

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PRODUÇÃO, TECNOLOGIA E HIGIENE EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**Atividade antimicrobiana da água eletroquimicamente ativada adicionada de ácidos orgânicos frente a *Salmonella* Heidelberg aspergida sobre carcaças (peito) de frango**

**Autora: Daiane Elisa Wilsmann**

**Porto Alegre**

**2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PRODUÇÃO, TECNOLOGIA E HIGIENE EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**Atividade antimicrobiana da água eletroquimicamente ativada adicionada de ácidos orgânicos frente a *Salmonella* Heidelberg aspergida sobre carcaças (peito) de frango**

**Autora: Daiane Elisa Wilsmann**

**Orientador: Prof. Dr. César A. M. Avancini**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista em Produção, Tecnologia e Higiene em Alimentos de Origem Animal, pela Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Porto Alegre**

**2019**

CIP - Catalogação na Publicação

Wilsmann, Daiane Elisa

Atividade antimicrobiana da água eletroquimicamente  
ativada adicionada de ácidos orgânicos frente a  
Salmonella Heidelberg aspergida sobre carcaças (peito)  
de frango / Daiane Élisá Wilsmann. -- 2019.

28 f.

Orientador: César Augusto Marchionatti Avancini.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Veterinária, Produção, tecnologia e higiene em  
alimentos de origem animal, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Água Eletroquimicamente Ativada. 2. Frango de  
corte. 3. Salmonella Heidelberg. I. Avancini, César  
Augusto Marchionatti, orient. II. Título.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho  
a meus pais Mildi e Sinécio.  
Obrigada  
por nunca deixarem  
de acreditar em mim!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e sua beleza de sonhar e realizar.

Aos meus pais por sempre terem me incentivado, me permitido sonhar e acreditar em mim. A minha família por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao professor César Avancini pela orientação.

A empresa *American Nutriets*<sup>®</sup> pela disponibilidade de trabalhar com seu produto.

## RESUMO

A *Salmonella* spp., é um dos patógenos mais importantes na avicultura, sendo a *Salmonella* Heidelberg (SH) um sorovar frequentemente isolado e que vem destacando-se por seu potencial zoonótico e resistência aos desinfetantes. Diante da necessidade de se produzir um alimento inócuo, busca-se alternativas e produtos que tenham um efeito bactericida, sem comprometer a segurança e as características dos alimentos, bem como afetar a saúde do consumidor. A água eletroquimicamente ativada (EA) é um composto bactericida produzido a partir da eletrólise de sal e água. Os geradores EA possuem membranas de eletrólise e produzem um composto com o cloro livre ácido hipocloroso, além de outros radicais livres. Esse composto (EA) vem destacando-se por ser indicado como seguro e ambientalmente responsável. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de duas formulações EA com 50 ppm de cloro livre, acrescida de ácidos orgânicos (fórmulação 1: ácido cítrico 3,5%, ácido láctico 4% e ácido ascórbico 2,5%; fórmulação 2: ácido cítrico 5%, ácido láctico 10% e ácido ascórbico 5%), frente a *S. Heidelberg* aspergida ( $10^3$  UFC/mL) em carcaças de frango de corte. Foram adquiridos 20 cortes de peito de frango no varejo local, e a contaminação dos cortes foi realizada por aspersão durante 60 segundos. Após 30 minutos da aplicação do inóculo, fez-se um suabe do lado direito do peito (controle positivo – sem tratamento). Após, os cortes foram tratados por aspersão com duas formulações da EA acrescida de ácido cítrico, láctico e ascórbico (10 cortes para cada fórmulação), durante 60 segundos a uma distância de 15 cm. Após 15 min de contato foi realizado um suabe no lado esquerdo de cada peito. Os suabes foram acondicionados em APT 0,1%, submetidos ao processamento através de diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ), seguido de contagem através do método *Drop-Plate* para *S. Heidelberg* em ágar XLD. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que as duas formulações de EA acrescidas de ácidos orgânicos foram eficazes no controle da contaminação dos cortes de frangos por SH reduzindo a densidade populacional para  $< 1$  UFC/mL, sugerindo sua utilização como composto antimicrobiano alternativo no setor avícola para controle deste patógeno.

Palavras-chave: *Salmonella*, água eletroquimicamente ativada,

## **ABSTRACT**

*Salmonella* spp. is one of the most important pathogens in poultry farming, and *Salmonella* Heidelberg (SH) is a serovar frequently isolated and has been noted for its zoonotic potential and resistance to disinfectants. In view of the need to produce an innocuous food, we seek alternatives and products that have a bactericidal effect, without compromising the safety and characteristics of food, as well as affect the health of the consumer. Electrochemically activated water (EA) is a bactericidal compound produced from the electrolysis of salt and water. EA generators have electrolysis membranes and produce a compound with free chlorine hypochlorous acid in addition to other free radicals. This compound (EA) has been noted for being indicated as safe and environmentally responsible. Therefore, the objective of this study was to evaluate the efficacy of two EA formulations with 50 ppm free chlorine plus organic acids (Formulation 1: 3.5% citric acid, 4% lactic acid and 2.5% ascorbic acid; 2: 5% citric acid, 10% lactic acid and 5% ascorbic acid) against *S. Heidelberg* ( $10^3$  CFU / mL) in broiler carcasses. Twenty cuts of chicken breast were purchased at the local retail, and the contamination of the cuts was performed by sprinkling for 60 seconds. After 30 minutes of application of the inoculum, a swab was made on the right side of the breast (positive control - no treatment). Afterwards, the cuts were treated by spraying two EA formulations plus citric, lactic and ascorbic acid (10 cuts for each formulation) for 60 seconds at a distance of 15 cm. After 15 min of contact a swab was performed on the left side of each breast. The swabs were packed in 0.1% APT, processed through serial dilution (10<sup>-1</sup> to 10<sup>-4</sup>), followed by counting by the Drop-Plate method for *S. Heidelberg* on XLD agar. The results obtained in this study demonstrated that the two EA formulations added with organic acids were effective in controlling the contamination of SH chickens by reducing the population density to < 1 CFU / mL, suggesting their use as an alternative antimicrobial compound in the poultry sector for control of this pathogen.

**Keywords:** *Salmonella*, electrochemically activated water

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Contagem de *Salmonella* Heidelberg nos peitos de frango, antes e após 15 min de contato com o tratamento com a Formulação 1 (EA 50 ppm de ácido hipocloroso + ácido cítrico 3,5%, ácido láctico 4% e ácido ascórbico 2,5%)...... 20
- Tabela 2 - Contagem de *Salmonella* Heidelberg nos peitos de frango, antes e após 15 min de contato com o tratamento com a Formulação 2 (EA 50 ppm de ácido hipocloroso + ácido cítrico 5%, ácido láctico 10% e ácido ascórbico 5%)...... 21



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Salmonella</i> Heidelberg e seu impacto na saúde pública .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Prevenção e controle de <i>Salmonella</i> Heidelberg.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Água eletroquimicamente ativada e ácidos orgânicos.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Água eletroquimicamente ativada e seus compostos químicos.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Ácidos orgânicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Local de estudo.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Isolado de <i>Salmonella</i> Heidelberg e preparação do inóculo .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>Preparo da solução bactericida.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>Inoculação de <i>Salmonella</i> Heidelberg em peitos de frango e tratamento com a solução antimicrobiana.....</b>	<b>18</b>
<b>3.5</b>	<b>Quantificação de <i>Salmonella</i> Heidelberg.....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>25</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é considerada uma das mais tecnificadas e desenvolvidas do mundo. O Brasil vem atingindo posição de destaque no mercado mundial, conquistando cada vez mais novos mercados importadores. No ano de 2016, 12,9 milhões de toneladas de carne de frango foram produzidas, consolidando o país como o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, ultrapassando a China. As exportações brasileiras chegaram ao valor de 4,3 milhões de toneladas neste mesmo ano, mantendo o país como maior exportador (ABPA, 2017).

Esse setor representa uma das maiores fontes de renda do país, principalmente nas regiões sul e sudeste, onde se concentram os maiores produtores de frango de corte. Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2016), mais de 3,5 milhões de empregos são gerados entre produtores, funcionários de empresas e profissionais vinculados direta e indiretamente ao setor.

Devido à grande importância da produção brasileira de produtos de origem avícola à economia do país, considerando o mercado exportador e todas as restrições sanitárias impostas, é imprescindível que haja programas de medidas de prevenção e controle de agentes potencialmente zoonóticos, os quais implicam na qualidade final do produto e lucratividade dos plantéis. Como consequência, Programas Boas Práticas de Produção, de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e de controle de qualidade como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), são essenciais para a obtenção de alimentos seguros (FORSYTHE, 2013).

Dentre os microrganismos cujo controle é preconizado pela indústria avícola, destaque-se os do gênero *Salmonella* spp.. A *Salmonella* Heidelberg pertence ao grupo das salmonelas paratíficas, podendo causar doenças em humanos e animais (BERCHIERI, 2009). Nos últimos anos, o ressurgimento específico deste sorovar e sua resistência a programas de tratamento tem gerado preocupações no mundo inteiro. No Brasil, Back (2015) realizou experimentos a campo na região sul e concluiu que o sorovar *S. Enteritidis*, o qual foi o de maior ocorrência em casos e surtos de salmonelose por anos, está sendo ultrapassado pelo sorovar *S. Heidelberg*. Das amostras coletadas, 44,7% foram positivas para *S. Heidelberg*, seguida por *S. Muenchen* (6,7%), *S. Schwarzengrund* (5,5%), *S. Livingstone* (3,6%), *S. Senftenberg* (2,4%), *S. Minnesota* (1,8%), *S. Mbandaka* (2,5%), *S. Anatum* (2,2%) e *S. Infantis* e *S. Agona*, ambas presentes em 1,9% das amostras.

Atualmente o controle de *Salmonella* spp. e outros microrganismos em abatedouros – frigoríficos de aves é realizado rotineiramente através de procedimentos de limpeza e de

desinfecção. Contudo, falhas durante este processo de higienização podem comprometer a inocuidade do produto final, o qual será destinado ao consumidor (KUANA, 2009). Sendo assim, alternativas seguras e eficientes devem ser buscadas com o intuito de assegurar um alimento seguro do ponto de vista microbiológico. A água eletroquimicamente ativada (EA) é uma tecnologia que produz 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 (HUANG YU-RU *et al.*, 2008; RADICAL WATERS, 2017).

Nesse contexto, o presente trabalho buscou verificar a eficácia da água eletroquimicamente ativada adicionada de ácidos orgânicos frente a isolados de *Salmonella* Heidelberg aspergidos sobre carcaça (peito) de frango.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Salmonella* Heidelberg e seu impacto na saúde pública

A *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Heidelberg pertence ao grupo de salmonelas paratíficas, podendo causar doença em animais ou em humanos. Um dos fatores que mais contribuem para a alta ocorrência de salmonelas paratíficas é o alto grau de diversidade antigênica que o gênero possui, facilitando sua adaptação a diversos hospedeiros (BERNDT *et al.*, 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 diferentes regiões do país (HOFER *et al.*, 1997). Borsoi *et al.* (2009) detectou a presença de *S. Heidelberg* em 9% dos isolados de carcaças de frango comercializadas no Rio Grande do Sul/BR.

A necessidade de controle de salmonelas paratíficas em frangos de corte não se deve unicamente para atender as barreiras sanitárias à exportação e risco em saúde pública, mas também devido a sua patogenicidade à saúde animal. Principalmente em aves no início do ciclo de produção, visto que 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).

Em humanos, a salmonelose é uma das doenças zoonóticas mais comuns e economicamente importantes. Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention* -CDC, 2013), estima-se que mais de 1,2 milhões de casos de salmonelose ocorram todo ano nos Estados Unidos, levando a mais de 23.000 hospitalizações e 450 mortes (RODRIGUES, 2013). Os principais sintomas de salmonelose são vômitos, diarreias, dores de cabeça e mal-estar. O maior risco é para as pessoas imunocomprometidas, pois podem vir a óbito (FORSYTHE, 2013).

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

Rápidos para Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais (do inglês *Food and Feed Safety Alerts - RASFF*), mostraram que a *S. Heidelberg* esteve entre os sorovares mais isolados nos anos de 2013 e 2014 na Europa (RASFF,2013; 2014), tornando a *S. Heidelberg* um dos sorovares mais freqüentes em alimentos de origem avícola para consumo humano.

## 2.2 Prevenção e controle da *Salmonella Heidelberg*

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 ou por contaminação cruzada durante o processo de abate (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. (BERCHIERI, 2009; COLLA, 2012b). Frente a esse desafio, no ano de 2003 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu o “Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus”. Este programa tem por objetivo verificar a prevalência de *Salmonella* spp. nos produtos avícolas, formar um banco de dados para análise dos índices de contaminação e monitorar constantemente o nível de contaminação desse patógeno em estabelecimentos de abate de aves. Estas medidas visam aumentar as garantias de inocuidade dos produtos avícolas no mercado interno e externo (BRASIL, 2003b).

Na indústria de alimentos, procedimentos de limpeza e desinfecção são rotineiramente realizados para controle de *Salmonella* e outros microrganismos. A higienização realizada após o término do processo produtivo compreende as seguintes etapas: 1) remoção de resíduos sólidos; 2) pré- enxágue com água quente (45°C); 3) aplicação de detergente; 4) enxágue com água; 5) aplicação de sanitizantes e 6) enxágue com água. O processo é realizado a cada 12 ou 24 horas, ao final do turno de abate, e são definidos como higiene pós-operacional. Entretanto, durante as operações, em tempos de 4 horas é realizada a higiene operacional, que consiste em um processo rápido de higienização nos intervalos na produção e que envolve etapas de remoção de resíduos sólidos e enxágue (CONTRERAS *et al.*, 2003; ANDRADE, 2008).

Segundo Andrade & Macedo (1996), uma vez realizada de forma correta, a limpeza reduz a contaminação microbiana no ambiente seja por meio da ação mecânica da água ou

bactericida dos detergentes. Entretanto, a quantidade remanescente de microrganismos pode ainda permanecer em níveis altos, fazendo-se necessária a continuidade da higienização através da desinfecção. O processo de desinfecção tem por objetivo inativar microrganismos patogênicos mediante utilização de agentes químicos bactericidas (destruição da bactéria na sua forma vegetativa) ou germicidas (eliminação de bactérias, fungos e esporos) (JAENISCH *et al.*, 2004).

É uma preocupação mundial a resistência dos microrganismos aos desinfetantes. Apesar da grande variedade de substâncias antibacterianas e seus mecanismos de ação amplamente diferentes, há apenas um número limitado de estratégias desenvolvidas pelas bactérias para desenvolver resistência. A resistência intrínseca pode ser uma característica própria, como por exemplo a composição da membrana e parede, a expressão de bombas de efluxo e a produção de enzimas de neutralização; é geralmente apresentada por bactérias Gram negativas, esporuladas, micobactérias e por vezes estafilococos (BOROWSKY *et al.*, 2006), ou a resistência pode ser alcançada por mutação, aquisição de nova informação genética por transferência horizontal de genes, expressão de genes previamente silenciosos, crescimento em biofilme e outras alterações fenotípicas (CHAPMAN, 2003).

Colla *et al.* (2012b) estudaram o perfil de resistência à clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético em isolados de *S. Heidelberg* obtidos em abatedouros. Os resultados encontrados indicaram que amostras isoladas no ano de 2005 apresentavam 100% de sensibilidade a amônia quaternária, enquanto que amostras do ano de 2009 apresentaram 33% de resistência ao mesmo sanitizante, ocorrendo uma progressão na resistência às substâncias. Nesse contexto, estudo sobre novas tecnologias e formas de prevenir e eliminar o risco de contaminação através de alimentos é necessário.

## **2.3 Água eletroquimicamente ativada e ácidos orgânicos**

### **2.3.1 Água eletroquimicamente ativada e seus compostos químicos**

A água eletroquimicamente ativada produz um biocida a partir da eletrólise de água e sal. Através de membranas de eletrólise, os geradores da água eletroquimicamente ativada produzem um composto não tóxico e biodegradável. Soma-se a isso a possibilidade de alta redução de custos, uma vez que os insumos utilizados são extremamente baratos e abundantes, sendo econômico, quando comparado aos produtos industrializados usualmente utilizados (HUANG YU-RU *et al.*, 2008; RADICAL WATERS, 2017).

Na primeira etapa do processo, o cloreto de sódio (NaCl) é diluído em água e armazenado em um recipiente, para posterior utilização na produção da EA. O gerador de EA recebe a solução de sal e de água potável por duas vias de acesso independentes. A mistura da solução de água com a solução salina recebe uma corrente elétrica na membrana no equipamento, que apresenta um elevado grau de compostos químicos que favorecem a reação, e transforma o eletrólito NaCl em estado ativado, formando radicais livres, ácido hipocloroso, entre outros compostos como cloro livre, através da modificação das estruturas iônicas que possuem atividade biocida (THORN *et al.*, 2011). A EA pode ter sua concentração de cloro livre ajustada de acordo com a utilização, o que pode ser feito através de diluição em água potável ou ajustando a amperagem do aparelho (RADICAL WATERS, 2017).

Os microrganismos quando entram em contato com essa solução serão expostos a oxidantes que sequestram elétrons dos seus compostos estruturais, levando a ruptura de ligações bioquímicas e perda de função. Um ambiente de alta osmolaridade desequilibra as concentrações de fluidos internas dos organismos em relação à solução, danificando estruturas da membrana (THORN *et al.*, 2011).

Atualmente a principal fonte de ácido hipocloroso utilizado nas indústrias matadouros-frigoríficos é obtida do desinfetante hipoclorito de sódio. Este produto é relativamente barato, seguro e de fácil manuseio. No entanto, falhas na utilização do produto como alterações de pH da água de dissolução e incorreções na concentração do composto químico são fatores limitantes na sua utilização, podendo reduzir sua ação (LAURY *et al.*, 2009).

### 2.3.2 Ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos estão naturalmente presentes em frutas e vegetais, ou são sintetizados por microrganismos na fermentação. Os ácidos possuem a capacidade de retardar o crescimento de alguns microrganismos e prevenir o crescimento de outros porque as bactérias, incluindo as causadoras de toxinfecções alimentares, não crescem em pH abaixo de 4. O modo de ação desses ácidos é atribuída a diminuição do pH, depressão do pH interno das células por ionização da molécula ácida não dissolvida ou interrupção do transporte de substrato pela alteração na permeabilidade da membrana celular (BEUCHAT, 1998).

O uso de ácidos na lavagem de carcaças não é uma prática comum, no entanto estudos vem demonstrando que o ácido láctico e o ácido cítrico nas concentrações de 1 a 3% reduzem *E. Coli* O157:H7, *Salmonella* e *Listeria* inoculadas em carcaças de frango e posteriormente

tratadas na forma de *spray*, visto que os ácidos causam acidificação intracelular (LAURY *et al.*, 2009).

O ácido cítrico provoca inibição microbiana, pois possui habilidade de difusão pela membrana celular. O ácido láctico diminui a concentração iônica dentro da membrana celular bacteriana, o que leva ao acúmulo de ácido dentro da célula, acidificando o citoplasma e comprometendo as atividades intracelulares (VASSEUR, 1999). Laury e colaboradores (2009) testaram o uso de ácidos na redução de *Salmonella* em carcaças de frango, obtendo 1.3 log UFC/mL de redução na forma de *spray* e 2.3 log UFC/mL na forma de imersão, sendo que não houve diferença significativa nos tempos de 5, 10 e 20 segundos de contato. Outros estudos também demonstram a ação do tratamento de ácido láctico a 2% na forma de *spray*, em carcaças de frango, reduzindo 2 log UFC/mL de *Salmonella* (YANG *et al.*, 1998).

O ácido ascórbico (vitamina C) é um antioxidante natural, cujo mecanismo de ação está associado com a remoção do oxigênio, através de reações químicas estáveis, tornando-o indisponível para atuar como propagador de reações de auto-oxidação (DAIUTO *et al.*, 2011). De acordo com Ismail *et al.* (2008), diversas pesquisas o reportam como um antioxidante eficaz na prevenção de alterações na cor de carne moída e carne suína irradiada, durante o armazenamento. O ácido láctico em solução tem sido utilizado como agente de descontaminação de carcaças, demonstrando efetiva capacidade inibitória sobre as bactérias presentes na superfície da carne (OUATTARA *et al.*, 1997).

Frente a isso, o objetivo do estudo foi avaliar a efetividade da água eletroquimicamente ativada, previamente produzida a 50 ppm de cloro livre e posteriormente acrescida de ácido cítrico, ácido láctico e ácido ascórbico para o tratamento de descontaminação cortes de peitos de frango. O objetivo de se adicionar os ácidos à EA deve-se ao fato de reduzir o pH e potencializar o efeito da mesma.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local do estudo

A água eletroquimicamente ativada foi produzida na empresa *American Nutrients*<sup>®</sup>. O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Tecnovates – Universidade do Vale do Taquari, onde as carcaças foram inoculadas com *Salmonella* Heidelberg e submetidas ao tratamento de aspersão com duas formulações da água eletroquimicamente ativada acrescida de ácido cítrico, ascórbico e lático. Posterior ao tratamento, a contagem de células viáveis de *Salmonella* Heidelberg foi realizada no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### 3.2 Isolado de *Salmonella* Heidelberg e preparação do inóculo

Foi utilizado um isolado de *Salmonella* Heidelberg de fonte avícola (suabe de arrasto) proveniente da região sul do Brasil, sendo isolado no ano de 2016. A cepa encontrava-se armazenada a -80° C em tubo tipo *ependorf* contendo caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI - Merck<sup>®</sup>) com glicerol na proporção 3:1. Para confirmação da pureza e reativação, foi realizado um repique, a partir do estoque, em ágar *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD - Merck<sup>®</sup>), seguido de incubação a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Após 24 horas, foi observada a presença de colônias compatíveis com *Salmonella* spp.

Uma colônia característica foi selecionada e inoculada em caldo BHI sob as mesmas condições de incubação anteriormente descritas. Uma alíquota do caldo BHI inoculado foi retirada e adicionada a um tubo contendo água peptonada tamponada 0,1% (APT – Himedia, Indian), 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, 10 mL da suspensão foi diluída consecutivamente em 100 mL de APT 0,1%, a fim de se atingir uma concentração de aproximadamente  $10^3$  UFC/mL.

O Caldo APT foi preparado conforme indicação do fabricante. Como composição neutralizadora, antes da esterilização, foram adicionados ao meio 10 mL de polissorbato TWEEN 80 (Sinth<sup>®</sup>), 2 g de lecitina de soja (DELAWARE<sup>®</sup>) e 2 g de tiosulfato de sódio, para cada litro do caldo, segundo British Standard Institution (2006), com adaptações.

### 3.3 Preparo da solução bactericida

A água eletroquimicamente ativada foi produzida com o aparelho Modelo EA-200<sup>®</sup>, com capacidade de produção de 200 litros/hora e imediatamente submetida à mensuração do cloro livre. O equipamento após acionado, é automaticamente abastecido com água potável e solução salina, oriundas de entradas distintas. Ocorre a reação de eletrólise e essa gera a solução EA, com os compostos biocidas. A concentração média de cloro livre da EA foi de 250 ppm, sendo esta diluída em água destilada estéril até estar ajustada na concentração de 50 ppm. As mensurações foram feitas com o equipamento Medidor de Cloro Múltiparâmetro – Micro 7 Plus (Exact<sup>®</sup>). Em seguida, para preparar a fórmulação 1, adicionou-se a EA o ácido cítrico 3,5%, ácido láctico 4% e ácido ascórbico 2,5%. Para preparar a Formulação 2, adicionou-se a EA o ácido cítrico 5%, ácido láctico 10% e ácido ascórbico 5%. A formulação 1 estava com um pH de 1,7 e a fórmula 2 pH 1,56. A definição dos ácidos bem como a concentração com que eles compuseram as formulações com água eletroquimicamente ativada foram definidas pela empresa, não tendo sido os critérios das escolhas informadas ao pesquisador executor do experimento. As duas fórmulas diferentes do produto foram testadas nas mesmas condições.

### 3.4 Inoculação de *Salmonella* Heidelberg em peitos de frango e tratamento com a solução antimicrobiana

A fim de avaliar o efeito da solução antimicrobiana frente a *S. Heidelberg* foi realizada a contaminação de cortes de peito de frango adquiridos no varejo local. Ao total foram utilizados 20 peitos de frango desossados e de uma mesma marca provenientes de matadouro - frigorífico com Sistema de Inspeção Federal (SIF). Os cortes foram colocados em bandejas estéreis, dentro de capela de fluxo laminar, buscando-se evitar a contaminação externa. A *S. Heidelberg* foi aspergida sobre os peitos de frango, com o auxílio de um borrifador estéril, de modo que todo o peito teve contato com o inóculo bacteriano. O procedimento foi realizado durante 60 segundos a uma distância de 15 cm dos cortes, tendo o procedimento sido executado com o cuidado para que toda a superfície estivesse aspergida. Esperou-se o tempo de 30 minutos para que houvesse a adesão da bactéria ao peito de frango. Em seguida, foi realizado um suabe em uma área delimitada de 5x5 cm do lado direito do peito. Os suabes

foram armazenados em tubos contendo 9 mL de APT 0,1% e refrigerados em caixa isotérmica a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  até o processamento.

Posteriormente, 10 cortes de peito foram tratados com a Formulação 1 da solução antimicrobiana e os outros 10 com a formulação 2. O tratamento foi realizado por aspersão do produto durante 60 segundos a uma distância de 15 cm. O tempo decorrido para o tratamento foi de 15 minutos, e passado esse tempo foi realizado suabe do lado esquerdo do peito de uma área de 5x5 cm. Os suabes foram armazenados em tubos contendo 9 mL APT 0,1% + neutralizador e refrigerados em caixa isotérmica a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  até o processamento.

### **3.5 Quantificação de *Salmonella* Heidelberg**

Os tubos contendo o suabe foram submetidos a agitação em vórtex por aproximadamente um minuto, em seguida uma alíquota de 1 mL foi transferida para 9 mL de solução salina 0,85%, sendo realizadas diluições seriadas até  $10^{-4}$ . A semeadura foi realizada em ágar XLD, pela técnica de *Drop-Plate* (MILLES & MISRA, 1938), inoculando-se 10  $\mu\text{L}$  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 RESULTADOS

A Formulação 1 do produto mostrou-se eficaz para todas as 10 repetições com 15 minutos de contato (Tabela 1). Após o tratamento não houve crescimento de *S. Heidelberg*.

Tabela 1 – Contagem de *Salmonella Heidelberg* nos peitos de frango, antes e após 15 min de contato com o tratamento com a Formulação 1 (EA 50 ppm de ácido hipocloroso + ácido cítrico 3,5%, ácido láctico 4% e ácido ascórbico 2,5%).

<b>Antes do tratamento</b>	<b>Após o tratamento</b>
1x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
1,4x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
2x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
6x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
3,5x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
5x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
4x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
5x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
8x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
1,3x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL

A formulação 2 do produto, assim com a 1, mostrou-se eficaz para todas as 10 repetições com 15 minutos de contato (Tabela 2). Após o tratamento não foi observado crescimento de *S. Heidelberg*.

Tabela 2 – Contagem de *Salmonella* Heidelberg nos peitos de frango, antes e após 15 min de contato com o tratamento com a Formulação 2 (EA 50 ppm de ácido hipocloroso + ácido cítrico 5%, ácido láctico 10% e ácido ascórbico 5%).

<b>Antes do tratamento</b>	<b>Após o tratamento</b>
1,2x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
2,3x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
1,9x10 <sup>2</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
1,3x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
9x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
2x10 <sup>4</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
5x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
2x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
2,2x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL
2,4x10 <sup>3</sup> UFC/mL	< 1 UFC/mL

## 5 DISCUSSÃO

O protocolo do teste determina a utilização de neutralizadores. Os neutralizantes têm a função de inativar resíduos da substância antimicrobiana, após a exposição do inóculo (REYBROUCK, 1998), inativando a substância antimicrobiana e evitando resultados falsos-negativos, expressos pela ausência de crescimento bacteriano devido somente a ação de inibição (CAMPOS et al, 2016). Como ressalva, a composição neutralizadora padronizada e utilizada tem a conhecida capacidade de neutralizar resíduos de ácido hipocloroso que por ventura viessem aderidos ao suabe e posteriormente colocado nos meios de diluição e de crescimento, não tendo sido determinado que inativaria igualmente os outros ácidos usados.

No ano de 2008 foi realizado um estudo, buscando *Salmonella* spp. em carcaças de frango de corte, em indústrias no estado de São Paulo, obtendo-se positividade em 1,7% das 116 amostras (TESSARI *et al.*, 2008). Frente a importância do controle de *Salmonella* spp. desde a criação das aves até a industrialização, visto seu potencial zoonótico e risco sanitário para as aves, buscaram-se alternativas e soluções para eliminar patógenos de toda cadeia produtiva de alimentos. A redução da contaminação de produtos avícolas, como carcaças de frango é muito importante. Um estudo utilizou ácido peracético e hipoclorito de sódio no controle de *Campylobacter* em carcaças de frango, concluindo que as concentrações de 100 ppm e 200 ppm de ácido peracético foram mais efetivos na redução da contaminação quando comparados a 25 e 50 ppm de hipoclorito de sódio (SMITH *et al.*, 2015). No presente estudo, uma concentração de 50 ppm de água eletroquimicamente ativada acrescida de ácidos orgânicos, reduziu a contaminação de *S. Heidelberg* da superfície do frango de corte.

O ácido láctico em solução tem sido utilizado como agente de descontaminação de carcaças, demonstrando efetiva capacidade inibitória sobre as bactérias presentes na superfície da carne. Avaliando o efeito do ácido láctico, em peito de frango desossado, Antunez e colaboradores (2006), verificaram que houve uma redução significativa de *Pseudomonas* spp. Wilsmann, 2018 (dados não publicados) avaliou a efetividade da EA *in vitro* contra *Salmonella Heidelberg* e obteve resultados que demonstram uma sensibilidade do patógeno diante do produto. No presente estudo, ácido cítrico, láctico e ascórbico foram adicionados na EA, possivelmente potencializando o seu efeito e obteve-se uma redução considerável de *S. Heidelberg*. Não é possível associar a redução microbiana exclusivamente aos ácidos ou a EA, visto que ambos não foram testados separadamente.

Cao e colaboradores (2009) testaram a EA frente a isolados de *S. Enteritidis* e constataram redução na contagem do patógeno após o tratamento, corroborando com os

resultados encontrados no presente estudo. Outros estudos demonstraram que a água eletroquimicamente ativada é eficiente frente a *E. coli* O157:H7, *Listeria Monocytogenes* (CAO *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2014; ZANG *et al.*, 2015). Esses resultados nos mostram a importância de estudos relacionados ao produto final destinado ao consumidor, como a carne de frango, visto que possui resultados eficientes frente a diferentes patógenos, os quais possuem importância em saúde pública.

Kim *et al* 2005, desafiaram *Campylobacter jejuni* com EA na forma de *spray* em carcaças e concluíram que combinar aspersões pré e pós *chiller* foram significativamente mais efetivas do que apenas após o *chiller*, enquanto que combinar aspersão com imersão não melhorou o efeito dos produtos. Os resultados do presente estudo, estimulam o estudo do produto na planta frigorífica, sob forma de *spray* e ou imersão de carcaças.

Northcutt *et al.* (2007) realizaram um estudo com carcaças de frango, adquiridas em varejo e inoculadas com conteúdo cecal de frangos de corte contendo *Salmonella* e *Campylobacter*. As carcaças foram tratadas com 50 ppm de água eletroquimicamente ativada e hipoclorito de sódio. Os resultados mostraram que em ambos os tratamentos houve uma redução significativa da contagem microbiana, mesmo com um tempo de tratamento de cinco e dez segundos.

Veasey S. e colaboradores (2016) avaliaram a efetividade da EA a 250 ppm de cloro livre, frente a um coquetel de *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, e *Salmonella* sp., *in vitro*. Os autores constataram uma redução de 6 logs com dois minutos de contato. No mesmo estudo, foi utilizada a EA a 25 e 250 ppm de cloro livre a fim de realizar a desinfecção em lâminas de corte, limpas e sujas. Os resultados mostraram um maior efeito bactericida nas lâminas limpas, o que reforça a importância de uma boa limpeza nos equipamentos e superfícies antes de realizar a desinfecção.

Apesar de não ter sido realizado o teste sensorial da carne após o tratamento, pode se observar que houve um enrijecimento da superfície tratada, bem como áreas esbranquiçadas.

Em futuros estudos, seria de grande valia realizar a avaliação isolada desses compostos pois há uma dificuldade em atribuir o efeito bactericida aos ácidos orgânicos ou à água eletroquimicamente ativada, visto que não foi realizado um controle de ambos separadamente, nas mesmas condições adotadas nesse trabalho, portanto o efeito antimicrobiano pode ser atribuído ao baixo pH e/ou ao ácido hipocloroso presente na água eletroquimicamente ativada.

Os resultados estimulam novos estudos relacionados ao produto no uso em alimentos e nos processos de desinfecção, uso da eletroquimicamente ativada na planta frigorífica, na forma de aspersão ou no *chiller*. No entanto, cabe ressaltar que as variáveis como concentração, tempo de contato e temperatura podem interferir na atuação destes antimicrobianos.



## 6 CONCLUSÕES

Concluiu-se que, nas condições do experimento, tanto a Formulação 1 quanto a Formulação 2 da EA acrescida de ácidos orgânicos foram capazes de inativar a *Salmonella* Heidelberg aspergidas sobre carcaças (peito) de frango, apresentando-se como potencial descontaminante de carcaças.

## REFERÊNCIAS

- 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](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. de; MACÊDO, J. A. B. de. Higienização na indústria de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1996, 179 p.
- ANDRADE N.J. 2008. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.
- ANTUNEZ, H. C. DA S. et al. EFEITO DO ÁCIDO LÁTICO E DA RADIAÇÃO GAMA NA ELIMINAÇÃO DE *Pseudomonas* spp . E NA PRODUÇÃO DE AMÔNIA EM PEITO DE FRANGO DESOSSADO RESFRIADO. **Alim. Nutr.**, v. 17, p. 367–372, 2006.
- BACK, A. Salmonella Heidelberg é líder absoluta entre variantes no sul do país. O Presente Rural, 11 de agosto de 2016. Disponível em: < <http://opresenterural.com.br/noticia/salmonella-heidelberg-e-lider-absoluta-entre-variantes-no-sul-do-pais/8105/> > Acesso em: jan. 2017.
- BERCHIERI, J.A. *et al.* **Doenças das aves**. São Paulo. Facta, 2009.
- BEUCHAT LR. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Food safety issues. Geneva, Switzerland: Food Safety Unit/World Health Organization. 42 p
- 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.
- 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. 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.
- CAMPOS F.L; VALENTE, P.; AVANCINI, C.A.M. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.4, p. 716 –725, out -dez 2016.
- 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.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271–276, 2003.

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., 2003, 210 p.

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.

CLSI. **Performance standars for antimicrobial susceptibilty testing**. 8. Ed. Wayne, PA, 2003.

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.

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

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

JAENISCH, F. R. F., COLDEBELLA, A, MACHADO, H.G.P., ABREU, P.G., ABREU, V.M.N., SANTIAGO, V. Importância da higienização na produção avícola. **Comunicado Técnico Embrapa** – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. p.05, 2004.

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.

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.

NORTHCUTT, J. K. et al. Recovery of Bacteria from Broiler Carcasses after Spray Washing with Acidified Electrolyzed Water or Sodium Hypochlorite Solutions. **Poultry Science**, v. 86, n. 10, p. 2239–2244, 2007.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 269 – 272, 1998.

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.

VASSEUR, C., L. BEVEREL, M. HEBRAUD, AND J. LABADIE. 1999. Effect of osmotic, alkaline, acid, or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 86:469– 476.

VEASEY, S.; MURIANA, P. Evaluation of Electrolytically-Generated Hypochlorous Acid ('Electrolyzed Water') for Sanitation of Meat and Meat-Contact Surfaces. **Foods**, v. 5, n. 2, p. 42, 2016.

YANG, Z. P., Y. B. LI, AND M. SLAVIK. 1998. Use of antimicrobial spray applied with an inside-outside bird washer to reduce bacterial contamination on prechilled chicken carcasses. *J. Food Prot.*

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.