria. (SPSS Statistics 22)

Huevo para plato

- a) Preparación de los huevos para plato: Se formaron tres grupos de 7 huevos para plato (Grupo 1: Control, Grupo 2: AC y Grupo 3: SES). Después, se contaminaron con 10^6 UFC/mL por 10 min y se secaron por 26 min.
- b) Aplicación de tratamientos y obtención de muestras: Se aplicó por aspersion (60 veces = 30 mL) la solución correspondiente a cada grupo de huevos durante 1 min.
- c) Evaluación de la cutícula: Con un colorímetro triestímulo, se determinaron los parámetros L (luminosidad), a (rojo-verde) y b (azul-amarillo) iniciales. Se realizó la tinción por inmersión en una solución de azul de tripán al 0.1 % por 1 min, se enjuagaron por 3 s con agua destilada y se dejaron secar por 20 min. Después, se midieron los parámetros L, a y b finales y se determinó la diferencia de color (ΔE).

- d) Evaluación de la calidad: Después de 40 días de almacenamiento a 25 °C, se pesaron los huevos y se abrieron para medir la altura del albumen denso con un Micrómetro de Haugh.
- e) Cuantificación de minerales: Los cascarones de los huevos se secaron en una estufa a 50 °C por 24 h. Posteriormente, se incineraron en una mufla y se realizaron digestiones ácidas para determinar el contenido de Mg y Ca por espectrofotometría de absorción atómica a 285.2 y 422.7 nm, respectivamente. El contenido de P fue cuantificado por espectrofotometría UV-Visible a 400 nm.

*Los experimentos se realizaron por duplicado y, para determinar diferencias entre los tratamientos, se realizó con $\alpha=0.05$ un ANOVA con una prueba *a posteriori* de DMS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto antimicrobiano de los desinfectantes

En la Figura 1, se muestran las diferencias en la carga bacteriana después del tratamiento y se aprecia que hay diferencia significativa entre el uso de desinfectante respecto al control. Es claro que la SES logró reducir significativamente la contaminación con *L. monocytogenes* 4.5 log (UFC/huevo) y que es mayor al que se obtuvo al utilizar la solución de AC como referencia (2.5 log (UFC/huevo)).

No existen estudios con los que se pueda comparar el efecto antimicrobiano contra este patógeno en esta matriz alimenticia. No obstante, Ni *et al.* (2014) demostró que una SES con pH neutro redujo 2.2 log (UFC/g huevo) la presencia de *Salmonella* Enteritidis y *Staphylococcus aureus*, y 1.5 log (UFC/g huevo) para *Escherichia coli* O157: H7. 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/cm²), 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.

Efecto sobre la supervivencia embrionaria

Por otra parte, en la Figura 2, se muestran las curvas de supervivencia embrionaria para cada tratamiento y, tras realizar el análisis estadístico se encontró que el Grupo 1 (control) es 1.8 veces más susceptible de riesgo de muerte que los del Grupo 3 (SES) y que el Grupo 2 (AC) también tiene 1.4 veces más riesgo de mortalidad que el Grupo 3. En contraste con los resultados de Fassenko *et al.* (2009), se obtuvo mayor mortalidad de la esperada (11.3-11.9 %) y esto se debió a un fallo en el control de la incubadora entre los días 7 y 11 de recibidos los huevos. Con esto, se puede asegurar que, ante acontecimientos de emergencia como el sucedido, el uso de SES con pH neutro favorece en la supervivencia de los embriones, representando así un impacto favorable en el sector avícola.

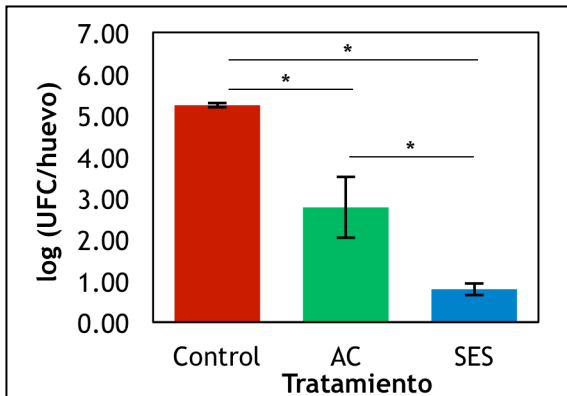


Figura 1 Efecto de los tratamientos sobre la cuenta bacteriana en huevo embrionado. * Diferencia significativa con $p < 0.05$

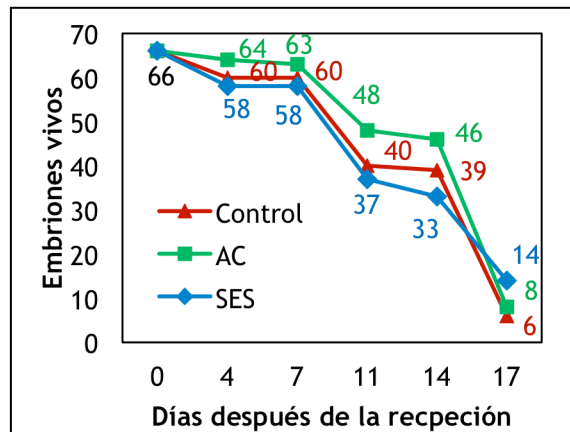
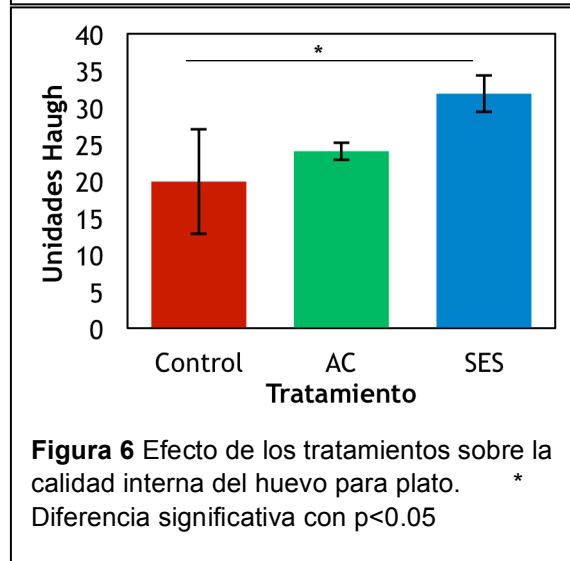
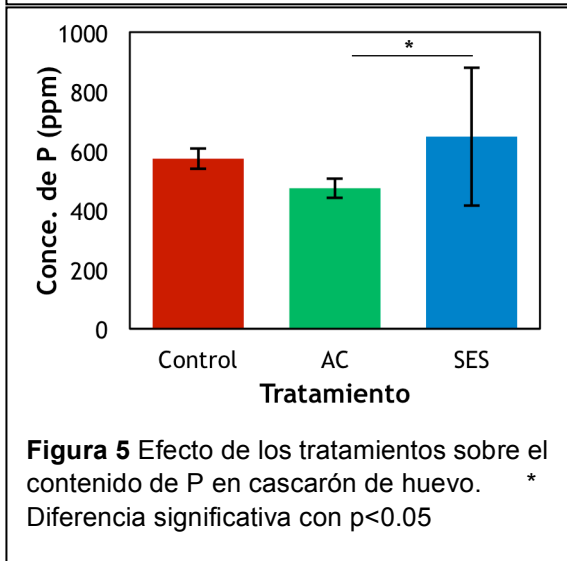
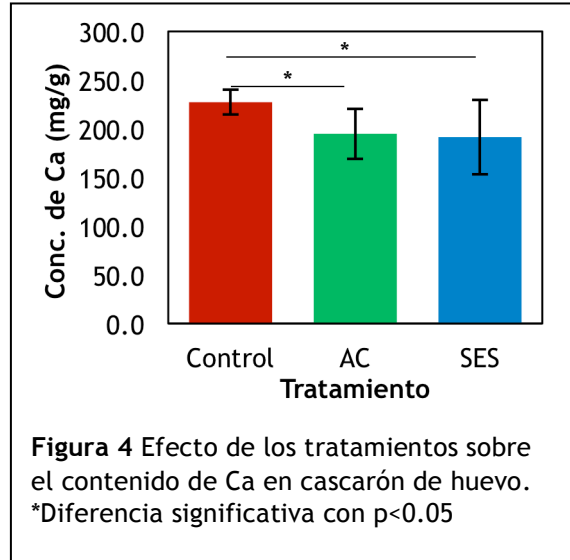
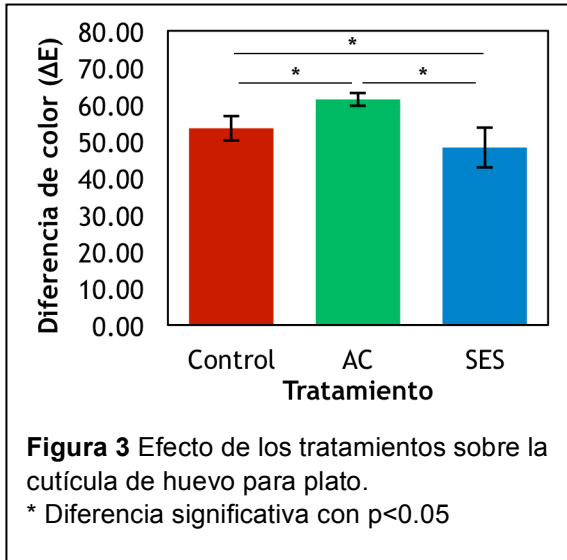


Figura 2 Efecto de los tratamientos sobre la supervivencia en huevo embrionado.

Efecto sobre la cutícula y sobre el cascarón

Se ha demostrado que algunos ácidos orgánicos como el cítrico tienen repercusión negativa sobre la cutícula del huevo lo que genera mayor porosidad en el cascarón de huevo (Leleu *et al.*, 2011). Sin embargo, sólo se cuenta con la referencia de Bialka *et al.* (2004) en la que se demostró que la SES ácida y alcalina destruyen la cutícula. Como se observa en la Figura 3, la diferencia en color (ΔE) depende del tratamiento. Es claro que el AC reaccionó con las proteínas de la cutícula y que permitió la penetración de coloración al observarse mayor ΔE y esto indica que las bacterias pueden entrar al ya no contar con esta barrera física. Entonces, se puede creer que la SES con pH neutro no afecta a la cutícula porque es estadísticamente diferente al grupo tratado con AC.

En las Figuras 4 y 5, se observa que el AC desmineralizó el cascarón por lo que se encontró menor concentración de Ca y P, mientras que la SES con pH neutro no redujo significativamente el contenido de P. En el caso del mineral Mg, no se encontró diferencia significativa entre el uso o no de algún desinfectante. De esta forma se complementa que este nuevo desinfectante pudiera ser que ayude a conservar las características de la cutícula y el cascarón del huevo, restaría realizar otras determinaciones para reportar su efecto con mayor claridad.



BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- Durán, H. (2010). Soluciones de superoxidación y su evolución tecnológica. *Dolor*, 3: 4-8.
- Fang, T., Huang, L. 2014. Growth and survival kinetics of *Listeria monocytogenes* in cooked egg whites. *Food Control*, 36: 191-198.
- 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.

- Gehan, Z. 2009. A new approach to evaluate the hygienic condition of commercial hatcheries. *International Journal of Poultry Science*, 8 (11): 1047-1051.
- 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.
- Jones, D., Musgrove, M. 2007. Pathogen Prevalence and Microbial Levels Associated with Restricted Shell Eggs. *Journal of Food Protection*, 9 (4); 2004-2007.
- 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.
- 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.
- 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.
- PROFECO. 2012. ¿Qué fue primero, el sabor o la nutrición? *Revista del Consumidor*, 429: 44-53.
- 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.
- 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.
- SAGARPA. 2011. *Manual de procedimientos para la prevención, control y erradicación de la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP)*. México: CPA, págs. 78 y 80. 84 p.
- Unión Nacional de Avicultores. 2014. *Compendio de Indicadores Económicos*. Disponible en línea: <http://www.una.org.mx/index/php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos>.
- Turtoi, M., Borda, D. 2014. Decontamination of egg shells using ultraviolet light treatment. *World's Poultry Science Journal*, 70: 265-277.