

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AÇÃO BACTERICIDA DA ÁGUA ELETROQUIMICAMENTE ATIVADA
FRENTE A *Salmonella* Heidelberg DE ORIGEM AVÍCOLA**

Dissertação de Mestrado

Daiane Elisa Wilsmann

PORTO ALEGRE

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AÇÃO BACTERICIDA DA ÁGUA ELETROQUIMICAMENTE ATIVADA
FRENTE A *Salmonella* Heidelberg DE ORIGEM AVÍCOLA**

Autor: Daiane Elisa Wilsmann

**Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na especialidade
de Sanidade Avícola**

**Orientador: Vladimir Pinheiro
do Nascimento**

PORTO ALEGRE

2018

Daiane Elisa Wilsmann

**AÇÃO BACTERICIDA DA ÁGUA ELETROQUIMICAMENTE ATIVADA
FRENTE A *Salmonella* Heidelberg DE ORIGEM AVÍCOLA**

Aprovada em: 26/02/2018

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Dr. Thales Quedi Furian
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo César Tondo
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos desafios, e por me dar força para lutar por aquilo que eu sonho. Por tudo que vivi nesses dois anos, todas as pessoas que conheci e que de alguma forma me ajudaram nessa jornada. Todos os momentos que vivi, bons e ruins me tornaram melhor, ensinaram a disciplina, a perseverança, paciência e outras qualidades, que se não fossem as adversidades eu não conheceria.

Aos meus pais Mildi e Sinécio, irmão César e cunhada Renata, agradeço imensamente. Por acreditarem em mim e por todo apoio. Minhas conquistas serão as conquistas de vocês também. Sou grata pela família que tenho e que tanto amo. Vocês me ensinaram a buscar o meu melhor sempre, sonhar, amar, trabalhar e lutar por aquilo que acredito. Obrigada.

Ao meu amigo e companheiro Nikolas, que me ajudou com palavras de incentivo nos momentos difíceis e me fez valorizar as pequenas conquistas, mostrando que cada momento é único e precisa ser valorizado. Obrigada pelo amor e carinho.

Ao meu orientador Vladimir Pinheiro do Nascimento, por acreditar que eu era capaz. Mesmo sem me conhecer direito, me acolheu nessa trajetória. Aos colegas e amigos que fiz durante esses dois anos no CDPA, agradeço pela força e incentivo que me deram. Obrigada por toda ajuda, e por todas maratonas de experimentos! Não teria conseguido sem a ajuda de vocês. Levarei todos comigo, lembrando com muito carinho de vocês.

Agradeço ao colega Abraão e à empresa American Nutrients que acreditou em mim e possibilitou a pesquisa com o seu produto.

*“Não é sobre chegar no topo do mundo
e saber que venceu, é sobre escalar e sentir
que o caminho te fortaleceu”*

(Ana Vilela)

RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, e o primeiro em exportação. Tamaña importância leva à necessidade de um criterioso programa de biossegurança, buscando impedir problemas sanitários que possam causar danos aos plantéis ou comprometer a qualidade do produto final. Um dos patógenos mais importantes na avicultura é a *Salmonella* spp., sendo a *Salmonella* Heidelberg (SH) um sorovar frequentemente isolado e que vem destacando-se por sua dificuldade de eliminação da cadeia avícola e seu potencial zoonótico. A água eletroquimicamente ativada (EA) é um composto bactericida produzido a partir da eletrólise de sal e água. Através de membranas de eletrólise, os geradores EA produzem um composto com cloro livre, ácido hipocloroso e outros radicais livres. Este método alternativo vem destacando-se por ser seguro e ambientalmente responsável para a redução da contaminação dos produtos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da EA frente a 30 isolados de *S. Heidelberg* nas concentrações de 5 ppm, 50 ppm e 200 ppm de cloro livre com tempo de contato de 5, 10 e 40 minutos a 4° C e 25° C. O método utilizado foi o de diluição, com teste de suspensão em células planctônicas, e a contagem bacteriana realizada através do método de *Drop plate*. Observou-se que nas três concentrações utilizadas, a SH foi sensível a água eletroquimicamente ativada, exceto na concentração de 5 ppm por 40 minutos. O tratamento de 5 ppm por 5 minutos obteve uma redução significativa ($3,3 \times 10^4$ UFC/mL) quando comparada ao grupo controle (sem tratamento) ($7,2 \times 10^4$ UFC/mL). Na concentração de 50 ppm, independentemente do tempo de contato, todos os isolados obtiveram uma diminuição significativa da contagem média bacteriana ($1,1 \times 10^4$ UFC/mL), quando comparado ao grupo controle ($5,1 \times 10^4$ UFC/mL). Na concentração de 200 ppm com 10 minutos de contato, houve uma redução significativa, sendo que dos 30 isolados de SH, apenas quatro foi observado crescimento bacteriano. Os resultados encontrados demonstraram que a EA é efetiva na redução de SH, podendo ser utilizada como composto antimicrobiano alternativo no setor avícola para controle deste patógeno.

Palavras-chave: biossegurança; avicultura; frango; patógenos

ABSTRACT

Brazil is the second largest producer of chicken meat in the world, and the first one to export. Such importance leads to the need for a careful biosecurity program, seeking to prevent sanitary problems that may cause damage to the plants or compromise the quality of the final product. One of the most important pathogens in poultry farming is Salmonella spp., With Salmonella Heidelberg (SH) being a frequently isolated serovar that has been distinguished by its difficulty in eliminating the poultry chain and its zoonotic potential. Electrochemically activated water (EA) is a bactericidal compound produced from the electrolysis of salt and water. Through electrolysis membranes, EA generators produce a compound with free chlorine, hypochlorous acid and other free radicals. This alternative method has been noted for being safe and environmentally responsible for reducing contamination of products. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effectiveness of EA against 30 S. Heidelberg isolates at concentrations of 5 ppm, 50 ppm and 200 ppm with contact time of 5, 10 and 40 minutes at 4°C and 25°C. The method used was the dilution, with suspension test in planktonic cells, and the bacterial count performed by the method of Drop plate. It was observed that in the three concentrations used, SH was sensitive to electrochemically activated water, except at the concentration of 5 ppm for 40 minutes. Treatment of 5 ppm for 5 minutes resulted in a significant reduction (3.3×10^4 CFU / mL) when compared to the control group (without treatment) (7.2×10^4 CFU / mL). At the concentration of 50 ppm, regardless of contact time, all the isolates had a significant decrease in the mean bacterial count (1.1×10^4 CFU / mL) when compared to the control group (5.1×10^4 CFU / mL). At the concentration of 200 ppm with 10 minutes of contact, there was a significant reduction, and of the 30 SH isolates, only four showed bacterial growth. The results showed that the EA is effective in the reduction of SH, and can be used as an alternative antimicrobial compound in the poultry sector to control this pathogen.

Keywords: Biosecurity; poultry farming; poultry; pathogens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de produção da água eletroquimicamente ativada e seus compostos.....	26
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros físico-químicos da EA.....	34
Tabela 2 -	Contagem bacteriana de 30 isolados de <i>S. Heidelberg</i> tratados com 5 ppm de cloro livre da água eletroquimicamente ativada, comparados ao grupo controle, de acordo com o tempo de contato.....	34
Tabela 3 -	Contagem bacteriana de 30 isolados de <i>S. Heidelberg</i> tratados com 50 ppm de cloro livre da água eletroquimicamente ativada, comparados ao grupo controle, de acordo com o tempo de contato.....	35
Tabela 4 -	Contagem bacteriana de 30 isolados de <i>S. Heidelberg</i> tratados com 200 ppm de cloro livre da água eletroquimicamente ativada, comparados ao grupo controle, de acordo com o tempo de contato....	35
Tabela 5 -	Varição da contagem bacteriana de <i>S. Heidelberg</i> tratada com água eletroquimicamente ativada em diferentes tempos de contato.....	36
Tabela 6 -	Varição da contagem bacteriana de <i>S. Heidelberg</i> tratada com água eletroquimicamente ativada de acordo com a concentração do tratamento.....	36
Tabela 7 -	Frequência absoluta de cepas de <i>Salmonella Heidelberg</i> sensíveis a água eletroquimicamente ativada nas concentrações de 5, 50 e 200 ppm, por tempo de contato de 5, 10 e 40 minutos.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	- Associação Brasileira de Proteína Animal
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	- Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
CDC	- <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CDPA	- Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
DO	- Densidade Óptica
DTA	- Doença Transmitida por Alimentos
EA	- Água Eletroquimicamente Ativada
EFSA	- <i>European Food Safety Authority</i>
FAO	- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
IN	- Instrução Normativa
HOCl	- Ácido Hipocloroso
LANAGRO	- Laboratório Nacional Agropecuário
NaCl	- Cloreto de Sódio
NaClO	- Hipoclorito de Sódio
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PNSA	- Programa Nacional de Sanidade Avícola
PPM	- Partes por milhão
RASFF	- Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
SH	- <i>Salmonella</i> Heidelberg
SIF	- Sistema de Inspeção Federal
UFC	- Unidade Formadora de Colônias
UFRGS	- Universidade Federal do Rio Grande do Sul
WHO	- <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Caracterização do gênero <i>Salmonella</i> spp	15
2.2	<i>Salmonella</i> Heidelberg	16
2.3	<i>Salmonella</i> spp na avicultura	18
2.4	Importância da <i>Salmonella</i> spp em saúde pública	19
2.5	Controle de <i>Salmonella</i> spp nos matadouros-frigoríficos	20
2.6	Higienização na indústria de alimentos	21
2.7	Água eletroquimicamente ativada	24
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Local do estudo	29
4.2	Isolados de <i>Salmonella</i> Heidelberg	29
4.3	Avaliação da atividade bactericida da água eletroquimicamente ativada	29
4.3.1	Determinação das variáveis do teste e preparo da água eletroquimicamente ativada para os ensaios antimicrobianos.....	29
4.3.2	Determinação da suspensão teste.....	31
4.3.3	Caldo BHI com neutralizador	31
4.4	Ensaio antimicrobianos	31
4.4.1	Método qualitativo.....	31
4.4.2	Método quantitativo (<i>Drop-Plate</i>)	32
4.4.3	Controle negativo.....	32
4.5	Análise estatística	32
5	RESULTADOS	34
5.1	Produção da água eletroquimicamente ativada	34
5.2	Avaliação da eficácia da água eletroquimicamente ativada – teste quantitativo	34

5.3	Avaliação da eficácia da água eletroquimicamente ativada – teste qualitativo.....	36
6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÕES.....	43
8	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44
	APÊNDICE A-Isolados de S. Heidelberg: ano de isolamento e origem.....	51

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira passou por grandes transformações a partir da década de 70, as quais levaram a uma grande tecnificação e organização da produção, principalmente da região Sul (SILVA, 2005). No ano de 2016, o Rio Grande do Sul foi responsável por 14,11% da produção total de carne de frango, sendo a região Sul responsável por 63,63%, segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2017).

A qualidade dos produtos leva à conquista de novos mercados importadores. No ano de 2016, 12,9 milhões de toneladas de carne de frango foram produzidas, sendo assim, o Brasil consolidou-se como o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos (ABPA, 2017). No Brasil o consumo *per capita*, tendo como um dos fatores principais a redução do preço no varejo e a qualidade de proteína animal, aumentou 47% nos últimos 10 anos, chegando a 44 kg/hab/ano, índice superior ao das carnes suína e bovina (NETO, 2011).

Considerando a importância desta atividade para o Brasil, a preocupação com o aspecto sanitário dos plantéis torna-se uma constante. A modernização da atividade avícola faz com que a capacidade de alojamento seja maior, este fato, aliado ao processo de melhoramento genético, torna as aves cada vez mais susceptíveis ao desenvolvimento de enfermidades. Dentre os microrganismos de maior preocupação na avicultura, está a *Salmonella* spp., a qual pode causar enfermidades, tanto nas aves quanto em humanos (FORSYTHE, 2013).

A *Salmonella* Heidelberg pertence ao grupo das salmonelas paratíficas, podendo causar doenças em humanos e animais (BERCHIERI, 2009). Esse patógeno vem sendo isolado de produtos avícolas, (CARDOSO *et al.*, 2015) e está entre os cinco sorovares mais comumente encontrados em casos de surtos por salmonelose em todo o mundo (ROBINSOM, 2013).

Com a facilidade de acesso a informação, as pessoas vêm buscando cada vez mais produtos de qualidade e inócuos, ou seja, alimentos seguros que sejam livres de patógenos causadores de gastroenterites e de outras enfermidades. As bactérias do gênero *Salmonella* spp. são um grande desafio para a avicultura mundial, além de serem apontadas como uma das principais causas de gastroenterites em humanos na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA) (WHO, 2017). Esses surtos alimentares estão

associados principalmente ao consumo de carne de frango crua ou mal cozida e à contaminação cruzada (EFSA, 2015).

A água eletroquimicamente ativada (EA) é uma tecnologia que torna possível produzir um biocida a partir de água, sal e eletricidade. Através de membranas de eletrólise, os geradores EA produzem um composto classificado como não tóxico e biodegradável. Consiste em um método alternativo, rentável, seguro e ambientalmente responsável para redução da contaminação dos produtos (HUANG YU-RU *et al.*, 2008; RADICAL WATERS, 2017). Esse produto poderia ser utilizado no *chiller*, lavagem de ovos comerciais e desinfecção de instalações em indústrias alimentícias.

A aplicação de controles de qualidade, boas práticas de higiene e fabricação, controles sanitários do plantel, higienização e seleção dos melhores produtos de desinfecção são práticas da indústria avícola que buscam fornecer o melhor produto ao mercado. Apesar da legislação rigorosa para controle de *Salmonella* desde as granjas até os matadouros – frigoríficos, a presença deste patógeno ainda é tida como um problema.

Nesse contexto, o presente trabalho buscou verificar a efetividade da água eletroquimicamente ativada frente a isolados de *Salmonella* Heidelberg de origem avícola.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização do gênero *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* está amplamente distribuído no ambiente em todo o mundo. Em 1885 foi isolado e identificado pela primeira vez por Daniel Elmer Salmon. É uma bactéria Gram negativa, com formato de bastonetes curtos (1 a 2 μm), anaeróbica facultativa e não formadora de endo esporos. É termossensível, podendo ser destruída a 60° C em 15 a 20 minutos. Com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, todas espécies são móveis com flagelos peritríquios. A temperatura ótima de crescimento do gênero é de aproximadamente 38° C e a mínima fica em torno de 7° C. Fermenta a glicose produzindo ácido e gás, e é incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose (TORTORA, FUNKE, 2012; FORSYTHE, 2013).

O gênero *Salmonella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, possui mais de 2.600 sorovares identificados. O gênero é classificado em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo essas diferenciadas por testes bioquímicos e sorológicos. A espécie *enterica* possui seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica* (FORSYTHE, 2013).

Infecções em humanos por *Salmonella* são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization* – WHO) afirma que a *Salmonella* é responsável por um em cada quatro casos de diarreia no mundo (WHO, 2017a). Todos os sorotipos de *Salmonella* podem causar doenças em humanos, no entanto alguns são hospedeiro específico e podem residir em apenas uma ou algumas espécies de animais, por exemplo, Dublin em bovinos e Choleraesuis em suínos. Embora todos os sorovares possam ser considerados patogênicos, cerca de 200 têm sido associados a doenças em humanos (WHO, 2013). No ano de 2013, os sorovares mais comumente reportados foram *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, representando, respectivamente, 39,5% e 20,2% de todos os casos de *Salmonella* confirmados na Europa (EFSA, 2015; EFSA 2017).

A bactéria *Salmonella* comporta-se como patógeno intracelular facultativo. Seu *habitat* é o trato gastro intestinal de animais e homens, não sendo apontada como parte da microbiota normal. Nas diferentes espécies animais, encontram-se associadas a

problemas entéricos, septicêmicos e abortos, devido a sua capacidade de invasão celular e de sobrevivência dentro dos fagócitos (RODRIGUEZ; OCHOA, 2005).

A maioria das infecções humanas por *Salmonella* são associadas à transmissão de origem alimentar a partir de carne, ovos e de produtos lácteos. Todavia, surtos têm sido relacionados também com uma variedade de frutas e vegetais, portanto é essencial que práticas higiênicas sejam adotadas durante a manipulação desses produtos para reduzir sua contaminação (BERCHIERI, 2009; FORSYTHE, 2013).

Apesar do parentesco próximo, sorovares de *Salmonella* diferem nos seus hospedeiros e sintomas que causam. Por exemplo, *S. Enteritidis* é um sorovar que costuma ser relacionado com a contaminação de ovos, e não tanto com a carne de frango. É também chamado de *Salmonella* invasiva, por ser um sorovar capaz de entrar na corrente sanguínea do animal e infectar o ovo. A *S. Typhimurium* possui muitas espécies como hospedeiros, incluindo humanos, aves e camundongos. Esse sorovar é frequentemente associado a ovos, mas é mais comum estar relacionado à carne de frango. Diferente da *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* que são específicas de aves, mas causam doenças distintas (FORSYTHE, 2013).

Segundo dados do Ministério da Saúde, entre 2007 e 2017 *Salmonella* foi responsável por 7,18% dos surtos alimentares, sendo que 70,6% não foram identificados (BRASIL, 2017). O número exato de casos clínicos não é conhecido devido à subnotificação. No entanto milhões de casos em humanos são mundialmente relatados todos os anos e a doença resulta em milhares de mortos além de grandes perdas econômicas (WHO, 2017).

O controle das salmoneloses é um grande desafio para a saúde pública e para a indústria alimentícia, considerando o surgimento de novos sorovares, cepas mais resistentes, tanto em países industrializados quanto nos emergentes. Consumidores também estão mais exigentes e informados, buscando produtos seguros. Sendo assim, é preciso conhecer o patógeno que a indústria enfrenta e as possibilidades de controle e eliminação da cadeia produtiva.

2.2 *Salmonella* Heidelberg

A *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Heidelberg pertence ao grupo de *Salmonellas* paratíficas e pode causar doença em animais ou em humanos. Um dos fatores que mais contribuem para a alta incidência de *Salmonellas* paratíficas é o alto grau de

diversidade antigênica que o gênero possui, facilitando sua adaptação a diversos hospedeiros. Esse fator faz com que o controle dessa bactéria seja complexo, pois outros animais e insetos podem carrear o patógeno, necessitando-se de um controle ainda mais severo (BERCHIERI, 2009). *Salmonella* Heidelberg é um dos sorovares de maior distribuição no mundo e pertence ao sorogrupo O:4 (B) com fórmula antigênica $\underline{1,4, [5],12-r-1,2}$ (GRIMONT & WEILL, 2007).

No Brasil, *S. Heidelberg* foi relatada pela primeira vez em um estudo retrospectivo de 30 anos, entre 1962 e 1991, em que foi isolada de aves e produtos derivados provenientes de diversas regiões do país (HOFER *et al.*, 1997). É um dos sorovares mais detectados em humanos e mais prevalente em alimentos para consumo humano, o que torna a pesquisa de *S. Heidelberg* essencial (WHO, 2013).

No Canadá, *S. Heidelberg* é o terceiro sorovar mais isolado de pessoas com salmoneloses. A maioria das infecções por *S. Heidelberg* levam a doenças suaves a moderadas, sendo que a bactéria também pode causar doença severa com complicações como septicemia, miocardite, infecções extraintestinais e morte. Em humanos a *S. Heidelberg* vem se mostrando mais invasiva do que os outros sorovares que causam gastroenterites (DUTIL *et al.*, 2010).

De acordo com dados do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), os sorovares mais encontrados em aves nos Estados Unidos são *S. Heidelberg*, *S. Kentucky*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Senftenberg* (CDC, 2008). Segundo Robinsom (2013), *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Javiana* e *S. Heidelberg* são os cinco sorovares mais comumente encontrados em caso de surtos de salmoneloses em todo o mundo, sem considerar a fonte de contaminação.

A bactéria *S. Heidelberg* é comumente isolada de aves sadias em granjas, matadouros-frigoríficos e produtos avícolas, sendo que muitos dos casos de salmonelose humana estão associados ao consumo de ovos e frangos (DUTIL *et al.*, 2010). Em estudo realizado por Nascimento *et al.* (1996), também avaliando a prevalência de *Salmonella* em carcaças e partes de frango, constatou que a *S. Heidelberg* foi o terceiro sorovar mais isolado (11%). Avaliando o processo higiênico-sanitário de abate de frangos em três matadouros-frigoríficos no Sul do Brasil, observou-se que carcaças apresentaram positividade para *Salmonella*, sendo a *S. Heidelberg* o sorovar de maior frequência de isolamento (63,9%), seguido de *S. Enteritidis* (31,9%), *S. Worthington* (2,1%) e *S. Tennessee* (2,1%) (DICKEL *et al.*, 2004).

Cardoso *et al.* (2015) avaliaram 609 carcaças de frangos resfriadas provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. *Salmonella* foi isolada de 89 (14,6%) carcaças, sendo *S. Enteritidis* (49,4%) o sorovar prevalente, seguida pelos sorovares *S. Albany* (15,7%), *S. Infantis* (11,2%), *S. Agona* (5,6%), *S. Tennessee* (4,5%), *S. Heidelberg* (3,4%), *Salmonella* spp. (3,4%), *S. Kentucky* (2,3%), *S. Enterica* O:4,5 (2,3%), *S. Montevideo* (1,1%) e *S. Newport* (1,1%).

De acordo com os dados do Sistema de Alertas Rápidos para Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais (do inglês *Food and Feed Safety Alerts - RASFF*), *S. Heidelberg* esteve entre os sorovares mais encontrados nos anos de 2013 e 2014 na Europa (RASFF, 2013 ;2014). Esse fato torna a *S. Heidelberg* um dos sorovares mais prevalentes em alimentos de origem avícola para consumo humano.

2.3 *Salmonella* spp. na avicultura

Na avicultura, um dos problemas sanitários mais graves é a salmonelose, devido ao risco de transmissão do microrganismo aos humanos através do consumo de carne e ovos. O paratifo aviário não tem um agente específico, e diversos sorotipos de *Salmonella* já foram isolados de aves com ou sem quadro de enfermidade. Os mais comuns são *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Mas outros, entre as quais, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Hadar* e *S. Heidelberg* também foram identificados (BERCHIERI, 2009).

As *Salmonellas* paratíficas não são específicas de aves, sendo assim elas se adaptam ao trato intestinal de outras espécies e podem persistir no trato entérico e ser eliminadas nas fezes durante várias semanas. Dessa forma, mesmo com o vazio sanitário, a bactéria pode persistir na granja (BERCHIERI, 2009). A proteção contra a entrada de novos sorotipos na cadeia de produção deve ser a mais rigorosa possível e na prática, se reconhece que o grau de proteção é melhor em granjas responsáveis por fornecer o material genético (matrizes, avós e bisavós) (NETO *et al.*, 2005).

A legislação é rigorosa tratando-se de *Salmonella*, e toda a cadeia de produção de produtos avícolas é periodicamente monitorada. São realizados *swabs* de cama, avaliação de mecônio, fundo de caixa de transporte de pintinhos e testes sorológicos em matrizes, desde as linhagens mais puras de bisavós de frangos, que devem ser negativas para qualquer sorotipo, até os produtos industrializados. Os sorovares *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são monitorados pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola - PNSA (BRASIL, 2003b). Os dois primeiros, quando presentes, e

confirmados em isolamento, determinam o sacrifício dos lotes de matrizes, avós e bisavós. Se matrizes forem positivas para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, os lotes são passíveis de tratamento, no entanto os ovos não serão incubados (BRASIL, 2003b).

A presença de salmonelas paratíficas em frangos de corte não deve ser controlada somente como barreira à exportação, devido ao risco de saúde pública, mas também devido a sua patogenicidade à saúde animal, principalmente em aves no início do ciclo de produção. Até os 21 dias de idade, o sistema imune do intestino das aves está imaturo e por esta razão agentes patogênicos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* podem persistir no lúmen intestinal por longos períodos, causando danos à mucosa intestinal e baixos parâmetros zootécnicos nas aves adultas (ITO et al., 2007).

2.4 Importância da *Salmonella* spp. em saúde pública

Doenças transmitidas por alimentos são definidas como doenças, de natureza infecciosa ou tóxica, causadas por agentes que entram no organismo por meio da ingestão de alimentos ou água. São consideradas um problema, pois os patógenos envolvidos adquirem maior resistência a antimicrobianos e sanitizantes ao longo dos anos (FORSYTHE, 2013).

Segundo a WHO, *Salmonella* é uma das mais comuns e amplamente distribuídas causas de surtos alimentares. A importância das doenças transmitidas pelos alimentos (DTA) é substancial: todos os anos quase 1 em cada 10 pessoas adoecem. As DTA's podem ser graves, especialmente para crianças. A diarreia é o sintoma mais comum resultante do consumo de alimentos contaminados; 550 milhões de pessoas ficam doentes todos os anos, incluindo 220 milhões de crianças com menos de 5 anos (WHO, 2017a).

Os principais sintomas de salmonelose são vômitos, diarreias, dores de cabeça e mal-estar. No entanto, pessoas imunocomprometidas podem vir a óbito. Um fator que agrava a doença é que alguns indivíduos podem tornar-se portadores crônicos e carrear o patógeno por várias semanas ou até anos sem apresentar qualquer sintomatologia e, diante de situações estressantes, sofrer a reativação da multiplicação e excreção do agente (FORSYTHE, 2013).

Estima-se que mais de 1,2 milhão de casos de salmonelose ocorram todo ano nos Estados Unidos, culminando em 55.000 hospitalizações e 450 mortes (EFSA, 2014; WHO, 2017) e representando um custo significativo para o país.

Salmonelose é uma zoonose que possui uma cadeia complexa. Dados do Ministério da Saúde apontam que no Brasil a maioria dos surtos são residenciais (BRASIL,2017). Existem fatores sociais e educacionais envolvidos, pois é uma zoonose vinculada principalmente ao mal preparo dos alimentos, com destaque para os produtos avícolas e a contaminação cruzada (BRASIL, 2017).

No Brasil, *Salmonella* spp. foi responsável por 7,2% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no ano de 2016. Contudo 70,6% dos surtos não foram identificados, o que demonstra uma falha no sistema de monitoramento e também no conhecimento da população a respeito de DTA's, bem como sua notificação aos órgãos de saúde (BRASIL, 2017).

2.5 Controle de *Salmonella* spp. nos matadouros-frigoríficos

O consumo brasileiro de carne de frango *per capita* foi de 43,25 Kg em 2016 (ABPA, 2017). Esse dado revela o quanto os produtos avícolas estão na mesa da população. Fatores econômicos, como um custo mais acessível, e fatores nutricionais são atribuídos a essa escolha. Assim a carne de frango deve ser produzida de maneira a obter um produto inócuo, que não ofereça perigos ao consumidor.

A presença de *Salmonella* spp. nas aves é um fator agravante para a indústria avícola e de processamento de carne, pois produtos contaminados e ou mal acondicionados podem favorecer a multiplicação da bactéria. A contaminação das carcaças de frango pelo patógeno pode acontecer devido à presença do microrganismo durante a fase de criação (FORSYTHE, 2013).

Os matadouros-frigoríficos seguem normas rígidas de controle e boas práticas de higienização e processamento (BRASIL, 2003b), porém estão sujeitos a contaminação por *Salmonella* spp., podendo gerar riscos à exportação e causando impacto econômico indesejável para a cadeia (BERCHIERI, 2009; COLLA, 2012b). Legislações foram desenvolvidas para atender as exigências internacionais e garantir um produto inócuo aos consumidores. De acordo com a Resolução RDC N° 12, de 2 de janeiro de 2001, é necessária a ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas de produto (ANVISA, 2001). Para atender essa normativa, a indústria possui controles internos, no qual continuamente lotes de carne de frango e seus derivados são avaliados microbiologicamente. Com o Programa de Redução de Patógenos disposto na Instrução Normativa n° 70, de 06 de outubro de 2003, o Monitoramento Microbiológico e Controle Sanitário de *Salmonella*

spp. em carcaças de frangos e perus em estabelecimentos registrados junto ao SIF é realizado (BRASIL, 2003b). Esse monitoramento gera um banco de dados para análise dos índices de contaminação dos produtos avícolas, além de aumentar a garantia de qualidade.

Com o objetivo de realizar uma avaliação sistemática do Programa de Redução de Patógenos, institui-se a Norma Interna SDA nº 2, de 11 de outubro de 2013, que aprova o programa exploratório para pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos abatidos em estabelecimentos registrados junto ao SIF (BRASIL, 2013). Essas análises são realizadas apenas em laboratórios pertencentes à Rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGRO) do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

A Comissão do *Codex Alimentarius* juntamente com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) criaram diretrizes para controle de *Salmonella* spp. em carnes de frango (FAO/WHO, 2009). Essas servem de base para a elaboração da legislação interna de cada país, uma vez que são elaboradas por membros voluntários de diversos países. O *Codex* determina padrões mínimos de higiene para proteger a saúde do consumidor e assegurar práticas justas no comércio de alimentos, através da elaboração de padrões e recomendações que descrevem processos e procedimentos para o preparo seguro dos alimentos (FORSYTHE, 2013). Faz parte da rotina de empresas avícolas brasileiras o uso de métodos para o controle de qualidade, buscando garantir à população um produto de qualidade a baixos custos. O Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) deve estar presente em toda a indústria alimentícia. Esse é uma ferramenta muito utilizada na análise e prevenção da contaminação de alimentos (FORSYTHE, 2013).

2.6 Higienização na indústria de alimentos

Durante o processo de fabricação de alimentos, ocorre o acúmulo de materiais indesejáveis, resíduos como restos de alimentos, substâncias químicas do processo e microrganismos (AZEVEDO & CERCA, 2012). Há estudos que comprovam que bactérias patogênicas são capazes de formar biofilmes em superfícies de processamento de alimentos. A presença de biofilmes é comum na indústria de alimentos, pois grande quantidade de nutrientes está disponível aos microrganismos e esses se tornam mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos (LANGSRUD, 2003; ANDRADE, 2008; AZEVEDO & CERCA, 2012).

Toda indústria alimentícia deve ser limpa e sanificada após o término do processo produtivo, e para isso há fases de higienização: I) remoção de resíduos sólidos; II) pré-enxague com água quente (45°C); III) aplicação de detergente; IV) enxágue com água; V) sanitizantes e VI) enxágue com água. Esse processo é realizado em 12 horas e 24 horas no final do turno de abate, e é denominada higiene pré-operacional. Durante o turno, em tempos de 4 e 8 horas é realizada a higiene operacional, que consiste em um processo rápido de higienização durante intervalos na produção através da remoção de resíduos sólidos e de enxágue (CONTRERAS *et al.* 2003; ANDRADE, 2008).

Sanitizante é um composto capaz de reduzir as contagens microbianas a níveis seguros de saúde pública e minimizar as chances de transmissão da doença entre um organismo e outro (BRASIL, 1993; TORTORA *et al.*, 2012). Na avicultura atual, o uso dos sanitizantes tornou-se imprescindível, mesmo adotando-se medidas rigorosas de higiene. Para que o processo seja efetivo, deve-se estabelecer um programa com objetivos claros, tais como susceptibilidade do agente patogênico, populações mistas de microrganismos, tipo de superfície e construção, condições ambientais (umidade e temperatura) e quantidade de matéria orgânica (MORGULIS, 2005; KUANA, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o MAPA são os órgãos responsáveis pela regulamentação do uso de saneantes. Antes da comercialização, os dois órgãos atuam no registro e notificação desses produtos, observando critérios de qualidade para garantir a eficácia e a segurança dos produtos. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 14 de 2007 aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com ação antimicrobiana destinados ao uso em objetos, superfícies inanimadas e ambientes (domiciliar, industrial, hospitalar e outros estabelecimentos públicos e privados de atendimento à saúde) (BRASIL, 2007). Além disso, a Instrução Normativa (IN) nº 26/2009 do MAPA regulamenta a fabricação, controle de qualidade e comercialização de produtos antimicrobianos de uso veterinário (BRASIL, 2009).

Os detergentes diminuem a carga bacteriana das superfícies, embora seu objetivo principal seja a remoção de resíduos orgânicos e minerais. A sanitização que é a última etapa do procedimento de higienização, busca reduzir microrganismos alteradores e eliminar patógenos até níveis seguros, para obter um produto de boa qualidade higiênico sanitária (MORAES, 1997). O sanitizante deve ser selecionado levando-se em conta algumas características: aprovação pelos órgãos competentes, apresentarem amplo espectro de ação e capacidade de destruir os microrganismos. Serem estáveis e com baixa

toxicidade e corrosividade. A ação deles é afetada pelas características da superfície, tempo e temperatura de contato, concentração de uso, tipos de resíduos presentes nas superfícies, pH, o tipo e a quantidade de microrganismos contaminantes (ANDRADE, 2008; ALTERTHUM, 2015).

O ácido peracético é um sanitizante comumente utilizado na indústria. Ele possui algumas vantagens, como não produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos, ter baixo impacto ambiental e ter ação contra biofilmes. É um sanitizante bactericida, esporicida, e fungicida, sendo eficaz contra bactérias gram positivas, gram negativas, fungos filamentosos, leveduras, vírus e esporos bacterianos (ROSSONI, 2000). Contudo, é irritante para pele, libera vapores irritantes, apresenta odor forte, incompatibilidade com cobre, ferro e alumínio e baixa estabilidade de estocagem. Também causa oxidação de grupos sulfidrilas das enzimas pela interferência em processos metabólicos e na função quimiosmótica da membrana citoplasmática (ANDRADE, 2008).

A solução de hipoclorito de sódio (NaClO), com 10 a 12% de cloro ativo, é um dos principais compostos clorados inorgânicos utilizados para desinfecção (ANDRADE, 2008; MACEDO; OLIVEIRA, 2010). Entre as principais vantagens que apresenta em relação a outros sanitizantes químicos estão: custo baixo, fácil preparação e aplicação, ação rápida, não afetado pela dureza da água, efetivo contra grande variedade de microrganismos e, em baixas concentrações, relativamente não-tóxico (ANDRADE, 2008).

A adição de cloro, hipoclorito de sódio e outros compostos clorados na água formam o ácido hipocloroso (HOCl), considerado a forma mais efetiva do cloro, pois tem carga neutra e se difunde tão rapidamente quanto a água através da célula (ANDRADE, 2008; VERMELHO et al., 2011). O ácido hipocloroso age através da inibição de alguns sistemas enzimáticos do metabolismo bacteriano, levando à oxidação dos grupos sulfídricos dos aminoácidos sulfurados presentes nas enzimas bacterianas (PAULINO, 2006; ANDRADE, 2008). No entanto, o sanitizante também apresenta algumas desvantagens: instabilidade ao armazenamento, inativação pela matéria orgânica, corrosão, irritação da pele, baixa eficiência em pH mais elevado e oxidação da borracha, que muitas vezes é componente de equipamentos (ANDRADE, 2008).

Os compostos de amônia quaternária são largamente utilizados como antissépticos e desinfetantes, devido à ação surfactante e à baixa toxicidade, aliado ao poder biocida. São detergentes catiônicos sintéticos com atividade antimicrobiana, sendo eficientes contra bactérias, bolores, leveduras e vírus (MCDONELL, 1999; ZOCHE, 2004). O

mecanismo de ação desse grupo se dá através da desnaturação e da precipitação das proteínas da membrana celular e do citoplasma bacteriano, liberando nitrogênio e potássio das células. Também agem quebrando os complexos lipoprotéicos da célula bacteriana e liberando enzimas autolíticas. Geralmente, os compostos de amônia quaternária combinam-se com proteínas, gorduras e alguns fosfatos e têm alto poder de adsorção na parede celular, onde exercem ação antibacteriana (PAULINO, 2006). Porém estas têm atuação limitada na presença de matéria orgânica e em superfícies com restos de sabões e detergentes aniônicos (ZOCCHÉ, 2004).

Nesse contexto, devido à necessidade de um controle rigoroso na indústria, aliado às características indesejáveis dos desinfetantes citadas acima, bem como o aumento da resistência antimicrobiana a estes compostos (MCDONNELL, 2012; MELO; BRAGG *et al.*, 2014), a busca por produtos alternativos faz-se necessária.

2.7 Água eletroquimicamente ativada

A EA é um biocida cujo componente principal é o ácido hipocloroso (HClO) que aliado a uma carga elétrica (ORP), à grande quantidade de oxigênio livre (> 30 mg/l), ao pH baixo, e a outros componentes, produzem um mecanismo de destruição microbiana ou impedindo sua atividade e o metabolismo de energia (ANDRADE *et al.*, 2008).

Os microrganismos são inativados, pois a EA age aumentando a permeabilidade da membrana e levando a um vazamento do conteúdo intracelular, bem como diminuindo as desidrogenases e as atividades de redutases de nitrato (KIURA *et al.*, 2002; ZENG *et al.*, 2010). Seus efeitos bactericidas em patógenos transmitidos pelos alimentos são documentados por numerosos estudos (IZUMI, 1999; GÓMEZ-LÓPEZ *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2008; DING *et al.*, 2010). Ela tem múltiplas vantagens sobre o uso de água clorada. A EA pode ser produzida no local, as matérias-primas (água e cloreto de sódio) são encontradas facilmente, além disto é ambientalmente correta, reduz custos e perigos associados ao tratamento com outros compostos liberadores de cloro, tem baixa citotoxicidade e o desenvolvimento de cepas resistentes ainda não foi relatado (AL-HAQ, 2002; HUANG *et al.*, 2008; GÓMEZ-LÓPEZ, 2012).

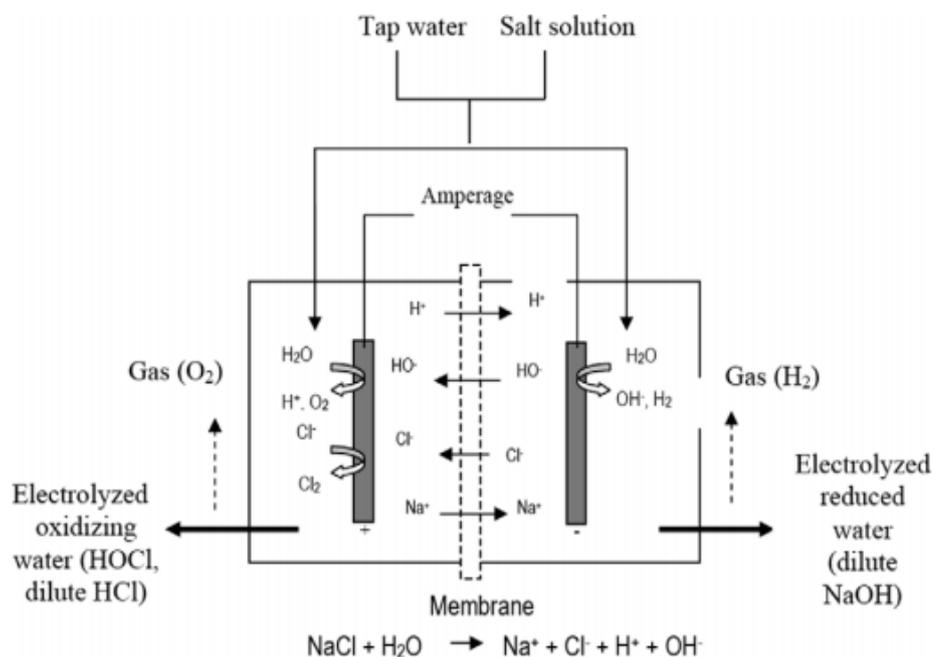
Quando imersos nessa solução, os microrganismos serão expostos a oxidantes que sequestram elétrons com alta eficiência dos seus compostos estruturais, causando a ruptura de ligações bioquímicas e subsequente perda de função. Além disso, acredita-se que um ambiente de alta osmolaridade desequilibra as concentrações internas dos

organismos em relação a solução, danificando estruturas da membrana. Isso irá levar a um aumento da porosidade da membrana, permitindo a entrada de oxidantes no citoplasma bacteriano, danificando proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, como consequência levando a morte celular (THORN *et al.*, 2011).

A água eletroquimicamente ativada é uma tecnologia que torna possível produzir um biocida a partir de água, sal e eletricidade. Através de membranas de eletrólise, os geradores EA produzem um composto classificado como não tóxico e biodegradável. A estes benefícios une-se a possibilidade de alta redução de custos, uma vez que os insumos utilizados são extremamente baratos e abundantes, resultando numa operação mais econômica, quando comparada aos produtos industrializados tradicionais (HUANG YU-RU *et al.*, 2008; RADICAL WATERS, 2017). Estudos mostram que a EA é eficiente no controle de *Salmonella*, *E. coli* e *Listeria monocytogenes* (PARK *et al.*, 2004; ABADIAS *et al.*, 2008; CHUANG *et al.*, 2013). Esses resultados estimulam novos estudos e o uso do produto na indústria alimentícia.

Em um recipiente, o cloreto de sódio (NaCl) diluído em água, é colocado para ser utilizado na produção da EA. O equipamento recebe a solução de sal e de água potável por duas vias de acesso independentes (Figura 1). Quando a corrente elétrica passa pela junção da água com a solução salina, a membrana no equipamento, que apresenta um elevado grau de compostos químicos que favorecem a reação, transforma o eletrólito NaCl em estado ativado, formando radicais livres, ácido hipocloroso, entre outros compostos através da modificação das estruturas iônicas (THORN *et al.*, 2011).

Figura 1 - Esquema da geração da água eletroquimicamente ativada e seus compostos.
 Fonte Huang Yu-Ru *et al.*, (2007).



Dentro de uma célula eletrolítica, o ânodo e o cátodo são separados por uma membrana. Ao submeter os eletrodos a tensões de corrente direta, íons carregados negativamente, como cloreto e hidróxido, na solução de sal diluída, deslocam-se para o ânodo para doar elétrons e se tornam gás oxigênio, gás cloro, íon de hipoclorito e ácido hipocloroso. Enquanto que os íons carregados positivamente, como hidrogênio e sódio, movem-se para o cátodo para receber elétrons e se tornam gás hidrogênio e hidróxido de sódio em uma menor proporção (HUANG YU-RU *et al.*, 2007).

Dois tipos de soluções podem ser produzidas, sendo uma delas com um baixo pH (2,3-4,5), alto potencial de oxidação-redução (ORP), elevado teor de oxigênio dissolvido e de cloro livre. A concentração depende da configuração da máquina, sendo produzida no lado do ânodo. A EA com pH elevado possui altos níveis de hidrogênio dissolvido e baixa ORP (-800 a -900 mV), sendo produzida no lado do cátodo (HUANG YU-RU *et al.*, 2008; THORN *et al.*, 2011). As características da solução pronta dependem de alguns parâmetros, como a célula eletroquímica, a condutividade em um pH baixo e o alto potencial de oxidação-redução (ORP). Normalmente, esses parâmetros que são almejados durante a fabricação (THORN *et al.*, 2011).

O ORP é definido como a capacidade de ganhar ou perder elétrons. O valor ORP positivo indica receber elétrons, enquanto os valores negativos designam doar elétrons.

Os sequestradores de elétrons da EA atraem elétrons da membrana celular bacteriana, tornando-a instável (JAY, 2005). Uma característica da EA é que quando ela entra em contato com matéria orgânica, ou é diluída em água, torna à solução inicial (GÓMEZ-LÓPEZ *et al.*, 2013). Assim, possui menor impacto negativo no ambiente, bem como na saúde dos usuários. Além disso, em comparação com outras técnicas de desinfecção convencionais, é fácil de manusear, tem poucos efeitos colaterais e é relativamente barata (TANAKA *et al.*, 1999). Foi comprovado que a presença de matéria orgânica reduz a eficácia do produto. Essa informação é importante pois quando há grande presença de matéria orgânica, faz-se necessário um alto ORP ou uma constante renovação da EA para que se mantenha a efetividade do produto (THORN *et al.*, 2011).

A desvantagem do uso da EA é o fato de que a solução rapidamente perde sua atividade antimicrobiana se não for continuamente renovada por eletrólise (KIURA *et al.*, 2002). Em contraste com a redução do cloro livre residual, os níveis de concentração de pH, potencial oxi-redutor e condutividade são relativamente estáveis durante o armazenamento a curto prazo, indicando que o potencial oxidante desta solução é mantida (THORN *et al.*, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade da água eletroquimicamente ativada frente a *Salmonella* Heidelberg de origem avícola.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a atividade antimicrobiana da EA nas concentrações de 5, 50 e 200 ppm de cloro livre frente a isolados de *S. Heidelberg*.
- b) Avaliar a atividade antimicrobiana da EA nas temperaturas de 4°C e 25°C, respectivamente, frente a isolados de *S. Heidelberg*.
- c) Avaliar a atividade antimicrobiana da EA frente aos isolados *S. Heidelberg* nos tempos de contato de 5, 10 e 40 minutos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

Os experimentos foram realizados no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todos os equipamentos necessários para o estudo pertencem ao laboratório.

4.2 Isolados de *Salmonella* Heidelberg

Os isolados de *S. Heidelberg* utilizados para a realização do experimento são de fonte avícola, procedentes da região sul do Brasil e seus dados encontram-se disponíveis no Apêndice A. Dentre as 30 cepas selecionadas para o estudo, 20 foram isoladas em 2006 (BORSOI *et al.*, 2009) e pertencem à bacterioteca do CDPA. As 10 cepas restantes foram isoladas em 2016 e gentilmente cedidas de um laboratório.

Os isolados encontravam-se armazenados a -80°C em tubos tipo *eppendorf* contendo caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI - Oxoid[®]) com glicerol na proporção 3:1. Para a sua reativação, foi utilizado primeiramente ágar *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD - Merck[®]). As placas foram incubadas a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e após 24 horas, foi observada a presença de colônias compatíveis com *Salmonella* spp. Uma colônia característica foi selecionada e semeada em caldo BHI sob as mesmas condições de incubação anteriormente descritas.

4.3 Avaliação da atividade bactericida da água eletroquimicamente ativada

4.3.1 Determinação das variáveis do teste e preparo da AE para os ensaios antimicrobianos

A susceptibilidade dos isolados de *S. Heidelberg* foi avaliada, em suspensão, frente a três diferentes concentrações da EA. As concentrações de teste fazem referência àquelas indicadas pelo fabricante do equipamento e que são rotineiramente utilizadas nas instalações e indústrias avícolas.

De acordo com a Portaria 210 de novembro de 1998, a água de renovação do sistema de pré-resfriamento por imersão poderá ser hiperclorada, permitindo-se no máximo 5 ppm de cloro livre. Com a finalidade de ser utilizada no *chiller*, e obedecendo

a esses parâmetros, a EA foi testada na concentração de 5 ppm. Da mesma forma, a temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ foi utilizada visando simular a temperatura máxima da água do *chiller* próximo a sua saída (BRASIL, 1998). O tempo de contato de 40 minutos correspondeu ao tempo médio que as carcaças permanecem nos tanques de resfriamento. Foi também utilizado o tempo de 5 minutos com o objetivo de verificar a eficácia do produto em um tempo de exposição reduzido.

A concentração de 50 ppm de cloro livre foi testada com a justificativa do seu uso ser permitido na água do *chiller* nos EUA (USDA, 2017). De acordo com esta normativa, o ácido hipocloroso gerado eletroquimicamente pode ser utilizado em diversos processos da indústria alimentícia. De maneira semelhante ao utilizado para a concentração de 5 ppm, os testes para 50 ppm foram também realizados a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com 40 minutos de contato. O tempo contato de 5 minutos também foi avaliado para simular um tempo de exposição reduzido.

A concentração de 200 ppm de cloro livre foi justificada por ser a concentração frequentemente utilizada na desinfecção de equipamentos e superfícies na indústria avícola (FDA, 2012). Os tempos de contato foram de 5 e 10 minutos, sendo esses os mais aproximados com a realidade da indústria. A temperatura utilizada para esta concentração foi de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, simulando a temperatura ambiente.

Após produzida, a EA foi imediatamente submetida à mensuração do cloro livre. A concentração média da EA foi de 250 ppm, sendo esta diluída em água destilada estéril até estar ajustada na concentração desejada. As mensurações foram feitas com o equipamento Medidor de Cloro Múltiparâmetro – Micro 7 Plus da marca Exact na indústria, estando essa a uma distância de 115 km do CDPA. Logo após a produção, a água eletroquimicamente ativada era transportada em caixa isotérmica. Chegando no CDPA, as amostras da EA foram novamente mensuradas e foi visto que permaneciam na mesma concentração. A seguir, foi distribuída, em tubos de ensaio, 9,8 mL de cada concentração a ser testada. A adição de 1% de Soro Fetal Bovino (Gibco®), indicando a presença de matéria orgânica, foi realizada imediatamente antes do início do ensaio. Os ensaios foram realizados em no máximo quatro dias após a produção da EA, sendo que não houve diferença após esse período em relação ao primeiro dia do ensaio.

4.3.2 Determinação da suspensão teste

Após a reativação dos isolados de *S. Heidelberg*, uma alíquota do caldo BHI inoculado foi retirada e adicionada a um tubo contendo água peptonada tamponada 0,1% (APT - Himedia[®]), a fim de se obter turbidez compatível com a escala 0,5 de MacFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL). Para confirmação da concentração bacteriana desejada, foi mensurada a densidade óptica (DO) por espectrofotômetro (SP 22, Biospectro, Brasil) no comprimento de onda de 625 nm e o inóculo bacteriano foi padronizado entre 0,08 a 0,1 nm (CLSI, 2003). Após, 1 mL da suspensão foi diluída em 10 mL de APT 0,1%, a fim de se atingir uma concentração de aproximadamente 10^6 UFC/mL.

4.3.3 Caldo BHI com neutralizador

O Caldo BHI foi preparado conforme indicação do fabricante. Antes da esterilização, foram adicionados, 10 mL de polissorbato TWEEN 80 (Sinth[®]), 2 g de lecitina de soja (DELAWARE[®]) e 2 g de tiosulfato de sódio, para cada litro do caldo, segundo British Standard Institution (2006), com adaptações.

4.4 Ensaio antimicrobianos

4.4.1 Método qualitativo

Um dos métodos utilizados para a avaliação da eficiência da água eletroquimicamente ativada foi o de diluição, com teste de suspensão em células planctônicas, conforme descrito pela Portaria nº 101 do MAPA (BRASIL, 1993).

Os tubos de ensaio contendo as diluições da EA foram submetidos a duas condições de temperatura ($4 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 1^\circ\text{C}$). A cada tubo, contendo 9,8 mL da EA acrescida do soro fetal bovino (GIBCO[®]) para simular a presença de matéria orgânica, foram adicionados 0,1 mL do inóculo. Após o tempo de exposição, alíquotas de 10 μL das suspensões foram retiradas e transferidas em triplicata para tubos contendo caldo BHI acrescidos de solução neutralizante, para que o efeito antimicrobiano da EA fosse inativado.

As amostras foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 96 horas. Os tubos com turvação, formação de película na superfície ou de precipitado no fundo foram considerados

positivos (crescimento bacteriano) e confirmados através do repique de uma alíquota em placas contendo meio seletivo XLD, a fim de confirmar a viabilidade bacteriana e excluir a possibilidade de presença de microrganismos contaminantes. As placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Ao final, as cepas testadas foram classificadas como resistentes ou sensíveis perante a ação da EA.

4.4.2 Método quantitativo (*Drop plate*)

Foi utilizado como referência o teste de suspensão quantitativo para avaliar a atividade bactericida de desinfetantes e anti-sépticos químicos (fase 1), conforme o protocolo do Comitê Europeu de Padronização (CEN) BS EN 1040:2005 (British Standards Institution, 2006).

A cada tubo, contendo 9,8 mL da EA acrescida do soro fetal bovino, foram adicionados 0,1 mL do inóculo. Transcorrido o tempo de teste, 1 mL da solução foi inoculada em 9 mL de BHI com neutralizador. Aguardou-se o tempo de 5 minutos de contato e uma alíquota de 1 mL foi transferida para 9 mL de solução salina 0,85%, sendo realizadas diluições seriadas até 10^{-4} , seguido de semeadura em meio XLD, pela técnica de *Drop-Plate* ou contagem em gota (MILLES & MISRA, 1938), inoculando-se 10 μL de cada diluição em quintuplicata (cinco gotas). Posteriormente, as placas foram incubadas a $36^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas e foi realizada a contagem de colônias características de *Salmonella* spp.

4.4.3 Controle negativo

Os 30 isolados utilizados foram submetidos às mesmas condições de tempo e temperatura com água destilada estéril. Após, foi realizada a contagem de células viáveis pela técnica de *Drop-Plate* ou contagem em gota inoculando 5 gotas com 10 μL de cada diluição.

4.5 Análise estatística

A análise estatística descritiva foi usada para determinar as médias de contagem bacteriana em cada tratamento e para determinar o agrupamento das amostras conforme a presença de crescimento bacteriano. O teste t para comparação de duas médias foi

utilizado para avaliar a contagem entre os períodos de tempo de tratamento. O programa PASW Statistics 18 foi utilizado para as análises, adotando-se como referência o nível de significância de 5%. O teste não-paramétrico de McNemar foi utilizado para avaliar a comparação entre os tratamentos para as amostras correlacionadas. O programa PASW Statistics 18 foi utilizado para as análises, adotando-se como referência o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Produção da água eletroquimicamente ativada

A água eletroquimicamente ativada foi produzida de acordo com as instruções do fabricante. Após sua produção, os parâmetros físico-químicos foram imediatamente mensurados, conforme consta na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos da EA

Parâmetros EA	Data de coleta	
	14/08	04/09
ORP	571,8	812,4
pH	7,37	8,15

ORP: potencial oxi-redutor
pH: potencial hidrogeniônico

5.2 Avaliação da eficácia da água eletroquimicamente ativada – Teste quantitativo

A água eletroquimicamente ativada obteve um efeito bactericida sob os isolados de *S. Heidelberg* testados. No tratamento com 5 ppm, houve diminuição significativa ($p < 0,05$) na média da contagem bacteriana quando comparado ao grupo controle, com exceção da concentração nos 40 minutos de contato (Tabela 2).

Tabela 2 – Contagem bacteriana de 30 isolados de *S. Heidelberg* tratados com 5 ppm de cloro livre da água eletroquimicamente ativada, comparados ao grupo controle, de acordo com o tempo de contato.

Tempo de contato	Tratamento	
	Controle*	5 ppm*
5 min	$7,2 \times 10^4 \pm 92139,83$ a	$3,3 \times 10^4 \pm 18614,02$ b
40 min	$5,1 \times 10^4 \pm 58755,18$ a	$3,4 \times 10^4 \pm 17846,67$ a

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$).

* Resultados em UFC/mL.

No tratamento com a água eletroquimicamente ativada na concentração de 50 ppm, independentemente do tempo de contato (5 ou 40 minutos), a média bacteriana foi significativamente inferior quando comparada ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Contagem bacteriana de 30 isolados de *S. Heidelberg* tratados com 50 ppm de cloro livre da água eletroquimicamente ativada, comparados ao grupo controle, de acordo com o tempo de contato.

Tempo de contato	Tratamento	
	Controle*	50 ppm*
5 min	$7,2 \times 10^4 \pm 92139,83$ a	$2,6 \times 10^4 \pm 9012,38$ b
40 min	$5,1 \times 10^4 \pm 58755,18$ a	$1,1 \times 10^4 \pm 12695,71$ b

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Na concentração de 200 ppm, independentemente do tempo de exposição, houve diminuição da contagem média bacteriana das cepas de *Salmonella Heidelberg* selecionadas para o estudo (Tabela 4). De 30 isolados, 26 não tiveram crescimento do XLD.

Tabela 4 - Contagem bacteriana de 30 isolados de *S. Heidelberg* tratados com 200 ppm de cloro livre da água eletroquimicamente ativada, comparados ao grupo controle, de acordo com o tempo de contato.

Tempo de contato	Tratamento	
	Controle*	200 ppm*
5 min	$5 \times 10^4 \pm 33051,47$ a	$4,9 \times 10^2 \pm 1366,60$ b
10 min	$6,9 \times 10^4 \pm 56308,83$ a	$1,3 \times 10^2 \pm 445,37$ b

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Em relação ao tempo de contato, a contagem média bacteriana somente apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração do produto a 50 e a 200 ppm. Com relação, a 50 ppm a contagem bacteriana foi menor após 40 minutos de contato, e no caso de 200 ppm foi menor nos 10 minutos de contato (Tabela 5).

Tabela 5 - Variação da contagem bacteriana de *S. Heidelberg* tratada com água eletroquimicamente ativada em diferentes tempos de contato.

Concentração	Tempo de contato		
	5 min*	10 min*	40 min*
5 ppm	$3,3 \times 10^4 \pm 18614,02$ a	-	$3,4 \times 10^4 \pm 17846,67$ a
50 ppm	$2,6 \times 10^4 \pm 9012,38$ a	-	$1,1 \times 10^4 \pm 12695,71$ b
200 ppm	$4,9 \times 10^2 \pm 1366,60$ a	$1,3 \times 10^2 \pm 445,37$ b	-

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$).

- Teste não realizado.

A contagem média bacteriana apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações do produto avaliadas (5 ppm e 50 ppm) no tempo de contato de 40 minutos. A concentração de 50 ppm apresentou menor contagem média em relação à concentração de 5 ppm. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações do produto avaliadas (5 ppm e 50 ppm) no tempo de contato de 5 minutos (Tabela 6).

Tabela 6 - Variação da contagem bacteriana de *S. Heidelberg* tratada com água eletroquimicamente ativada de acordo com a concentração do tratamento.

Tempo de contato	Tratamento	
	5 ppm*	50 ppm*
5 min	$3,3 \times 10^4 \pm 18614,02$ a	$2,6 \times 10^4 \pm 9012,38$ a
40 min	$3,4 \times 10^4 \pm 17846,67$ a	$1,1 \times 10^4 \pm 12695,71$ b

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$).

5.3 Avaliação da eficácia da água eletroquimicamente ativada - teste qualitativo

A EA não impediu a turvação dos isolados de *S. Heidelberg* nos tratamentos com 5 e 50 ppm, independentemente do tempo de contato. No tratamento a 200 ppm por 5 minutos de contato, houve a turvação de 50% (15/30) das amostras, sendo que em 10 minutos 53,3% (16/30) não turvaram. A presença de crescimento bacteriano não variou ($p > 0,05$) entre o tratamento a 200 ppm do produto por 5 minutos em relação ao tratamento a 200 ppm por 10 minutos (Tabela 7).

Tabela 7 – Frequência absoluta de cepas de *Salmonella* Heidelberg sensíveis a água eletroquimicamente ativada nas concentrações de 5, 50 e 200 ppm, por tempo de contato de 5, 10 e 40 minutos.

CEPAS	Tempo de contato (minutos)	Concentração(ppm)			
		5	50	200	
n = 30 SH	5	0	0	15	
	10	-	-	16	
	40	0	0	-	
Não inativadas			-	-	24

- Não foi realizado o teste

6 DISCUSSÃO

O teste de eficiência da água eletroquimicamente ativada foi realizado para avaliar a resistência dos isolados de *Salmonella* Heidelberg testados em fase planctônica. Foram utilizadas concentrações e tempos de contato estabelecidos pela legislação (BRASIL, 1998) e usuais em matadouros-frigoríficos e ou em estabelecimentos que realizem desinfecção como prática rotineira para o controle microbiano. Os resultados de eficiência da EA encontrados no presente trabalho foram favoráveis. Em todos os isolados, independentemente da concentração e do tempo utilizado, a EA foi eficaz, com exceção do teste a 5 ppm por 40 minutos.

Os resultados obtidos estão de acordo com outros estudos, nos quais os microrganismos *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 também foram sensíveis a EA (ABADIAS *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2014; ZANG *et al.*, 2015). Além disso, alguns trabalhos vêm demonstrando que a EA pode ser utilizada em produtos avícolas, como carcaças, cortes e miúdos de frango (HUANG YU-RU *et al.*, 2008; LORETZ *et al.*, 2010). Esses resultados são importantes, pois estimulam novas pesquisas para a utilização do produto na produção animal, de alimentos e inclusive em locais que são pontos críticos de controle.

O teste realizado na concentração de 5 mg/L de cloro residual na temperatura de 4° C obteve uma redução significativa na contagem bacteriana média ($3,3 \times 10^4$ UFC/mL) nos cinco minutos de contato quando comparado ao grupo controle ($7,2 \times 10^4$ UFC/mL). Resultado semelhante foi encontrado por Akbas e Olmez (2007) a partir da inoculação de *L. monocytogenes* e *E. coli* em alface e posterior lavagem com EA. Os autores constataram que a atividade antimicrobiana da EA deu se já nos primeiros minutos de contato. Esse resultado é importante pois demonstra que não há a necessidade de aguardar um período para que haja ação do produto. A mesma concentração de 5 ppm foi testada com 40 minutos de contato, a 4°C, contudo não se observou uma redução significativa na contagem bacteriana. Provavelmente a baixa concentração de cloro livre e de ácido hipocloroso, somado a presença de matéria orgânica pode ter saturado com o passar do tempo, não havendo um efeito bactericida significativo.

Cao e colaboradores (2009) testaram isolados de *S. Enteritidis* frente a EA na concentração de 6 mg/L, e constataram redução na contagem do patógeno após o tratamento, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Park *et al.* (2004) também avaliaram a eficácia da EA na concentração de 5 mg/L frente a cepas de

E. coli O157: H7 e *L. monocytogenes*, e observaram uma importante redução da carga microbiana para ambos microrganismos. Ainda, neste estudo os mesmos isolados foram desafiados com a mesma concentração de cloro livre, no entanto com pH 3,0, 5,0 e 7,0. Como resultado, os autores constataram que quando o pH era menor, a sensibilidade a AE foi maior, e que acrescido disso, em baixas concentrações de pH o ORP era maior, o que aumentou o potencial bactericida, constatando que o ácido hipocloroso está em maior proporção quando o pH é mais ácido. Entretanto isso não quer dizer que a EA não tenha ação bactericida em pH neutro, o que é demonstrado no estudo de Zang *et al.*, (2015).

Segundo a Portaria nº 210 de 1998 do MAPA, os estabelecimentos que realizarem cortes e/ou desossa de aves devem garantir temperatura ambiente não superior a 12°C e o resfriamento dos produtos de aves a uma temperatura da água do *chiller* de no máximo 4°C, respeitando, assim, o regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. Os resultados obtidos nesse estudo com a EA a 5 ppm na temperatura de 4°C são importantes, pois demonstram a possibilidade deste antimicrobiano ser utilizado de maneira alternativa ao cloro no *chiller*, visto que durante a passagem das carcaças pelo *chiller*, ocorreria o reabastecimento contínuo da EA. Seu uso a 5 ppm seria uma alternativa para redução da contaminação por *Salmonella* Heidelberg. O equipamento que produz a EA poderia ser instalado na planta frigorífica, e logo após a fabricação da EA, essa abasteceria o *chiller*. Aliado a isso a EA apresenta como vantagem a característica de não possuir efeito corrosivo em superfícies metálicas (ABADIAS 2008). Nos EUA a EA já é utilizada no *chiller*, no entanto sua concentração é de 50 ppm (USDA, 2017).

Conforme descrito pelo MAPA - Portaria nº 101 (BRASIL, 1993), foi realizado o teste de desinfetantes, sendo que nenhum dos isolados foi sensível no teste qualitativo, pois em todos os tubos foi verificado crescimento bacteriano ao término das 96 horas nas concentrações de 5 ppm e 50 ppm. Esses resultados eram esperados visto que houve uma redução na contagem, mas não a eliminação total do microrganismo. Visando a utilização da concentração de 5 ppm para a água do *chiller*, sendo o reabastecimento contínuo para evitar a saturação, pode se indicar que o efeito da EA é positivo, pois a contaminação nesse local não é eliminada por completo, e sim reduzida, pois há uma entrada constante de carcaças contaminadas (BRASIL, 1998).

Nos testes em que foi utilizada a concentração de 50 ppm, houve a redução da contagem média bacteriana ($2,6 \times 10^4$ UFC/mL em 5 minutos e $1,1 \times 10^4$ em 10 minutos) quando comparada ao grupo controle ($7,2 \times 10^4$ UFC/mL), independentemente do tempo

em que o microrganismo permaneceu em contato com o produto. A redução foi maior quando comparada à concentração de 5 mg/L de cloro residual, o que já era previsto, visto que quanto maior a concentração do produto, maior sua eficácia (Park *et al.*, 2004; Chuang *et al.*, 2013).

Park e colaboradores (2002) testaram a EA na concentração de 50 mg/L de cloro residual frente a *Campylobacter jejuni* e não recuperaram o microrganismo após o tratamento. O pH 2,57 e o ORP 1082 mV pode explicar uma eficácia maior que a encontrada nesse estudo, visto que o pH e o ORP também influenciam na ação bactericida. No mesmo estudo, os autores testaram a EA e cloro diluído em água, ambos na concentração de 25 ppm. A EA teve uma maior eficácia quando comparada ao cloro, o que pode ser justificado pelo fato de possuir ORP e outros radicais livres em sua composição. Esse resultado é importante, pois demonstra que a EA possui um melhor efeito bactericida em relação ao cloro. Por outro lado, Abadias *et al.* (2008) não verificaram diferença na redução da contagem de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. innocua* e *E. carotovora* quando comparado EA a 50 ppm e água clorada a 120 ppm. Da mesma forma, Lindsey *et al.*, (2009) não observaram diferença significativa de redução da contagem de *E. coli* O157:H7 em folhas de alface utilizando EA (50 ppm) e cloro (200 ppm).

Guentzel e colaboradores (2008) testaram a eficácia da EA nas concentrações de 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm e 120 ppm com tempo de contato de 10 minutos. Os microrganismos estudados foram *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Enterococcus faecalis* na concentração de 10^8 UFC/mL. Os autores verificaram redução da contagem microbiana para todos os isolados, independente da concentração testada. Ao testar a EA em uma faixa de pH mais próxima à neutralidade (6,3 – 6,5), observaram que a EA também possui ação bactericida mesmo não estando com um pH ácido. O mesmo pôde ser constatado no presente trabalho com o uso da EA a 50 ppm, em que o produto mostrou-se eficaz no controle de *S. Heidelberg* em condições de pH próximo à neutralidade.

É sabido da importância da higiene das caixas de transporte de aves, para evitar a contaminação cruzada entre os lotes. Considerando que o transporte dos animais até o matadouro-frigorífico é de muito estresse, há o aumento da excreção de fezes e consequentemente de patógenos como a *Salmonella* spp. (BERCHIERI, 2009). Diante desta problemática, Zang *et al.* (2015) verificaram a eficácia da EA em um pH próximo à neutralidade, na concentração de 50 ppm contra a *S. Enteritidis* em caixas de transporte de aves, observando redução significativa da contagem microbiana. Estes resultados estão

de acordo com o obtido no presente estudo, e estimulam a utilização da EA na lavagem de caixas visando reduzir a contaminação por *S. Heidelberg*, cuja fonte de infecção pode estar relacionada a estas caixas.

De acordo com a Portaria nº 1, de 21 de fevereiro de 1990 do MAPA, ovos destinados à industrialização devem ser previamente lavados, observando os requisitos estabelecidos pelo Serviço de Inspeção Federal para o procedimento mencionado, sendo que se recomenda a não utilização de compostos de cloro em níveis superiores a 50 ppm como sanitizante na água de lavagem de ovos em natureza. Visto que na concentração de 50 ppm, 5 minutos de contato reduziram a contaminação de SH, os resultados obtidos nesse estudo e em outros previamente citados, sugerem a utilização da EA na lavagem de ovos, buscando a redução de sua contaminação. O teste nesse trabalho foi realizado a 4°C, contudo a temperatura para lavagem de ovos é de 35° C a 45° C. Considerando que o efeito antimicrobiano da AE é mais pronunciado em temperaturas mais elevadas, assim como o ocorre com os desinfetantes, estima-se que este produto possa também apresentar-se uma boa alternativa para a indústria de ovos.

Al Holy e Rasco (2015) desenvolveram um estudo no qual inocularam *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, e *L. monocytogenes* em diferentes matrizes alimentícias. Obtiveram resultados de redução, semelhante a esse trabalho, no entanto nenhum tratamento eliminou completamente a contaminação, o que pode ser explicado pela grande quantidade de matéria orgânica presente nos alimentos. É importante destacar que no trabalho desenvolvido com *S. Heidelberg*, mesmo na presença de matéria orgânica, a EA foi eficiente nas três concentrações testadas, possuindo boa efetividade contra o microrganismo mesmo em baixas concentrações. Zang *et al.*, (2015) verificaram que um tempo maior de contato com o agente melhora a eficácia do produto, corroborando nossos resultados, já que o uso de 50 ppm por 40 minutos permitiu uma maior redução de *S. Heidelberg* ao comparar com 5 minutos de contato.

Quando os isolados de *S. Heidelberg* foram testados com uma concentração de 200 ppm, os resultados foram ainda mais favoráveis. Dos 30 isolados, 86,6%, (26/30) foram sensíveis a EA, não se evidenciando crescimento bacteriano. Nas 13,4% amostras restantes, (4/30) foi verificado crescimento, contudo a contagem microbiana foi baixa ($1,3 \times 10^2$ UFC/mL) após 10 minutos de contato a 25°C quando comparado ao controle sem tratamento ($6,9 \times 10^4$ UFC/mL). Chuang *et al.*, (2013) constataram que a EA a 200 ppm também foi efetiva frente a isolados de *E. coli* e *Bacillus subtilis*.

Este resultado é importante, pois estimula a utilização da EA a 200 ppm como produto alternativo aos desinfetantes comuns após a etapa de limpeza, como parte do processo de higienização. Outro estudo realizado com EA a 200 ppm demonstrou que houve uma maior redução da contaminação conforme o aumento do tempo de contato (5, 10, 20 e 30 minutos) (LEE *et al.*, 2014). Corroborando com esse resultado, Ju (2016) também verificou que houve uma maior redução microbiana com a EA estando a 200 ppm quando comparada a 100 ppm.

Além da sua eficácia como antimicrobiano e ser de fácil manuseio, a EA não é tóxica (HUANG YU-RU *et al.*, 2008). O teste qualitativo (BRASIL, 1993) ratifica os resultados do teste quantitativo, uma vez que houve a turvação. No entanto, aos 10 minutos de contato, 53,6% dos isolados foram sensíveis a EA, o que é uma grande redução visto que nas outras concentrações 100% dos isolados tiveram crescimento no caldo BHI. A técnica de quantificação é melhor quando se pretende avaliar a atividade antimicrobiana de um produto, já que considera a redução da contagem, ao passo de que o teste qualitativo só avalia a inativação ou não do microrganismo pelo produto.

Os isolados de *S. Heidelberg* eram de mesma origem, porém de anos distintos (2006 e 2016). No entanto, não foi observada nenhuma diferença de resistência a EA entre eles, diferente do que ocorreu no estudo de Bassani (2017), em que os mesmos isolados no teste de susceptibilidade a antibióticos, sendo que os isolados de 2016 foram mais resistentes que os de 2006. Isso pode ser explicado pelo fato da EA não ser utilizada na produção avícola ou frigoríficos, não sendo verificados relatos de resistência até o momento.

É sabido da importância e da preocupação com bactérias resistentes aos antimicrobianos (WHO, 2014). Frente a isso, sendo a EA produzida a partir de sal e água, e o fato de não ser uma reação permanente, ocorrendo a dissociação das moléculas, a torna um produto que não prejudica ou degrada o ambiente. O fato da solução voltar aos compostos iniciais pode diminuir o efeito de resistência, característica extremamente desejada em se tratando de um produto com poder bactericida. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para verificar essas características.

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi reportada a sensibilidade da *Salmonella* Heidelberg isolada de fontes avícolas, frente a água eletroquimicamente ativada.

1. Em todas as concentrações da EA 5, 50 e 200 ppm, os 30 isolados testados foram sensíveis, exceto aos 5 ppm em 40 minutos.
2. A água eletroquimicamente ativada é uma possível alternativa a outros produtos liberadores de cloro, visto que foi efetiva na inativação de *S. Heidelberg*.
3. À medida que a concentração de cloro livre da EA e o tempo de contato aumentam, aumenta a inativação de *S. Heidelberg*.
4. A EA não elimina totalmente a *S. Heidelberg*, apenas reduz sua carga microbiana.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Avaliar a atividade da EA frente a SH em fontes alimentícias.
2. Realizar testes sensoriais em produtos testados com EA.
3. Avaliar a atividade da EA frente a outros patógenos alimentares e também bactérias deteriorantes.
4. Avaliar a atividade da EA na remoção e anti formação de biofilmes microbianos.

REFERÊNCIAS

ABADIAS, M., *et al.* Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, 123:151–158, 2008.

ABPA- Relatório Anual 2017. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Disponível em:
<http://abpa.br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf>. Acesso em dez. de 2017.

ANDRADE N.J. 2008. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.

AKBAS, M.Y., OLMEZ, H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on Iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. **Letters in Applied Microbiology**, 44, 619–624, 2007.

AL-HAQ, M.I. *et al.* Disinfection effects of electrolyzed water on suppressing fruit rot of pear caused by *Botryosphaeria Berengiana*. **Food Research International**, 35, 657-664. 2002.

AL-HOLY, M.A. & RASCO, B.A. The bactericidal activity of acidic electrolyzed oxidizing water against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* thiphymurium, and *Listeria monocytogenes* on raw fish, chicken and beef surfaces. **Food Control**, v.54, p.317–321, 2015.

ALTERTHUM, F. Controle dos micro-organismos/Origem e natureza química dos principais agentes antibacterianos/Mecanismos de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, p. 57-86, 2015.

AZEVEDO N.F & CERCA N. **Biofilmes na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Porto, Portugal: Publindústria Edições Técnicas, pp 396, 2012.

BASSANI, J. **Eficácia de sanitizantes e susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* Heidelberg isoladas de fontes avícolas em 2006 e 2016**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

BERCHIERI, J.A. *et al.* **Doenças das aves**. São Paulo. Facta, 2009.

BORSOI, A. **Inoculação de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Enteritidis em pintos de corte para avaliação da morfometria cecal, invasibilidade, persistência de excreção fecal e o uso de ácidos orgânicos e óleos essenciais no controle de *Salmonella* Enteritidis**. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009.

BRAGG, R.; JANSEN, A.; COETZEE, M.; VAN DER WESTHUIZEN, W.; BOUCHER, C. Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, mar. 2014.BRASIL.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 12, de 02 de janeiro de 2001. Padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**, Maio de 2017. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017>> Acesso em: nov. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 101, de 17 de agosto de 1993. Métodos de análise microbiológica para alimentos. **Diário Oficial da União**, DF, 17 de agosto de 1993, Seção 1, p. 11937.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, 5 de março de 1999, seção 1, p. 17.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº70, de 06 de outubro de 2003. Aprova o Programa de redução de patógenos - monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus. **Diário Oficial da União**, DF, 10 de outubro de 2003b, Seção 1, p. 226.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 1, de 21 de fevereiro de 1990. Normas gerais de inspeção de ovos e derivados. **Diário Oficial da União**, DF, 06 de março de 1990, Seção 1, p. 4321.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Normativa nº 26, de 09 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. **Diário Oficial da União**, DF, 10 de julho de 2009, Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. **Aprovação dos Produtos Antimicrobianos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/27931>> Acesso em: out. 2017.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. European Standard EN 1040:2005. **Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative - suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics: test method and requirements** (phase 1). London, 2006.

CAO W. *et al.* Efficiency of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella* enteritidis and its contaminated shell eggs. **International Journal of Food Microbiology**, 130:88–93, 2009.

CARDOSO A. *et al.* Ocorrência de *Salmonella* spp. Em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil no período de 2000 a 2010. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.24, n.0 2015.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Salmonella surveillance**: annual summary, 2006. U. S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, GA, 2008.

CHUANG C.Y. Inactivation efficiency to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* bacterial aerosol of spraying neutral electrolyzed water. **Journal of the Air & Waste Management Association**, 63:12, 1447-1456, 2013.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 8. Ed. Wayne, PA, 2003.

COLLA, F. L.; RODRIGUES, L. B.; DICKEL, E. L.; BORSOI, A.; NASCIMENTO, V.P.; SANTOS, L. R. Avaliação in vitro de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 289-292, 2012b.

CONY, A. V.; ZOCHE, A. T. Manejo de frango de corte. In: MENDES, A.A; NAAS, I. A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: Facta, 2004, p.117-136.
CONTRERAS, C. J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K. M. V. A. B; MIYAGUSKU, L. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Varela, 1. ed., 210 p., 2003.

DICKEL, E.L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de Salmonella em carcaças de frango para o controle higiênico sanitário do processo de abate**. 2004. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DING T., *et al*, Response surface modelling of *Listeria monocytogenes* inactivation on lettuce treated with electrolyzed oxidizing water. **Journal of Food Process Engineering**, 34, pg. 1729-1735, 2010.

DUTIL L., *et al*. Ceftiofur Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg from Chicken Meat and Humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, Jan; 16(1): 48–54, 2010.

EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 1, n. 13, 169 p., 2015.

EFSA. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 14, n. 2, 207 p, 2016.EFSA, European Food Safety Authority. Salmonella. 2017. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella> > Acesso em: novembro de 2017.

European Communities (2013) The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual Report 2013.

European Communities (2014) The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual Report 2014.

FDA- Food and Drugs Administration. Department of Health and Human Services, Part 178 Indirect Food Additives: Adjuvants, Producers AIDS and Sanitizers. **Code of Federal Regulation**. Title 21, v.3. 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607 p.

KONG, F.K.; CHEN, C.H.; COOPER, M.D. Reversible Disruption of Thymic Function by Steroid Treatment. *J. Immunol.* v. 168; 6500-6505, 2002.

GÓMEZ-LÓPEZ V. *et al.* Operating conditions for the electrolytic disinfection of process wash water from the fresh-cut industry contaminated with *E. coli* O157:H7, **Food Control** 29, 42 e 48, 2013.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th Edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **Institute Pasteur**, Paris, 2007. Disponível em: <<https://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>> Acesso em: nov. 2017.

GUENTZEL, J.L. *et al.* Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. **Food Microbiology** 25, 36-41, 2008.
HOFER, E.; FILHO, S. J. S.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 55-62, jun. 1997.

HUANG YU-RU *et al.* Application of electrolyzed water in the food industry. **Food Control**, 19, 329–345, 2008.

IZUMI H. *et al.* Electrolyzed water as a disinfectant for fresh-cut vegetables. **Journal Food Science.**, 64, pg. 536-539, 1999.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JU S.Y. *et al.* Does electrolyzed water have diferente sanitizing effects than sodium hypochlorite on diferente vegetable types? **British Food Journal**, Vol. 119 Issue: 2, pp.342-356, 2016.

KIURA H. *et al.* Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration. **International Journal of Food Microbiology Methods**, 49, pg. 285-293, 2002.

KIM C. *et al.* Roles of oxidation- reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. **Journal of Food Protection**. 63, 19 – 24, 2000a.

KIM C. *et al.* Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**. 61, 199-207, 2000b.

KIM, C., HUANG, Y.-C., BRACKETT, R.E., LIN C.-S. Efficacy of electrolyzed oxidizing water in inactivating *Salmonella* on alfalfa seeds and sprouts. **Journal of Food Protection** 66, 208–214, 2003.

KUANA, S. L. Limpeza e desinfecção de instalações avícolas. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas/SP: FACTA, 2 ed., p. 21-38, 2009.

LANGSRUD, S.; SIDHU, M. S.; HEIR, E.; HOLCK, A. L. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 283-290, jun. 2003.

LEE N.Y. *ET AL.* Decontamination efficacy of neutral electrolyzed water to eliminate indigenous flora on a large-scale of cabbage and carrot both in the laboratory and on a real processing line. **Food Research International**, 64, 234-240, 2014.

LINDSEY A. K. *et al.* Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology** 132, 134–140, 2009.

LORETZ, M., R. STEPHAN, AND C. ZWEIFEL. Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: a literature survey. **Food Control**, 21:791- 804, 2010.

MACEDO, J. A. B.; OLIVEIRA, F. S. Desinfecção secundária: o estado da arte do processo desinfecção em ETAs, com redução de custos operacionais e garantia da qualidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 3, n. 2, mar./jun. 2010.

MILLES, A. A. L. & MISRA, S. S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, p. 732-749, 1938.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MELO, A. D. B. O futuro dos antimicrobianos na produção animal. **Avicultura Industrial**, n. 07, ano 105, Ed. 1235, p. 56-58, 2014.

MORAES, M.S.V.; ANDRADE, N.J.; CHAVES, J.B.P. *et al.* Isolament of aerobic mesofilicand termofilic spores in equipments of poultry slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, p.325-329, 1997.

MORGULIS, M. S. F. A.; SPINOSA, H. S. Antimicrobianos: Desinfetantes. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S., GORNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura**. 1 ed., São Paulo/SP: Roca, 2005, p. 105-113.

NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R.; CARDOSO, M. O. **Qualidade microbiológica dos produtos avícolas**. II Simpósio Goiano de Avicultura da Associação Goiana de Avicultura e Escola de Veterinária da UFG, p. 13-17, 1996.

PARK E.J. *et al*, Effects of organic matter on acidic electrolysed water for reduction of foodborne pathogens on lettuce and spinach. **Journal of Applied Microbiology**, 105, pg. 1802-1809, 2008.

PARK, H., HUNG Y.C., CHUNG D. Effects of chlorine and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, 91, 13-18, 2004.

PARK H., HUNG Y.C, BRACKETT R.E. Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. **International Journal of Food Microbiology**, 72, 77-83, 2002.

PARK, B.; CHEN, Y.R.; NGUYEN, M. Multispectral Image Analysis Using Neural Network Algorithm for Inspection of Poultry Carcasses. **Journal of Engng. Researche**, v.69, p. 351-363, 1998.

PAULINO, C. A. Antissépticos e desinfetantes. In: SPINOSA, H.; GORNIK, S.; BERNARDI, M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**, 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 441-447.

RADICAL WATERS. Disponível em: <<http://www.radicalwaters.com/>>; Acesso em: outubro de 2017.

RODRIGUEZ, A.V.; OCHOA, I.M. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.47, n.1-2, p. 25-42. 2005.

ROSSONI E.M.M.; GAYLARDE C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International journal of food microbiology**, 61: 81-85, 2000.

SILVA, C.F., GEHLEN, S.S.; WEBBER, B. *et al*. Biofilm Former *Salmonella* Enteritidis are Multiresistant to Antibiotics. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, p.1229. 2005

TANAKA N., *et al*. The effect of electrolyzed strong acid aqueous solution on hemodialysis equipment. **Artificial Organs**, 23, pg. 1055-1062, 1999.

THORN, R.M.S.; *et al*. Electrochemically activated solutions: evidence for antimicrobial efficacy and applications in healthcare environments. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual 2012**. Brasília, p. 01-113, 2012.

USDA-FSIS. **Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products**. 2017. Directive 7120.1 Rev. 42. Disponível em: <<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/bab10e09-aefa-483b-8be8-809a1f051d4c/7120.1.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em setembro de 2017.

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 239 p.

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**, Geneva, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en>> Acesso em: jun. 2017.

WHO. World Health Organization. Salmonella (non-typhoidal). 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>> Acesso em: dez. 2017.

WHO. World Health Organization. Health Topics: Salmonella. 2017a. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/salmonella/en/> Acesso em: novembro de 2017.

XU, G., *et al.* Combined effect of electrolyzed oxidizing water and chitosan on the microbiological, physicochemical, and sensory attributes of American shad (*Alosa sapidissima*) during refrigerated storage. **Food Control**, 46, 397- 402, 2014.

ZANG Y. T. Modeling disinfection of plastic poultry transport cages inoculated with *Salmonella enteritidis* by slightly acidic electrolyzed water using response surface methodology. **Poultry Science**, 94:2059–2065, 2015.

ZENG X. *et al.* Studies on disinfection mechanism of electrolyzed oxidizing water on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, 75 pg. M253-M260, 2010.

APÊNDICE A – Isolados de *S. Heidelberg*: ano de isolamento e origem

Identificação	Ano de isolamento	Origem
1	2006	Suabe de cloaca
2	2006	Suabe de cloaca
3	2006	Suabe de arrasto
4	2006	Carça
5	2006	Carça
6	2006	Suabe de arrasto
7	2006	Suabe de arrasto
8	2006	Suabe de cloaca
9	2006	Carça
10	2006	Carça
11	2006	Suabe de cloaca
12	2006	Carça
13	2006	Suabe de cloaca
14	2006	Carça
15	2006	Carça
16	2006	Carça
17	2006	Carça
18	2006	Carça
19	2006	Suabe de cloaca
20	2006	Carça
21	2016	Suabe de arrasto
22	2016	Suabe de arrasto
23	2016	Suabe de arrasto
24	2016	Suabe de arrasto
25	2016	Suabe de arrasto
26	2016	Suabe de arrasto
27	2016	Suabe de arrasto
28	2016	Suabe de arrasto
29	2016	Suabe de arrasto
30	2016	Suabe de arrasto