

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

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ÁGUA ELETROQUIMICAMENTE
ATIVADA NA REDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS E NA
FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *SALMONELLA* HEIDELBERG EM
SUPERFÍCIES DE MATADOURO FRIGORÍFICO DE AVES**

Tese de Doutorado

Daiane Elisa Wilsmann

PORTO ALEGRE

2022

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

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ÁGUA ELETROQUIMICAMENTE
ATIVADA NA REDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS E NA
FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *SALMONELLA* HEIDELBERG EM
SUPERFÍCIES DE MATADOURO FRIGORÍFICO DE AVES**

Autora: Daiane Elisa Wilsmann

**Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutora em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva.**

**Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do
Nascimento**

Coorientador: Dr. Thales Quedi Furian

PORTO ALEGRE

2022

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Wilsmann, Daiane Elisa
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ÁGUA ELETROQUIMICAMENTE
ATIVADA NA REDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS E NA
FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE SALMONELLA HEIDELBERG EM
SUPERFÍCIES DE MATADOURO FRIGORÍFICO DE AVES / Daiane
Elisa Wilsmann. -- 2022.
103 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Coorientador: Thales Quedi Furian.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Água eletroquimicamente ativada. 2. Salmonella Heidelberg. 3. Biofilmes. 4. Desinfetantes. I. Pinheiro do Nascimento, Vladimir, orient. II. Quedi Furian, Thales, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DAIANE ELISA WILSMANN

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ÁGUA ELETROQUIMICAMENTE
ATIVADA NA REDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS E NA
FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *SALMONELLA* HEIDELBERG EM SUPERFÍCIES
DE MATADOURO FRIGORÍFICO DE AVES

Aprovada em MAIO 2022.

APROVADO POR:

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

Dr. Thales Quedi Furian
Coorientador

Prof. PhD Lenita de Cássia Moura Stefani
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm
Membro da Comissão

Dra. Karen Apellanis Borges
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser esse Pai de amor e Sua presença insubstituível em minha vida. 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.

Ao meu marido Nikolas, por ser o meu maior incentivador, por todos os dias que você me ajudou, com palavras positivas e abraços reconfortantes, obrigada por tudo.

Aos meus pais, Mildi e Sinécio, por apoiarem os meus sonhos, sendo o meu porto seguro, lugar de aconchego e amor. Ao meu irmão César, pela amizade, conselhos e incentivos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela disponibilidade, ensino e infraestrutura para realização deste projeto.

Agradeço ao meu orientador, professor Vladimir Pinheiro do Nascimento, pela oportunidade de realizar o doutorado na UFRGS, e pela confiança para o desenvolvimento deste projeto.

Ao coorientador Thales Quedi Furian, por todo suporte ao longo dos meus anos no CDPA, pela presença e orientação durante o projeto, dedicação, disposição de ajudar e conhecimento, muito obrigada!

À American Nutrients, em especial ao Abrahão e Claus, por acreditarem em mim e no projeto, agradeço por todo suporte financeiro e estrutural.

Agradeço a ajuda valiosa da Karen e Daiane Carvalho, que auxiliaram nas etapas do projeto e debateram ideias e metodologias, enriquecendo o meu conhecimento.

Aos colegas e amigos do CDPA, Gabriela Zottis, Bruna Webber, Karine Pontin, Vivian Lucca, Bruna Emery pela ajuda, apoio e amizade. Levarei vocês sempre comigo.

Ao Theodore e Harry, por serem minha companhia durante os longos meses de isolamento devido à pandemia.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração do projeto.

*I remember, You have always been faithful to me
I remember, even when my own eyes could not see
You were there, always there, with me*

(Lauren Daigle)

RESUMO

O desenvolvimento de novas tecnologias e a constante busca pelo aperfeiçoamento dos processos que garantam a segurança dos alimentos impulsionam estudos que visam conhecer melhor as características de patógenos que, quando presentes, causam impactos negativos ao setor avícola. *Salmonella* Heidelberg (SH) é o sorovar que se destacou nos últimos anos devido a sua alta prevalência e multirresistência aos antimicrobianos. O mundo está enfrentando um crescente surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos e a necessidade de reduzir o seu uso indiscriminado é fundamental, assim como a busca por produtos que diminuam os impactos ambientais. A água eletroquimicamente ativada (ECAW) é um biocida produzido a partir de água, sal e eletricidade, sendo o ácido hipocloroso (HClO) seu principal componente, além do cloro e outros radicais livres, aliado ao potencial oxi redutor. Buscou-se nesse estudo avaliar a eficácia da ECAW no controle de SH presente em biofilmes em superfícies utilizadas na cadeia produtiva e em carne de frango. Foram avaliados também outros detergentes e desinfetantes já utilizados pela indústria avícola. Avaliou-se a capacidade da ECAW na prevenção e remoção de biofilmes de SH em poliestireno em tempos de 10 e 20 minutos de ação e em temperaturas de 25°C e 37°C. A ECAW removeu até 57% do biofilme em 20 minutos de contato e preveniu até 58% a formação de biofilme de SH. Nos testes em aço inoxidável e polietileno, superfícies comumente utilizadas na indústria alimentícia, foi possível identificar a capacidade da SH em formar biofilme em temperaturas de 25°C e 37°C. A ECAW removeu até 5 log UFC de SH nestas superfícies, em 20 minutos de contato e na concentração de 200 ppm. Quando comparada aos desinfetantes já utilizados na indústria, não houve diferença entre os produtos. Além disso, o efeito residual da ECAW foi testado em superfícies de borracha a 25°C. A ECAW apresentou um efeito residual de até 9 horas frente a SH. O efeito bactericida da ECAW foi testado, na concentração de 50 ppm, em matriz cárnea na temperatura de 7°C por 5, 30 minutos e 1 hora, sendo a ECAW eficiente para redução da carga microbiana em diferentes tempos de contato com a matriz confrontada. A capacidade da ECAW de corroer o aço inoxidável e o ferro galvanizado, materiais utilizados na indústria alimentícia e produção animal, foi avaliado. A ECAW não apresentou um efeito corrosivo significativamente superior aos outros desinfetantes. Os resultados demonstram a eficácia da ECAW no controle de SH e reforçam a possibilidade dessa tecnologia em ser uma alternativa viável no controle de patógenos nos frigoríficos avícolas.

Palavras-chave: água eletroquimicamente ativada, *Salmonella* Heidelberg, biofilmes, susceptibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

The development of new technologies and the constant search for the improvement of processes that guarantee food safety leads to studies that aim to better understand the characteristics of pathogens that, when present, cause negative impacts on the poultry industry. Salmonella Heidelberg (SH) is the serovar that has stood out in recent years due to its high prevalence and multi-resistance to antimicrobials. The world is facing a growing emergence of antibiotic-resistant bacteria and the need to reduce their indiscriminate use is fundamental, as is the search for products that reduce environmental impacts. Electrochemically activated water (ECAW) is a biocide produced from water, salt and electricity, hypochlorous acid (HClO) is its main component, in addition to chlorine and other free radicals, combined with the oxi-reducing potential. The aim of this study was to evaluate the efficacy of ECAW in the control of SH present in biofilms on surfaces commonly used in the industry. Other detergents and disinfectants already used by the poultry industry were also evaluated. The ability of ECAW to prevent and remove SH biofilms in polystyrene was evaluated at the contact time of 10 and 20 minutes at temperatures of 25°C and 37°C. ECAW removed up to 57% of biofilm within 20 minutes of contact and prevented up to 58% of SH biofilm formation. In tests on stainless steel and polyethylene, surfaces commonly used in the food industry, it was possible to identify the ability of SH to form biofilms at temperatures of 25°C and 37°C. ECAW removed up to 5 log CFU of SH on these surfaces, in 20 minutes of contact and at a concentration of 200 ppm. When compared to disinfectants already used in the poultry industry, there was no difference between the products. In addition, the residual effect of ECAW was tested on rubber surfaces at 25°C. ECAW showed a residual effect of up to 9 hours against SH. The bactericidal effect of ECAW was tested, at a concentration of 50 ppm, in meat matrix at a temperature of 7°C for 5, 30 minutes and 1 hour, with ECAW being efficient to reduce the microbial load. The capacity of ECAW to corrode stainless steel and galvanized iron, materials used in the food industry and animal production, was evaluated. ECAW did not have a significantly superior corrosive effect than other disinfectants. The results demonstrate the effectiveness of ECAW in the control of SH and reinforce the possibility of this technology being a viable alternative in the control of pathogens in poultry slaughterhouses.

Keywords: electrochemically activated water, Salmonella Heidelberg, biofilms, antimicrobial susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da geração da água eletroquimicamente ativada e seus compostos.....	36
Figura 2	Micrografias obtidas através de microscopia confocal de varredura da formação de biofilme por <i>Salmonella</i> Heidelberg nas superfícies avaliadas: aço inoxidável - AISI 316 (A) e polietileno (B e C)	61
Figura 3	Micrografias obtidas através de microscopia confocal de varredura da formação de biofilme por <i>Salmonella</i> Heidelberg a 25°C, após o tratamento com água eletroquimicamente ativada.....	70
Figura 4	Micrografias obtidas através de microscopia confocal de varredura da formação de biofilme por <i>Salmonella</i> Heidelberg a 25°C, após o tratamento com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média (%) de remoção de biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg após o tratamento com água eletroquimicamente ativada (ECAW) e com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A) a 25°C e 37°C, conforme a variação da concentração do produto e do tempo de contato.....	44
Tabela 2	Média (%) de remoção de biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg após o tratamento com os detergentes alcalino e ácido a 25°C e 37°C, conforme a variação do tempo de contato e da concentração dos produtos.....	48
Tabela 3	Média (%) de prevenção da formação de biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg após o tratamento com água eletroquimicamente ativada (ECAW), com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A), detergentes alcalino e ácido por 24 horas, conforme a variação da concentração do produto e da temperatura.....	51
Tabela 4	Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm ⁻²) obtidas no ensaio de formação de biofilme por <i>Salmonella</i> Heidelberg, conforme a superfície de contato e a temperatura.....	57
Tabela 5	Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm ⁻²) após o tratamento do biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg em aço inoxidável e polietileno com a água eletroquimicamente ativada (ECAW) e com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A), conforme a variação da temperatura e do tempo de contato.....	63
Tabela 6	Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm ⁻²) após o tratamento do biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg a 25°C e 37°C com a água eletroquimicamente ativada (ECAW) e com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A), conforme a variação do tempo de contato e da superfície.....	

		66
Tabela 7	Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm ⁻²) após o tratamento do biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg por 10 e 20 minutos com a água eletroquimicamente ativada (ECAW) e com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A), conforme a variação da superfície e da temperatura de incubação.....	67
Tabela 8	Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm ⁻²) após o tratamento da borracha inoculada com <i>Salmonella</i> Heidelberg e tratada com a água eletroquimicamente ativada (ECAW), conforme a variação do tempo de contato com o produto.....	75
Tabela 9	Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC/g) após o tratamento de carne de frango crua contaminada com <i>Salmonella</i> Heidelberg com a água eletroquimicamente ativada (ECAW), conforme o tempo de contato.....	78
Tabela 10	Média da densidade de corrente de corrosão ($\log A/cm^2$) do aço inoxidável e do aço galvanizado na presença da água eletroquimicamente ativada (ECAW) e dos desinfetantes à base de cloreto de didecil dimetil amônio (A) e ácido peracético (D), conforme a concentração dos produtos.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AEOW	Água Eletroquimicamente Ativada Acidificada
AHL'S	N-Acil-Hemossiderina-Lactona
AI	Auto-Indutores
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT	Água Peptonada Tamponada
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i> (caldo cérebro-coração)
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAC	Comissão do <i>Codex Alimentarius</i>
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos)
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
Cl ⁻	Íons Cloro
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (Microscopia confocal a laser)
Cl ₂	Gás Cloro
CMM	Centro de Microscopia e Microanálise
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
DO	Densidade Óptica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECAW	Água Eletroquimicamente Ativada
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i> (substâncias poliméricas extracelulares)
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)

FAVET	Faculdade de Veterinária
H ⁺	Íons Hidrogênio
H ₂	Gás Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HClO	Ácido Hipocloroso
IN	Instrução Normativa
KWL	<i>Kauffmann-White-LeMinor</i>
Kg	Quilograma
LABCOR	Laboratório de Corrosão
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Na ⁺	Íons Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
O ₂	Gás Oxigênio
OCl ⁻	Hipoclorito
OCP	Potencial de Circuito Aberto
OH ⁻	Íons Hidróxido
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
ORP	Potencial de Redução
PCA	<i>Plate Count Agar</i> (ágar para contagem em placa)
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
ppm	Partes por milhão
QS	<i>Quorum-Sensing</i>
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i> (Sistema de Alerta Rápido para os Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais)
RS	Rio Grande do Sul
RJ	Rio de Janeiro
SAEOW	Solução Levemente Acidificada de Água Eletroquimicamente Ativada
SH	<i>Salmonella</i> Heidelberg
SIF	Serviço de Inspeção Federal
THM	Trihalometanos

TSA	<i>Tryptone Soy Agar</i> (ágar triptona de soja)
TSB	<i>Tryptone Soy Broth Without Dextrose</i> (ágar triptona de soja sem glicose)
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNIVATES	Universidade do Vale do Taquari
USDA - FSIS	<i>United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service</i> (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – Serviço de Inspeção e Segurança dos Alimentos)
XLD	<i>Xylose Lysine Deoxycholate</i> (xilose-lisina-desoxicolato)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
mV	Milivolt
nm	Nanômetro
n°	Número
%	Porcentagem
pH	Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Gênero <i>Salmonella</i>	22
3.2 <i>Salmonella</i> em saúde pública e os controles desenvolvidos pela cadeia avícola	23
3.3 <i>Salmonella</i> Heidelberg	25
3.4 Higiene na indústria de alimentos	27
3.4.1 O processo de higienização	27
3.4.2 Principais desinfetantes utilizados na indústria de alimentos	28
3.5 Biofilmes microbianos	30
3.6 Biofilmes na indústria alimentícia	32
3.6.1 Superfícies de adesão	33
3.7 Métodos alternativos para controle de biofilmes	34
3.7.1 Água eletroquimicamente ativada	34
3.8 Ensaios de polarização potenciostática	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Locais do estudo	41
4.2 Cepas de <i>Salmonella</i> Heidelberg	41
4.3 Produção da água eletroquimicamente ativada e preparo dos desinfetantes e detergentes	41
4.4 Análises estatísticas	42
5 EXPERIMENTOS	43
5.1 Experimento 1 – Remoção de biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg em microplacas de poliestireno	43
5.1.1 Materiais e Métodos	43
5.1.2 Resultados e Discussão	44
5.2 Experimento 2 – Prevenção da formação de biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg em microplacas de poliestireno	50
5.2.1 Materiais e Métodos	50
5.2.2 Resultados e Discussão	51

5.3 Experimento 3 - Formação de biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg em superfícies utilizadas na cadeia avícola em diferentes temperaturas	55
5.3.1 Materiais e Métodos	55
5.3.2 Microscopia eletrônica	56
5.3.3 Resultados e Discussão	57
5.4 Experimento 4 - Remoção de biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg de superfícies utilizadas na cadeia avícola	62
5.4.1 Materiais e Métodos	62
5.4.2 Microscopia eletrônica	63
5.4.3 Resultados e Discussão	63
5.4.3.1 Efeito da temperatura e do tempo de contato nos tratamentos das superfícies para a remoção de biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg	63
5.4.3.2 Efeito das superfícies na remoção do biofilme de <i>Salmonella</i> Heidelberg	66
5.4.3.3 Microscopia confocal de varredura a laser (CLMS)	69
5.5 Experimento 5 - Avaliação da viabilidade da água eletroquimicamente ativada e do desinfetante em superfícies de borracha	73
5.5.1 Materiais e Métodos	73
5.5.2 Resultados e Discussão	74
5.6 Experimento 6 – Ação da água eletroquimicamente ativada em carne de frango inoculada com <i>Salmonella</i> Heidelberg	77
5.6.1 Materiais e Métodos	77
5.6.2 Resultados e Discussão	78
5.7 Experimento 7 - Avaliação da densidade de corrente de corrosão estimada em ensaios de polarização potencioestática	81
5.7.1 Materiais e Métodos	81
5.7.2 Resultados e Discussão	82
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
7 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE A – Isolados de <i>Salmonella</i> Heidelberg utilizados no experimento	103

1 INTRODUÇÃO

O mercado avícola é um importante setor para a economia de diversos países, em especial para o Brasil. O país ocupa a posição de maior exportador mundial de carne de frango, sendo responsável, somente no ano de 2020, por mais de 35% da exportação mundial (ABPA, 2021). Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), a região sul do Brasil representou 64,37% da produção total de carne de frango obtida em 2020. Desse montante, o estado do Rio Grande do Sul (RS) foi responsável por 14,02% da produção (ABPA, 2021). Já o consumo *per capita* de carne de frango no Brasil aumentou de 42,84 Kg/habitante/ano em 2019 para 45,27 Kg/habitante/ano em 2020.

Neste contexto, tamanha importância da avicultura para a economia brasileira faz com que o setor tenha que cumprir com uma demanda de exigências relacionadas a questões que envolvem sanidade, bem-estar animal, produtividade e qualidade dos produtos gerados. A presença de microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp., afeta negativamente a indústria avícola, sendo o seu controle essencial desde a produção no campo, nos matadouros-frigoríficos até a obtenção do produto final. Esse patógeno possui relevância em saúde animal e pública, sendo os alimentos de origem avícola a principal fonte de transmissão. Aliado a isso, os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto à inocuidade e à qualidade dos produtos, levando à necessidade da adoção de medidas de controle mais rigorosas.

O gênero *Salmonella* pode ser dividido em dois grupos: tifoide, cujos hospedeiros são restritos, e não tifoide, grupo que não possui sorovares de *Salmonella* adaptados ao hospedeiro e que não ocasiona doenças sistêmicas. A epidemiologia complexa dessas salmoneloses engloba várias espécies de animais, além dos seres humanos, o que torna difícil o seu controle e favorece a ocorrência de infecções (ANDREATTI, 2020). Conforme dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Centers of Diseases Control and Prevention* - CDC) e da Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority* - EFSA), as salmoneloses são a maior causa de gastroenterites nos Estados Unidos e a segunda causa de enterites na Europa, afetando cerca de 88.000 pessoas por ano (CDC; EFSA, 2021). Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os principais sorovares encontrados em carcaças de frango e em aves vivas no Brasil são *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* e *S. Mbandaka* (BRASIL, 2012). Recentemente, *S.*

Heidelberg emergiu como um dos principais sorovares em surtos alimentares relacionados com o consumo de produtos avícolas (GIERALTOWSKI *et al.*, 2016; DEWI *et al.*, 2021).

Uma característica bacteriana agravante é que múltiplos sorovares de *Salmonella* possuem a capacidade de formar biofilmes em diferentes superfícies (WANG *et al.*, 2015; BORGES *et al.*, 2018; WEBBER *et al.*, 2019). Estas estruturas favorecem a sobrevivência bacteriana em ambientes hostis, como em matadouros-frigoríficos e em indústrias processadoras de alimentos. Biofilmes são um grande problema em saúde pública, pois a ruptura destas estruturas pode provocar a liberação de microrganismos patogênicos e, conseqüentemente, ocorrer a contaminação dos produtos. *S. Heidelberg* é capaz de produzir biofilmes, o que dificulta sua eliminação e reduz a ação de antimicrobianos, sendo essa uma preocupação na indústria avícola (BORGES *et al.*, 2018).

Além disto, a procura por compostos antimicrobianos eficazes e ambientalmente corretos tem-se mostrado expressiva nos últimos anos. O objetivo é diminuir os problemas da resistência antimicrobiana e melhorar a qualidade dos processos de higienização, reduzindo assim as chances de microrganismos patogênicos estarem presentes nos alimentos. Aliado a este fato, tem-se a necessidade de reduzir o uso indiscriminado de antimicrobianos sintéticos, tanto na medicina humana como na área veterinária. Frente a isso, a água eletroquimicamente ativada (ECAW) torna-se uma importante ferramenta a ser avaliada como uma alternativa aos desinfetantes comumente utilizados, já que resultados iniciais demonstraram que a ECAW é efetiva na redução de *S. Heidelberg* (WILSMANN *et al.*, 2019).

Nesse intuito, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da ECAW na remoção e na prevenção de biofilme por cepas de *Salmonella Heidelberg* (SH), e na redução da contagem bacteriana em carne de frango experimentalmente contaminada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliação da atividade antimicrobiana da ECAW frente a biofilmes formados por *Salmonella* Heidelberg de origem avícola em superfícies de equipamentos em frigoríficos avícolas e na redução da contaminação bacteriana da carne de frango.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinação da capacidade de formação de biofilme por cepas de *S. Heidelberg* de origem avícola em microplacas de poliestireno e em cupons de aço inoxidável e polietileno.
- Avaliação da eficácia da ECAW, de um desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio, de um detergente alcalino e de um detergente ácido na prevenção da formação de biofilmes de *S. Heidelberg* em microplacas de poliestireno em diferentes temperaturas de incubação, concentrações e tempos de contato.
- Avaliação da eficácia da ECAW, de um desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio, de um detergente alcalino e de um detergente ácido na remoção de biofilmes de *S. Heidelberg* em microplacas de poliestireno em diferentes temperaturas de incubação, concentrações e tempos de contato.
- Avaliação da eficácia da ECAW e de um desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio na remoção de biofilme de *S. Heidelberg* em cupons de aço inoxidável e de polietileno em diferentes temperaturas de incubação e tempos de contato.
- Avaliação da capacidade da ECAW em reduzir a contaminação por *S. Heidelberg* em carcaças de frango inoculadas experimentalmente.
- Avaliação do período de viabilidade da ECAW e de um desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio em superfícies de borracha.

- Avaliação da densidade de corrente de corrosão da ECAW estimada em ensaios de polarização potencioestática.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* está amplamente distribuído no ambiente, tendo sido inicialmente isolado e identificado por Daniel Elmer Salmon em 1885. *Salmonella* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos e com formato de bacilos curtos. A maioria das espécies é móvel (com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*), possuindo flagelos peritríquios. A partir da fermentação da glicose, a bactéria produz ácido e gás, porém é incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose. As espécies apresentam temperatura ótima de crescimento a aproximadamente 37°C (TORTORA *et al.*, 2012). Crescem em pH entre 4 e 9, sendo 7 o ideal, e são relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60°C após 15 a 20 minutos de exposição (FORSYTHE, 2013, RYAN; O'DWYER; ADLEY, 2017).

O gênero *Salmonella* é pertencente à família *Enterobacteriaceae*, a qual possui mais de 50 gêneros bacterianos, incluindo um grande número de patógenos, como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., entre outros. Estudos genéticos estimam que os genomas de *E. coli* e de *Salmonella enterica* possuam uma diferença de apenas 10% nas suas sequências de DNA, sugerindo que estas espécies tenham derivado de um ancestral comum há 100 milhões de anos (JONG *et al.*, 2012).

A classificação do gênero reconhecida atualmente inclui duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, a qual apresenta seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie *salamae* (II), *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subespécie *houtenae* (IV), *S. enterica* subespécie *indica* (VI). Essas subespécies podem ser diferenciadas bioquimicamente ou através de análise antigênica. Bactérias classificadas como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* representam 99,5% dos microrganismos isolados do gênero (GRIMONT; WEIL, 2007).

Além da classificação em espécies e subespécies, existe a classificação das cepas em sorogrupos. A bactéria *Salmonella*, assim como outras enterobactérias, possui antígenos O (somáticos) que correspondem à porção mais externa da cobertura da superfície das bactérias e antígenos H (flagelares), sendo essa uma estrutura filiforme delgada. Alguns grupos também possuem o antígeno Vi (capsular) (BRENNER *et al.*, 2000; TORTORA *et al.* 2012). Os antígenos O são polissacarídeos termoestáveis e podem

ser distinguidos pela sua diferente composição. Os antígenos H são constituídos por proteínas termolábeis e distinguem-se pelo teor de proteína dos flagelos. Cada antígeno O e H tem um número de código único e o sorogrupo é determinado baseado na combinação antigênica distinta de O e H (GRIMONT; WEILL, 2007). Atualmente já foram descritos mais de 2.600 sorovares através do esquema *Kauffmann-White-LeMinor* (KWL), caracterizando-se os diferentes sorovares do gênero com base em suas fórmulas antigênicas (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014). De todos os sorovares de *Salmonella* já descritos, menos de 100 são os responsáveis pela maioria das infecções humanas. Aproximadamente 60% dos sorovares isolados de diferentes fontes pertencem à subespécie *enterica* (GRIMONT; WEILL, 2007; LIBBY *et al.*, 2008).

3.2 *Salmonella* em saúde pública e os controles desenvolvidos pela cadeia avícola

Doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são definidas como doenças de natureza infecciosa ou tóxica, causadas por agentes que entram no organismo por meio da ingestão de alimentos ou água contaminados. A Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO) estima que anualmente as DTAs causem a perda da qualidade de vida de aproximadamente 33 milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente crianças com menos de cinco anos, e levando a óbito cerca de 420.000 pessoas. Especificamente, as doenças diarreicas são responsáveis pelo adoecimento de 550 milhões de pessoas e por causar 230.000 mortes todos os anos, sendo que os principais agentes etiológicos envolvidos são *Salmonella* não tifoides, *E. coli*, *Campylobacter* e Norovírus (WHO, 2018). Os sinais clínicos mais comuns que caracterizam os surtos de DTAs são: diarreia, dor abdominal, vômito e náuseas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Salmonella spp. é um dos principais agentes associados a DTAs em todo o mundo, causando grandes prejuízos anualmente (WHO, 2018; CDC, 2019). A salmonelose é uma doença alimentar comum e amplamente distribuída, sendo considerada a principal causadora de diarreia nos seres humanos (WHO, 2018). Segundo dados da EFSA, um em cada três casos e surtos alimentares ocorridos na União Europeia em 2018 foi causado por *Salmonella* (EFSA, 2019). Conforme dados do CDC, 1,35 milhões de pessoas ficam doentes anualmente, 26.500 são hospitalizadas e 420 morrem em decorrência de *Salmonella* spp. associada com DTAs nos Estados Unidos (CDC, 2022).

No Brasil, os principais microrganismos envolvidos em casos de DTAs são: *E. coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*. Contudo, cabe ressaltar que grande parte dos surtos não teve o microrganismo identificado entre os anos de 2009 e 2018, correspondendo a 66,4% dos casos totais. No Brasil, *Salmonella* spp. é responsável por aproximadamente 30% dos casos (BRASIL, 2018). De acordo com os dados nacionais da Vigilância Epidemiológica, no ano de 2018, 6.803 pessoas adoeceram, sendo identificados 503 surtos de DTAs, 731 pacientes hospitalizados e nove óbitos relacionados. Em 2018, a água foi o alimento suspeito identificado mais frequentemente (29,9%), seguida pelos alimentos mistos (23,4%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Dados do Ministério da Saúde apontam que no Brasil a maioria dos surtos são residenciais (BRASIL, 2018). 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, 2018).

No RS, *Salmonella* é responsável por aproximadamente 60% dos surtos de gastroenterite de origem infecciosa investigados (VEDTA, 2013). Entre 1980 e 2012, 4.071 surtos foram notificados no RS, sendo que 49.451 pessoas adoeceram e onze vieram a óbito.

Conforme o CDC, dentre os sorovares de maior relevância envolvidos em surtos de DTAs e relacionados a uma maior resistência antimicrobiana, destacam-se: *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Hadar* e *S. Heidelberg*, (CDC, 2016). Dentre as salmonelas que causam infecções em humanos, *S. Heidelberg* tem-se apresentado mais invasiva em comparação aos demais sorovares que podem ocasionar gastroenterite. Aproximadamente 13% dos pacientes com gastroenterite associada com *S. Heidelberg* desenvolvem infecção sistêmica (DEWI *et al.*, 2021; DUTIL *et al.*, 2010; NAKAO *et al.*, 2018). Além disto, em geral, este patógeno possui resistência à maioria das substâncias antimicrobianas, limitando as opções de tratamento em casos de salmoneloses (GIERALTOWSKI *et al.*, 2016; NISAR *et al.*, 2017; TAGG *et al.*, 2019).

Frente a esse desafio, legislações foram desenvolvidas para atender às exigências internacionais e garantir um produto inócuo aos consumidores. Em 1996, o Serviço de Inspeção e Segurança dos Alimentos (*Food Safety and Inspection Service -FSIS*), vinculado ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*Unites States Department of Agriculture - USDA*), estabeleceu o Programa de Verificação de *Salmonella* como parte do serviço de inspeção de patógenos. Com esse programa, foi

possível tomar medidas frente ao controle de *Salmonella* spp. em produtos e na indústria em geral (GAMBLE *et al.*, 2016).

Neste contexto, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou, em 2003, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que visa controlar importantes patógenos na avicultura, destacando-se os sorovares *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (BRASIL, 2003). Em 2003, também foi emitida a Instrução Normativa (IN) n° 70 que trata do Programa Nacional de Controle de Patógenos e visa conferir um controle maior sobre o processo de abate de carcaças de frangos para pesquisa de *Salmonella* spp, envolvendo todos os estabelecimentos de abate registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF). Esse monitoramento gera um banco de dados para análise dos índices de contaminação dos produtos avícolas, além de aumentar a garantia de qualidade (BRASIL, 2003b). Dessa forma, pode-se atender às exigências de segurança dos alimentos nos mercados interno e externo. De acordo com a IN n° 60, de 23 de dezembro de 2019, é necessária a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de produto (ANVISA, 2019).

Outro órgão importante no controle de patógenos é a Comissão do *Codex Alimentarius* (CAC) que, juntamente com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO) e a WHO, criaram diretrizes para o controle de *Salmonella* spp. em carnes de frango (FAO/WHO, 2019). Essas diretrizes servem de base para a elaboração da legislação interna e específica de cada país. 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; FAO, 2019).

3.3 *Salmonella* Heidelberg

O sistema intensivo de criação de aves favorece a introdução, a instalação, a permanência e a disseminação de salmonelas não tifoides ou paratíficas, as quais podem causar doença em animais e nos seres humanos. Dessa forma, a infecção paratífica aviária tornou-se um complexo problema ao setor avícola, pois a bactéria pode ser ou não patogênica para as aves e, especialmente, muito patogênica para os seres humanos (ANDREATTI, 2020). A introdução e disseminação de *Salmonella* não tifóide em aves pode estar relacionada tanto à transmissão vertical da bactéria a partir de reprodutoras

infectadas, quanto à transmissão horizontal a partir do contato direto com lotes infectados ou com fontes ambientais, como ração ou água potável contaminadas (VOSS-RECH *et al.*, 2019). Uma característica importante e complexa da epidemiologia da *Salmonella* spp. é que indivíduos infectados podem tornar-se portadores crônicos por vários meses. Diante de situações de estresse, ocorre a reativação e a multiplicação bacteriana com uma nova excreção do agente. Além disto, os patógenos envolvidos adquirem maior resistência aos antimicrobianos e sanitizantes ao longo dos anos (FORSYTHE, 2013).

Um dos fatores que mais contribuem para a incidência de salmonelas paratíficas é o alto grau de diversidade antigênica que o gênero possui, facilitando sua adaptação a diversos hospedeiros. Soma-se a isto o fato de que animais e insetos também podem carrear o patógeno (ANDREATTI, 2020). Assim, apesar de todos os esforços e programas de controle adotados no setor, observou-se uma ascensão de outros sorovares de *Salmonella* nos últimos anos na cadeia avícola, com destaque para o sorovar *S. Heidelberg* (SOUZA *et al.*, 2019; ANDREATTI, 2020).

Salmonella frequentemente coloniza aves sem presença de sinais clínicos, e *S. Heidelberg* estabelece uma condição semelhante à microbiota comensal das aves (DEWI *et al.*, 2021). Produtos alimentícios como ovos, carne de frango e derivados continuam sendo veículos importantes para a infecção humana (SHAH *et al.*, 2017; FERRARI *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019). Diferentes estudos demonstram uma alta prevalência de *Salmonella* em carne de frango provinda do varejo nos Estados Unidos (EUA), destacando-se o sorovar *S. Heidelberg* (GURAN; MANN; ALALI, 2017; SHAH *et al.*, 2017). Segundo dados da EFSA, *S. Heidelberg* está entre os cinco principais sorotipos identificados na União Europeia, sugerindo, inclusive, que este seja incluído na lista dos cinco sorovares controlados em aves reprodutoras (KOUTSOUMANIS *et al.*, 2019). De acordo com o Sistema de Alertas Rápidos para Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais (*Food and Feed Safety Alerts - RASFF*), *S. Heidelberg* esteve entre os sorovares mais isolados em 2013 e 2014, bem como nos anos de 2016 e 2018 (RASFF, 2016; 2018).

No Brasil, um estudo retrospectivo desenvolvido por Hofer e colaboradores (1997) demonstra que *S. Heidelberg* já havia sido identificada em aves e produtos derivados no país entre 1962 e 1991. Recentemente, foi demonstrado que *S. Heidelberg* têm sido um dos sorovares de maior prevalência, especialmente na Região Sul do Brasil, a qual é responsável por mais de 60% da produção nacional de carne de frango. Tais dados evidenciam a disseminação de *S. Heidelberg* na região, bem como a sua resistência e manutenção no ambiente (VOSS-RECH *et al.*, 2019).

3.4 Higiene na indústria de alimentos

3.4.1 O processo de higienização

Durante o processo de fabricação de alimentos, ocorre o acúmulo de materiais indesejáveis, como restos de alimentos, substâncias químicas do processo e microrganismos (AZEVEDO; CERCA, 2012). A higienização dentro de uma indústria é um dos fatores mais importantes para assegurar a inocuidade dos alimentos produzidos e deve ser considerada como parte essencial do processo. Para isso, as empresas devem ter planos de higienização que contemplem todas as instalações, visando prevenir a contaminação dos alimentos produzidos ou que estes tenham a vida de prateleira diminuída (TONDO; BARTZ, 2012; FORSYTHE, 2013). A falta de eficiência dos procedimentos de higienização e limpeza permite a adesão de microrganismos e, muitas vezes, o desenvolvimento de biofilmes nessas superfícies, os quais se constituem em uma potencial fonte de contaminação dos alimentos (AZEVEDO; CERCA, 2012).

O termo higienização não deve ser confundido com limpeza, visto que higienização é o processo que engloba primeiro a limpeza, destinada à remoção de sujidades e, posteriormente, a desinfecção, que tem a função de reduzir o número de microrganismos sobre uma superfície inanimada (TONDO; BARTZ, 2012). A limpeza deve ser executada em intervalos regulares e frequentes ou mesmo de forma contínua para garantir consistentemente a qualidade do produto. A forma como a limpeza é realizada depende da natureza da sujidade ou da contaminação, do tipo de superfície a ser limpa, dos materiais utilizados, do grau de dureza da água e do padrão de limpeza requerido (FORSYTHE, 2013). De acordo com a Portaria 210 do MAPA, a desinfecção é a operação realizada depois de uma limpeza completa e é destinada a destruir os microrganismos patogênicos, bem como reduzir o número de microrganismos a um nível que não permita a contaminação do produto alimentício, utilizando-se agentes químicos e/ou físicos higienicamente satisfatórios (BRASIL, 1998).

Na indústria alimentícia, os procedimentos de higienização realizados após o término do processo produtivo compreendem as seguintes etapas: remoção de resíduos sólidos, pré-enxague com água quente (45°C), aplicação de detergente, enxágue com água, aplicação de sanitizantes e enxágue com água. O processo é realizado a cada 12 ou 24 horas, ao final do turno de abate, e é definido como higiene pré-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 de produção e que envolve etapas de remoção de resíduos sólidos e enxágue (CONTRERAS *et al.*, 2003; ANDRADE, 2008).

3.4.2 Principais desinfetantes utilizados na indústria de alimentos

O procedimento de higienização na indústria avícola consiste fundamentalmente no uso de água quente, detergentes e sanitizantes. Ainda que os detergentes diminuam a carga bacteriana das superfícies, o objetivo principal do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos (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). A sanitização, que é a última etapa do procedimento de higienização, visa reduzir a carga de microrganismos alteradores e eliminar patógenos até níveis seguros, para obter um produto de boa qualidade higiênico sanitária (ANDRADE, 2008). Para que o processo seja efetivo, deve-se estabelecer um programa com objetivos claros, definindo-se a susceptibilidade do agente patogênico, populações mistas de microrganismos, tipo de superfície, condições ambientais (umidade e temperatura) e quantidade de matéria orgânica (MORGULIS, 2005; KUANA, 2009). Já o sanitizante deve ser selecionado levando-se em conta algumas características, como aprovação pelos órgãos competentes e apresentação de amplo espectro de ação. Também deve ser estável, apresentar baixa toxicidade e corrosividade. A ação dos sanitizantes é afetada pelas características da superfície, tempo e temperatura de contato, concentração de uso, resíduos presentes nas superfícies, pH, tipo e quantidade de microrganismos contaminantes (ANDRADE, 2008; ALTERTHUM, 2015).

No Brasil, a ANVISA e o MAPA são os órgãos responsáveis pela regulamentação do uso de sanitizantes. Antes da comercialização, os dois órgãos atuam no registro e notificação dos produtos, observando critérios de qualidade para garantir eficácia e segurança. A RDC n° 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 IN n° 26 de 2009 do MAPA regulamenta a fabricação, controle de qualidade e comercialização de produtos antimicrobianos de uso veterinário (BRASIL, 2009).

O ácido peracético é um sanitizante comumente utilizado na indústria. É um sanitizante bactericida, esporicida e fungicida, sendo eficaz contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos filamentosos, leveduras, vírus e esporos bacterianos (SOUZA, 2005). Possui algumas vantagens, como não produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos, apresentar baixo impacto ambiental e ação contra biofilmes (SVIDZINSKI *et al.*, 2007). Contudo, é irritante para pele, libera vapores irritantes, apresenta odor forte, incompatibilidade com cobre, ferro e alumínio, além de baixa estabilidade durante estocagem (ANDRADE, 2008).

Os compostos de amônia quaternária são amplamente utilizados como antissépticos e desinfetantes. São detergentes catiônicos sintéticos com atividade antimicrobiana, sendo eficientes contra bactérias, leveduras e vírus. Os compostos de amônia quaternária são livres de odor e cor, altamente estáveis e pouco corrosivos para os metais, desde que usados nas concentrações recomendadas. Possuem ação surfactante e baixa toxicidade, aliado ao poder biocida (PAULINO, 2006). Entretanto, têm atuação limitada na presença de matéria orgânica e em superfícies com restos de sabões e detergentes aniônicos (KUANA, 2009). O mecanismo de ação desse grupo dá-se através da desnaturação e da precipitação das proteínas da membrana celular e do citoplasma bacteriano, liberando nitrogênio e potássio das células. Também agem clivando 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).

O hipoclorito de sódio atua como solvente de gordura e ácidos graxos, transformando-os em sais de ácidos graxos (sabão) e glicerol (álcool), reduzindo a tensão superficial da solução remanescente. Age neutralizando aminoácidos, formando água e sal. Com a saída dos íons hidroxila, há uma redução de pH. O ácido hipocloroso, substância presente na solução de hipoclorito de sódio, quando em contato com o tecido orgânico atua como solvente, libera cloro que, combinado com o grupo amino da proteína, forma cloraminas. Ácido hipocloroso e íons hipoclorito leva a degradação de aminoácidos e hidrólise. A reação de cloraminação entre o cloro e o grupo amino (NH) forma cloraminas que interfere no metabolismo celular. Cloro ação antimicrobiana inibindo enzimas bacterianas levando a uma oxidação irreversível dos grupos grupo sulfidrila de enzimas bacterianas essenciais (ESTRELA *et al.*, 2002).

3.5 Biofilmes microbianos

Biofilmes são definidos como comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, envoltos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances* - EPS). Estas estruturas geralmente estão aderidas a um substrato biótico ou abiótico, em cuja formação os microrganismos exibem diferenças fenotípicas, metabólicas, fisiológicas e genéticas (FLEMMING *et al.*, 2016; SATPATHY *et al.*, 2016). A expressão “agregado” deve-se ao fato de que a maioria das células em um biofilme está em contato com outras células, visto que apenas uma camada do biofilme tem contato direto com a superfície na qual está aderido (FLEMMING *et al.*, 2016). O biofilme não possui uma estrutura uniforme, e as espécies bacterianas, bem como vários fatores extrínsecos (temperatura, condições de fluxo, pH, presença de sais, nutrientes) desempenham um papel importante em influenciar a formação de biofilme e o grau de adesão (LEE *et al.*, 2018).

A fração de EPS, que representa cerca de 90% da composição do biofilme, corresponde a biopolímeros de origem microbiana, principalmente polissacarídeos. O EPS possui papel fundamental para a sobrevivência dos microrganismos em situações adversas, além de fornecer proteção contra ação antimicrobiana. Além disso, há uma variedade de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos e ácidos nucleicos na sua composição. Todas estas substâncias proporcionam estabilidade mecânica, facilitam a adesão às superfícies e formam uma rede coesa e tridimensional que imobiliza o biofilme (CORTÉS; BONILLA; SINISTERRA, 2011; AZEVEDO; COSTA, 2012; SATPATHY *et al.*, 2016).

A formação de biofilmes é uma parte integrante do ciclo celular de grande parte dos microrganismos e ocorre a partir de uma sequência de eventos (AZEVEDO; COSTA, 2012). Seis estágios simples e generalizados podem demonstrar essa formação. Inicialmente, há a adesão das células planctônicas de maneira reversível a uma superfície que proporcione o adequado crescimento (estágio I), seguido de ligação irreversível das bactérias, as quais passam a formar microcolônias na matriz de EPS (estágio II). As microcolônias expandem-se e essa confluência leva a um fenótipo mais estruturado com espaços não colonizados, iniciando o desenvolvimento da arquitetura do biofilme e a produção de moléculas de sinalização entre células (estágio III). Estes espaços não colonizados são preenchidos com bactérias e uma arquitetura firmemente madura com EPS é produzida, cobrindo toda a superfície (estágio IV) e possibilitando a visualização

tridimensional do biofilme, além da dispersão de fragmentos (estágio V). Por fim, as bactérias dispersam da estrutura sésil e retornam ao seu estado planctônico, podendo colonizar outras superfícies (estágio VI) (NADELL; DRESCHER; FOSTER, 2016; SATPATHY *et al.*, 2016). Isto é, uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constantes, liberando fragmentos ou células planctônicas dos microrganismos que podem comprometer a qualidade microbiológica de produtos (WANG *et al.*, 2016).

Considerando que os biofilmes são comunidades de microrganismos geralmente multiespécies, a comunicação entre eles é de grande importância. Bactérias em biofilmes comunicam-se através de sinalizações moleculares chamadas de *quorum-sensing* (QS) e também através de sinais elétricos (FLEMMING *et al.*, 2016). O QS é uma sinalização baseada no tamanho da população e consiste na habilidade de uma bactéria em produzir, detectar informações ou sinais e responder a outras células quando atingem a densidade crítica, ou seja, o *quorum*. É reconhecido como um mecanismo eficiente para regular a expressão de genes específicos responsáveis pelos comportamentos em comunidade (WHITEHEAD; VERRAN, 2015; FLEMMING *et al.*, 2016). Durante o QS, as bactérias fortalecem-se por aumentar sua densidade ou coletivamente produzirem fatores de virulência necessários para a sua patogenicidade (ВОРОБЕЙ; ВОРОНКОБА; ВИННИКОВ, 2012). Os sinais também podem induzir a secreção de quelantes de nutrientes, enzimas digestivas, adesinas de superfícies, agentes umectantes, entre outras moléculas de sinalização (NADELL; DRESCHER; FOSTER, 2016; PAPENFORT; BASSLER, 2016). As células bacterianas liberam substâncias chamadas de auto-indutores (AI). Em bactérias Gram-negativas são conhecidos três tipos de AI. As moléculas de N-acil-hemossiderina-lactona (AHLs) são consideradas a classe mais comum de AI-1 e participam principalmente do processo de comunicação intra-espécie. O AI-2 é um conjunto de moléculas de furanosil borato formado pela proteína LuxS e é considerado um sistema universal de comunicação entre as espécies. Por último, o AI-3 consiste em um sinal emitido basicamente por bactérias entéricas (PAPENFORT; BASSLER, 2016). A interação nos biofilmes também pode ser competitiva. A competição por espaço e por recursos limitados podem levar à secreção de antimicrobianos, injeção direta de toxinas nas células adjacentes e a mecanismos para deslocar ou sufocar células vizinhas. Esses compostos podem alterar a composição dos biofilmes (NADELL; DRESCHER; FOSTER, 2016).

A funcionalidade do biofilme pode ser definida como a maneira que ele opera, sendo muito dependente de fatores ambientais e microbiológicos. O principal motivo para a produção do biofilme é a defesa das células contra condições nocivas, além de também possibilitar futuras adesões em novas superfícies. Os biofilmes fornecem proteção contra o sistema imune dos hospedeiros e contra fatores físicos e predadores, além de serem uma barreira de difusão frente a diferentes compostos químicos, como antimicrobianos, biocidas e desinfetantes (FLEMMING *et al.*, 2016; GALIÉ *et al.*, 2018). Consequentemente, ocorre a ineficiência de tratamentos e de procedimentos de higienização (CHUANG *et al.*, 2013; OGLESBY-SHERROUSE *et al.*, 2014; WHITEHEAD; VERRAN, 2015; YAN; BASSLER, 2019). Além disto, biofilmes têm fundamental importância também na troca de genes entre os microrganismos, contribuindo com a resistência antimicrobiana (FLEMMING *et al.*, 2016).

3.6 Biofilmes na indústria alimentícia

As superfícies industriais desempenham grande influência na formação de biofilme, favorecendo a adesão microbiana em estruturas e equipamentos (LEE *et al.*, 2018; RAHAMAN; SADEKUZZAMAN, 2018). A maior preocupação é relacionada aos biofilmes formados em materiais que entram em contato direto com os alimentos e que são comumente encontrados na indústria alimentícia, tais como aço inoxidável, polietileno, vidro, polipropileno e borracha (ABDALLAH *et al.*, 2014; COLAGIORGI *et al.*, 2017; WEBBER *et al.*, 2019). Os locais para o desenvolvimento de biofilmes dependem do tipo de fábrica e podem incluir placas de pasteurizador, membranas de osmose reversa, mesas, luvas, carcaças, superfícies de contato, silos de armazenamento de matérias-primas e aditivos, tubulações, material de embalagem, entre outros (GALIÉ *et al.*, 2018). Os biofilmes nestes ambientes são uma grande preocupação para a saúde pública, pois podem ocasionar a contaminação cruzada e a contaminação pós-processamento dos alimentos (WANG *et al.*, 2013a). Além disso, os biofilmes formados nas superfícies metálicas das instalações de processamento podem ocasionar a corrosão dos materiais devido à produção de ácido pelas bactérias. Frequentemente estas estruturas também são responsáveis pelos bloqueios mecânicos, como entupimentos, e por interferências nos processos de transferência de calor (AZEVEDO; CERCA, 2012).

Salmonella spp. pode aderir e formar biofilmes em superfícies inertes de processamento de alimentos, na carne e em outras matrizes alimentícias (WANG *et al.*,

2013; LEE *et al.*, 2018). Além disto, é capaz de sobreviver em biofilmes formados em aço inoxidável por longos períodos, podendo ser uma fonte de contaminação aos alimentos produzidos (MORITA *et al.*, 2011). Particularmente, *S. Heidelberg* tem se mostrado um importante patógeno associado a surtos relacionados a alimentos de origem avícola e a sua capacidade de formar biofilmes está diretamente relacionada à permanência do patógeno nas estruturas das instalações (GIERALTOWSKI *et al.*, 2016; NISAR *et al.*, 2017; DEWI *et al.*, 2021). Aliado a isso, está a preocupação com a resistência deste sorovar aos programas e produtos utilizados na higienização das estruturas e dos ambientes de produção (OBE *et al.*, 2018; MELO *et al.*, 2021).

3.6.1 Superfícies de adesão

Entre os fatores que favorecem a formação de biofilmes em matadouros-frigoríficos, destacam-se as características das superfícies de contato como a rugosidade, estabilidade físico-química e a resistência à corrosão (GIAOURIS *et al.*, 2014). De acordo com a legislação brasileira, qualquer superfície que venha a ter contato com o alimento deve ser suave, impermeável, livre de rachaduras ou ranhuras, não porosa, não absorvente, não suscetível à contaminação ou não contaminante, resistente à corrosão, durável e lavável (BRASIL, 2004). Para estar de acordo com estas características, os materiais mais utilizados na indústria são o aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, madeira, fibra de vidro, poliuretano, PVC, mármore, silicone, granito, teflon e vidro (ANDRADE, 2008).

O aço inoxidável, um dos materiais mais utilizados na indústria alimentícia, consiste em uma liga metálica composta por carbono, cromo e níquel que é resistente à corrosão causada pela maioria dos alimentos, detergentes e sanitizantes (ANDRADE, 2008). Além disso, o aço inoxidável apresenta outras vantagens como a maior dureza, ampla variedade de derivações do produto, facilidade na fabricação e baixo custo, além de resistir a altas temperaturas, ser liso, impermeável e facilmente higienizado (SCHMIDT *et al.*, 2012). No entanto, o aço inoxidável pode favorecer o acúmulo de resíduos de alimentos e de microrganismos, quando é danificado ou corroído (ANDRADE, 2008).

Os polímeros também são amplamente utilizados na indústria de alimentos, pois são capazes de prevenir a deterioração no material de embalagem devido a influências externas, como a presença de oxigênio, de luz e de microrganismos. O polietileno, um

polímero termoplástico produzido à base de petróleo, consiste em um dos polímeros de maior importância nas indústrias de processamento de carnes. Além do uso industrial e comercial, o polietileno também é empregado em superfícies domésticas para o preparo de diversos alimentos (AKELAH, 2013). Um dos principais problemas no uso do polietileno é a maior facilidade na ocorrência de contaminação cruzada, relacionada principalmente à capacidade de adesão dos microrganismos em geral (CLIVER, 2006).

3.7 Métodos alternativos para controle de biofilmes

A susceptibilidade reduzida do biofilme aos desinfetantes e aos agentes antimicrobianos torna o seu controle um desafio. Costerton *et al.* (1995) relataram que as células aderidas são 500 a 1.000 vezes mais resistentes em comparação às células planctônicas, sendo necessário avaliar novos procedimentos e compostos para o controle dos biofilmes. Com esse intuito, inúmeros estudos buscam métodos alternativos e eficazes para o controle da formação de biofilmes na indústria alimentícia. Dentre eles, pode-se destacar o uso de produtos naturais, como ácidos orgânicos, biossurfactantes, e óleos essenciais (AMRUTHA; SUNDAR; SHETTY, 2017; BOTH *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2022), bacteriófagos (DE ORNELLAS DUTKA GARCIA *et al.*, 2018; CHEGINI *et al.*, 2020, RIZZO *et al.*, 2020), nanopartículas (LARA *et al.*, 2020, PONTIN *et al.*, 2021), água eletroquimicamente ativada (WILSMANN *et al.*, 2019), ionização e radiação ultravioleta (ANGARANO *et al.*, 2020) e a ação do ozônio (MARINO *et al.*, 2018).

3.7.1 Água eletroquimicamente ativada

A água eletroquimicamente ativada (ECAW) é uma tecnologia desenvolvida na Rússia no ano de 1974 com o intuito de tratar a água. Pesquisadores russos, que idealizaram a tecnologia, possuem aproximadamente 300 patentes para aplicação da ECAW em diferentes setores, como na agricultura, torres de resfriamento, piscinas, dermatologia e na limpeza de feridas e de instrumentos (MARAIS; BRÖZEL, 1999). No Japão, o uso da ECAW também foi reportado em 1980, sendo empregada na indústria médica e no tratamento de água (RAHMAN; KHAN; OH, 2016).

A ECAW é um biocida que atua aumentando a permeabilidade da membrana celular, levando a um extravazamento do conteúdo intracelular, e diminuindo as

desidrogenases e as atividades de redutases de nitrato (ZENG *et al.*, 2010). A oxidação pode danificar as membranas celulares dos microrganismos, afetando os processos metabólicos e ocasionando a morte da célula (LIAO; CHEN; XIAO, 2007). A ECAW é produzida a partir de água, sal e eletricidade, sendo o ácido hipocloroso (HClO) seu principal componente. O HClO é a variante química do hipoclorito de equilíbrio ácido (OCl^-), o qual predomina em pH 6,6 a 6,8. O HClO é considerado mais reativo que o OCl^- , embora ambos sejam fortes oxidantes (VEASEY; MURIANA, 2016). Aliado a isso, o HClO possui potencial de oxi-redução (ORP), grande quantidade de oxigênio livre (> 30 mg/L), pH baixo e outros componentes que produzem a inativação microbiana (ANDRADE *et al.*, 2008; KHALID *et al.*, 2018). O cloro é mais forte na forma de HClO e exibe um poder saneante 80 vezes maior que o OCl^- , quando o pH da solução encontra-se entre 5,0 a 6,5. Assim, os microrganismos são inativados rapidamente pelo HClO (RAHMAN; KHAN; OH, 2016).

Para a produção da ECAW, o cloreto de sódio (NaCl) é diluído em água e armazenado em um recipiente. O equipamento recebe a solução de sal e de água potável por duas vias de acesso independentes (Figura 1). Após o início do processo de eletrólise, o NaCl se dissolve na água e se dissocia em íons carregados positivamente (Na^+) e negativamente (Cl^-). Simultaneamente, íons hidróxido (OH^-) e hidrogênio (H^+) também são formados na solução. 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 favorece a reação, transforma o eletrólito NaCl em estado ativado formando radicais livres, ácido hipocloroso, entre outros compostos a partir da modificação das estruturas iônicas (THORN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2019a). Os íons carregados negativamente (OH^- e Cl^-) movem-se em direção ao ânodo, onde os elétrons são liberados, formando-se ácido hipocloroso (HClO), íon hipoclorito (OCl^-), ácido clorídrico (HCl), gás oxigênio (O_2) e gás cloro (Cl_2). Íons carregados positivamente (Na^+ e H^+) movem-se em direção ao cátodo, onde ganham elétrons, resultando na geração de hidróxido de sódio (NaOH) e hidrogênio gasoso (H_2).

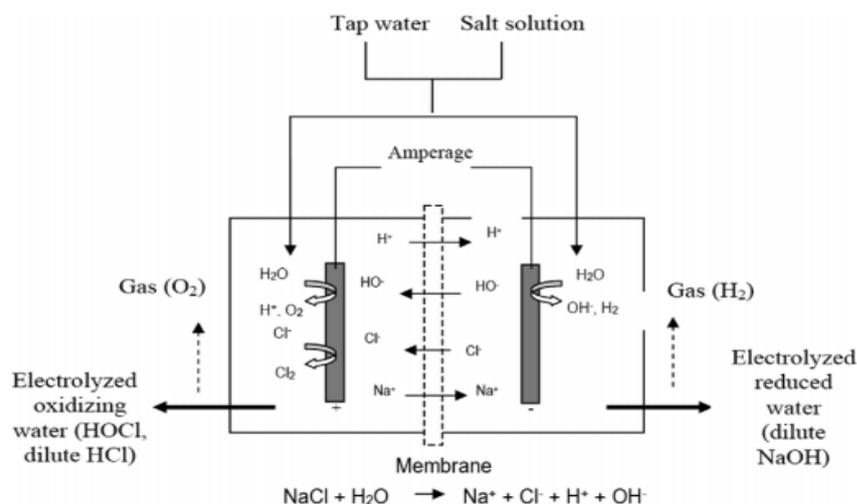


Fig. 1. Schematics of electrolyzed water generator and produced compounds.

Figura 1 - Esquema da geração da água eletroquimicamente ativada e seus compostos.

Fonte Huang Yu-Ru *et al.*, (2007)

É possível produzir soluções de ECAW acidificadas ou básicas, ajustando-se o pH da solução. A ECAW acidificada (AEOW), com pH baixo (2,3 a 2,7), alto potencial de oxi-redução (ORP > 1000 mV), alta concentração de oxigênio dissolvido e de cloro é produzida no ânodo. Já a ECAW básica, com pH mais alto (10,0 a 11,5), alta concentração de hidrogênio dissolvido e baixo ORP (~ 800 a ~ 900 mV) é produzida no cátodo e pode ser usada para remover sujeira e gordura de utensílios de cozinha, como tábuas de corte (HUANG *et al.*, 2008; THORN *et al.*, 2012). Há também uma solução levemente acidificada (SAEOW), com pH 6.2-6.5.

As características da solução pronta dependem de alguns parâmetros, como a célula eletroquímica, a condutividade em um pH baixo e o alto ORP, sendo normalmente esses os parâmetros almejados durante a fabricação da ECAW (THORN *et al.*, 2012; RAHMAN; KHAN; OH, 2016). O efeito antimicrobiano da SAEOW (pH 6.2-6.5 e 10 ppm) e da AEOW (pH 2.5 e 50 ppm) na carne de peito de frango fresco foi avaliado frente a *S. Typhimurium* (ATCC 14028) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115). As carcaças foram inoculadas e após tratadas, sob imersão, durante 10 minutos, apresentando um aumento de vida de prateleira e reduções de 1.5 a 2.3 log₁₀ UFC/g. Não houve diferença significativa entre a eficácia dos tratamentos entre a ECAW ácida e levemente ácida, demonstrando que a ação possa estar mais relacionada ao cloro do que ao pH e ao ORP (RAHMAN *et al.*, 2012a).

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 ECAW atraem elétrons da membrana celular bacteriana, tornando-a instável (JAY, 2005). Liao *et al.* (2007) demonstraram que o ORP age danificando as membranas bacterianas, levando à inativação dos microrganismos. As bactérias aeróbias e anaeróbicas podem crescer na faixa de ORP de +200 a + 800mV e - 700 a + 200mV, respectivamente. Devido à mudança no fluxo de elétrons na célula, a ECA com ORP mais alto (> 1000mV) causa modificações nos fluxos metabólicos e na produção de adenosina trifosfato (ATP). O baixo pH (2,3 a 2,7) pode sensibilizar a membrana externa das células bacterianas, permitindo que o ácido hipocloroso (HClO) entre na célula. Além da ação oxidante que sequestra elétrons dos compostos estruturais dos microrganismos, acredita-se que um ambiente de alta osmolaridade da ECAW desequilibre as concentrações internas dos organismos em relação à solução, assim danificando estruturas da membrana celular. Isso ocasionará um aumento na porosidade da membrana, permitindo a entrada de oxidantes no citoplasma bacteriano, danificando proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, levando à morte celular (LIAO; CHEN; XIAO, 2007; THORN *et al.*, 2012). O efeito da ECAW nas células bacterianas pode ser demonstrado através da análise por microscopia eletrônica de varredura e consequente visualização da parede celular enrugada com poros arredondados (OSAFUNE; EHARA; ITO, 2006).

A lista de ingredientes seguros e adequados para uso na indústria de alimentos, de acordo com FSIS-USDA, inclui o HClO gerado eletroliticamente (USDA, 2017). Esse pode ser utilizado no *chiller* na concentração de 50 ppm nos EUA, e seu uso em indústrias produtoras de bebidas, lavagem de verduras e frutas vem sendo estimulado (HUANG *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2019a). A ECAW é um composto classificado como biodegradável e de baixa citotoxicidade. O desenvolvimento de cepas resistentes ainda não foi relatado (HUANG *et al.*, 2008; AL-HOLY; RASCO, 2015). A utilização da ECAW é vista como uma oportunidade de reduzir o uso e os custos com compostos químicos, uma vez que os insumos utilizados para sua produção possuem baixo custo e são abundantes. Além disto, diminui-se a necessidade de estoque de produtos ou reagentes e de amplos locais de armazenamento, pois a ECAW pode ser produzida no local pelo equipamento gerador adquirido pela indústria (LIAO; CHEN; XIAO, 2007; HUANG *et al.*, 2008; KHALID *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019).

3.8 Ensaios de polarização potencioestática

A corrosão pode ser definida basicamente como a deterioração de um metal ou liga, a partir de sua superfície, pelo meio no qual está inserido. O processo envolve reações de oxidação e de redução (redox) que convertem o metal ou componente metálico em óxido, hidróxido ou sal (SILVA *et al.*, 2015). Todos os metais estruturais possuem algum grau de corrosão em ambientes naturais (CANO; LAFUENTE; BASTIDAS, 2010; SILVA *et al.*, 2015). A corrosão metálica é a transformação de um material metálico ou liga metálica pela sua interação química ou eletroquímica em um determinado meio de exposição, resultando na formação de produtos de corrosão e na liberação de energia (AMBROZIN; KURI; MONTEIRO, 2009). O processo de corrosão eletroquímica é a mais frequente na natureza, envolvendo necessariamente a presença de água e a transferência de elétrons. Esse processo espontâneo ocorre devido à diferença de potencial químico entre o metal e o meio, envolvendo a reação desses materiais com substâncias não-metálicas presentes no meio (AMBROZIN; KURI; MONTEIRO, 2009; CANO; LAFUENTE; BASTIDAS, 2010). A rápida corrosão pode ser desencadeada por diversos fatores, como umidade, velocidade ou acidez da água, movimento do metal, aumento da temperatura, aeração, presença de certas bactérias, entre outros (CANO; LAFUENTE; BASTIDAS, 2010; SILVA *et al.*, 2015).

Muitos dispositivos e equipamentos existentes na indústria alimentícia são comumente produzidos a partir de vários metais (WANG *et al.*, 2019b). A corrosão pode prejudicar a precisão do equipamento e aumentar diretamente os custos operacionais. Além disso, a corrosão que ocorre nas superfícies em contato com alimentos pode formar rachaduras, que favorecem a sobrevivência de bactérias na higienização e possibilita a contaminação cruzada (WANG *et al.*, 2014). A corrosão de metais causada pela aplicação da ECAW é uma preocupação potencial, devido à existência de fatores indutores de corrosão, como baixo pH, Cl^- , ClO^- e outros agentes oxidantes (HAN *et al.*, 2018). A avaliação da corrosividade da ECAW em metais comumente usados em matadouros de animais é, portanto, crítica e pode ajudar a evitar perdas desnecessárias. Alguns estudos indicam que a ECAW não danifica o aço inoxidável, sendo sugerida como um possível desinfetante para a indústria alimentícia (AYEBAH; HUNG; FRANK, 2005; HUANG *et al.*, 2008).

Existem diferentes ensaios que podem ser realizados para avaliação da corrosão, mas todos visam prever como a corrosão acontece nas condições reais de operação. Ensaio eletroquímico em corrente contínua são realizados para análise dos potenciais dos eletrodos (método galvanostático) ou para análise da corrente devido à aplicação de potencial (método potencioestático), sendo este o mais comum (EBRAHIMI *et al.*, 2012). As representações gráficas dos ensaios eletroquímicos em corrente contínua chamam-se curvas de polarização. A polarização é o fenômeno que gera a alteração do potencial de equilíbrio de um eletrodo, quando há a passagem de uma corrente elétrica por ele (EBRAHIMI *et al.*, 2012). O ensaio de polarização potencioestática visa demonstrar o comportamento eletroquímico da amostra, quando submetida a potenciais constantes com variação contínua do potencial de eletrodo, modificando-se ponto a ponto e se medindo a corrente correspondente após sua estabilização. Após o ensaio, uma das análises que pode ser realizada é a avaliação da densidade de corrente de corrosão através da curva de aproximação da equação de *Butler-Volmer* (CANO; LAFUENTE; BASTIDAS, 2010; LIU *et al.*, 2014; FLEXER *et al.*, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais do estudo

As análises microbiológicas foram desenvolvidas no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Parque Científico e Tecnológico da Universidade do Vale do Taquari (Univates). O Ensaio de Polarização foi realizado junto ao Laboratório de Corrosão (LABCOR-UFRGS) e as análises de Microscopia Confocal foram realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM-UFRGS).

4.2 Cepas de *Salmonella* Heidelberg

Foram selecionadas oito cepas de *S. Heidelberg* isoladas de suabe de arrasto de granjas avícolas no interior do Rio Grande do Sul nos anos de 2018 e 2019. As cepas foram isoladas –por um laboratório privado de diagnóstico avícola (Porto Alegre, RS) e foram cedidas gentilmente ao CDPA (Apêndice A). As cepas de *S. Heidelberg* foram sorotipificadas através do esquema de KWL pelo Laboratório de Patógenos Entéricos da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ). Os microrganismos estavam armazenados a -20°C em caldo infusão de cérebro e coração (*Brain-Heart Infusion* - BHI) (Oxoid; Hampshire, Inglaterra) com 20% de glicerol. As cepas foram reativadas em BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, as amostras foram plaqueadas em ágar xilose-lisina desoxicolato (XLD) (Merck; Darmstadt, Alemanha) e foram incubadas novamente a 37°C por 24 horas. A partir do crescimento em XLD, selecionou-se uma colônia morfológicamente compatível com *Salmonella* para a realização de testes bioquímicos preliminares, conforme a metodologia descrita na Portaria nº 126 de 03 de novembro de 1995 do MAPA (MAPA, 1995). Para as análises foram utilizados dois *pools* de cepas, sendo cada um composto por quatro cepas de *S. Heidelberg*, escolhidas aleatoriamente e previamente identificadas como formadoras de biofilme.

4.3 Produção da água eletroquimicamente ativada e preparo dos desinfetantes e detergentes

A produção da ECAW foi realizada em um gerador (Centrego; Frome, Inglaterra) com capacidade de produção de 200 litros por hora, empregando-se água de abastecimento da rede comum do local e solução de cloreto de sódio a 0,1%. Após a produção da ECAW, foi realizada a mensuração do cloro livre e do ORP da solução em medidor *Micro 7 Plus* (Akso; São Leopoldo, Brasil). O ORP mensurado foi de 800 a 900 mV e a concentração média de cloro livre obtida na solução inicial de ECAW foi de 350 a 400 ppm, sendo esta diluída em água destilada para se obter as concentrações de trabalho. Baseando-se em resultados prévios sobre a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* em diferentes concentrações (WILSMANN *et al.*, 2019), a ECAW foi testada em três concentrações no atual estudo: pura, 250 e 200 ppm de cloro livre.

Um desinfetante e dois detergentes disponíveis comercialmente para uso na indústria de produção animal e alimentícia foram avaliados e comparados com a ECAW em algumas etapas do trabalho. Foram selecionados: um desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A), um detergente alcalino à base de hidróxido de sódio (C) e um detergente ácido à base de ácido fosfórico (D). Os desinfetantes e detergentes foram diluídos com água destilada a partir do produto disponível comercialmente. O desinfetante A foi testado nas concentrações fraca (0,1%), recomendada (0,2%) e forte (0,5%), conforme indicação do fabricante. Os detergentes C e D foram avaliados nas concentrações fraca (0,25%), recomendada (0,5%) e forte (1%), conforme indicações do fabricante.

4.4 Análises estatísticas

A análise estatística descritiva foi usada para determinar as médias de formação, prevenção ou remoção de biofilmes e as contagens bacterianas em cada tratamento. Os resultados foram analisados por meio da análise de comparação das médias com o teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os programas *Microsoft Excel* (Microsoft; Redmond, EUA) e *GraphPad Prism* (GraphPad; San Diego, EUA) foram utilizados para a análise estatística dos dados.

5 EXPERIMENTOS

5.1 Experimento 1 – Remoção de biofilme de *Salmonella* Heidelberg em microplacas de poliestireno

5.1.1 Materiais e Métodos

O objetivo desta etapa foi avaliar a capacidade da ECAW, do desinfetante e dos detergentes em remover o biofilme previamente formado por *S. Heidelberg* em microplacas de poliestireno, de acordo com a técnica descrita por Carvalho *et al.* (2022). A avaliação da ação dos tratamentos na remoção dos biofilmes foi realizada nos tempos de contato de 10 e 20 minutos, simulando condições de desinfecção. Os produtos foram testados em duas temperaturas: a 25°C e a 37°C, simulando, respectivamente, a temperatura ambiente e a temperatura ótima de crescimento do microrganismo.

Colônias puras de cada cepa de *S. Heidelberg* foram semeadas em ágar TSA (*Tryptone Soy Agar* - TSA) (Oxoid; Hampshire, Inglaterra) sem glicose e incubadas a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Após este período, uma colônia de cada cepa foi inoculada em caldo triptona de soja sem glicose (*Tryptone Soy Broth Without Dextrose* - TSB) (Oxoid; Hampshire, Inglaterra) e os tubos foram incubados nas mesmas condições anteriormente descritas. Foram utilizados dois pools de SH, cada um com 4 isolados. Os *pools* foram constituídos pela mesma quantidade de TSB de cada cepa (200 µL), atingindo um volume final de 5 mL. A turvação no TSB foi ajustada até a escala 1 de *McFarland*, correspondendo a um valor de absorvância entre 0,224 a 0,300 em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm (SP-22 – Biospectro; São Paulo, Brasil). Após o ajuste do inóculo dos *pools*, 200 µL de cada suspensão bacteriana foram adicionados, em triplicata, em microplacas estéreis de poliestireno com 96 poços de fundo plano (Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil). O controle negativo de cada placa foi o caldo TSB não inoculado, também adicionado em triplicata. Para controle interno dos testes foi utilizada uma cepa padrão de *S. Enteritidis* (ATCC 13076) e uma cepa de *S. Heidelberg* da bacterioteca do CDPA, previamente classificada como produtora de biofilme. O controle positivo foi a formação de biofilme com posterior tratamento com água destilada estéril. Após a incubação, em temperaturas de 25°C e 37°C, das placas para a formação de biofilme, o conteúdo foi aspirado e os poços foram lavados com 250 µL de solução de cloreto de sódio a 0,85% estéril (Synth; Diadema, Brasil) para remoção das células

planctônicas. O biofilme pré-formado foi tratado com 200 µL de cada concentração dos produtos testados. Após os tempos de contato de 10 e 20 minutos nas temperaturas anteriormente citadas, a suspensão de cada poço foi aspirada, as microplacas foram lavadas três vezes com 250 µL de solução de cloreto de sódio a 0,85% estéril e levemente secas. Em seguida, as células bacterianas foram fixadas com 200 µL de metanol (Nuclear; Diadema, Brasil) por 20 minutos. O metanol foi removido e as microplacas foram secas em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram coradas com 200 µL de cristal violeta de *Hucker* 2% (MediQuímica; Porto Alegre, Brasil) por 15 minutos, lavadas em água corrente e secadas novamente. Após adição de 250 µL de ácido acético glacial a 33% (Nuclear; Diadema, Brasil), foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (ELX800 Biotek; Winooski, Estados Unidos) utilizando-se um filtro de 550 nm.

A avaliação da capacidade de uma substância de remover o biofilme pré-formado foi realizada através da determinação do percentual de biomassa removido em relação ao controle. Este percentual foi obtido através da seguinte fórmula (PITTS *et al.*, 2003):

$$\% \text{ prevenção/remoção de biofilme da cepa} = \frac{(C-B) - (T-B)}{(C-B)} \times 100$$

Sendo:

C: Média da triplicata da densidade óptica do controle sem tratamento (controle positivo);

T: Média da triplicata da densidade óptica de cada tratamento;

B: Média da triplicata da densidade óptica do controle negativo de cada placa.

5.1.2 Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão descritos os percentuais de remoção de biofilme de *S. Heidelberg* após o tratamento com a ECAW e com o desinfetante A nas temperaturas de incubação de 25°C e 37°C, respectivamente.

Tabela 1 – Média (%) de remoção de biofilme de *Salmonella Heidelberg* após o tratamento com água eletroquimicamente ativada (ECAW) e com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A) a 25°C e 37°C, conforme a variação da concentração do produto e do tempo de contato.

Produto	Concentração	Tempo de contato (minutos) a 25°C		Tempo de contato (minutos) a 37°C	
		10	20	10	20
ECAW	200 ppm	35,53 ± 9,71 ^{aA}	41,51 ± 10,60 ^{aA}	22,76 ± 12,97 ^{aA}	51,00 ± 8,34 ^{bA}
	250 ppm	27,77 ± 8,52 ^{aA}	57,32 ± 3,50 ^{bB}	22,36 ± 4,73 ^{aA}	53,13 ± 4,70 ^{bA}
	Puro	32,81 ± 10,20 ^{aA}	56,68 ± 4,86 ^{bB}	38,66 ± 14,64 ^{aA}	49,32 ± 12,05 ^{aA}
Desinfetante A	0,1%	24,57 ± 7,49 ^{aA}	32,70 ± 5,93 ^{aA}	37,47 ± 12,83 ^{aA}	37,33 ± 18,41 ^{aA}
	0,2%	25,67 ± 3,96 ^{aA}	37,07 ± 6,20 ^{aA}	46,17 ± 16,66 ^{aA}	42,83 ± 20,13 ^{aA}
	0,5%	29,44 ± 7,57 ^{aA}	40,88 ± 6,45 ^{aA}	49,71 ± 9,58 ^{aA}	49,29 ± 16,15 ^{aA}

Os valores correspondem à média (%) ± desvio padrão da remoção de biofilme das oito cepas de *Salmonella* Heidelberg. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de contato para o mesmo produto e a mesma concentração. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações para o mesmo produto e o mesmo tempo de contato.

Avaliando-se a ação da ECAW sobre o biofilme de *S. Heidelberg* a 25°C, observa-se que o aumento do tempo de contato resultou em uma remoção significativamente maior ($p < 0,05$) do biofilme formado pela bactéria, com exceção à concentração de 200 ppm do produto (Tabela 1). A 37°C, o tempo de contato também influenciou na remoção do biofilme nas concentrações a 200 e 250 ppm da ECAW. O tempo de contato está diretamente relacionado com a capacidade de remoção do biofilme, independentemente do tipo de tratamento, superfície ou espécie bacteriana avaliada (CARVALHO *et al.*, 2022). Assim como observado sobre os biofilmes formados por *S. Heidelberg*, tratamentos com a ECAW em tempos de contato superiores também foram mais eficazes frente a células planctônicas do mesmo sorovar (WILSMANN *et al.*, 2019).

Em relação à concentração de ECAW, se observou diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual de remoção do biofilme apenas após 20 minutos de contato a 25°C. A remoção do biofilme na concentração de 200 ppm de ECAW foi significativamente inferior ($p < 0,05$) àquela obtida nas demais concentrações do produto. Possivelmente, no tempo de contato de 20 minutos, o produto apresente ação máxima sobre o biofilme formado por *S. Heidelberg* na concentração de 250 ppm. Estudos anteriores demonstraram que SAEW a 250 ppm e em solução com pH 6,0 inativa 100% das bactérias e fungos em materiais sólidos (poeira, fezes, penas e ração), sendo mais eficiente do que desinfetantes químicos comuns, como solução de cloreto de benzalcônio (1:1000 vol/vol) e solução de iodopovidona (1:1000 vol/vol) (HAO *et al.*, 2013). Da mesma forma, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na capacidade de remoção do biofilme entre as diferentes concentrações da ECAW no tempo de contato de 10 minutos, provavelmente

devido ao menor período de exposição do produto. Sabe-se que a ECAW possui uma ação mesmo em tempos mais curtos (OKANDA *et al.*, 2019), no entanto, tempos de contato mais longos permitem uma ação melhor dos compostos biocidas (WILSMANN *et al.*, 2019).

Outros estudos que avaliaram a ação da ECAW em biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* a 25°C e 37°C também obtiveram resultados similares, ratificando-se a capacidade da ECAW em remover biofilmes bacterianos (SUN *et al.*, 2012). Contudo, salienta-se que o aumento gradativo do pH da solução influencia diretamente na ação da ECAW. A ECAW geralmente não apresenta ação na remoção de biofilme em pH ácido (2,5 a 3,5) (SUN *et al.*, 2012), apesar de possuir uma maior ação bactericida, já que o baixo pH sensibiliza a membrana externa das células bacterianas permitindo que o HClO seja interiorizado (LIAO; CHEN; XIAO, 2007; THORN *et al.*, 2012). Entretanto, a atividade antimicrobiana da ECAW é mais complexa frente aos biofilmes do que em células planctônicas (OKANDA *et al.*, 2019), pois os biofilmes consistem uma barreira de difusão aos compostos bactericidas (FLEMMING *et al.*, 2016; GALIÉ *et al.*, 2018). Para confirmar o papel do pH da ECAW na remoção de biofilme de *S. aureus* no estudo de Sun *et al.* (2012), uma série de soluções ácidas e básicas foram usadas no tratamento de biofilme pré-formado. Os resultados demonstraram que em pH 2,5, tanto a ECAW quanto a solução de HCl não removeram o biofilme, mas em pH 11,3, tanto a ECAW quanto a solução de NaOH removeram o biofilme. Os resultados mostraram que o pH da solução desempenhou um papel importante (SUN *et al.*, 2012). De qualquer forma, a influência do pH da solução de ECAW sobre o biofilme de *S. Heidelberg* deve ser avaliada futuramente pelo nosso grupo de pesquisa.

O desinfetante A não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) na capacidade de remoção do biofilme de *S. Heidelberg*, independentemente da concentração do produto, do tempo de contato ou da temperatura. O produto apresentar um bom resultado, mesmo na concentração fraca, pode justificar não haver diferenças entre as concentrações. Outros pesquisadores também já constaram a capacidade de desinfetantes convencionais, incluindo àqueles à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio, em remover biofilmes de *P. aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* formados em placas de poliestireno, com diferentes concentrações de uso (LUCIANO *et al.*, 2016).

Apesar de não terem sido observadas neste trabalho, outros autores relataram diferenças significativas na remoção de biofilmes pelo desinfetante A nas temperaturas

de 25°C e 37°C. Nestes estudos, biofilmes formados a 25°C apresentavam uma maior produção de polissacarídeos, o que foi associado a uma maior resistência aos tratamentos (KIM; KIM; KANG, 2020). O efeito da temperatura na resistência do biofilme também foi relatado em um estudo que mostrou que os biofilmes de *L. monocytogenes* exibiram maior resistência ao composto de amônio quaternário a 15°C quando comparado a 4°C (PANG *et al.*, 2019).

Quando a ação da ECAW é comparada ao desinfetante A a 25°C, identifica-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na capacidade de remoção do biofilme entre os produtos no tempo de contato de 10 minutos. Logo, a ação da ECAW não difere da ação de um desinfetante já utilizado pela indústria em um tempo de exposição mais curto. Já no tempo maior de tratamento, a ECAW a 250 ppm apresentou uma ação significativamente superior ($p < 0,05$) na remoção de biofilme de *S. Heidelberg* quando comparada ao desinfetante A nas mesmas condições. Em biofilmes formados a 37°C, não houve diferença significativa entre os tratamentos, independentemente da concentração ou tempo de contato. Esses resultados são importantes, pois demonstram que a ECAW pode ser uma alternativa para a remoção de biofilmes.

Na Tabelas 2, estão descritos os percentuais de remoção de biofilme de *S. Heidelberg* após o tratamento com os detergentes alcalino à base de hidróxido de sódio (B) e com o detergente ácido à base de ácido fosfórico (C) a 25°C e 37°C, respectivamente. Conforme os resultados apresentados na Tabelas 2, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na capacidade de remoção do biofilme de *S. Heidelberg* somente entre as concentrações “recomendada” e “forte” do detergente alcalino a 25°C e após 10 minutos de contato. Da mesma forma, o tempo maior de exposição aos produtos somente refletiu em uma maior remoção de biofilme ($p < 0,05$) na concentração “fraca” do detergente a 25°C. Esses resultados demonstram que se o produto for diluído conforme a recomendação do fabricante, não há necessidade de um tempo maior do que 10 minutos frente ao biofilme formado por *S. Heidelberg*.

Tabela 2 – Média (%) de remoção de biofilme de *Salmonella* Heidelberg após o tratamento com os detergentes alcalino e ácido a 25°C e 37°C, conforme a variação do tempo de contato e da concentração dos produtos.

Detergente	Concentração	Tempo de contato (minutos) a		Tempo de contato (minutos) a	
		25°C		37°C	
		10	20	10	20
Alcalino	0,25%	65,41 ± 11,51 ^{aA}	79,16 ± 4,56 ^{bA}	65,74 ± 27,71 ^{aA}	69,48 ± 6,75 ^{aA}
	0,5%	74,99 ± 7,54 ^{aA}	83,13 ± 4,75 ^{aA}	65,67 ± 37,54 ^{aA}	72,13 ± 7,33 ^{aA}
	1%	77,93 ± 5,62 ^{aB}	81,80 ± 4,69 ^{aA}	75,27 ± 22,25 ^{aA}	75,84 ± 9,68 ^{aA}
Ácido	0,25%	13,52 ± 8,94 ^{aA}	20,37 ± 1,50 ^{aA}	15,49 ± 13,00 ^{aA}	26,45 ± 22,80 ^{aA}
	0,5%	21,16 ± 11,10 ^{aA}	22,88 ± 5,54 ^{aA}	24,03 ± 12,34 ^{aA}	25,16 ± 33,34 ^{aA}
	1%	26,09 ± 9,24 ^{aA}	30,71 ± 7,41 ^{aA}	35,64 ± 13,00 ^{aA}	40,77 ± 14,63 ^{aA}

Os valores correspondem à média (%) ± desvio padrão da remoção de biofilme das oito cepas de *Salmonella* Heidelberg.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de contato para o mesmo produto e a mesma concentração.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações para o mesmo produto e o mesmo tempo de contato.

Os detergentes ácidos podem ser divididos entre orgânicos e inorgânicos, sendo que sua ação principal é sobre minerais. Sua atuação ocorre a partir da transformação química dos minerais, tornando-os solúveis em água (ANDRADE, 2008). Os detergentes alcalinos possuem como característica principal a liberação do íon hidroxila (OH^-) que promove a saponificação dos ácidos graxos e a solubilização das proteínas, tornando os solúveis em água (ANDRADE, 2008). Outros pesquisadores avaliaram a ação de detergentes em biofilmes formados por *P. aeruginosa* e *E. faecalis* em superfícies de poliestireno, encontrando resultados efetivos na remoção destas estruturas (LUCIANO *et al.*, 2016). A ação de detergentes alcalinos e ácidos na remoção de biofilmes também foi comprovada frente a isolados de *Salmonella* presentes em superfícies de aço inoxidável e polipropileno (PRESTES; NASCIMENTO; HERTWIG, 2022). Além disto, os detergentes alcalinos e ácidos apresentam efeito positivo no controle de biofilmes de *E. coli* presentes em tubos de endoscópio (FANG *et al.*, 2010).

Comparando ao detergente ácido, o detergente alcalino à base de hidróxido de sódio foi mais eficaz na remoção do biofilme de *S. Heidelberg* em todas as concentrações e tempos de contato, independentemente da temperatura de incubação. O detergente ácido age principalmente sobre os minerais (ANDRADE, 2008), o que pode justificar uma ação

reduzida deste produto nos biofilmes, visto que é composto principalmente por substâncias que são removidas pelo detergente alcalino e não por minerais. O pH da solução também desempenha um papel importante na remoção do biofilme pelos detergentes. Assim como observado para a ECAW em soluções básicas, estudos anteriores demonstraram que soluções de NaOH em pH 11,3 foram eficazes na remoção de biofilme de *S. aureus*, ao contrário de soluções de HCl em pH 2,5 (SUN *et al.*, 2012). A solução de NaOH possui um mecanismo de ação baseado na desagregação de bicamadas lipídicas das membranas celulares que provavelmente contribui para as diferenças observadas na ação contra o biofilme de *S. Heidelberg* (MASSE; KENNEDY; CHOU, 2001).

Os mecanismos de ação dos produtos são diferentes, assim como também o momento de aplicação, sendo os detergentes utilizados na etapa de limpeza, eliminando matéria orgânica e incrustações de minerais (ANDRADE, 2008). A ECAW e o desinfetante atuam na etapa de desinfecção. É importante salientar que devido a estes objetivos de uso distintos, não houve comparação dos resultados obtidos pelos dois grupos de produtos no estudo.

Salienta-se que para a realização deste experimento não foi feito um tratamento prévio com detergentes, conforme indicado nos protocolos para remoção dos compostos orgânicos para a potencialização da ação dos desinfetantes (ANDRADE, 2008). Nesse sentido, um estudo avaliou a eficácia da ECAW no controle de *L. monocytogenes* em aço inoxidável limpo e com a presença de matéria orgânica. As concentrações da ECAW testadas foram de 25 e 250 ppm, sendo obtida uma redução de 3,6 log UFC e 5,7 log UFC após os tratamentos em superfícies limpas. Quando as mesmas concentrações foram testadas em superfícies sujas, a redução foi limitada a 0,64 log UFC e 3,3 log UFC (VEASEY; MURIANA, 2016).

Nesse estudo, a temperatura de incubação não influenciou na remoção do biofilme de *S. Heidelberg* pelos produtos testados no estudo. Diferente de outros pesquisadores que encontraram diferenças na ação do produto de acordo com a temperatura de formação do biofilme (CARVALHO *et al.*, 2022). É indicado que em estudos futuros a influencia da temperatura de formação dos biofilmes seja avaliada na ação da ECAW.

5.2 Experimento 2 – Prevenção da formação de biofilme de *Salmonella Heidelberg* em microplacas de poliestireno

5.2.1 Materiais e Métodos

O objetivo desta etapa foi avaliar a capacidade da ECAW, do desinfetante e dos detergentes em prevenir a formação de biofilme por *S. Heidelberg* em microplacas de poliestireno. A metodologia utilizada foi aquela descrita por Carvalho *et al.* (2022). A avaliação da ação dos tratamentos na prevenção da formação dos biofilmes foi realizada após 24 horas de contato com os compostos. Os produtos foram testados em duas temperaturas: a 25°C e a 37°C, simulando, respectivamente, a temperatura ambiente e a temperatura ótima de crescimento do microrganismo.

Inicialmente, microplacas estéreis de poliestireno com 96 poços de fundo plano (Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil) foram tratadas com 200 µL dos compostos em suas respectivas concentrações, seguido de incubação a 25°C e a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Após a incubação das placas, o conteúdo foi aspirado e os poços tratados com os detergentes B e C foram lavados com 250 µL de água destilada estéril. As placas foram secas em estufa bacteriológica a 37°C por uma hora e, posteriormente, foram adicionados 200 µL de cada inóculo em triplicata, preparados conforme descrito no item 5.1.1. O controle negativo de cada placa foi o caldo TSB não inoculado, também adicionado em triplicata. O controle sem tratamento para cada temperatura foi uma microplaca tratada com 200 µL de água destilada estéril. As microplacas foram incubadas novamente a 25°C e a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Após, o conteúdo foi aspirado e os poços foram lavados três vezes com 250 µL de solução de cloreto de sódio a 0,85% estéril (Synth; Diadema, Brasil), e as células bacterianas foram fixadas com 200 µL de metanol (Nuclear; Diadema, Brasil) por 20 minutos. O metanol foi removido e as microplacas foram secas em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram coradas com 200 µL de cristal violeta de *Hucker* 2% (MediQuímica; Porto Alegre, Brasil) por 15 minutos, e depois levemente lavadas em água corrente e secas novamente. Após adição de 250 µL de ácido acético glacial a 33% (Nuclear; Diadema, Brasil), foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (ELX800 Biotek; Winooski, Estados Unidos) utilizando-se um filtro de 550 nm.

A avaliação da capacidade de um composto em prevenir a formação de biofilmes foi realizada através da determinação do percentual de biomassa não formado em relação ao controle sem tratamento. Este percentual foi obtido através da seguinte fórmula (PITTS *et al.*, 2003):

$$\% \text{ prevenção/remoção de biofilme da cepa} = \frac{(C-B) - (T-B)}{(C-B)} \times 100$$

Sendo:

C: Média da triplicata da densidade óptica do controle sem tratamento;

T: Média da triplicata da densidade óptica de cada tratamento;

B: Média da triplicata da densidade óptica do controle negativo de cada placa.

5.2.2 Resultados e Discussão

Na Tabela 3, estão descritos os percentuais de prevenção da formação de biofilme de *S. Heidelberg* após o tratamento com a ECAW e com o desinfetante A por 24 horas.

Tabela 3 - Média (%) de prevenção da formação de biofilme de *Salmonella Heidelberg* após o tratamento com água eletroquimicamente ativada (ECAW), com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A), detergentes alcalino e ácido por 24 horas, conforme a variação da concentração do produto e da temperatura.

Produto	Concentração	Temperatura (°C)	
		25	37
ECAW	200 ppm	46,09 ± 8,56 ^{aA}	50,90 ± 13,60 ^{aA}
	250 ppm	58,94 ± 29,24 ^{aA}	44,27 ± 13,09 ^{aA}
	Puro	58,01 ± 17,13 ^{aA}	47,10 ± 18,59 ^{aA}
Desinfetante A	0,1%	33,49 ± 9,17 ^{aA}	47,33 ± 16,28 ^{aA}
	0,2%	38,09 ± 9,60 ^{aA}	51,74 ± 6,10 ^{aA}
	0,5%	39,84 ± 13,50 ^{aA}	47,98 ± 7,24 ^{aA}
Alcalino	0,25%	25,22 ± 13,73 ^{aA}	35,18 ± 19,68 ^{aA}
	0,5%	41,51 ± 22,59 ^{aA}	46,13 ± 20,07 ^{aA}
	1%	48,54 ± 10,98 ^{aB}	60,39 ± 11,73 ^{aA}
Ácido	0,25%	25,82 ± 12,56 ^{aA}	28,76 ± 10,30 ^{aA}
	0,5%	36,27 ± 8,17 ^{aA}	41,62 ± 7,55 ^{aA}
	1%	39,49 ± 2,52 ^{aA}	44,01 ± 7,62 ^{aB}

Os valores correspondem à média (%) \pm desvio padrão da prevenção da formação de biofilme das oito cepas de *Salmonella* Heidelberg.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as temperaturas para o mesmo produto e a mesma concentração.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações para o mesmo produto e a mesma temperatura.

Após o contato prévio por 24 horas em superfície de poliestireno, a ECAW previniu até aproximadamente 59% do biofilme formado por *S. Heidelberg* (Tabela 3). Os resultados obtidos com a ECAW foram similares ($p > 0,05$) aos observados com o desinfetante A. Logo, o efeito residual da ECAW possui ação semelhante ao desinfetante que já utilizado na indústria avícola. A ação da ECAW na prevenção de biofilmes bacterianos em diferentes concentrações e temperaturas já havia sido demonstrada por Okanda *et al.* (2019).

Assim como constatado com o desinfetante, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na ação da ECAW entre as concentrações do produto ou entre as duas temperaturas testadas. Ao contrário do que se observa para outros compostos alternativos, como óleos essenciais à base de fenólico carvacrol ou nanopartículas de prata (SONI *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2019). Em nanopartículas de prata, frente a biofilmes *S. Enteritidis*, foi observada uma capacidade de prevenir a formação em até 99,46% e de eliminar o biofilme de até 57,73% (EMERY, 2021). A ação da ECAW na prevenção do biofilme de *S. Heidelberg* demonstra não ser dependente da concentração do produto. Porém, assim como relatado no Experimento 1, a capacidade na prevenção da formação de biofilme dos desinfetantes clorados dependem fortemente da concentração de HOCl. O conteúdo de HOCl no desinfetante de cloro está relacionado ao pH (OKANDA *et al.*, 2019). Logo, apesar dos resultados demonstrarem que a ECAW é uma alternativa ao desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio, o controle do pH da ECAW é fundamental, pois este pode influenciar na eficácia do composto (IGNATOV *et al.*, 2015).

Além disto, o sucesso na prevenção da formação do biofilme, independentemente do composto, mantém relação com a realização de procedimentos adequados de limpeza e desinfecção, com ênfase nas superfícies de processamento de alimentos (CRAVEIRO *et al.*, 2015). Segundo Gosling (2017), grande parte dos produtos falharam em controlar biofilmes de *Salmonella* após 4 dias de maturação. Nguyen e Yuk (2013) pesquisaram o efeito das condições de maturação na resistência de biofilmes de *Salmonella*

Typhimurium aos desinfetantes. Os autores observaram que o envelhecimento do biofilme resultou em maior resistência, embora a extensão dessa melhoria fosse altamente dependente das condições de desenvolvimento do biofilme. (DUONG; NGUYEN; YUK, 2013). A presença de matéria orgânica é outro fator a ser considerado para a aplicação dos desinfetantes. Wales *et al.* (2006) observaram ser mais importante a realização adequada do processo de limpeza e desinfecção do que depender da aplicação do desinfetante de maior eficácia no final de um processo deficitário. Isso porque o uso de um desinfetante sozinho, mesmo na presença de uma camada fina de matéria orgânica, raramente é eficaz (WALES; BRESLIN; DAVIES, 2006).

Analisando-se a prevenção da formação do biofilme nas diferentes condições avaliadas a 25°C, observa-se que o detergente alcalino na maior concentração removeu um maior percentual de biofilme ($p < 0,05$) do que nas demais. Já a 37°C, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações do desinfetante alcalino. O detergente ácido apresentou variação da sua ação na remoção do biofilme somente a 37°C, sendo que a maior concentração removeu um percentual significativamente maior ($p < 0,05$) de biofilme em relação às demais concentrações. Por último, a ação na remoção do biofilme nas concentrações de ambos detergentes não foi significativamente diferente ($p > 0,05$) nas duas temperaturas analisadas, indicando uma boa atividade em ambas as situações.

Apesar de não ser a função principal dos detergentes, outros estudos também comprovaram a eficácia de detergentes ácidos e alcalinos na remoção do biofilme de *Salmonella* (GOSLING *et al.*, 2017). Estes produtos também são capazes de prevenir a formação de biofilmes de *Vibrio parahaemolyticus* e os detergentes alcalinos podem ser utilizados na lavagem de frutas, demonstrando resultados efetivos no controle de *E. coli* (ELEXSON *et al.*, 2014; DANYLUK *et al.*, 2019).

Os detergentes alcalino e ácido não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) na prevenção da formação de biofilme, independentemente da temperatura e das concentrações utilizadas. Apesar do crescimento bacteriano e da adesão celular serem maiores com o aumento da temperatura, a partir de 24 horas de incubação a adesão bacteriana é similar tanto a 25°C quanto a 37°C (PRESTES; NASCIMENTO; HERTWIG, 2022). Assim, trabalhos futuros com períodos de incubação inferiores, por exemplo de 8 horas, devem ser realizados para avaliação da influencia da temperatura na cinética de formação do biofilme.

O biofilme pode ser controlado impedindo-se a produção da matriz de EPS pelas bactérias ou se tratando o biofilme já estabelecido com produtos químicos e com procedimentos de limpeza (NAHAR, 2018). Ambos os detergentes, assim como a ECAW e o desinfetante, foram capazes de prevenir a formação de biofilme, indicando serem importantes ferramentas no controle e remoção de patógenos, como *S. Heidelberg*. Por último, observa-se uma ampla variação dos resultados obtidos nos testes de remoção e de prevenção da formação de biofilme, demonstrado através do desvio padrão alto em cada tratamento, o que pode ser justificado pela variação intrínseca das cepas e pela técnica empregada no estudo. No entanto, a mesma é considerada uma técnica simples e mais eficaz na quantificação de biomassa bacteriana (STIEFEL *et al.*, 2016).

5.3 Experimento 3 - Formação de biofilme de *Salmonella* Heidelberg em superfícies utilizadas na cadeia avícola em diferentes temperaturas

5.3.1 Materiais e Métodos

O objetivo desta etapa foi avaliar a capacidade de formação de biofilme de *S. Heidelberg* no aço inoxidável e no polietileno de alta densidade. A metodologia utilizada foi adaptada a partir das técnicas descritas por (PONTIN et al., 2021).

Cupons de aço inoxidável (AISI 316) e de polietileno de alta densidade confeccionados nas dimensões de 1 cm (largura) x 1 cm (comprimento) x 0,1 cm (espessura) foram utilizados. Os cupons foram submetidos à limpeza manual com auxílio de esponja não abrasiva, água e detergente neutro líquido. Após, procedeu-se o enxágue e a imersão dos cupons em água destilada por 24 horas, seguido de imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 24 horas e de um novo enxágue com água destilada. Por último, cada lado da superfície dos cupons foi esterilizado em luz ultravioleta por 2 horas.

Uma microplaca estéril de poliestireno com 12 poços de fundo plano (Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil) foi utilizada para a avaliação da adesão microbiana de cada *pool* de *S. Heidelberg*. Após o preparado dos inóculos, conforme descrito no item 5.1.1, foram adicionados 3 mL de cada *pool* em triplicata nos poços. Em seguida, os cupons de aço inoxidável e de polietileno foram adicionados individualmente e as placas foram incubadas a 25°C e a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Cada superfície foi testada em triplicata em uma mesma microplaca. Após a incubação, os cupons foram retirados dos poços com o auxílio de uma pinça estéril e foram lavados com 5 mL de água peptonada tamponada (APT) estéril a 0,1% (Merck; Darmstadt, Alemanha) para remoção das células planctônicas. Posteriormente, os cupons foram adicionados em tubos contendo 5 mL de APT estéril a 0,1% e esferas de vidro estéreis e foram agitados em vórtex (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) durante um minuto para remoção das células sésseis.

Para a contagem bacteriana em UFC/mL, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) em solução de cloreto de sódio estéril a 0,85% para cada cupom. As diluições foram transferidas para o meio XLD para quantificação pelo método *drop plate* (inoculação de cinco gotas de 10 μ L de cada diluição) após incubação a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica (MILLES; MISRA, 1938). Para a determinação da contagem

microbiológica, foi considerada a área de superfície dos dois lados do cupom, além da sua área lateral, utilizando-se a seguinte fórmula (GEHLEN, 2016):

$$\text{UFC.cm}^{-2} = (\text{Vd/Va}) \times \text{M} \times (\text{D/A})$$

Sendo:

Vd: volume do diluente utilizado no enxágue (5 mL);

Va: volume da alíquota utilizada no plaqueamento (0,05 mL);

M: média da contagem obtida nas placas (UFC/mL);

D: diluição utilizada na contagem;

A: área do cupom (2,4 cm²).

5.3.2 Microscopia eletrônica

A microscopia confocal de varredura a laser foi realizada com o objetivo de se visualizar e de se comparar *in situ* a adesão das células bacterianas nas diferentes superfícies. As análises foram desenvolvidas de acordo com o protocolo utilizado no Centro de Microscopia de Microanálises (CMM) da UFRGS. A microscopia foi realizada posteriormente à tabulação e interpretação dos resultados de adesão microbiana dos dois *pools* de *S. Heidelberg* nos cupons de aço inoxidável e de polietileno. Como não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na adesão microbiana entre os *pools*, somente o *pool* 1 foi selecionado para a realização da microscopia. O teste foi realizado em microplaca estéril de poliestireno com 12 poços de fundo plano, sendo o cupom de cada superfície adicionado em poços independentes. A formação do biofilme nos cupons foi realizada como descrita no item 5.3.1. No CMM, um volume de 2 μL de uma solução de 1:1 de corante fluorescente SYTO9 (3.34mM em *Dimethyl sulfoxide* - DMSO) e de iodeto de propídio (20 mM em DMSO) do *Kit LIVE/DEAD BacLight™ Viability* (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) foram adicionados a 497,5 μL de cloreto de sódio estéril a 0,85%. Posteriormente, 50 μL da solução foram depositados sobre os cupons. A microplaca com os cupons foi mantida no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos para que o marcador fluorescente se liga-se às células bacterianas. Na microscopia confocal, o SYTO9 emite uma fluorescência verde quando a membrana bacteriana está intacta, ou seja, quando a célula se encontra viável. As membranas bacterianas lesadas são marcadas pelo iodeto de propídio, que emite fluorescência vermelha e marca as células bacterianas mortas com membranas danificadas (PEREIRA, 2019). As análises foram realizadas no microscópio confocal modelo *FluoView™*

FV10000 (Olympus Inc. Tóquio Japão), no qual as seções do eixo Z foram reconstruídas tridimensionalmente. A análise e o processamento das imagens foram feitos utilizando-se o *software Olympus Fluoviwe v.4.* (Olympus Inc. Tóquio Japão).

5.3.3 Resultados e Discussão

Na Tabela 4, estão descritas as contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) obtidas nos ensaios de formação de biofilme por *S. Heidelberg* nos cupons de aço inoxidável e de polietileno após 24 horas de incubação.

Tabela 4 – Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) obtidas no ensaio de formação de biofilme por *Salmonella Heidelberg*, conforme a superfície de contato e a temperatura.

Superfície	Temperatura (°C)	
	25	37
Aço inoxidável	6,66 ± 0,29 ^{aA}	7,29 ± 0,10 ^{bA}
Polietileno	7,28 ± 0,10 ^{aB}	7,54 ± 0,18 ^{aA}

Os valores correspondem à média (\log_{10} UFC.cm⁻²) ± desvio padrão das contagens das colônias das oito cepas de *S. Heidelberg*.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as temperaturas para a mesma superfície.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as superfícies para a mesma temperatura.

A adesão e formação de biofilmes por patógenos de origem alimentar consistem em uma grande preocupação relacionada à seguridade dos alimentos e à alta probabilidade da ocorrência de contaminações cruzadas (GALIÉ *et al.*, 2018). As principais vias de contaminação são do ar para o alimento, da superfície para o alimento em fluidos e do contato direto da superfície com o alimento (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2008). Mais de 98% das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de surtos alimentares são capazes de produzir biofilme, sendo que aproximadamente 42% destas são classificadas como fortemente produtoras (MORAES *et al.*, 2018). Estima-se que cerca de 50% dos

isolados de *Salmonellas* spp. de granjas avícolas são capazes de produzir biofilme em estruturas de produção, como em paredes, pisos, canos e ralos, e em superfícies de contato formadas por diferentes materiais, como o aço inoxidável, alumínio, náilon, borracha, plástico, poliestireno e vidro (MARIN; HERNANDIZ; LAINEZ, 2009; WANG *et al.*, 2013; MERINO *et al.*, 2019). Os resultados encontrados no presente estudo corroboram esses estudos e reafirmam a necessidade de controles para a prevenção da formação de biofilmes.

Conforme Voss-Rech *et al.* (2019), a região sul do Brasil apresenta entre 5% e 11% de positividade para *Salmonella* não tifóide de origem aviária, destacando-se o aumento nos últimos anos da prevalência de *S. Heidelberg* e de outros sorovares como *S. Hadar*, *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka*, *S. Newport*, *S. Infantis* e *S. Senftenberg*. Neste contexto, os resultados obtidos ratificam a capacidade do sorovar *S. Heidelberg* em formar biofilmes em superfícies comumente utilizadas em incubatórios, granjas e matadouros-frigoríficos de aves (VOSS-RECH *et al.*, 2019), o que pode justificar a dificuldade de eliminação desse patógeno e o seu maior isolamento na cadeia avícola.

No atual estudo, *S. Heidelberg* foi capaz de formar biofilmes em uma faixa aproximada de 6 a 7 log₁₀ UFC.cm⁻², tanto no aço inoxidável quanto em polietileno. Esses resultados são similares aos observados por outros autores que também relataram que *Salmonella* spp. formou biofilmes com cerca de 5 log₁₀ UFC.cm⁻² em aço inoxidável e 7 log₁₀ UFC.cm⁻² em polietileno (JOSEPH *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Com exceção à temperatura de 25°C, a formação de biofilme foi similar nas duas superfícies. Da mesma forma, Tondo *et al.* (2010) não observaram diferença na adesão dos sorovares *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, e *S. Bredeney* em superfícies de aço inoxidável e polietileno. Nos resultados, também se observa um importante desvio padrão das médias das contagens bacterianas nas superfícies antimicrobianas, independentemente da temperatura de incubação. Dentro de um mesmo sorovar de *Salmonella* spp., existem variações importantes quanto à habilidade em se produzir biofilme (TONDO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018). Estas diferenças podem estar relacionadas com características intrínsecas das cepas, como a presença de genes associados à produção de biofilme (WANG *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2018).

Isolados que possuem alta capacidade de adesão e formação de biofilmes apresentam um risco maior de persistência em superfícies, equipamentos e instalações. Além disso, apresentam maior resistência aos agentes empregados nos procedimentos de higienização quando comparados aos microrganismos em forma de vida sésil (WANG

et al., 2017). O biofilme formado pode atuar como uma barreira física que impede ou limita a ação de agentes saneantes, tornando a eliminação desses patógenos um grande desafio em instalações de processamento de alimentos (WANG *et al.*, 2017; LAJHAR; BROWNLIE; BARLOW, 2018).

Além da capacidade de *S. Heidelberg* em formar biofilme em aço inoxidável, a qual já havia sido relatada anteriormente (Moraes, 2018), observou-se a influência da temperatura de incubação na variação da contagem bacteriana. O aumento de temperatura para 37°C resultou em uma maior formação de biofilme ($p < 0,05$) nos cupons de aço inoxidável. As variações de temperatura são críticas para a atividade enzimática bacteriana e afetam estruturas celulares, como flagelos, fímbrias, pili, curli e lipopolissacarídeos, responsáveis pela adesão inicial da bactéria às superfícies durante a formação do biofilme (VAN HOUTT; MICHIELS, 2010). Moraes *et al.* (2018) também observou que a capacidade de formação de biofilme em aço inoxidável de diferentes sorovares de *Salmonella*, incluindo-se *S. Heidelberg*, foi negativamente influenciada pela diminuição da temperatura de incubação. Porém, é importante salientar que a redução de temperatura pode reduzir o metabolismo bacteriano de alguns sorovares de *Salmonella*, mas não se inibe totalmente a formação de biofilme em temperaturas mais baixas (MORAES *et al.*, 2018).

Ao contrário do que foi observado no aço inoxidável, não ocorreu uma diferença significativa ($p > 0,05$) na formação de biofilme nas superfícies de polietileno com a variação das temperaturas de incubação. Por outro lado, houve uma maior formação de biofilme ($p < 0,05$) a 25°C na superfície de polietileno quando comparada à superfície de aço inoxidável. Dantas *et al.* (2018) constataram um percentual superior de biofilme de *S. Enteritidis* em madeira (60%), uma superfície com várias ranhuras, seguida de superfícies polímeras (40%) e de vidro (10%). Além disto, *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes* aderem-se melhor e produzem mais biofilme em superfícies hidrofóbicas (SINDE; CARBALLO, 2000; WANG *et al.*, 2017). Placas de polietileno são utensílios comumente utilizados em ambientes domésticos ou industriais e são superfícies propícias à ocorrência de contaminação cruzada (DANTAS *et al.*, 2018). Além disto, apesar de a lavagem das tábuas de corte com detergente de cozinha reduzir a contaminação bacteriana, é fundamental a posterior desinfecção dos utensílios para se garantir a segurança microbiológica dos alimentos (BARKER; NAEENI; BLOOMFIELD, 2003).

Neste aspecto, o *design* das instalações e equipamentos e a escolha dos materiais e revestimentos usados na indústria são extremamente importantes e consistem na melhor

estratégia para se evitar a formação de biofilmes (COUGHLAN *et al.*, 2016). Mesmo se adotando programas de limpeza e higienização eficazes, não é possível higienizar adequadamente cantos, fissuras, fendas, válvulas e juntas inacessíveis que são pontos vulneráveis ao acúmulo de biofilme (MERINO *et al.*, 2019). Soma-se a isto, a possível resistência dos biofilmes de *Salmonella* spp. a desinfetantes e antimicrobianos (COUGHLAN *et al.*, 2016).

Na Figura 2 são apresentadas as micrografias geradas pela microscopia confocal de varredura (*Confocal Laser Scanning Microscopy* - CLSM) para avaliação da formação dos biofilmes de *S. Heidelberg* obtidos nas superfícies de aço inoxidável e de polietileno, a 25°C e a 37°C. A utilização da CLSM para análise das células *in situ* permitiu a avaliação e ratificação dos resultados microbiológicos obtidos anteriormente. As imagens geradas através da CLSM mostram a presença de células bacterianas, cuja quantidade corresponde aos números cultiváveis de células recuperadas no meio seletivo (NOYCE *et al.*, 2006). Desta forma, ao se analisar as diferenças de adesão entre as superfícies, observa-se uma menor adesão celular bacteriana no aço inoxidável, o que corrobora as contagens encontradas nos testes microbiológicos, nos quais a formação do biofilme em polietileno foi 1 log maior na temperatura de 25°C.

Através de análises também realizadas por CLSM, *S. Heidelberg* demonstrou-se capaz de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável e em cupos de polietileno, respectivamente, nos estudos desenvolvidos por Wang *et al.* (2013b) e González-Machado *et al.* (2018). Byun *et al.* (2021) também identificaram a capacidade de formação de biofilme de *S. Enteritidis* em cupons de poliestireno e aço inoxidável.

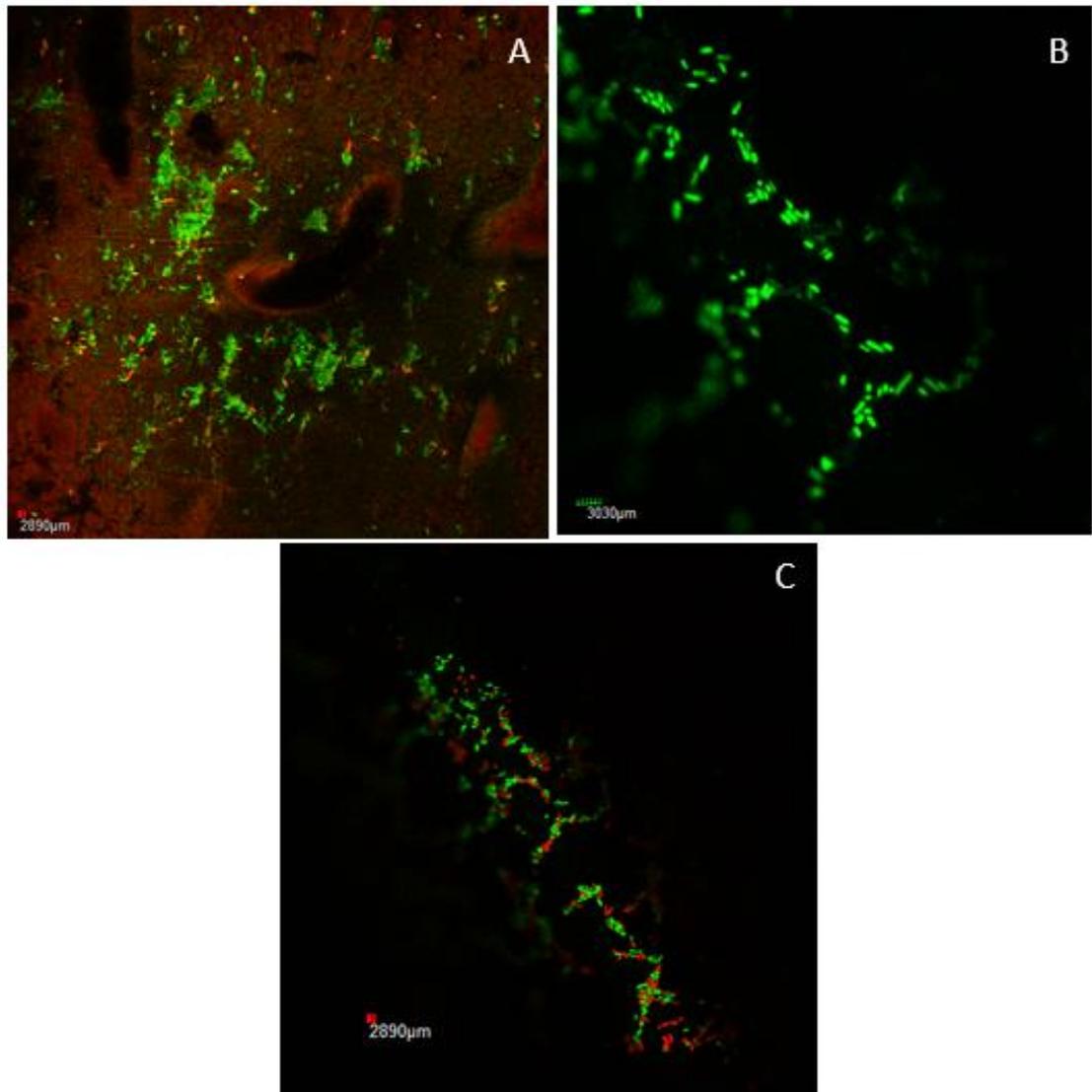


Figura 2 - Micrografias obtidas através de microscopia confocal de varredura da formação de biofilme por *Salmonella* Heidelberg nas superfícies avaliadas: aço inoxidável - AISI 316 (A) e polietileno (B e C). Células viáveis marcadas em verde e células inviáveis em vermelho.

5.4 Experimento 4 - Remoção de biofilme de *Salmonella* Heidelberg de superfícies utilizadas na cadeia avícola

5.4.1 Materiais e Métodos

O objetivo desta etapa foi avaliar a capacidade dos compostos em remover o biofilme previamente formado por *S. Heidelberg* em cupons de aço inoxidável e de polietileno de alta densidade. A metodologia utilizada foi a técnica descrita por Carvalho *et al.* (2022). A seleção dos produtos e das respectivas concentrações, além do tempo de contato a ser avaliado, foi determinada de acordo com os melhores resultados obtidos nos Experimento 1 e 2, descritos nos itens 5.1 e 5.2. Assim, a ECAW foi avaliada na concentração de 200 ppm e o desinfetante A na concentração recomendada pelo fabricante (0,2%). Os tempos de contato foram de 10 e 20 minutos.

A formação de biofilme foi realizada conforme descrito anteriormente no item 5.3.1. Uma microplaca estéril de poliestireno com 12 poços de fundo plano (Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil) foi utilizada para cada *pool* de *S. Heidelberg*. Após o preparo dos inóculos, foram adicionados 3 mL de cada *pool* em triplicata nos poços. Em seguida, os cupons de aço inoxidável e de polietileno foram adicionados e as placas foram incubadas a 25°C e a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Cada superfície foi testada em triplicata em uma mesma microplaca. Após a incubação, os cupons foram retirados dos poços com o auxílio de uma pinça estéril e foram lavados com 5 mL de APT estéril a 0,1% (Merck; Darmstadt, Alemanha), para remoção das células planctônicas. Os cupons foram transferidos para outra microplaca contendo 3 mL de cada produto a ser testado, em triplicata. Como controle negativo de cada placa, foi utilizado um tratamento com 3 mL de água destilada estéril, também em triplicata.

Após 10 e 20 minutos de contato, os cupons foram adicionados em 5mL de APT estéril a 0,1% com agentes neutralizantes (Tween 80 - polisorbato [Dinâmica; Diadema, Brasil] tiossulfato de sódio [Dinâmica; Diadema, Brasil]) e esferas de vidro estéreis por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os tubos contendo os cupons foram agitados em vórtex por um minuto para remoção das células sésseis. Para a contagem bacteriana em UFC/mL, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) em solução de cloreto de sódio estéril a 0,85% para cada cupom. As diluições foram transferidas para o meio XLD para quantificação pelo método *drop plate* (inoculação de cinco gotas de 10 μ L de cada diluição) após incubação a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica (MILLES;

MISRA, 1938). Para a determinação da contagem microbiológica, foi considerada a área de superfície dos dois lados do cupom, além da sua área lateral, utilizando-se a fórmula descrita no item 5.3.2.

5.4.2 Microscopia eletrônica

A microscopia confocal de varredura a laser foi realizada com o objetivo de se visualizar e de se comparar *in situ* o efeito dos tratamentos na adesão das células bacterianas nas diferentes superfícies. Como não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na adesão microbiana entre os *pools*, somente o *pool* 1 foi selecionado para a realização da microscopia. Para avaliar a remoção do biofilme, os cupons foram lavados com 5mL de água destilada estéril para remoção das células planctônicas após o tratamento. As análises foram desenvolvidas no CMM da UFRGS e interpretadas de acordo com o protocolo descrito no item 5.3.1.

5.4.3 Resultados e Discussão

5.4.3.1 Efeito da temperatura e do tempo de contato nos tratamentos das superfícies para a remoção de biofilme de *Salmonella* Heidelberg

Na Tabela 5 estão descritas as contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) obtidas nos cupons de aço inoxidável e de polietileno após o tratamento do biofilme de *S. Heidelberg* com a ECAW e com o desinfetante.

Tabela 5 - Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) após o tratamento do biofilme de *Salmonella* Heidelberg em aço inoxidável e polietileno com a água eletroquimicamente ativada (ECAW) e com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A), conforme a variação da temperatura e do tempo de contato.

Tratamento	Temperatura (°C)	Tempo de contato (minutos) em Aço Inox		Tempo de contato (minutos) em Polietileno	
		10	20	10	20
		Controle		6,67 ± 0,29 ^{aA}	6,67 ± 0,29 ^{aA}
ECAW	25	3,44 ± 0,15 ^{aB}	2,67 ± 0,12 ^{bB}	4,77 ± 0,14 ^{aB}	2,62 ± 0,12 ^{bB}
Desinfetante A		3,63 ± 0,11 ^{aB}	2,97 ± 0,29 ^{bB}	5,08 ± 0,12 ^{aC}	4,88 ± 0,08 ^{bC}
Controle		7,29 ± 0,10 ^{aA}	7,29 ± 0,10 ^{aA}	7,54 ± 0,18 ^{aA}	7,54 ± 0,18 ^{aA}
ECAW	37	3,10 ± 0,27 ^{aB}	2,77 ± 0,25 ^{aB}	4,64 ± 0,19 ^{aB}	2,62 ± 0,00 ^{bB}
Desinfetante A		3,10 ± 0,27 ^{aB}	3,01 ± 0,25 ^{aB}	5,37 ± 0,16 ^{aC}	4,97 ± 0,22 ^{bC}

Os valores correspondem à média (\log_{10} UFC.cm⁻²) ± desvio padrão das contagens das colônias das oito cepas de *Salmonella* Heidelberg.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de contato para o mesmo tratamento e a mesma temperatura.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para o mesmo tempo de contato e a mesma temperatura.

No atual estudo, a ECAW e o desinfetante A tiveram resultados efetivos na remoção de biofilme de *S. Heidelberg*. Em todas as superfícies, temperaturas de incubação e tempos de contato avaliados, os compostos apresentam uma contagem bacteriana significativamente inferior ($p < 0,05$) ao controle. Além disso, a contaminação observada no polietileno foi maior após o tratamento com o desinfetante A do que com a ECAW, independentemente do tempo de contato e da temperatura. Os resultados foram similares ao estudo de Tondo *et al.* (2010) que avaliaram a eficiência de desinfetantes à base de ácido peracético, amônia quaternária e hipoclorito de sódio frente a diferentes sorovares de *Salmonella* spp, em que os desinfetantes não eliminaram completamente o patógeno, apesar de uma significativa redução.

Independente do tempo de contato, nenhum dos tratamentos foi capaz de eliminar completamente *S. Heidelberg*. Outros estudos também demonstraram uma resistência dos biofilmes de *Salmonella* frente a desinfetantes à base de amônia quaternária e de dióxido de cloro (WANG *et al.*, 2017). É provável que a presença da bactéria seja justificada pela maior resistência dos biofilmes aos desinfetantes e

compostos bactericidas (PANG *et al.*, 2019), A característica hidrofóbica desta superfície também favorece a adesão microbiana e dificulta a ação dos produtos (TONDO *et al.*, 2010).

Quando se compara a ação dos compostos, observa-se que a ECAW apresentou ação similar ($p > 0,05$) ao desinfetante A na superfície de aço inoxidável, em ambas temperaturas e tempos de contato. A ECAW também teve uma melhor ação sobre os biofilmes de *S. Heidelberg* nas superfícies de polietileno do que o desinfetante em ambas as temperaturas. A ECAW tem sido amplamente recomendada como um substituto aos desinfetantes, devido aos seus fortes efeitos bactericidas em diferentes microrganismos patogênicos e deteriorantes (HUANG *et al.*, 2008; VEASEY; MURIANA, 2016; WANG *et al.*, 2019a). O efeito do cloro em suas diferentes formas (Cl_2 , OCl^- e HCl) é bem reconhecido e desempenha um papel importante na ação antimicrobiana da ECAW. O HOCl pode penetrar na bicamada lipídica da membrana celular por difusão passiva e é um poderoso agente oxidante (TANG *et al.*, 2011; AKBULUT, 2019). Por outro lado, o OCl^- não é capaz de penetrar na célula microbiana e age somente na inativação de proteínas funcionais localizadas na membrana plasmática. Além do cloro, outros compostos de espécies reativas de oxigênio podem ser produzidos no processo de eletrólise, o que contribui para a eficiência antimicrobiana da ECAW (MEMAR *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos indicam que, independentemente do tratamento, o tempo de contato de 20 minutos diminui significativamente ($p < 0,05$) o biofilme de *S. Heidelberg*, exceto no aço inoxidável a 37°C . Assim, demonstra-se a importância de se manter o desinfetante em contato com as superfícies por um período maior (REGALADO *et al.*, 2016). Teoricamente, uma desvantagem do uso da ECAW seria o fato de que a solução rapidamente perderia sua atividade antimicrobiana devido à diminuição do cloro livre residual (WANG *et al.*, 2019a). Por outro lado, os níveis de pH, ORP e condutividade são relativamente estáveis, mantendo-se o potencial oxidante da solução e possivelmente se justificando a ação da ECAW mesmo em tempos maiores de exposição (THORN *et al.*, 2012; RAHMAN; KHAN; OH, 2016). Trabalhos anteriores demonstraram que o tempo de contato maior também influenciou a ação da ECAW frente ao norovírus humano. O aumento do tempo de exposição em 5, 10, 15 e 30 minutos reduziu a quantidade do vírus de forma significativa em 0,5, 1,6, 2,4 e 5 log UFC, respectivamente (MOORMAN, ERICMONTAZERI; JAYKUS, 2017). Qiao Han *et al.* (2017) também demonstraram que períodos prolongados de contato com a ECAW foram melhores na remoção de patógenos

alimentares, como *Vibrio parahaemolyticus* e *L. monocytogenes* (HAN *et al.*, 2017). Além disto, os desinfetantes também são importantes na prevenção da adesão microbiana, pois possuem efeitos residuais (SINDE; CARBALLO, 2000).

Os resultados indicam que o tempo de tratamento é mais importante para a ação dos compostos que a temperatura de formação do biofilme. O tempo de contato de 20 minutos foi melhor para o controle do biofilme em ambas superfícies a 25°C e, no polietileno, a 37°C. Os tratamentos com antimicrobianos com um tempo de contato maior são mais eficazes (WILSMANN *et al.*, 2019). É visto que a ECAW possui ação em tempos curtos, no entanto é importante ressaltar que períodos maiores potencializam sua ação (BESSI *et al.*, 2014).

5.4.3.2 Efeito das superfícies na remoção do biofilme de *Salmonella* Heidelberg

Na Tabela 6 estão descritas as contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) obtidas após o tratamento para remoção do biofilme de *S. Heidelberg* com a ECAW e com o desinfetante A, a 25°C e 37°C, nas diferentes superfícies.

Tabela 6 - Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) após o tratamento do biofilme de *Salmonella* Heidelberg a 25°C e 37°C com a água eletroquimicamente ativada (ECAW) e com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A), conforme a variação do tempo de contato e da superfície.

Tratamento	Tempo de contato (minutos)	Superfície em 25°C		Superfície em 37°C	
		Aço inoxidável	Polietileno	Aço inoxidável	Polietileno
Controle	10	6,67 ± 0,29 ^{aA}	7,28 ± 0,18 ^{aA}	7,29 ± 0,10 ^{aA}	7,54 ± 0,18 ^{aA}
ECAW		3,44 ± 0,15 ^{aB}	4,77 ± 0,14 ^{bB}	3,10 ± 0,27 ^{aB}	4,64 ± 0,19 ^{bB}
Desinfetante A		3,63 ± 0,11 ^{aB}	5,08 ± 0,12 ^{bC}	3,10 ± 0,27 ^{aB}	5,37 ± 0,16 ^{bC}
Controle	20	6,67 ± 0,29 ^{aA}	7,54 ± 0,18 ^{aA}	7,29 ± 0,10 ^{aA}	7,54 ± 0,18 ^{aA}
ECAW		2,67 ± 0,12 ^{aB}	2,62 ± 0,00 ^{aB}	2,77 ± 0,25 ^{aB}	2,62 ± 0,00 ^{aB}
Desinfetante A		2,97 ± 0,29 ^{aC}	4,88 ± 0,08 ^{bC}	3,01 ± 0,25 ^{aB}	4,97 ± 0,22 ^{bC}

Os valores correspondem à média (\log_{10} UFC.cm⁻²) ± desvio padrão das contagens das colônias das oito cepas de *Salmonella* Heidelberg.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as superfícies para o mesmo tratamento e o mesmo tempo de contato.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para a mesma superfície e o mesmo tempo de contato.

Apesar de atuarem nos biofilmes, os compostos não foram capazes de inativar todos os microrganismos aderidos, independentemente da superfície. Assim como relatado por Tondo *et al.* (2010), contagens bacterianas significativamente mais altas ($p < 0,05$) foram observadas em cupons de polietileno. A possível presença de microrranhuras, vista no polietileno favorece a maior formação de biofilme, e dificultam a ação do desinfetante, já que o material não fica totalmente submerso durante o tratamento. Assim, os processos de higienização são prejudicados (FLEMMING *et al.*, 2016; GALIÉ *et al.*, 2018). Os resultados confirmam a importância de se evitar a formação do biofilme, visto que sua completa eliminação é dificultada pela presença da matriz de EPS que fornece proteção contra a ação bactericida dos compostos (AZEVEDO; COSTA, 2012; SATPATHY *et al.*, 2016).

Na Tabela 7 estão descritas as contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) obtidas após o tratamento do biofilme de *S. Heidelberg* com a ECAW e com o desinfetante A, conforme a variação da superfície e da temperatura de incubação.

Tabela 7 - Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) após o tratamento do biofilme de *Salmonella Heidelberg* por 10 e 20 minutos com a água eletroquimicamente ativada (ECAW) e com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A), conforme a variação da superfície e da temperatura de incubação.

Tratamento	Superfície	Temperatura (°C) por 10 minutos		Temperatura (°C) por 20 minutos	
		25	37	25	37
Controle		6,67 ± 0,29 ^{aA}	7,29 ± 0,10 ^{aA}	7,29 ± 0,10 ^{aA}	7,29 ± 0,10 ^{aA}
ECAW	Aço inox	3,44 ± 0,09 ^{aB}	3,10 ± 0,27 ^{bB}	2,67 ± 0,12 ^{aB}	2,77 ± 0,25 ^{aB}
Desinfetante A		3,63 ± 0,11 ^{aB}	3,10 ± 0,27 ^{bB}	2,96 ± 0,29 ^{aB}	3,01 ± 0,25 ^{aB}
Controle		7,28 ± 0,18 ^{aA}	7,54 ± 0,18 ^{aA}	7,28 ± 0,10 ^A	7,54 ± 0,18 ^{aA}
ECAW	Polietileno	4,77 ± 0,14 ^{aB}	4,64 ± 0,19 ^{aB}	2,67 ± 0,12 ^B	2,62 ± 0,00 ^{aB}
Desinfetante A		5,08 ± 0,12 ^{aC}	5,37 ± 0,16 ^{bC}	4,88 ± 0,08 ^{aC}	4,97 ± 0,22 ^{aC}

Os valores correspondem à média (\log_{10} UFC.cm⁻²) ± desvio padrão das contagens das colônias das oito cepas de *S. Heidelberg*.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as temperaturas para o mesmo tratamento e o mesmo tempo de contato.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para a mesma superfície e a mesma temperatura.

Quando o efeito da temperatura para a formação dos biofilmes é avaliado após 10 minutos de contato, observa-se que houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na contagem bacteriana a 37°C para os dois compostos no aço inoxidável e apenas para o desinfetante A no polietileno.. Em ambas as superfícies a redução foi inferior a 1 log. No tempo de 20 minutos, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos tratamentos entre as diferentes temperaturas de incubação, independentemente da superfície avaliada.

Conforme as recomendações da *American Public Health Association* (APHA 2014), é necessário que os sanitizantes físicos ou químicos reduzam em até 2 log (\log_{10} UFC.cm⁻²) o número de microrganismos para que as superfícies sejam consideradas higienizadas. De acordo com a norma EN 13697:2001 do teste de superfícies da União Europeia (União Europeia 2001b; MØRETRØ *et al.*, 2009), em superfícies com biofilmes, a redução deve ser de no mínimo 4 log (\log_{10} UFC.cm⁻²),. No atual estudo, a ECAW foi efetiva na remoção de biofilme de *S. Heidelberg* em ambos os tempos de contato, atingindo os padrões mínimos estabelecidos. Após 10 minutos de exposição, o tratamento com a ECAW apresentou uma redução média de 3 log (\log_{10} UFC.cm⁻²) na contagem bacteriana em relação ao controle nas duas superfícies. Já após 20 minutos, a redução foi de 5 logs (\log_{10} UFC.cm⁻²) em relação ao controle, tanto no aço inoxidável quanto no polietileno, independentemente da temperatura de incubação. Além disto, o tratamento com a ECAW apresentou uma redução média de 2 log (\log_{10} UFC.cm⁻²) da contagem bacteriana no polietileno, em ambas as temperaturas, em relação ao desinfetante A, já utilizado na indústria.

A partir destes resultados promissores, o emprego da ECAW também tem sido sugerido em outros sistemas de produção animal. Conforme Jim *et al.* (2021), a ECAW consiste em uma alternativa sustentável e de menor custo para o controle de biofilmes e para a desinfecção de canulações utilizadas em laticínios. A nebulização com ECAW também é facilmente adaptada a uma variedade de aplicações, podendo ser utilizada em salas de ovos ou em instalações com animais. A utilização da ECAW na forma de aspersão em salas de desmame de granjas de suínos reduz significativamente a carga bacteriana total (TENZIN *et al.*, 2019).

A ECAW também pode ser uma alternativa aos processos de desinfecção atuais da cadeia avícola que utilizam formaldeído e que necessitam de um longo período de vazio das instalações. O formol é um irritante de mucosas e a sua fumigação tem um odor nocivo persistente (SWENBERG *et al.*, 2014; GRAHAM *et al.*, 2018;). Quando a ECAW entra em contato com a matéria orgânica ou é diluída em água potável, retorna ao estado

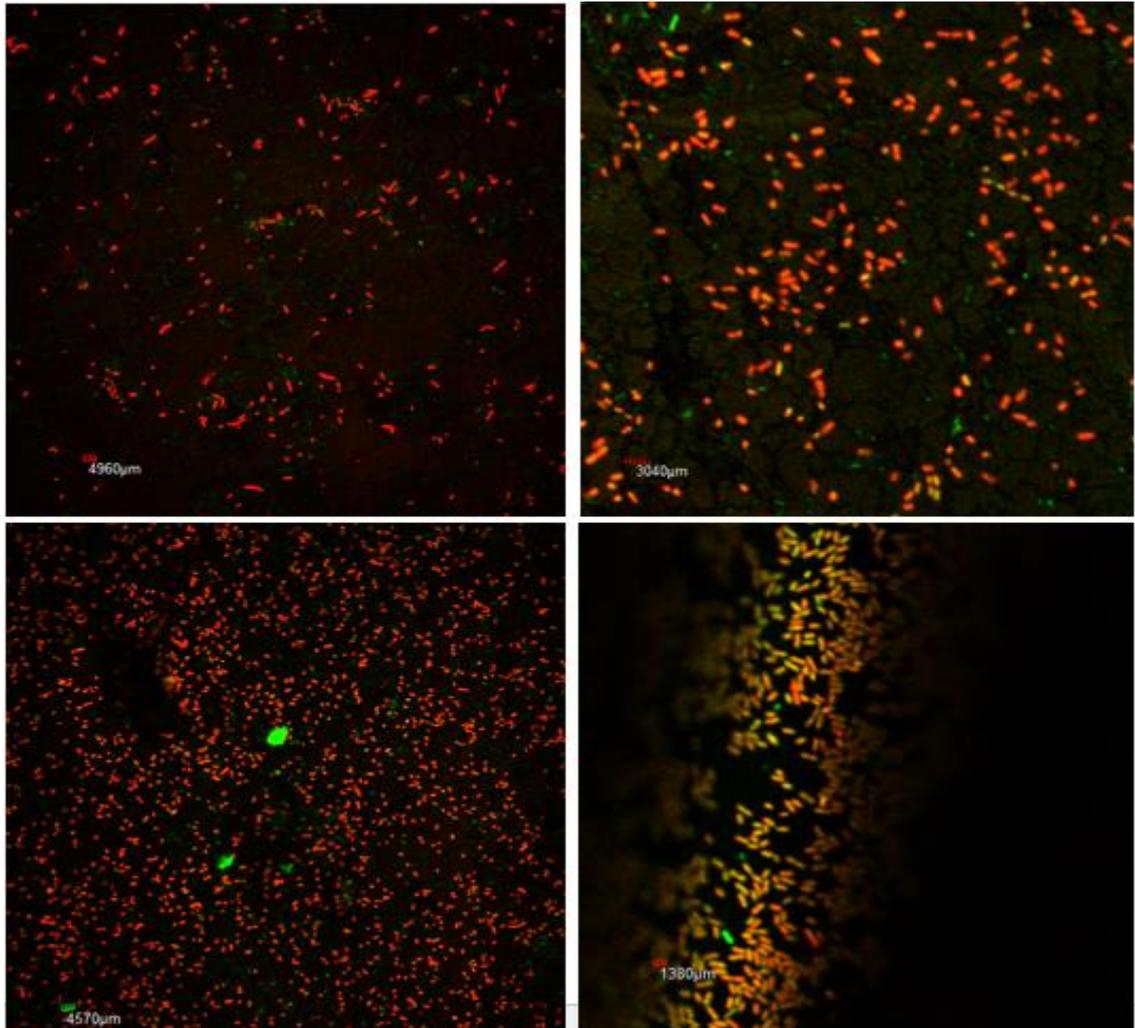
inicial. Portanto, os impactos causados ao meio ambiente ou à saúde dos usuários são baixos. Além disso, em comparação com outras técnicas de desinfecção convencionais, o tempo de limpeza é menor, é um produto fácil de manusear e tem poucos efeitos colaterais (HUANG *et al.*, 2008). A ECAW é considerada segura para a pele, mucosas e olhos dos animais, de acordo com estudos de biocompatibilidade *in vitro* (SIPAHI *et al.*, 2019).

5.4.3.3 Microscopia confocal de varredura a laser (CLMS)

Nas Figuras 3 e 4 são apresentadas as micrografias geradas pela CLMS para avaliação dos tratamentos com a ECAW e com o desinfetante A frente ao biofilme de *S. Heidelberg* nas superfícies de aço inoxidável e polietileno, a 25°C e 37°C. A utilização da CLSM permite a avaliação da ação antimicrobiana dos desinfetantes nas células *in situ* (NOYCE *et al.*, 2006). Observou-se no item 5.3.3 que a maioria das células bacterianas em biofilmes não tratados apresentou um forte sinal de fluorescência verde (Figura 2), tanto no aço inoxidável quanto no polietileno. Por outro lado, a intensidade da fluorescência verde diminuiu e a intensidade da fluorescência vermelha aumentou após o tratamento com a ECAW e o desinfetante A (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Micrografias obtidas através de microscopia confocal de varredura da formação de biofilme por *Salmonella* Heidelberg a 25°C, após o tratamento com água eletroquimicamente ativada.

Legenda: Células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho). Cupons de aço inoxidável (AISI 316) tratados com o produto após 10 (A) e 20 (B) minutos de contato, respectivamente. Cupons de polietileno tratados com o produto após 10 (C) e 20 (D) minutos de contato, respectivamente.



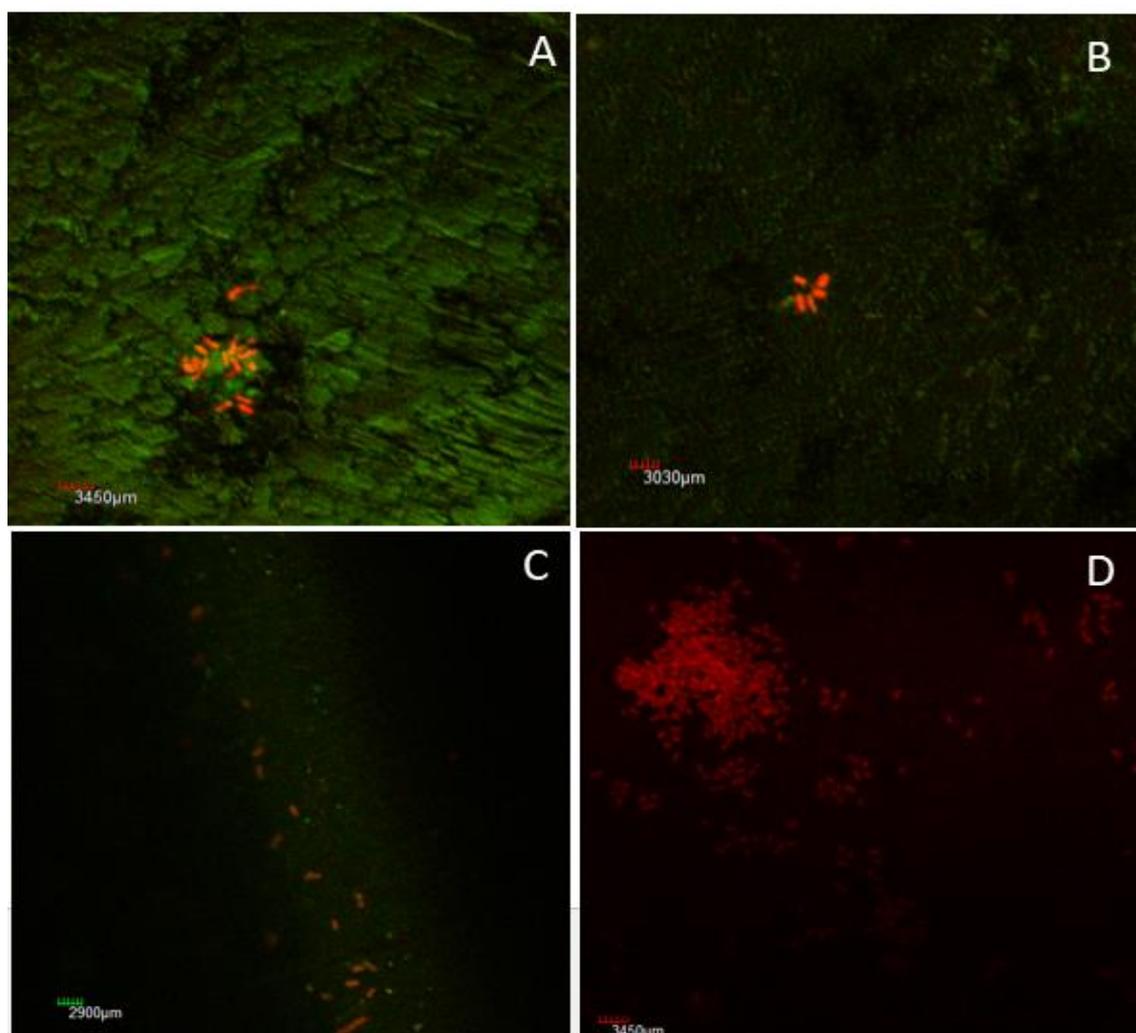


Figura 4 - Micrografias obtidas através de microscopia confocal de varredura da formação de biofilme por *Salmonella* Heidelberg a 25°C, após o tratamento com o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio. Legenda: Células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho). Cupons de aço inoxidável (AISI 316) tratados com o produto após 10 (A) e 20 (B) minutos de contato, respectivamente. Cupons de polietileno tratados com o produto após 10 (A) e 20 (B) minutos de contato, respectivamente.

Após os tratamentos, foi possível observar que a ECAW, além de inativar as células de *S. Heidelberg*, também eliminou o biofilme da superfície (Figura 3). Através da análise por CLSM, Cheng *et al.* (2016) já haviam demonstrado a efetividade da ECAW em biofilmes formados por *E. faecalis* (CHENG *et al.*, 2016). No presente estudo, apesar de o desinfetante A ter reduzido a quantidade de células do patógeno, a ação não foi tão intensa na remoção do biofilme. Esses resultados são importantes para o entendimento da ação dos compostos frente aos biofilmes de *S. Heidelberg* e corroboram com os resultados encontrados nos testes microbiológicos. Os resultados obtidos indicam que ambos os

produtos foram efetivos, sendo que o polietileno foi a superfície que proporcionou maior adesão e formação de biofilmes. Outro aspecto importante é o fato da ECAW não apenas eliminar o patógeno, mas também remover a massa de biofilme, possivelmente, dificultado a adesão futura de novas células bacterianas em uma matéria presente nas superfícies comuns na indústria alimentícia. Em estudo semelhante realizado por Li *et al.* (2020), a ECAW preveniu a formação de biofilme durante um período de 12 horas.

5.5 Experimento 5 - Avaliação da viabilidade da água eletroquimicamente ativada e do desinfetante em superfícies de borracha

5.5.1 Materiais e Métodos

O objetivo desta etapa foi avaliar o tempo de viabilidade da ECAW e do desinfetante A em uma superfície lisa e não absorviva. A metodologia utilizada foi previamente estabelecida pela *Japanese Industrial Standard* (JIS Z 2801: 2000). Os dois compostos foram selecionados por fazerem parte da etapa de sanitização, podendo permanecer na superfície higienizada (FDA, 2012). A seleção das concentrações dos compostos foi determinada de acordo com os melhores resultados obtidos nos Experimento 1 e 2, descritos nos itens 5.1 e 5.2. Assim, foram selecionados a ECAW a 200 ppm e o desinfetante A na concentração recomendada pelo fabricante (0,2%). Para este experimento foram utilizados cupons de borracha nas dimensões de 4 cm de largura x 4 cm de comprimento x 0,5 cm de altura. Após a limpeza com detergente neutro e esponja não abrasiva, as superfícies de borracha foram imersas em álcool etílico a 70% por 1 hora, seguido de esterilização em autoclave por 15 minutos a 121°C.

O inóculo de *S. Heidelberg* foi preparado conforme descrito no item 5.1.1 e, posteriormente, foi padronizado na concentração de $1,6 \times 10^5$ UFC/mL para a realização do experimento. As borrachas foram acondicionadas individualmente em placas de Petri 90 x 15 mm estéreis. Após, 1 mL do produto a ser testado foi aplicado na borracha, em duplicata. As placas de Petri foram mantidas fechadas em temperatura ambiente. Os cupons de borracha foram avaliados a cada 24 horas pelo período de 7 dias. Adicionalmente, a superfície com ECAW foi avaliada nos tempos de 0, 5, 15 e 30 minutos e nos períodos de 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 horas após a adição do produto. Para cada tempo teste, 1 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% estéril (Synth; Diadema, Brasil) foi adicionada nos cupons e utilizada como controle sem tratamento. Depois dos períodos estipulados, 400 µL do inóculo padronizado foram inoculados sobre as superfícies de borracha. Após 5 minutos de contato, as borrachas e o respectivo conteúdo foram transferidos para um saco de *stomacher* contendo 20 mL de APT estéril a 0,1% (Merck; Darmstadt, Alemanha) acrescida de substância neutralizadora (para cada litro de APT, 10 mL de polissorbato TWEEN 80 (Synth®), e 2 g de tiosulfato de sódio). Para a contagem bacteriana em UFC/mL, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) em solução de

cloreto de sódio estéril a 0,85% e as diluições foram transferidas para o ágar padrão para contagem (PCA, Merck; Darmstadt, Alemanha) para quantificação pelo método *drop plate* (inoculação de cinco gotas de 10 µL de cada diluição) após incubação a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica (MILLES; MISRA, 1938).

5.5.2 Resultados e Discussão

Do ponto de vista microbiológico, caso ocorram falhas nos programas de qualidade e segurança nas indústrias alimentícias e ou higienização deficiente, microrganismos podem não ser completamente removidos das superfícies e instalações que entram em contato com os alimentos. A retenção e acúmulo de resíduos e microrganismos em tais ambientes contribuirão para o desenvolvimento de biofilmes. (AZEVEDO; CERCA, 2012). Sabe-se da importância em prevenir a formação de biofilmes, sendo que a principal estratégia é uma adequada limpeza e desinfecção. O procedimento de higienização nos abatedouros de aves consiste fundamentalmente no uso de água sob pressão, detergentes e sanitizantes. A escolha do sanitizante correto nas indústrias de alimentos é fator primordial para obtenção de um produto final seguro à saúde dos consumidores, já que a sanitização é a última etapa do processo de higienização e visa reduzir os microrganismos até níveis aceitáveis (MORAES *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2014). Um dos parâmetros para escolha do sanitizante é a viabilidade do produto nas superfícies. Só foi observado crescimento bacteriano nas superfícies de borracha após 12 horas contato, no tratamento com ECAW. Na Tabela 8 estão descritas as contagens bacterianas (UFC/mL) obtidas, conforme a variação do tempo residual do produto. A contagem de SH no tratamento controle prévio ao tempo de 12 horas, não difere significativamente dos demais períodos avaliados.

Tabela 8 - Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) após o tratamento da borracha inoculada com *Salmonella* Heidelberg e tratada com a água eletroquimicamente ativada (ECAW), conforme a variação do tempo de contato com o produto.

Tratamento	Tempos de contato (horas) *				
	12	15	18	21	24
Controle	5,35 ±0,07 ^{aA}	5,39 ±0,04 ^{aA}	5,30 ±0,04 ^{aA}	5,39 ±0,06 ^{aA}	5,35 ±0,05 ^{aA}
ECAW	4,98 ±0,15 ^{aA}	5,13 ±0,05 ^{aA}	5,32 ±0,03 ^{aA}	5,32 ±0,03 ^{aA}	5,39 ±0,03 ^{aA}

Os valores correspondem à média (\log_{10} UFC.cm²) ± desvio padrão das contagens das colônias das quatro cepas de *Salmonella* Heidelberg.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de contato.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento e o controle.

*Não houve crescimento na superfície tratada com ECAW nos tempos de 0, 5, 15 e 30 minutos e 1, 2, 4, 6 e 9 horas de tratamento.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) ao longo do tempo de contato e entre o controle e a ECAW. Entretanto, o desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio mostrou-se eficaz até o sétimo dia de exposição em borrachas, não sendo observado crescimento de *S. Heidelberg*. Esse resultado demonstra o longo efeito residual do produto, o que é interessante para instalações, como galpões de frango e suínos, que ocasionalmente possam permanecer em vazio sanitário prolongado após a etapa de higienização (MACARI *et al.*, 2018).

O *Codex Alimentarius* elaborou padrões, diretrizes e recomendações que descrevem processos e procedimentos para o preparo seguro dos alimentos. A aplicação desses padrões tem como objetivo prevenir, eliminar ou reduzir os perigos nos alimentos até níveis aceitáveis (FORSYTHE, 2013). De acordo com o FDA, é permitido o uso de até 50 ppm de ECAW nas superfícies que têm contato com alimentos, sem que haja a necessidade de se realizar enxágue (FDA, 2012). Logo, são concentrações menores de ECAW do que às utilizadas, por exemplo, em superfícies para a criação de animais e menores do que a que foi selecionada para avaliação da viabilidade do produto (HAO *et al.*, 2013a; HAO *et al.*, 2013b). Neste experimento, foi observado crescimento bacteriano similar ao do grupo controle nas superfícies de borracha do tratamento com a ECAW a partir de 12 horas (Tabela 8). Hao *et al.* (2013a, 2013b) avaliaram a ECAW nas concentrações de 250 ppm e 300 ppm na aspersão em pisos de galpões de aves ou de

suínos e também relataram que não houve aumento da contagem microbiana total por um período de até 8 horas, corroborando com os nossos resultados. É importante salientar que o tempo entre a higienização e o início do abate de aves é de, geralmente, 4 a 6 horas. Os resultados do presente estudo demonstram que a ECAW age como desinfetante das superfícies em um período de até 9 horas, desde que não haja adição de matéria orgânica ou enxágue do local.

5.6 Experimento 6 – Ação da água eletroquimicamente ativada em carne de frango inoculada com *Salmonella Heidelberg*

5.6.1 Materiais e Métodos

O objetivo desta etapa foi avaliar o efeito antimicrobiano da ECAW frente a *S. Heidelberg* em cortes de peito de frango inoculados experimentalmente. A metodologia seguida foi aquela descrita por Cardoso-Toset *et al.* (2017). Os peitos de frango foram obtidos no varejo local (Teutônia, Rio Grande do Sul) e são provenientes da mesma empresa, com matadouro-frigorífico com Sistema de Inspeção Federal (SIF). Para o experimento, fragmentos de carne crua com 2 g e 1 x 1 cm² foram acondicionados em placas de Petri 90 x 15 mm estéreis e expostos à luz UV por 15 minutos em cada um dos seus lados a fim de se reduzir e/ou evitar a contaminação superficial.

O inóculo de *S. Heidelberg* (*pool* 1) foi preparado conforme descrito no item 5.1.1 e, posteriormente, foi padronizado em espectrofotômetro na concentração de aproximadamente 10⁷ UFC/mL. Os fragmentos de carne foram inoculados por imersão em um volume de 18 mL (proporção 1:10) do inóculo para se obter uma carga bacteriana inicial de aproximadamente 10⁵ UFC/mL (Cardoso-Toset *et al.*, 2017). Após 2 minutos de imersão no inóculo, os fragmentos da carne foram acondicionados em placas de Petri 90 x 15 mm estéreis em temperatura ambiente por 10 minutos para se permitir a fixação microbiana. Posteriormente, os fragmentos de carne previamente inoculados com *S. Heidelberg* foram imersos individualmente em um volume de 18 mL (proporção 1:10) de ECAW na concentração de 50 ppm e foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos. Como controle negativo, fragmentos de carne com as mesmas dimensões foram imersos em 18 mL de solução APT estéril a 0,1 % estéril (Merck; Darmstadt, Alemanha). Após, os fragmentos de carne foram transferidos para tubos estéreis e incubados a 7°C, que corresponde à temperatura que as carcaças de frango devem atingir por um período de 1 até 24 horas depois do resfriamento (BRASIL, 1998). Depois de transcorridos 5, 30 e 60 minutos, a quantidade de bactérias remanescentes na matriz cárnea foi determinada. Os fragmentos de carne foram imersos em 18 mL de APT estéril a 0,1% e agitados em vórtex por 2 minutos. Para a contagem bacteriana em UFC/mL, foram realizadas diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁴) em solução de cloreto de sódio estéril a 0,85% e as diluições foram transferidas para o ágar padrão para contagem (PCA, Merck; Darmstadt, Alemanha) para

quantificação pelo método *drop plate* (inoculação de cinco gotas de 10µL de cada diluição), seguida de incubação a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica (MILLES; MISRA, 1938). O cálculo para determinação da contagem bacteriana (UFC/g) na amostra de carne foi determinado a partir da seguinte equação descrita por Silva *et al.* (2010):

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{UFC/mL da suspensão} \times \text{volume de diluente (mL)}}{\text{peso da amostra (g)}}$$

5.6.2 Resultados e Discussão

De acordo com a legislação norte-americana (USDA, 2021), o HClO gerado eletroquimicamente pode ser utilizado em diversos processos da indústria alimentícia. A concentração de até 50 ppm de cloro livre é permitida na lavagem de carcaças de frango, no processamento de carne de frango, na água do *chiller* e na lavagem de miúdos (FDA, 2012). Na Tabela 9, descreve-se a contagem bacteriana (UFC/g) após ação da ECAW a 50 ppm na carne inoculada experimentalmente com *S. Heidelberg*. Os tratamentos foram avaliados a 7°C, temperatura máxima permitida para as carcaças de frango após a etapa de resfriamento (BRASIL, 1998).

Tabela 9 - Média das contagens bacterianas (log₁₀ UFC/g) após o tratamento de carne de frango crua contaminada com *Salmonella* Heidelberg com a água eletroquimicamente ativada (ECAW), conforme o tempo de contato.

Tratamento	Tempo de contato (minutos)		
	5	30	60
Controle	2,40 ± 0,09 ^{aA}	2,42 ± 0,08 ^{aA}	2,42 ± 0,06 ^{aA}
ECAW 50 ppm	1,72 ± 0,07 ^{aB}	1,35 ± 0,17 ^{bB}	0,95 ± 0,00 ^{cB}

Os valores correspondem à média ± desvio padrão das contagens das colônias de *Salmonella* Heidelberg. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa (p<0,05) entre os tempos de contato para o mesmo tratamento.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (p<0,05) entre os tratamentos para o mesmo tempo de contato.

Nos últimos anos, há um aumento nas permissões de uso do HClO gerado eletroquimicamente. No presente trabalho, a ECAW apresentou importante redução de *S. Heidelberg* na carne de frango, o que corrobora com outros estudos previamente

realizados com o produto (GUENTZEL *et al.*, 2008; RAHMAN *et al.*, 2012a). A média da contagem bacteriana após o tratamento com a ECAW a 50 ppm foi significativamente inferior ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo controle, independentemente do tempo de contato (Tabela 15). A redução média observada foi de 1,07 \log_{10} UFC/g, similar à encontrada por Hernández- Pimentel *et al.* (2020) e Rasschaert *et al.* (2013), que avaliaram a ECAW na mesma concentração de 50 ppm frente a *S. Typhimurium* e *Campylobacter* spp., respectivamente, em carcaças de frangos de corte. Além disto, a contagem bacteriana reduziu significativamente ($p < 0,05$) com o aumento dos tempos de contato para o tratamento com ECAW no atual estudo. No geral, o aumento do tempo de contato melhora a eficácia dos produtos (ZANG *et al.*, 2015).

No atual estudo, nenhum tratamento foi capaz de eliminar completamente a bactéria. É possível que a ação antimicrobiana da ECAW varie com a presença de matéria orgânica, especialmente quando se utilizam concentrações menores do produto (AL HOLY; RASCO, 2015). Burfoot *et al.* (2015) não identificaram redução significativa de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango antes da etapa de resfriamento em uma indústria frigorífica com o uso de ECAW a 25 ppm. Da mesma forma, estudo prévio do nosso grupo também não demonstrou redução de *S. Heidelberg* frente a ECAW a 5ppm (WILSMANN *et al.*, 2019). Neste contexto, a redução de patógenos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em produtos alimentícios tratados com ECAW altas é mais significativa para alimentos de superfície lisa, como ovos e tomates, enquanto pode ser menor em produtos cárneos (AFARI; HUNG, 2018). Além da matéria orgânica, é possível que ORP e pH também influenciem na ação do composto (RAHMAN *et al.*, 2012b).

A presença de compostos orgânicos em águas que sofrem o processo de cloração também resulta na formação dos trihalometanos (THM). Os THM são compostos orgânicos clorados e a principal classe de subprodutos formados durante a etapa da desinfecção no processo de tratamento da água, bem como são considerados indicadores da presença de outros compostos orgânicos na água (ARAÚJO *et al.*, 2020). O hipoclorito de sódio (NaClO), na presença de matéria orgânica, promove a formação de THM por uma reação de oxidação, o que tem prejudicado o seu uso. O clorofórmio é considerado um indicador desses compostos tóxicos e foi detectado após tratamentos com NaClO em carcaças de frangos de corte. A situação representa um perigo químico devido às propriedades cancerígenas do clorofórmio (VIZZIER-THAXTON; EWING; BONNER, 2010). Nenhuma evidência foi encontrada sobre a formação de THM resultante do uso de

ECAW (HERNÁNDEZ-PIMENTEL *et al.*, 2020). O uso de ECAW não representa um risco à saúde e não necessita monitoramento constante ou de precauções de segurança ocupacional (WANG *et al.*, 2018b). Além disto, a aplicação de ECAW em qualquer ambiente de laboratório ou em plantas de abate de frangos de grande escala possibilita não apenas reduzir a carga microbiana inicial, mas também estender a vida útil das carcaças. No estudo de Duan *et al.* (2017), as carcaças de frango que foram aspergidas durante 15 segundos com ECAW apresentaram até dois dias de vida de prateleira estendidos quando comparados aos demais tratamentos com NaClO, dióxido e ácido láctico.

5.7 Experimento 7 - Avaliação da densidade de corrente de corrosão estimada em ensaios de polarização potencioestática

5.7.1 Materiais e Métodos

O objetivo desta etapa foi avaliar o potencial de corrosão da ECAW, do desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (A) e de um desinfetante à base de ácido peracético (D), a partir da análise eletroquímica de polarização potencioestática dos produtos quando em contato com aço inoxidável e ferro galvanizado. Estas estruturas foram selecionadas por geralmente constituírem superfícies a serem higienizadas na indústria avícola e alimentícia. O potencial de corrosão dos produtos foi avaliado em três concentrações: 200 ppm, que corresponde à concentração máxima de uso permitido segundo o FDA, e 100 e 400 ppm, que correspondem, respectivamente, à metade e ao dobro da concentração de uso permitido (FDA, 2017). A preparação do material, os ensaios e a interpretação dos resultados foram realizados de acordo com o protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Corrosão, Proteção e Reciclagem de Materiais da UFRGS (LACOR-UFRGS).

Para a realização dos ensaios de polarização potencioestática, cupons de aço inoxidável (AISI 316) e de aço galvanizado com 10 cm (comprimento) x 5 cm (largura) x 0,1 cm (espessura) foram confeccionados. Inicialmente, foi realizado o processo de jateamento abrasivo para verificar o efeito da rugosidade no ângulo de contato em cada superfície. Todas as amostras foram lavadas com detergente comercial e água. Após, foram imersas na solução diluída do desengraxante alcalino por 10 minutos a uma temperatura de 65°C. Sucessivamente, as amostras foram lavadas com água corrente e água deionizada e verificadas quanto à efetividade do desengraxe através do teste de quebra d'água para posterior secagem com jato de ar quente.

O ensaio de polarização potencioestática foi realizado após 5 minutos de potencial de circuito aberto (OCP) para a estabilização do potencial depois da imersão na solução desinfetante. Para os ensaios, foi utilizado o equipamento potencioestato *Autolab PGSTAT 302* (Ecochemie[®], Holanda) com a interface Nova e uma célula convencional de três eletrodos. Como eletrólito, contraeletrodo e eletrodo de referência foram utilizados, respectivamente, solução de 0,1 mol/L de NaCl, eletrodo de platina e eletrodo de Ag/AgCl com solução saturada de KCl. Os ensaios de cada amostra foram realizados em

duplicata. Para todas as medidas foram utilizadas soluções de NaCl 0,1 mol/L (pH 6,0) com área exposta de 0,6 cm² do eletrodo de trabalho. Os potenciais apresentados nos resultados estão expressos em relação ao potencial do eletrodo de referência utilizado. Uma gaiola de *Faraday* foi utilizada para evitar interferências eletromagnéticas externas no sinal. A polarização potencioestática foi configurada para iniciar em -500 mV_{OCP} e terminar em +800 mV_{OCP} com uma velocidade constante de 10 mV/s e um passo de 1 mV. Após a realização da polarização, as curvas foram analisadas pela densidade de corrente de corrosão através da curva de aproximação da equação de *Butler-Volmer*. A análise considera a comparação das amostras a partir da diferença de ordem de grandeza, sendo significativa quando maior de 1 log. Para esta análise, utilizou-se a interface Nova, com posterior comparação gráfica das médias (logA/cm²) pelo programa *Origin*[®] versão 2017 (OriginLab Corporation; Washington, EUA).

5.7.2 Resultados e Discussão

A análise através do ensaio de polarização potencioestática considera a comparação logarítmica dos resultados, pois a diferença é realizada pelo número de vezes em que uma superfície é melhor do que a outra (WOLYNEC, 2003). O potencial de corrosão da ECAW e dos desinfetantes A e B foi analisado utilizando-se a curva de aproximação da equação de *Butler-Volmer*, a qual considera significativa a diferença da ordem de grandeza das amostras quanto esta for maior do que 1 log. Quanto menor o valor da densidade de corrente, mais a superfície resistiu à corrosão. Na Tabela 10, estão descritas as médias logarítmicas das densidades de corrente de corrosão (logA/cm²) do aço inoxidável na presença da ECAW e dos desinfetantes A e D, conforme a variação da concentração dos produtos.

Tabela 10 - Média da densidade de corrente de corrosão ($\log A/cm^2$) do aço inoxidável e do aço galvanizado na presença da água eletroquimicamente ativada (ECAW) e dos desinfetantes à base de cloreto de didecil dimetil amônio (A) e ácido peracético (D), conforme a concentração dos produtos.

Superfície	Produto	Concentração (ppm)		
		100	200	400
Aço inoxidável	ECAW	$4,17 \times 10^{-8aA}$	$3,99 \times 10^{-8aA}$	$1,33 \times 10^{-7bA}$
	Desinfetante A	$5,67 \times 10^{-7aB}$	$8,11 \times 10^{-7aB}$	$5,35 \times 10^{-7aA}$
	Desinfetante D	$2,54 \times 10^{-7aB}$	$2,31 \times 10^{-7aB}$	$2,84 \times 10^{-7aA}$
Aço Galvanizado	ECAW	$1,69 \times 10^{-5aA}$	$5,83 \times 10^{-5aA}$	$5,42 \times 10^{-5aA}$
	Desinfetante A	$7,22 \times 10^{-7aB}$	$2,74 \times 10^{-5bA}$	$4,77 \times 10^{-5bA}$
	Desinfetante D	$4,27 \times 10^{-5aA}$	$7,41 \times 10^{-5aA}$	$5,48 \times 10^{-5aA}$

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença na ordem de grandeza ($>1 \log A/cm^2$) entre as concentrações do mesmo produto.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença na ordem de grandeza ($>1 \log A/cm^2$) entre os produtos na mesma concentração.

Os desinfetantes à base de cloreto de didecil dimetil amônio e ácido peracético apresentaram densidades de corrosão similares ($p > 0.05$) nas três concentrações testadas no aço inoxidável (Tabela 10). Desta forma, pode-se inferir que as concentrações destes produtos não influenciaram na atividade corrosiva. Segundo o Código de Regulamentações Federais do FDA, a concentração de 200 ppm corresponde ao limite máximo permitido (FDA, 2017). Porém, mesmo utilizando-se o dobro dessa concentração, não houve alterações na densidade de corrosão de ambos os desinfetantes.

A ECAW, nas concentrações de 100 e 200 ppm, apresentou mudança na ordem de grandeza na densidade de corrente de corrosão, quando comparada aos desinfetantes A e D. Assim, a ECAW demonstrou ser menos corrosiva nesses casos. Por outro lado, não houve diferença na ordem de grandeza da ECAW em relação aos desinfetantes à base de cloreto de didecil dimetil amônio e ácido peracético na concentração de 400 ppm. Esses resultados são semelhantes aos descritos por outros estudos (AYEBAH; HUNG, 2005; THORN *et al.*, 2012). Tanaka *et al.* (1999) avaliaram a corrosividade do aço inoxidável em contato com a ECAW durante 36 dias e constataram um nível de corrosão considerado baixo, quando comparada ao hipoclorito de sódio. Os autores concluíram que os níveis de corrosão associados à ECAW seriam baixos no período de até três anos

(TANAKA *et al.*, 1999). Da mesma forma, Wang *et al.* (2019) também não obtiveram diferenças entre a ECAW e o hipoclorito de sódio na taxa de corrosão do aço inoxidável.

Atualmente, o aço é o mais importante material de engenharia entre as ligas metálicas. As ligas de aço, em geral, são as mais utilizadas no mundo, mas detêm propriedades precárias contra a corrosão. A solução é a utilização de filmes protetores que isolam a superfície do meio, e um processo amplamente empregado para revestir aços é a galvanização com zinco (Zn) (ZHANG, 2013a). O revestimento promove três formas de proteção (PORTER, 1994). A primeira é o efeito barreira, ou seja, o isolamento entre o aço e o meio, pois o Zn tem adesão sobre o ferro (Fe) e impede a chegada da água e do oxigênio à superfície do aço. A segunda forma é a proteção catódica, já que o Zn é menos nobre eletroquimicamente que o Fe. Assim, quando o aço é exposto ao meio, este passa a ser o cátodo em relação ao zinco, reduzindo-se a taxa de corrosão do aço. A última forma de proteção é o próprio Zn no revestimento, que em longos tempos de exposição ao ar, cria uma pátina, protegendo-o do meio (PORTER, 1994; ZHANG, 2013a).

Na concentração de 100 ppm, o desinfetante à base de cloreto de didecil dimetil amônio resultou em menor corrosão do aço galvanizado, quando comparado com a ECAW e o desinfetante à base de ácido peracético. Por outro lado, os três produtos apresentaram a mesma taxa de densidade de corrente de corrosão na concentração de uso de 200 ppm. Comparando-se os dados obtidos nas duas superfícies, constata-se que o aço inoxidável foi mais resistente. Esses resultados estão de acordo com outros estudos (AYEBAH; HUNG, 2005; WANG *et al.*, 2019). Ao se analisar individualmente a densidade de corrente de corrosão do aço inoxidável frente às três concentrações dos produtos (Tabela 10), observa-se que houve diferença de uma ordem de grandeza na corrosão da ECAW a 100 e 200 ppm em relação à concentração de 400 ppm. Por outro lado, não houve mudança significativa na ordem de grandeza na presença dos desinfetantes à base de cloreto de didecil dimetil amônio e ácido peracético. Logo, as concentrações avaliadas não influenciaram na atividade corrosiva, demonstrando que a resistência intrínseca do material à corrosão é provavelmente mais importante que a variação da concentração para estes produtos. Neste sentido, Wang *et al.* (2019) avaliaram a resistência à corrosão do alumínio, cobre, aço inoxidável e aço carbono frente a ECAW, e constataram que a corrosividade entre os materiais foi diferente na mesma concentração do produto.

Ao se analisar individualmente a densidade de corrente de corrosão do aço galvanizado frente às diferentes concentrações dos produtos (Tabela 10), observa-se que

não houve mudança significativa na ordem de grandeza da densidade de corrente de corrosão, com exceção quando da exposição da superfície ao desinfetante à base de cloreto de didecil dimetil amônio na concentração de 100 ppm. Contudo, na concentração de uso de 200 ppm, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na densidade de corrosão da superfície, independentemente do produto avaliado. Os resultados obtidos no atual estudo impulsionam o desenvolvimento de novas pesquisas sobre a corrosão da ECAW. Sugere-se que outras técnicas de mensuração e com diferentes superfícies, associadas ou não à presença de microrganismos que podem afetar a corrosão, sejam empregadas e avaliadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo buscou avaliar a atividade antimicrobiana da ECAW frente a biofilmes formados por *Salmonella* Heidelberg de origem avícola em superfícies de matadouros-frigoríficos e na redução da contaminação da carne de frango. Observou-se que os isolados de *S. Heidelberg* possuem a habilidade de produzir biofilme em diferentes temperaturas (25°C e 37°C) e superfícies (poliestireno, aço inoxidável e polietileno). Essa produção de biofilme impacta diretamente na capacidade de adesão às superfícies e na permanência do patógeno nas estruturas. Esses resultados dão continuidade aos estudos já desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa desde o ano de 2016.

A ECAW foi efetiva na remoção de biofilmes de *S. Heidelberg* formada em superfícies de poliestireno, atingindo aproximadamente 57% de remoção. Quando avaliada na prevenção da formação de biofilmes de *S. Heidelberg* em superfícies de poliestireno, os níveis de prevenção foram de até 58%. A ECAW também foi efetiva na remoção de biofilmes de *S. Heidelberg* do aço inoxidável e polietileno, superfícies comumente utilizadas na cadeia avícola, atingindo até 5 log UFC de remoção. Quando comparada a outro desinfetante já presente no mercado, a ECAW demonstrou um efeito semelhante ou superior no controle de *S. Heidelberg*. Essa tecnologia é uma possível alternativa no controle de *S. Heidelberg* na cadeia produtora de alimentos.

A avaliação do período de viabilidade da ECAW e do desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio em superfícies de borracha indicou que a ECAW permanece agindo, frente a *S. Heidelberg*, por um período de até 9 horas, enquanto que o desinfetante convencional permaneceu viável em todo o período de observação no estudo que foi de sete dias. Sabe-se da importância em reduzir a contaminação da carne de frango, reduzindo riscos biológicos e aumentando a vida de prateleira dos produtos. A ECAW foi eficaz em reduzir a contaminação por *S. Heidelberg* em carcaças de frango inoculadas experimentalmente.

A possível corrosão e danos causados por produtos químicos nas mais diversas estruturas da indústria são uma preocupação. A análise da densidade de corrente de corrosão da ECAW e de outros desinfetantes já utilizados estimada em ensaios de polarização potencioestática demonstrou que estruturas de aço inoxidável e ferro galvanizado apresentam o mesmo nível de corrosão com emprego de ambos os produtos. Esses dados trazem segurança no uso da ECAW quanto aos possíveis danos nas estruturas metálicas.

O uso da ECAW deve ser mais estudado a fim de se garantir sua eficácia na indústria de alimentos. Para isso, nosso grupo de pesquisa estuda formas de uso na indústria, buscando a aplicabilidade da ECAW e simulando situações mais próximas o possível da realidade do setor avícola. O grande desafio hoje é sanar algumas dúvidas referentes à aplicabilidade e à autorização de uso no Brasil. Além disso, também é necessário avaliar a estabilidade e a durabilidade do ácido hipoloroso e de outros radicais livres produzidos na solução. É necessário unir e ampliar informações para propiciar que esta seja uma ferramenta adicional em programas de controle de qualidade dos alimentos e de instalações agropecuárias

7 CONCLUSÕES

- Os isolados de *Salmonella* Heidelberg possuem capacidade de produzir biofilmes em placas de poliestireno a 25°C e 37°C após 24 horas de incubação.
- Os isolados de *Salmonella* Heidelberg possuem capacidade de produzir biofilmes em cupons de aço inoxidável e polietileno a 25°C e 37°C após 24 horas de incubação.
- A ECAW na concentração de 200 ppm foi eficaz na remoção e prevenção da formação de biofilme de *S. Heidelberg* em placas de poliestireno.
- A ECAW na concentração de 200 ppm foi eficaz na remoção de biofilme de *S. Heidelberg* em cupons de aço inoxidável e polietileno.
- O detergente alcalino foi mais eficaz na remoção de biofilme de *S. Heidelberg* quando comparado ao detergente ácido.
- Houve redução da contaminação de carne de frango contaminada experimentalmente por *S. Heidelberg* após o tratamento com ECAW a 50 ppm.
- O período residual de ação da ECAW em superfície de borracha foi de até 9 horas, enquanto que do desinfetante A foi de no mínimo 7 dias.
- A corrosão no aço inoxidável e no ferro galvanizado causada pela ECAW não foi superior àquela causada por desinfetantes utilizados pela indústria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, M. et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 7, p. 453–472, 2014.
- ABPA- **Relatório Anual 2021**. Associação Brasileira de Proteína Animal. Disponível em: <http://abpa-br.org/mercados/#relatorios>. Acesso em dez. de 2020.
- AFARI, G. K.; HUNG, Y. C. A meta-analysis on the effectiveness of electrolyzed water treatments in reducing foodborne pathogens on different foods. **Food Control**, v. 93, n. June, p. 150–164, 2018.
- AKBAS, M. Y.; CAG, S. Use of organic acids for prevention and removal of *Bacillus subtilis* biofilms on food contact surfaces. **Food Science Technology**. Int. 22, 587–597, 2016
- AKBULUT, M. B. In vitro antimicrobial activity of different electrochemically-activated solutions on enterococcus faecalis. **European Oral Research** v. 53, n. 1, p. 44–50, 2019.
- AKELAH, A. **Polymers in Food Processing Industries**. A Functionalized Polymeric Materials in Agriculture and the Food Industry. USA: Springer. 2013. Cap. 4, pp 195-248
- AL-HOLY, M. A.; RASCO, B. A. The bactericidal activity of acidic electrolyzed oxidizing water against *Escherichia coli* O157 : H7 , *Salmonella* Typhimurium , 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.
- AMBROZIN, A. R. P.; KURI, S. E.; MONTEIRO, M. R. Corrosão metálica associada ao uso de combustíveis minerais e biocombustíveis. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1910–1916, 2009.
- AMRUTHA, B.; SUNDAR, K.; SHETTY, P. H. Microbial Pathogenesis Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 156–162, 2017.
- ANDRADE N.J. 2008. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.
- ANDREATTI, R.L. *et al.* **Doença das aves**. São Paulo: Facta, 2020.
- ANGARANO, V. *et al.* Food and Bioproducts Processing The potential of violet , blue , green and red light for the inactivation of *P. fluorescens* as planktonic cells , individual cells on a surface and biofilms. **Food and Bioproducts Processing**, v. 124, p. 184–195, 2020.
- AYEBAH, B.; HUNG, Y. C.; FRANK, J. F. Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 7, p. 1375–1380, 2005.

APHA, **American Public Health Association**. 2014. Disponível em : <<http://www.apha.org/>>. Acessado em maio de 2020.

ARAUJO, P. C. O. *et al.* Effect of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide on acute and subchronic animal models of inflammatory pain: Behavioral, biochemical and molecular insights. **Chemico-Biological Interactions**, v. 317, n. September 2019, 2020.

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

BARKER, J.; NAEENI, M.; BLOOMFIELD, S. F. The effects of cleaning and disinfection in reducing *Salmonella* contamination in a laboratory model kitchen. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 6, p. 1351–1360, 2003.

BESSI, H. *et al.* Microbial reduction and quality of stored date fruits treated by electrolyzed water. **Journal of Food Quality**. v. 37, p. 42–49, 2014.

BORGES, K. A. *et al.* Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 71–76, 2018.

BORSOI, A. *et al.* Most probable number of *Salmonella* isolated from refrigerated broiler carcasses. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 11, p. 2338–2342, 2010.

BOTH, J. *et al.* Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 252, n. April, p. 18–23, 2017.

BYUN, K. H. *et al.* Efficacy of chlorine-based disinfectants (sodium hypochlorite and chlorine dioxide) on *Salmonella* Enteritidis planktonic cells, biofilms on food contact surfaces and chicken skin. **Food Control**, v. 123, n. September 2020, p. 107838, 2021.

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. Portaria SDA - 126, de 03/11/1995. Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). **Diário Oficial da União**, DF, 03 de novembro de 1995, Seção I – pag. 17694 e 17698.

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. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **ANVISA**. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Brasília, DF, 2004.

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. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 26. Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Dados epidemiológicos– DTA** – período de 2000 a 2017. 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-SurtosDTA-2018.pdf> >. Acesso em 02 de fevereiro 2020.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2019. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-fevereirode2019.pdf>> Acesso em: 09 mai. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 60 - Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, DF, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Salmonella (Salmonelose)**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/salmonella-salmonelose/salmonella-salmonelose> > Acesso em fevereiro 2022.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, Georgia, v.38, n.7, 2000. p.2465-2467

CANO, E.; LAFUENTE, D.; BASTIDAS, D. M. Use of EIS for the evaluation of the protective properties of coatings for metallic cultural heritage: A review. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 14, n. 3, p. 381–391, 2010.

CARVALHO, D. et al. Antibiofilm activity of the biosurfactant and organic acids against foodborne pathogens at different temperatures, times of contact, and concentrations. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 0123456789, 2022.

CDC Centers for Disease Control and Prevention. 2016. **National enteric disease surveillance: salmonella annual report**. Atlanta, GA. Disponível em: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf> Acessado em: janeiro de 2020.

CDC Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella*. 2019. Disponível em : <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>. Acesso em janeiro de 2022.

CDC Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella*. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/>. Acesso em março de 2022.

CHEGINI, Z. et al. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms : a review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p. 1–17, 2020.

CHENG, X. et al. Bactericidal effect of strong acid electrolyzed water against flow *Enterococcus faecalis* Biofilms. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 7, p. 1120–1125,

2016.

CHUANG, C. *et al.* Inactivation efficiency to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* bacterial aerosols of spraying neutral electrolyzed water **Journal of the Air & Waste Management Association**. v. 2247, n. November 2017, 2013.

CLIVER, D. O. Cutting Boards in. p. 538–542, 2006.

COLAGIORGI, A. *et al.* *Listeria monocytogenes* Biofilms in the wonderland of food industry. **Pathogens**, v. 6, n. 3, 2017.

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.

COUGHLAN, L. M. *et al.* New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–21, 2016.

COSTERTON, J.W. *et al.* Microbial biofilmes. **Annual Review of Microbiology**. v.49. p.711-745, 1995.

CRAVEIRO, S. *et al.* Original article *Aeromonas* biofilm on stainless steel : efficiency of commonly used disinfectants. **International Journal of Food Science and Technology**. p. 851–856, 2015.

DANTAS, S. T. A. *et al.* Cross-Contamination and Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis on Various Cutting Boards. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 2, p. 81–85, 2018.

DANYLUK, M. D. *et al.* Reduction of *Escherichia coli* , as a surrogate for *Salmonella spp* ., on the surface of grapefruit during various packingline processes. **Journal Of Food Microbiology**, v. 78, n. June 2018, p. 188–193, 2019.

DE ORNELLAS DUTKA GARCIA, K. C. *et al.* Bacteriophage use to control *Salmonella* biofilm on surfaces present in chicken slaughterhouses. **Poultry Science**, v. 96, n. 9, p. 3392–3398, 2018.

DEWI, G. *et al.* Effect of lemongrass essential oil against multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg and its attachment to chicken skin and meat. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101116, 2021.

DUGUID, J. P.; ANDERSON, E. S.; CAMPBELL, I. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonella*. **The Journal of pathology and bacteriology**, v. 92, n. 1, p. 107–138, 1966.

DUONG, H.; NGUYEN, N.; YUK, H. Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 236–240, 2013.

DUTIL, L. *et al.* Ceftiofur Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg from Chicken Meat and Humans , Canada. **Emerging Infectious Diseases** v. 16, n. 1, 2010.

EBRAHIMI, N. *et al.* A comparative study of critical pitting temperature (CPT) of stainless steels by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), potentiodynamic and

potentiostatic techniques. **Corrosion Science**, v. 59, p. 96–102, 2012.

EFSA. *Salmonella* the most common cause of foodborne outbreaks in the European Union. 2019. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/news/salmonella-mostcommon-cause-foodborne-outbreaks-european-union>. Acesso em: novembro de 2021.

EFSA. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. 2021. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2021.6406>. Acesso em: novembro de 2021.

ELEXSON, N. *et al.* Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotics-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolates. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 378–385, 2014.

EMERY, B.D. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata frente a isolados de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg de origem avícola. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2021.

ESPERANZA CORTÉS, M.; CONSUEGRA BONILLA, J.; DARIO SINISTERRA, R. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 2, n. January 2011, p. 896–905, 2011.

European Communities (2016) The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual Report 2016.

European Communities (2018) The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual Report 2018.

FANG, Y. *et al.* A study of the efficacy of bacterial biofilm cleanout for gastrointestinal endoscopes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 8, p. 1019–1024, 2010.

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. About Codex Alimentarius. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-whocodexalimentarius/about-codex/en/> Acesso em: janeiro de 2020.

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.

FERRARI, R. G. *et al.* Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, n. May, 2019.

FLEMMING, H. C. *et al.* Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FLEXER, V. *et al.* A New Strategy for Corrosion Inhibition Coatings for Lead Heritage Metal Objects. **Electrochimica Acta**, v. 179, p. 441–451, 2015.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre, Brazil: Artmed, p.410; 2013.

GALIÉ, S. *et al.* Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–18, 2018.

- GAMBLE, G. R. *et al.* Effect of simulated sanitizer carryover on recovery of *Salmonella* from broiler carcass rinsates. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 5, p. 710–714, 2016.
- GEHLEN, S.S. Dinâmica de formação de biofilmes multiespécies por *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de procedimentos de higienização. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
- GIAOURIS, E. *et al.* Attachment and bio film formation by foodborne bacteria in meat processing environments : Causes , implications , role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **MESC**, v. 97, n. 3, p. 298–309, 2014.
- GIERALTOWSKI, L. *et al.* National outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to a single poultry company. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–13, 2016.
- GÓMEZ, N. C *et al.* A. Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**. v.30, p.51–58, 2012.
- GONZÁLEZ-MACHADO, C. *et al.* Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella agona* biofilms at different stages of development. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, 2018.
- GOSLING, R. J. *et al.* E fficacy of disinfectants and detergents intended for a pig farm environment where *Salmonella* is present. **Veterinary Microbiology**, v. 204, n. December 2016, p. 46–53, 2017.
- GRAHAM, L. E. *et al.* Use of probiotics as an alternative to formaldehyde fumigation in commercial broiler chicken hatch cabinets. **Journal Name Poultry Science**, v. 27, n. 3, p. 371–379, 2018.
- GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella**. France: Institute Pasteur, 2007.
- GURAN, H. S.; MANN, D.; ALALI, W. Q. *Salmonella* prevalence associated with chicken parts with and without skin from retail establishments in Atlanta metropolitan area, Georgia. **Food Control**, v. 73, p. 462–467, 2017.
- HAN, Q. *et al.* Removal of Foodborne Pathogen Biofilms by Acidic Electrolyzed Water. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, n. June, p. 1–12, 2017.
- HAO, X. X. *et al.* Application of slightly acidic electrolyzed water for inactivating microbes in a layer breeding house. **Poultry Science**. p. 2560–2566, 2013.
- HERNÁNDEZ-PIMENTEL, V. M. *et al.* Effect of neutral electrolyzed water as antimicrobial intervention treatment of chicken meat and on trihalomethanes formation. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 29, n. 3, p. 622–635, 2020.
- HUANG, Y. R. *et al.* Application of electrolyzed water in the food industry. **Food Control**, v. 19, n. 4, p. 329–345, 2008.
- IGNATOV, I. *et al.* Preparation of Electrochemically Activated Water Solutions (

Catholyte / Anolyte) and Studying Their Physical-Chemical Properties. **Journal of Medicine, Physiology and Biophysics**. v. 11, p. 1–22, 2015.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. *et al.* Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014.

JAPANESE INDUSTRIAL STANDARD. **Test for Antimicrobial Activity of Plastics**. (JIS) Z 2801, 2000.

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

JEANETTE BEBER DE SOUZA. Comparison between sodium hypochlorite and peracetic acid for *E. coli*, coliphages and *C. perfringens* inactivation of high organic matter concentration water. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**. p. 111–117, 2005.

JONG, H. K. DE *et al.* Host – Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. **PLOS Pathogens**. v. 8, n. 10, p. 1–9, 2012.

JOSEPH, B. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella spp.* On food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 367–372, 2001.

KHALID, N. I. *et al.* Electrolyzed water as a green cleaner: chemical and physical characterization at different electrolyzing parameters. **Food Research**, v. 2, n. 6, p. 512–519, 2018.

KHATOON, Z. *et al.* Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. **Heliyon**, n. December, p. e01067, 2018.

KIM, W.; KIM, S.; KANG, D. Thermal and non-thermal treatment effects on *Staphylococcus aureus* biofilms formed at different temperatures and maturation periods. **Food Research International** v. 137, n. June, p. 1–8, 2020.

KOUTSOUMANIS, K. *et al.* *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. **EFSA Journal**, v. 17, n. 2, 2019.

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.

LAJHAR, S. A.; BROWNIE, J.; BARLOW, R. Correction: Characterization of biofilm-forming capacity and resistance to sanitizers of a range of *E. coli* O26 pathotypes from clinical cases and cattle in Australia (BMC Microbiology (2018) 18 (41) DOI: 10.1186/s12866-018-1182-z). **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2018.

LARA, H. H. *et al.* Inhibition of *Candida auris* Biofilm Formation on Medical and Environmental Surfaces by Silver Nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**. v.12, 21183–21191, 2020.

LEE, K. *et al.* Viability of *Salmonella* Typhimurium biofilms on major food-contact surfaces and eggshell treated during 35 days with and without water storage at room temperature Bacterial Strains and Growth Conditions. **Poultry Science**, v. 99, n. 9, p. 4558–4565, 2018.

- LI, Y. *et al.* Acidic electrolyzed water more effectively breaks down mature *Vibrio parahaemolyticus* biofilm than DNase I. **Food Control**, v. 117, n. April, p. 107312, 2020.
- LIAO, L. B.; CHEN, W. M.; XIAO, X. M. The generation and inactivation mechanism of oxidation-reduction potential of electrolyzed oxidizing water. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 4, p. 1326–1332, 2007.
- LIBBY, S.J.; HALSEY, T.A.; ALTIER, C., POTTER, J.; GYLES, C.L. *Salmonella*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F. SONGER, J.G.; THOEN, C.O. (Ed.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 3.ed. Blackwell Publishing, 2008. p.143-167
- LIU, Y. *et al.* A electro-deposition process for fabrication of biomimetic super-hydrophobic surface and its corrosion resistance on magnesium alloy. **Electrochimica Acta**, v. 125, p. 395–403, 2014.
- LUCCA, V. *et al.* Influence of the norepinephrine and medium acidification in the growth and adhesion of *Salmonella* Heidelberg isolated from poultry. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, n. October 2019, p. 103799, 2020.
- LUCIANO, C. *et al.* American Journal of Infection Control Evaluation of the ability of different detergents and disinfectants to remove and kill organisms in traditional biofilm. **AJIC: American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 11, p. e243–e249, 2016.
- LUO, K.; OH, D. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* enterica serovar Typhimurium on fresh-cut bell pepper treated with slightly acidic electrolyzed water combined with ultrasound and mild heat. **Food Microbiology**, v. 53, p. 165–171, 2016.
- MACARI, M.; *et al.* **Produção de Frangos de Corte**. 2º edição, São Paulo: FACTA, 2014, p.565
- MARAIS, J. T.; BRÖZEL, V. S. Electro-chemically activated water in dental unit water lines. **British Dental Journal**.v. 187, n. 3, p. 154–158, 1999.
- MARIN, C.; HERNANDIZ, A.; LAINEZ, M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. **Poultry Science**, v. 88, n. 2, p. 424–431, 2009.
- MARINO, M. *et al.* Inactivation of Foodborne Bacteria Biofilms by Aqueous and Gaseous Ozone. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, n. August, p. 1–12, 2018.
- MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**. v. 77, 2001.
- MELO, R. T. *et al.* Molecular Characterization and Survive Abilities of *Salmonella* Heidelberg Strains of Poultry Origin in Brazil. **Frontiers in Microbiology**. v. 12, n. June, 2021.
- MEMAR, M. Y. *et al.* Antimicrobial use of reactive oxygen therapy : current insights. **Infection and Drug Resistance**. p. 567–576, 2018.
- MERINO, L. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* spp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. **Food Research International**, v. 119, n.

November 2017, p. 530–540, 2019.

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.

MOORMAN, E. *et al.* Efficacy of Neutral Electrolyzed Water for Inactivation of Human Norovirus. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 83, 2017.

MORAES, J. O. *et al.* Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella* enterica strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 281, n. August 2017, p. 90–100, 2018.

MØRETRØ, T. *et al.* Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of Applied Microbiology**. v. 106, p. 1005–1012, 2009.

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.

MORITA, Y. *et al.* Survival of biofilm-forming salmonella on stainless steel bolt threads under dry conditions. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 52, n. 5, p. 299–303, 2011.

NADELL, C. D.; DRESCHER, K.; FOSTER, K. R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 589–600, 2016.

NAHAR, S. Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry. **Institute of Food Technologists**, 2018.

NAKAO, J. H. *et al.* Unusually high illness severity and short incubation periods in two foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections with potential coincident *Staphylococcus aureus* intoxication. p. 19–27, 2018.

NISAR, M. *et al.* Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the midwestern United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 12, 21183–2119, 2017.

NOYCE, J. O.; MICHELS, H.; KEEVIL, C. W. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. **Journal of Hospital Infection**, v. 63, n. 3, p. 289–297, 2006.

OBE, T. *et al.* Homologous stress adaptation , antibiotic resistance , and biofilm forming ability of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg ATCC8326 on different food-contact surfaces following exposure to sublethal chlorine. **Poultry Science**, v. 97, n. 3, p. 951–961, 2018.

OGLESBY-SHERROUSE, A. G. *et al.* The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 3, p. 307–320, 2014.

OKANDA, T. *et al.* Slightly acidic electrolyzed water disrupts biofilms and effectively disinfects *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, n. 6, p. 452–457, 2019.

OLIVEIRA, K. *et al.* Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 318–323, 2007.

- OSAFUNE, T.; EHARA, T.; ITO, T. Electron microscopic studies on bactericidal effects of electrolyzed acidic water on bacteria derived from kendo protective equipment. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 11, n. 4, p. 206–214, 2006.
- PANG, X. *et al.* Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and its resistance to quaternary ammonium compounds in a simulated salmon processing environment. **Food Control**, v. 98, n. September 2018, p. 200–208, 2019.
- PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* signal-response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 576–588, 2016.
- 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.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. *et al.* Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 3, p. 131–144, 2008.
- PITTS, B. *et al.* A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. **Journal of Microbiological Methods**. v. 54, p.269–276, 2003.
- PRESTES, S.; NASCIMENTO, M. S.; HERTWIG, A. M. VON. Biofilm formation and resistance to sanitizers by *Salmonella spp.* Isolated from the peanut supply chain. **Food Research International**. v. 152, n. August 2021, 2022.
- RAHAMAN, F.; SADEKUZZAMAN, M. Effects of NaCl , glucose , and their combinations on bio film formation on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) surfaces by **Vibrio parahaemolyticus**. **Food Control**, v. 89, p. 203–209, 2018.
- RAHMAN, S.; KHAN, I.; OH, D. H. Electrolyzed Water as a Novel Sanitizer in the Food Industry: Current Trends and Future Perspectives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 3, p. 471–490, 2016.
- RAHMAN, S. M. E. *et al.* Stability of low concentration electrolyzed water and its sanitization potential against foodborne pathogens. **Journal of Food Engineering**, v. 113, n. 4, p. 548–553, 2012a.
- RAHMAN, S. M. E. *et al.* Effects of slightly acidic low concentration electrolyzed water on microbiological, physicochemical, and sensory quality of fresh chicken breast meat. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012b.
- REGALADO, C. *et al.* Evaluation of electrolyzed water as cleaning and disinfection agent on stainless steel as a model surface in the dairy industry. **Food Control**. v. 60, p. 320–328, 2016.
- RODRIGUES, L. B. *et al.* Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 3, p. 225, 2018.
- RYAN, M. P.; O'DWYER, J.; ADLEY, C. C. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- SATPATHY, S. *et al.* Review on bacterial biofilm: An universal cause of

- contamination. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 56–66, 2016.
- SCHMIDT, R. H. *et al.* Characteristics of Food Contact Surface Materials : Stainless Steel. **Food Protection Trends**. v. 32, n. 10, p. 574–584, 2012.
- SHAH, D. H. *et al.* Microbiology and food safety: Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes. **Poultry Science**, v. 96, n. 3, p. 687–702, 2017.
- SILVA, M. V. F. *et al.* Corrosão do aço-carbono: Uma abordagem do cotidiano no ensino de química. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 293–296, 2015.
- SINDE, E.; BLOOMFIELD, J. Attachment of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 439–447, 2000.
- SINGH, A. K. *et al.* Standardization and Classification of In vitro Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Global Infectious Diseases**. p. 93–101, 2017.
- SIPAHI, H. *et al.* In vitro biocompatibility study approaches to evaluate the safety profile of electrolyzed water for skin and eye. **Human and Experimental Toxicology**. v. 38, 2019.
- SONI, K. A. *et al.* Inhibition and Inactivation of *Salmonella* Typhimurium Biofilms from Polystyrene and Stainless Steel Surfaces by Essential Oils and Phenolic Constituent Carvacrol. **Journal of Food Protection**. v. 76, n. 2, p. 205–212, 2013.
- SOUZA, M. N. *et al.* Molecular detection of *Salmonella* serovars Enteritidis, Heidelberg and Typhimurium directly from pre-enriched poultry samples. **British Poultry Science**, v. 60, n. 4, p. 388–394, 2019.
- STIEFEL, P. *et al.* Is biofilm removal properly assessed ? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 4135–4145, 2016.
- SUN, J. *et al.* Efficacy of acidic and basic electrolyzed water in eradicating *Staphylococcus aureus* biofilm. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 454, n. 17, p. 448–454, 2012.
- SVIDZINSKI, A. E. *et al.* Eficiência do ácido peracético no controle de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. **Ciência, Cuidado e Saúde**. v. 6, n. 3, p. 312–318, 2007.
- SWENBERG, J. A. *et al.* NIH Public Access. v. 41, n. 2, p. 181–189, 2014.
- TAGG, K. A. *et al.* Novel trimethoprim resistance gene dfrA34 identified in *Salmonella* Heidelberg in the USA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 74, 2019, 38–41, 2019.
- TAKEDA, Y. *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications Acidic electrolyzed water potently inactivates SARS-CoV-2 depending on the amount of free available chlorine contacting with the virus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 530, n. 1, p. 1–3, 2020.
- TANG, W. *et al.* Disinfection Effect and Its Mechanism of Electrolyzed Oxidizing Water on Spores of *Bacillus subtilis* var . *niger*. **Food Science and Biotechnology**. v.

20, n. 4, p. 889–895, 2011.

TENZIN, S. *et al.* Decontamination of aerosolised bacteria from a pig farm environment using a pH neutral electrochemically activated solution (Ecas4 anolyte). **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–15, 2019.

THORN, R. M. S. *et al.* Electrochemically activated solutions: Evidence for antimicrobial efficacy and applications in healthcare environments. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 5, p. 641–653, 2012.

TONDO, E. C. *et al.* Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1027–1037, 2010.

TONDO E.C & BARTZ S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 263p., 2012.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. São Paulo: Artmed, 2012; p. 933.

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 2020.

USDA-FSIS. **Safe and suitable ingredients**. 2021. Disponível em: <https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-09/7120.1_table_2.pdf>. Acesso em setembro de 2020.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.

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.

VEDTA - Programa de vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos. **Relatório 2013**. Divisão de Vigilância Epidemiológica/RS- Secretaria da Saúde do Estado.

VIZZIER-THAXTON, Y.; EWING, M. L.; BONNER, C. M. Generation and detection of trihalomethanes in chicken tissue from chlorinated chill water. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, n. 2, p. 169–173, 2010.

VOSS-RECH, D. *et al.* Longitudinal study reveals persistent environmental *Salmonella* Heidelberg in Brazilian broiler farms. **Veterinary Microbiology**, v. 233, n. February, p. 118–123, 2019.

WALES, A.; BRESLIN, M.; DAVIES, R. Assessment of cleaning and disinfection in *Salmonella* -contaminated poultry layer houses using qualitative and semi-quantitative culture techniques. v. 116, p. 283–293, 2006.

WANG, H. *et al.* Biofilm formation of *Salmonella* serotypes in simulated meat processing environments and its relationship to cell characteristics. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 10, p. 1784–1789, 2013a.

WANG, H. *et al.* In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation

under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 3, p. 293–302, 2013b.

WANG, H. *et al.* Effects of microbial redox cycling of iron on cast iron pipe corrosion in drinking water distribution systems. **Water Research**, v. 65, p. 362–370, 2014.

WANG, H. *et al.* Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 298–304, 2016.

WANG, H. *et al.* Effects of O3/Cl2 disinfection on corrosion and opportunistic pathogens growth in drinking water distribution systems. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 73, p. 38–46, 2018a.

WANG, H. *et al.* Combination of a novel designed spray cabinet and electrolyzed water to reduce microorganisms on chicken carcasses. **Food Control**, v. 86, p. 200–206, 2018b.

WANG, H. *et al.* Primary concerns regarding the application of electrolyzed water in the meat industry. **Food Control**, v. 95, n. July 2018, p. 50–56, 2019a.

WANG, H. *et al.* Primary concerns regarding the application of electrolyzed water in the meat industry. **Food Control**, v. 95, n. June 2018, p. 50–56, 2019b.

WANG, R. *et al.* Biofilm Formation, Antimicrobial Resistance, and Sanitizer Tolerance of *Salmonella enterica* Strains Isolated from Beef Trim . **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 12, p. 687–695, 2017.

WEBBER, B. *et al.* *Salmonella* Enteritidis forms biofilm under low temperatures on different food industry surfaces. **Ciencia Rural**, v. 49, n. 7, 2019.

WHITEHEAD, K. A.; VERRAN, J. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 84–91, 2015.

WHO (World Health Organization). Health Topics: *Salmonella* (non – typhoidal). 2018. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acessado em 20 de janeiro 2020.

WILSMANN, D. E. *et al.* Electrochemically-Activated Water Presents Bactericidal Effect Against *Salmonella* Heidelberg Isolated from Poultry Origin. **Foodborne pathogens and disease**, v. XX, n. XX, p. 1–6, 2019.

WOLYNEC, S. **Técnicas Eletroquímicas em Corrosão**. São Paulo; EdUSP, v. 49, p. 166, 2003.

YAN, J.; BASSLER, B. L. Minireview Surviving as a Community : Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms Minireview. **Cell Host and Microbe**, v. 26, n. 1, p. 15–21, 2019.

ZANG, Y. T. *et al.* Modeling disinfection of plastic poultry transport cages inoculated with *Salmonella* enteritidis by slightly acidic electrolyzed water using response surface methodology. **Poultry Science** n. 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**, v. 75, n. 5, 2010.

ZHAO, L.; LI, S.; YANG, H. Recent advances on research of electrolyzed water and its applications. **Current Opinion in Food Science**, v. 41, n. Cdc, p. 180–188, 2021.

ВОРОБЕЙ, Е.; ВОРОНКОВА, О.; ВИННИКОВ, А. Бактериальные биопленки. Quorum sensing – «Чувство кворума» у бактерий в биопленках. **Вісник Дніпропетровського Університету. Біологія, Екологія**, v. 20, n. 1, 2012.

APÊNDICE A – Isolados de *Salmonella* Heidelberg utilizados no experimento.

Identificação	Ano de isolamento	Fonte de isolamento	<i>Pool</i>
9	2018	Swab de arrasto	1
11	2018	Swab de arrasto	2
13	2018	Swab de arrasto	2
16	2018	Swab de arrasto	1
25	2018	Swab de arrasto	2
33	2019	Swab de arrasto	2
51	2018	Swab de arrasto	1
52	2018	Swab de arrasto	1