



## Atividade antibiofilme *in vitro* da água eletroquimicamente ativada contra biofilmes de *Salmonella* Heidelberg em superfícies de poliestireno

### *In vitro* antibiofilm activity of electrochemically activated water against *Salmonella* Heidelberg biofilms on polystyrene surfaces

Daiane Elisa Wilsmann<sup>1</sup> , Thales Quedi Furian<sup>1</sup> , Daiane Carvalho<sup>1</sup> , Gabriela Zottis Chitolina<sup>1</sup> , Brunna Dias de Emery<sup>1</sup> , Vivian Lucca<sup>1</sup> , Karen Apellanis Borges<sup>\*1</sup> , Abrahão Carvalho Martins<sup>1</sup> , Daniela Tonini da Rocha<sup>1</sup> , Hamilton Luiz de Souza Moraes<sup>1</sup> , Vladimir Pinheiro do Nascimento<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

\*Autor correspondente: karen.borges@ufrgs.br

**Resumo:** Para garantir a segurança do alimento, abatedouros-frigoríficos de aves seguem protocolos rígidos para evitar a contaminação por bactérias deteriorantes e patogênicas. Entretanto, *Salmonella* Heidelberg permanece como um problema de saúde pública, uma vez que é capaz de produzir biofilme e sobreviver em superfícies abióticas por longos períodos de tempo. Existe uma necessidade mundial para a identificação de compostos naturais que sejam capazes de remover e de prevenir a formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos. A água eletroquimicamente ativada (ECAW) é uma alternativa potencial aos desinfetantes químicos utilizados contra patógenos de alimentos. A atividade antibiofilme da ECAW já foi demonstrada em aço inoxidável e no polietileno, mas não em superfícies de poliestireno. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibiofilme de ECAW contra os biofilmes de *S. Heidelberg* em superfícies de poliestireno e comparar com um desinfetante de amplo espectro, um detergente alcalino e um detergente ácido. Todos os produtos foram testados em três concentrações para determinar a atividade antibiofilme de ECAW contra os biofilmes de *S. Heidelberg* em superfícies de poliestireno a 25°C e a 37°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. A ECAW foi efetiva em 56% na capacidade de remoção dos biofilmes de *S. Heidelberg* formados em superfícies de poliestireno, sendo observada influência do tempo de contato, concentração do produto e temperatura. Em relação à prevenção da formação dos biofilmes, ECAW foi efetiva em 54% e apresentou resultados similares ou superiores ao desinfetante e aos detergentes avaliados. Os resultados encontrados *in vitro* demonstram que ECAW é efetiva na remoção e na prevenção de biofilmes de *S. Heidelberg* em superfícies de poliestireno. Ademais, confirmam o seu potencial para ser utilizada como uma alternativa na cadeia de produção de alimentos.

**Palavras-chave:** composto natural; prevenção de biofilmes; remoção de biofilmes

Recebido: 29 de fevereiro, 2024. Aceito: 20 de setembro, Publicado: 11 de novembro, 2024.

**Abstract:** To guarantee food safety, poultry slaughterhouses follow rigid standards to control pathogenic bacteria and prevent spoilage. However, *Salmonella* Heidelberg remains a major public health concern because it produces biofilms that increase its survival on abiotic surfaces for long periods of time. There is a global need to identify naturally-occurring compounds to remove and prevent biofilms produced on food-contact surfaces. Electrochemically activated water (ECAW) is a potential alternative to chemical disinfectants against foodborne pathogens. The antibiofilm activity has been demonstrated on stainless steel and polyethylene, but not on polystyrene surfaces. The aim of this study was to evaluate the antibiofilm activity of ECAW against *S. Heidelberg* biofilms on polystyrene surfaces and to compare with a broad-spectrum disinfectant, an alkaline detergent, and an acid detergent. All products were tested at three concentrations for antibiofilm activity against *S. Heidelberg* at 25 and 37 °C. ECAW was effective in removing *S. Heidelberg* biofilms formed on polystyrene surfaces (56% removal). The influence of contact time, product concentration, and temperature was observed on biofilm removal by ECAW. ECAW prevented up to 54% of *S. Heidelberg* biofilms on polystyrene. ECAW presented similar, or even superior, antibiofilm activity to that of disinfectant for the prevention and removal of *S. Heidelberg* biofilms. Our findings demonstrate that ECAW is effective in removing and preventing *S. Heidelberg* biofilms on polystyrene surfaces and confirmed its potential alternative to control *S. Heidelberg* in the food production chain.

**Keywords:** biofilm prevention; biofilm removal; natural compound

## 1. Introdução

*Salmonella* spp. é uma das principais causas de gastroenterite em todo o mundo<sup>(1)</sup> e foi a segunda zoonose mais reportada em humanos na União Europeia em 2021<sup>(2)</sup>. Nos Estados Unidos, 1,35 milhões de pessoas adoecem, 26.500 são hospitalizadas e 420 morrem a cada ano em decorrência de infecção por *Salmonella* spp.<sup>(3)</sup>. Uma característica importante de diversos sorovares de *Salmonella* é a capacidade de produzir biofilme em diferentes superfícies<sup>(4)</sup>. Esta habilidade favorece a sobrevivência bacteriana em superfícies abióticas e em ambientes hostis, como em plantas de matadouros-frigoríficos e de indústrias produtoras de alimentos, por longos períodos podendo ser uma fonte de contaminação dos alimentos<sup>(5)</sup>. Esta contaminação representa um risco à saúde dos consumidores e resulta em perdas econômicas para a indústria. *Salmonella* Heidelberg é um importante patógeno associado com os surtos envolvendo isolados multirresistentes aos antimicrobianos a partir de produtos de origem avícola. A emergência deste sorovar e a sua alta persistência no ambiente levaram a um aumento da preocupação com o risco sanitário às plantas processadoras de alimentos<sup>(6,7)</sup>.

Para garantir a qualidade microbiológica dos alimentos, plantas produtoras de alimentos estão constantemente sujeitas a processos de limpeza e desinfecção para promover o controle da contaminação e evitar a adesão bacteriana às superfícies. Entretanto, devido ao aumento da resistência antimicrobiana, existe uma preocupação global para identificar e avaliar a eficácia de compostos naturais contra os principais patógenos<sup>(8,9)</sup>. A água eletroquimicamente ativada (ECAW) é um composto natural, *eco-friendly* e com bom custo-benefício. É produzida a partir de água, sal e eletricidade, sendo o ácido hipocloroso (HOCl) seu principal componente<sup>(10)</sup>. HOCl é um desinfetante não tóxico, não corrosivo, prático e de baixo custo que elimina patógenos<sup>(11,12)</sup>.

A atividade antimicrobiana da ECAW frente a isolados de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* já foi previamente descrita<sup>(13-16)</sup>. Além disto, a atividade antibiofilme da ECAW em prevenir e remover biofilmes já foi demonstrada em superfícies de aço inoxidável e de poliestileno<sup>(17)</sup>. Entretanto, estudos em superfícies de poliestireno ainda são escassos. Poliestireno é um polímero amplamente utilizado na indústria de produção de alimentos para embalagem de produtos cárneos, lácteos e de padaria<sup>(18)</sup>.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação antibiofilme de ECAW contra biofilmes de *S. Heidelberg* pré-formados e também a capacidade de prevenir a formação destas estruturas em superfícies de poliestireno, comparando-a com um desinfetante de amplo espectro, um detergente alcalino e um detergente ácido.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Produção da água eletroquimicamente ativada

A ECAW foi produzida em um gerador (Centrego, Frome, Reino Unido) com uma capacidade de produção de 200 L/h utilizando uma fonte de água e uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,1%. O cloro livre e o potencial de oxirredução (ORP) foram medidos imediatamente após a produção utilizando um medidor Micro 7 Plus (Akso, São Leopoldo, Brasil). Os valores de ORP variaram de 800 mV a 900 mV, e a concentração média de cloro livre obtida na solução inicial de ECAW variou entre 350 ppm e 400 ppm.

### 2.2 Preparação da água eletroquimicamente ativada e dos produtos comerciais

A atividade antibiofilme foi avaliada em quatro tratamentos: (A) ECAW, (B) desinfetante composto de quaternário de amônia (QAC), (C) detergente alcalino e (D) detergente ácido. ECAW foi testada em três concentrações (solução inicial [350–400 ppm], 200, e 250 ppm) de cloro livre. Estas concentrações foram selecionadas com base em estudos *in vitro* realizados anteriormente para avaliação da ação antimicrobiana de ECAW<sup>(15)</sup>. O desinfetante foi testado em uma concentração fraca (0,1%), na concentração recomendada pelo fabricante (0,2%) e em uma concentração forte (0,5%). Os detergentes foram testados em uma concentração fraca (0,25%), na concentração recomendada pelo fabricante (0,5%) e em uma concentração forte (1%). Todos os produtos foram diluídos em água destilada estéril.

### 2.3 Cepas de *Salmonella* Heidelberg

Oito cepas de *S. Heidelberg* isoladas de fontes avícolas entre 2018 e 2019 foram selecionadas, aleatoriamente, da nossa coleção de estoque para este estudo. Estas cepas foram previamente identificadas e sorotipificadas pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, Brasil). Todas as cepas foram previamente testadas utilizando-se o teste cristal violeta para determinar sua habilidade em produzir biofilmes a 25°C (temperatura ambiente) e a 37°C (temperatura ótima de crescimento de *Salmonella*) (dados não publicados). Isolados

bacterianos foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  em caldo infusão cérebro-coração (BHI; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) suplementado com glicerina 15% (Synth, Diadema, Brasil). Cepas foram reativadas em BHI por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  e plaqueadas em ágar xilose lisina deoxycolato (XLD; Oxoid) por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4 Preparação do inóculo

Colônias de *S. Heidelberg* foram semeadas em ágar triptona de soja sem glicose (TSA; Oxoid) e incubadas por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Uma colônia de cada cepa foi inoculada em caldo triptona de soja sem glicose (TSB; Oxoid), e os tubos foram incubados por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . A escala de McFarland No. 1 (Probac do Brasil, Brasil) foi utilizada como referência para ajustar a turbidez da suspensão bacteriana do TSB a  $3 \times 10^8$  UFC/mL. O espectrofotômetro SP 22 (Biospectro, Brasil) foi utilizado para medir a turbidez da solução a um comprimento de onda de 620 nm, e o intervalo de leitura foi de 0.224 a 0.300. As análises foram realizadas com dois *pools* de quatro cepas cada. Para preparar os *pools*, foram utilizados 200  $\mu\text{L}$  de cada solução bacteriana em 4,2 mL de TSB para atingir um volume final de 5 mL.

#### 2.5 Remoção dos biofilmes formados

Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada *pool* foram inoculadas em triplicata em cada poço de uma microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil), seguido de incubação por 24 h a 25 e a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após a incubação, a suspensão foi removida e a microplaca foi lavada com 250  $\mu\text{L}$  de solução estéril de cloreto de sódio a 0,85% (Synth) para remover as células planctônicas. Os biofilmes formados foram tratados com 200  $\mu\text{L}$  de cada produto (A, B, C e D) de cada concentração por 10 e 20 min a  $25^{\circ}\text{C}$  e a  $37^{\circ}\text{C}$ . O conteúdo dos poços foi removido e os poços foram lavados três vezes com 250  $\mu\text{L}$  de solução estéril de cloreto de sódio a 0,85%. As bactérias aderidas foram fixadas com 200  $\mu\text{L}$  de metanol (Nuclear, Brasil) por poço por 20 min. O metanol foi removido e as microplacas foram coradas com 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta de Hucker a 2% (MediQuímica, Brasil) em cada poço por 15 min. O corante foi removido e as microplacas foram gentilmente lavadas em água corrente. As microplacas foram secas ao natural em temperatura ambiente. O biofilme foi ressuscitado com 250  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial a 33% (Nuclear, Brasil) por poço. A densidade óptica (DO) de cada poço foi medida em um comprimento de onda a 550 nm com um leitor de absorvância ELx800 (Biotek, EUA).

#### 2.6 Prevenção da formação de biofilmes

Microplacas foram tratadas com 200  $\mu\text{L}$  de cada produto (A, B, C, e D) nas suas respectivas concentrações, seguido de incubação por 24 h a 25 e a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após a incubação, o conteúdo dos poços foi removido. Os poços tratados com os detergentes (C e D) foram lavados com 250  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril, como recomendado pelo fabricante. As microplacas foram secas ao natural em temperatura ambiente. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de cada *pool* foram adicionados em triplicata, conforme descrito anteriormente. As microplacas foram incubadas por 24

h a 25 e a 37 °C. Após a incubação, a suspensão celular foi removida e as microplacas foram preparadas conforme descrito anteriormente. A densidade óptica (DO) de cada poço foi medida a 550 nm com um leitor de absorvância ELx800 (Biotek, EUA).

### 2.7 Controles negativo, positivo e de qualidade

Os controles foram inoculados em triplicata e foram os mesmos para ambos os experimentos. Controles negativos e positivos foram usados para todas as temperaturas, concentrações e tempos de contato. Para o controle negativo (sem tratamento e sem biofilme), foi inoculado apenas TSB sem glicose estéril. Para o controle positivo (sem tratamento), uma cepa padrão de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e uma cepa de *S. Heidelberg* de nossa coleção de estoque, anteriormente classificada como produtora de biofilme, foram usadas neste estudo.

### 2.8 Medição dos efeitos da prevenção e da remoção de biofilme

A capacidade de cada produto de remover biofilmes formados ou prevenir a formação de biofilmes foi avaliada pela determinação da porcentagem (%) de biomassa removida ou não formada em relação ao controle não tratado. A prevenção e a remoção de biofilme foram calculadas usando a seguinte fórmula<sup>(19)</sup>:

$$\frac{((C - B) - (T - B))}{(C - B)} \times 100 (\%)$$

onde B é a absorvância média por poço sem tratamento e sem biofilme (controle negativo), C é a absorvância média por poço sem tratamento (controle positivo) e T é a absorvância média por poço para poços tratados para cada composto avaliado.

### 2.9 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism com um nível de significância de 5%. O teste t de Student foi usado para comparar a remoção/prevenção de biofilme entre as diferentes temperaturas e tempos de contato. A análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de diferença honestamente significativa (HSD) de Tukey, foi usada para detectar diferenças na prevenção e remoção de biofilme entre concentrações e compostos.

## 3. Resultados e discussão

A atividade antibiofilme de ECAW foi demonstrada contra biofilmes de *S. Heidelberg* em superfícies de aço inoxidável e polietileno<sup>(17)</sup>, mas não para poliestireno. Considerando que as bactérias que compõem os biofilmes são até 1.000 vezes mais resistentes a antimicrobianos do que as bactérias planctônicas<sup>(20)</sup>, é improvável que agentes antimicrobianos sejam capazes de inibir completamente os biofilmes. Um composto antimicrobiano pode ser usado como uma medida de controle preventivo para interromper a fixação de patógenos em

superfícies abióticas ou como um tratamento a ser adotado para remover o biofilme formado. Portanto, neste estudo, avaliamos o uso potencial de ECAW para remoção e prevenção de biofilme.

Para este estudo, foi selecionado um desinfetante e dois detergentes. Os compostos foram selecionados com base em sua disponibilidade no mercado e uso na cadeia de produção avícola. Desinfetantes e detergentes apresentam diferentes mecanismos de ação e propósitos em plantas de processamento de alimentos. Enquanto os detergentes são usados durante a etapa de limpeza para remover a sujidade das superfícies, os desinfetantes são usados durante a etapa de sanitização para reduzir a carga bacteriana nas superfícies<sup>(21)</sup>. Assim, a atividade antibiofilme dos detergentes não foi comparada à dos desinfetantes e à ECAW. No entanto, devido a sua importância como uma etapa anterior nos processos de limpeza e desinfecção, os detergentes foram incluídos neste estudo para avaliar sua atividade antibiofilme. O desinfetante selecionado para este estudo atua rompendo as membranas celulares microbianas e o metabolismo, e é considerado um desinfetante químico de amplo espectro<sup>(22)</sup>. Os detergentes facilitam o contato entre a água e a superfície, diminuindo a tensão superficial, e são usados para decompor e soltar a sujidade das superfícies<sup>(21)</sup>. O detergente alcalino utilizado contém hidróxido de sódio (NaOH). NaOH libera íons hidroxila que promovem a saponificação de ácidos graxos e a solubilização de proteínas, tornando-as solúveis em água<sup>(23,24)</sup>. O ácido nítrico, principal componente do detergente ácido, é um ácido inorgânico e um agente oxidante usado para remover sujidades complexas e depósitos de incrustações de superfícies de plantas de processamento de alimentos<sup>(21,25)</sup>.

Os efeitos dos quatro compostos avaliados na remoção *in vitro* de biofilmes formados por *S. Heidelberg* em superfície de poliestireno são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade antibiofilme *in vitro* de água eletroquimicamente ativada (ECAW) (A), desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (B), detergente alcalino (C) e detergente ácido (D) na remoção de biofilme formado por *Salmonella Heidelberg* a 25°C e a 37°C em superfície de poliestireno.

Composto	Concentração	Média (%) ± desvio-padrão			
		25°C		37°C	
		Tempo de contato (min)		Tempo de contato (min)	
		10	20	10	20
ECAW	200 ppm	35,53 ± 4,49 <sup>aAB</sup>	51,75 ± 3,68 <sup>ba</sup>	13,63 ± 9,84 <sup>aA</sup>	41,24 ± 16,13 <sup>ba</sup>
	250 ppm	22,66 ± 0,08 <sup>aA</sup>	55,98 ± 4,81 <sup>ba</sup>	14,18 ± 4,78 <sup>aA</sup>	42,78 ± 15,38 <sup>ba</sup>
	Solução inicial (350–400 ppm)	40,66 ± 9,96 <sup>aB</sup>	55,31 ± 6,38 <sup>ba</sup>	21,47 ± 7,79 <sup>aA</sup>	55,82 ± 18,48 <sup>ba</sup>
desinfetante	0,10%	24,57 ± 5,02 <sup>aA</sup>	32,70 ± 6,21 <sup>ba</sup>	30,23 ± 42,75 <sup>aA</sup>	37,33 ± 15,94 <sup>aA</sup>
	0,20%	25,67 ± 3,34 <sup>aA</sup>	37,07 ± 6,07 <sup>ba</sup>	33,64 ± 33,04 <sup>aA</sup>	42,83 ± 17,76 <sup>aA</sup>
	0,50%	29,44 ± 4,90 <sup>aA</sup>	40,88 ± 6,06 <sup>ba</sup>	38,18 ± 15,34 <sup>aA</sup>	49,29 ± 20,66 <sup>aA</sup>
detergente alcalino	0,25%	65,41 ± 5,47 <sup>aA</sup>	79,15 ± 1,75 <sup>ba</sup>	52,26 ± 45,22 <sup>aA</sup>	69,48 ± 1,03 <sup>aA</sup>
	0,50%	74,99 ± 3,94 <sup>aB</sup>	83,13 ± 3,52 <sup>ba</sup>	65,67 ± 8,84 <sup>aA</sup>	72,13 ± 0,90 <sup>aB</sup>
	1%	77,93 ± 0,72 <sup>aB</sup>	81,80 ± 2,33 <sup>ba</sup>	76,31 ± 39,65 <sup>aA</sup>	75,84 ± 1,34 <sup>aB</sup>

detergente	0,25%	11,12 ± 9,15 <sup>aA</sup>	20,37 ± 14,06 <sup>aA</sup>	15,49 ± 5,82 <sup>aA</sup>	26,45 ± 14,57 <sup>aA</sup>
	0,50%	21,16 ± 7,67 <sup>aAB</sup>	22,88 ± 4,25 <sup>aA</sup>	24,03 ± 12,19 <sup>aAB</sup>	25,16 ± 25,98 <sup>aA</sup>
ácido	1%	26,09 ± 6,61 <sup>aB</sup>	30,71 ± 5,25 <sup>aA</sup>	35,64 ± 13,30 <sup>aB</sup>	40,77 ± 11,99 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de contato (10 min e 20 min) para o mesmo composto, concentração e temperatura. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações para o mesmo produto, tempo de contato e temperatura.

Neste estudo, em geral, o tempo de contato foi importante para reduzir a adesão bacteriana, exceto para o detergente ácido. Essa influência foi observada para ECAW em todas as temperaturas e concentrações ( $p < 0,05$ ). Para o detergente alcalino e o desinfetante, diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas a 25°C para todas as concentrações. Em todos os casos, a remoção do biofilme foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) após 20 min de contato. A influência do tempo de contato na atividade de ECAW foi previamente demonstrada em células planctônicas de *S. Heidelberg*<sup>(17)</sup>. Espera-se que o aumento do tempo de contato possa resultar em aumento da atividade antibiofilme, independentemente do composto ou espécie bacteriana avaliada<sup>(8,26)</sup>. No entanto, destaca-se que o aumento do tempo de contato implica em processos de limpeza e desinfecção mais longos em plantas de processamento de alimentos.

A atividade antibiofilme de desinfetantes químicos depende de sua concentração. A redução de células de biofilme aumenta com maiores concentrações de desinfetante<sup>(8)</sup>. Neste estudo, o aumento da concentração do produto resultou em um aumento significativo da remoção bacteriana em pelo menos uma temperatura para ECAW e para ambos os detergentes. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas para ECAW a 25°C após 10 min de contato. Neste caso, 250 ppm do produto resultaram em uma redução significativamente ( $p < 0,05$ ) menor na remoção de biofilme do que a solução inicial. Da mesma forma, o detergente alcalino a 0,25% resultou na menor remoção de biofilme ( $p < 0,05$ ) após 10 e 20 min de contato a 25°C e 37°C, respectivamente. Finalmente, o detergente ácido a 1% removeu significativamente ( $p < 0,05$ ) mais biofilme do que a menor concentração (0,25%) após 10 min de contato em ambas as temperaturas.

A influência da temperatura foi observada para ECAW após 10 min de contato e para o detergente alcalino após 20 min de contato. Em ambos os casos, a remoção do biofilme foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) a 25°C do que a 37°C. A formação de biofilme por isolados de *Salmonella* é fortemente influenciada pelas temperaturas de incubação<sup>(27)</sup>, e estudos anteriores demonstraram a influência da temperatura na remoção e na prevenção do biofilme por vários microrganismos<sup>(8,27,28)</sup>. A expressão de alguns componentes necessários para a produção de biofilme, como curli e celulose, ocorre principalmente em temperaturas que variam de 20 a 30°C. Em temperaturas mais altas, há um aumento na taxa de crescimento bacteriano que pode afetar a produção de biofilme<sup>(27,29)</sup>. Além disso, uma diminuição na temperatura do tratamento é geralmente seguida por uma diminuição na eficiência dos compostos desinfetantes<sup>(30)</sup>. Assim, neste estudo, esperava-se que a temperatura influenciasse

a remoção e/ou prevenção bacteriana. No entanto, a influência da temperatura da remoção do biofilme não foi observada em quase nenhum dos casos avaliados.

Também foram feitas comparações entre o desinfetante, os detergentes e a ECAW. Para comparação, concentrações equivalentes (baixa, recomendada/média e alta) foram consideradas para cada temperatura. O detergente alcalino apresentou maior ( $p < 0,05$ ) capacidade de remoção de biofilme do que o detergente ácido, independentemente da concentração, tempo de contato ou temperatura, exceto por 20 min de contato a 25°C (média) e 10 min de contato a 37°C (baixa). A ECAW apresentou maior ( $p < 0,05$ ) remoção de biofilme do que os desinfetantes a 25°C para baixas e altas concentrações, independentemente do tempo de contato. Os resultados foram semelhantes para as outras condições ( $p > 0,05$ ).

Os efeitos dos quatro compostos na prevenção da formação de biofilme por *S. Heidelberg* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade antibiofilme de água eletroquimicamente ativada (ECAW) (A), desinfetante à base de cloridrato de polihexametileno biguanida e cloreto de benzalcônio (B), detergente alcalino (C) e detergente ácido (D) na prevenção da formação de biofilme por *Salmonella Heidelberg* a 25°C e a 37°C.

Composto	Concentração	Média (%) ± desvio-padrão	
		Temperatura (°C)	
		25	37
ECAW	200 ppm	43,28 ± 13,58 <sup>aA</sup>	39,54 ± 1,53 <sup>aA</sup>
	250 ppm	41,43 ± 48,49 <sup>aA</sup>	42,65 ± 2,82 <sup>aA</sup>
	Solução inicial (350–400 ppm)	48,07 ± 25,17 <sup>aA</sup>	53,71 ± 9,13 <sup>aB</sup>
desinfetante	0,10%	33,49 ± 9,94 <sup>aA</sup>	47,33 ± 7,13 <sup>bA</sup>
	0,20%	38,09 ± 10,83 <sup>aA</sup>	53,43 ± 1,87 <sup>bA</sup>
	0,50%	39,84 ± 16,06 <sup>aA</sup>	54,67 ± 1,97 <sup>bA</sup>
detergente alcalino	0,25%	20,71 ± 2,46 <sup>aA</sup>	19,63 ± 15,76 <sup>aA</sup>
	0,50%	26,39 ± 19,44 <sup>aA</sup>	22,72 ± 22,80 <sup>aA</sup>
	1%	48,54 ± 12,16 <sup>aB</sup>	50,69 ± 6,02 <sup>aB</sup>
detergente ácido	0,25%	21,70 ± 18,81 <sup>aA</sup>	43,80 ± 8,83 <sup>bA</sup>
	0,50%	36,27 ± 6,13 <sup>aAB</sup>	43,44 ± 7,61 <sup>aA</sup>
	1%	39,49 ± 1,46 <sup>aB</sup>	45,68 ± 8,53 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as temperaturas para o mesmo produto e mesma concentração. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações para o mesmo produto e mesma temperatura.

Foi observada uma influência significativa ( $p < 0,05$ ) da temperatura para o detergente ácido a 0,25% e para o desinfetante em todas as concentrações. Em ambos os casos, a prevenção de biofilme foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) a 37°C do que a 25°C. Em relação ao efeito da concentração do composto, uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi observada a 37°C para a ECAW e o detergente alcalino. A 25°C, diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram

observadas para ambos os detergentes. Em todos os casos, a maior concentração apresentou prevenção de biofilme significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que a menor concentração.

Semelhante ao ensaio de remoção de biofilme, também foram feitas comparações entre os compostos utilizando concentrações equivalentes (baixa, média e alta) em cada temperatura. O detergente alcalino apresentou maior ( $p < 0,05$ ) prevenção de biofilme do que o detergente ácido em baixas concentrações em ambas as temperaturas. A 37°C, o detergente alcalino apresentou maior ( $p < 0,05$ ) prevenção de biofilme do que o detergente ácido em concentração média. O ECAW apresentou prevenção de biofilme semelhante ( $p > 0,05$ ) em comparação ao desinfetante, independentemente da concentração e da temperatura.

Em relação à remoção e prevenção de biofilme, ambos os detergentes reduziram a carga de células bacterianas. A remoção ou prevenção de biofilme não é a principal função dos detergentes; no entanto, esses resultados demonstram a importância da etapa de limpeza durante a limpeza e desinfecção. A atividade antibiofilme de detergentes alcalinos e ácidos foi demonstrada anteriormente para *Salmonella*, *E. coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* em várias superfícies<sup>(31-35)</sup>. Em concentrações mais altas, o detergente alcalino removeu/preveniu mais biofilme do que o detergente ácido. Esse resultado pode ser explicado pela composição do biofilme. Os detergentes ácidos atuam principalmente em minerais, enquanto os detergentes alcalinos atuam em proteínas e lipídios, que são os principais componentes dos biofilmes<sup>(36)</sup>. Além disso, o pH da solução desempenha um papel importante na remoção de biofilmes usando detergentes. Estudos anteriores demonstraram que soluções de NaOH em pH 11,3 foram eficazes na remoção de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, mas isso não foi observado com soluções de HCl em pH 2,5<sup>(37)</sup>.

No presente estudo, a ECAW apresentou atividade antibiofilme semelhante, ou até superior, ao desinfetante para prevenção e remoção de biofilmes de *S. Heidelberg*. Uma vez que HOCl é o principal componente da ECAW, sua eficácia depende da concentração de HOCl, que está relacionado ao pH da solução<sup>(38,39)</sup>. A ECAW geralmente apresenta maior ação bactericida em pH baixo devido às propriedades químicas da membrana externa das células bacterianas, que permitem que o HOCl seja internalizado<sup>(40,41)</sup>. Entretanto, alterações no pH da solução podem afetar a atividade da ECAW. Por exemplo, a ECAW perde sua atividade antibiofilme em um pH variando de 2,5 a 3,5<sup>(37)</sup>, porque os biofilmes constituem uma barreira de difusão para compostos bactericidas. Assim, sua atividade antimicrobiana é mais complexa contra biofilmes do que contra células planctônicas<sup>(39,42)</sup>.

Independentemente do agente antimicrobiano, o sucesso do controle do biofilme está diretamente associado a procedimentos adequados de limpeza e desinfecção. Assim, é importante prevenir a formação de biofilme removendo bactérias aderidas nos estágios iniciais da formação do biofilme<sup>(43)</sup>. A maioria dos produtos falha no controle de biofilmes de *Salmonella* após quatro dias de maturação, porque biofilmes maduros geralmente apresentam maior resistência a agentes antimicrobianos<sup>(33,44)</sup>. Além disso, a presença de matéria orgânica pode influenciar na aplicação de desinfetantes<sup>(45)</sup>. Nesse contexto, o uso de ECAW pode ser uma ferramenta importante para inibir a fixação bacteriana em superfícies e prevenir a formação de biofilme. Após os processos de limpeza e desinfecção, a ECAW permanece atuando na

superfície, impedindo a adesão de células bacterianas. No entanto, até o momento, não há autorização para o uso de ECAW como método preventivo no Brasil.

## 4. Conclusão

Os resultados demonstraram a ação antibiofilme da ECAW em superfícies de poliestireno, que foi aumentada com tempos de contato maiores e altas concentrações do produto, similar ao que acontece com outros produtos comerciais. Em alguns casos, a ECAW apresentou maior capacidade de remover biofilmes do que o desinfetante comum. Desta forma, esta tecnologia representa uma potencial alternativa para o controle de *S. Heidelberg* na cadeia de produção de alimentos. Novos testes podem incluir a avaliação da interação entre a ECAW e o detergente alcalino para aumentar a ação antibiofilme.

## Declaração de conflito de interesses

Os autores não possuem interesses financeiros ou não financeiros relevantes para declarar.

## Contribuição dos autores

*Conceituação:* D. E. Wilsmann, T. Q. Furian, K. A. Borges, A. C. Martins e V. P. Nascimento. *Curadoria de dados:* D. E. Wilsmann e T. Q. Furian. *Análise formal:* D. E. Wilsmann e T. Q. Furian. *Aquisição de recursos:* D. E. Wilsmann, A. C. Martins e V. P. Nascimento. *Administração de projeto:* D. E. Wilsmann, T. Q. Furian, A. C. Martins, D. T. Rocha, H. L. S. Moraes e V. P. Nascimento. *Metodologia:* D. E. Wilsmann, D. Carvalho, G. Z. Chitolina e V. Lucca. *Supervisão:* A. C. Martins, D. T. Rocha, H. L. S. Moraes e V. P. Nascimento. *Investigação:* D. E. Wilsmann, T. Q. Furian, D. Carvalho, G. Z. Chitolina, V. Lucca e K. A. Borges. *Visualização:* D. E. Wilsmann e T. Q. Furian. *Redação (rascunho original):* D. E. Wilsmann, T. Q. Furian e K. A. Borges. *Redação (revisão e edição):* D. E. Wilsmann, T. Q. Furian e K. A. Borges.

## Referências

1. World Health Organization (WHO). Food Safety. [citado 2023 Jan 07]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
2. European Food Safety Authority (EFSA). *Salmonella* the most common cause of foodborne outbreaks in the European Union. [citado 2022 Nov 15]. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/news/salmonella-mostcommon-cause-foodborne-outbreaks-european-union>
3. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). *Salmonella*. [citado 2022 Fev 07]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>.
4. Carvalho D, Chitolina GZ, Wilsmann DE, Lucca V, Dias de Emery B, Borges KA, Furian TQ, Salle CTP, Moraes HLS, do Nascimento VP. Adhesion capacity of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, and *Campylobacter jejuni* on polystyrene, stainless steel, and polyethylene surfaces. *Food Microbiology*. 2023;114:104280. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104280>
5. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14:563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
6. Gieraltowski L, Higa J, Peralta V, Green A, Schwensohn C, Rosen H, Libby T, Kissler B, Marsden-Haug N, Booth H, Kimura A, Grass J, Bicknese A, Tolar B, Defibaugh-Chávez S, Williams I, Wise M. National outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to a single poultry company. *PLoS One* 2016;11:e0162369 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162369>
7. Voss-Rech D, Kramer B, Silva VS, Rebelatto R, Abreu PG, Coldebella A, Vaz CSL. Longitudinal study reveals persistent environmental *Salmonella* Heidelberg in Brazilian broiler farms. *Veterinary Microbiology*. 2019;233:118-123 <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.004>

8. Carvalho D, Menezes R, Chitolina GZ, Kunert-Filho HC, Wilsmann DE, Borges KA, Furian TQ, Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP. Antibiofilm activity of the biosurfactant and organic acids against foodborne pathogens at different temperatures, times of contact, and concentrations. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2022;53:1051-1064 <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00714-4>
9. Crouzet J, Arguelles-Arias A, Dhondt-Cordelier S, Cordelier S, Pršić J, Hoff G, Mazeyrat-Gourbeyre F, Baillieux F, Clément C, Ongena M, Dorey S. Biosurfactants in plant protection against diseases: rhamnolipids and lipopeptides case study. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:1-11 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.01014>
10. Wessels K, Rip D, Gouws P. *Salmonella* in chicken meat: consumption, outbreaks, characteristics, current control methods and the potential of bacteriophage use. *Foods*. 2021;10:1742 <https://doi.org/10.3390%2Ffoods10081742>
11. Block MS, Rowan BG. Hypochlorous Acid: A Review. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 2020 ;78(9):1461-1466. <https://doi.org/10.1016%2Fj.joms.2020.06.029>
12. Nature's own powerful, non-toxic disinfectant. *British Dental Journal*. 2018;224,553. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.302>
13. Al-Holy MA, Rasco BA. 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*. 2015;54:317–321 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.017>
14. 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*. 2016;53:165–171 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.014>
15. Wilsmann DE, Carvalho D, Chitolina GZ, Borges KA, Furian TQ, Martins AC, Webber B, Nascimento VP. Electrochemically-activated water presents bactericidal effect against *Salmonella* Heidelberg isolated from poultry origin. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2020;17:228-233 <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2682>
16. Zang YT, Li BM, Bing S, Cao W. Modeling disinfection of plastic poultry transport cages inoculated with *Salmonella* Enteritidis by slightly acidic electrolyzed water using response surface methodology. *Poult Science*. 2018;94:2059–2065 <https://doi.org/10.3382/ps/pev188>
17. Wilsmann DE, Furian TQ, Carvalho D, Chitolina GZ, Lucca V, Emery BD, Borges KA, Martins AC, Pontin KP, Salle CTP, de Souza Moraes HL, do Nascimento VP. Antibiofilm activity of electrochemically activated water (ECAW) in the control of *Salmonella* Heidelberg biofilms on industrial surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2023;54(3):2035-2045 <http://doi.org/10.1007/s42770-023-01005-2>
18. Vallejos S, Trigo-López M, Arnaiz A, Miguel Á, Muñoz A, Mendía A, García JM. From Classical to Advanced Use of Polymers in Food and Beverage Applications. *Polymers (Basel)*. 2022;14(22):4954. <http://doi.org/10.3390/polym14224954>
19. Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*. 2003;54:269–276. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00034-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00034-4)
20. Potera C. Antibiotic resistance: biofilm dispersing agent rejuvenates older antibiotics. *Environmental Health Perspectives*. 2010;118:A288 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2920928/>
21. Food and Agriculture Organization (FAO). Slaughterhouse cleaning and sanitation. [citado 2022 Jun 07]. Disponível em: <https://www.fao.org/3/x6557e/X6557E00.htm#TOC>
22. Chindera K, Mahato M, Sharma AK, Horsley H, Kloc-Muniak K, Kamaruzzaman NF, Kumar S, McFarlane A, Stach J, Bentin T, Good L. The antimicrobial polymer PHMB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. *Science Reports*. 2016;6:23121 <https://doi.org/10.1038/srep23121>
23. Andrade NJ. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela; 2008. 412 p. (Portuguese)
24. Eazychem. The benefits of using an alkaline detergent. [citado 2022 Mai 09]. Disponível em: <https://www.eazychem.co.uk/benefits-using-alkaline-detergent>
25. Emery BD, Chitolina GZ, Qadir MI, Furian TQ, Borges KA, Moraes HLS, Salle CTP, Nascimento VP. Antimicrobial and antibiofilm activity of silver nanoparticles against *Salmonella* Enteritidis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2023;54:285–292 <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00868-1>

26. Borges A, Saavedra MJ, Simões M. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*. 2012;28:755–767 <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.706751>
27. Borges KA, Furian TQ, Souza SN, Menezes R, Tondo EC, Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2018;38:71–76 <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4928>
28. 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*. 2020;137:109432 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109432>
29. Gemba M, Rosiak E, Nowak-Życzyńska Z, Kałęcka P, Łodykowska E, Kołożyn-Krajewska D. Factors influencing biofilm formation by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *Pantoea* spp., and *Bacillus* spp. isolated from human milk determined by PCA analysis. *Foods*. 2022;11:3862. <https://doi.org/10.3390/foods11233862>
30. Yuan L, Sadiq FA, Wang N, Yang Z, He G. Recent advances in understanding the control of disinfectant-resistant biofilms by hurdle technology in the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021;61:3876-3891. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1809345>
31. Danyluk MD, Friedrich LM, Dunn LL, Zhang J, Ritenour MA. Reduction of *Escherichia coli*, as a surrogate for *Salmonella* spp., on the surface of grapefruit during various packingline processes. *Journal of Food Microbiology*. 2019;78:188–193. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.014>
32. Elexson N, Afsah-Hejri L, Rukayadi Y, Soopna P, Lee HY, Zainazor TCT, Ainy MN, Nakaguchi Y, Mitsuaki N, Son R. Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotics-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Food Control*. 2014;35:378–385 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.020>
33. Gosling RJ, Mawhinney I, Vaughan K, Davies RH, Smith RP. Efficacy of disinfectants and detergents intended for a pig farm environment where *Salmonella* is present. *Veterinary Microbiology* 2017;204:46–53 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.004>
34. Hertwig AM, Prestes FS, Nascimento MS. Biofilm formation and resistance to sanitizers by *Salmonella* spp. Isolated from the peanut supply chain. *Food Research International*. 2022;152:110882 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110882>
35. Luciano CC, Olson N, Tipple AF, Alfa M. Evaluation of the ability of different detergents and disinfectants to remove and kill organisms in traditional biofilm. *American Journal of Infection Control* 2016;44:e243–e249 <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.040>
36. Peng D. Biofilm formation of *Salmonella*. In: Dhanasekaran D. & Thajuddin N. (Eds.), *Microbial biofilms: importance and applications*. IntechOpen, online. 2016. [citado 2023 Dez 04]. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/50456>
37. Sun JL, Zhang SK, Chen JY, Han BZ. Efficacy of acidic and basic electrolyzed water in eradicating *Staphylococcus aureus* biofilm. *Canadian Journal of Microbiology*. 2012;58:448–454. <https://doi.org/10.1139/w2012-005>
38. Ignatov I, Gluhchev G, Karadzhev S, Miloshev G, Ivanov N, Mosin O. Preparation of electrochemically activated water solutions (catholyte/anolyte) and studying their physical-chemical properties. *Journal of Medicine, Physiology and Biophysics*. 2015;13:64-78. [oai:ojs.localhost:article/22411](http://oai.ojs.localhost:article/22411)
39. Okanda T, Takahashi R, Ehara T, Ohkusu K, Furuya N, Matsumoto T. Slightly acidic electrolyzed water disrupts biofilms and effectively disinfects *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2019;25:452–457 <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.01.014>
40. Liao LB, Chen WM, Xiao XM. The generation and inactivation mechanism of oxidation-reduction potential of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering* 2007;78:1326–1332 <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.01.004>
41. Thorn RM, Lee SW, Robinson GM, Greenman J, Reynolds DM. Electrochemically activated solutions: evidence for antimicrobial efficacy and applications in healthcare environments. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2012;31:641–653 <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1369-9>

42. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14:563–575 <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
43. Craveiro S, Alves-Barroco C, Crespo MTB, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. *Aeromonas* biofilm on stainless steel: efficiency of commonly used disinfectants. *International Journal of Food Science & Technology*. 2015;50:851–856 <https://doi.org/10.1111/ijfs.12731>
44. Duong H, Nguyen N, Yuk H. Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. *Food Control*. 2013;29:236–240 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.006>
45. Wales A, Breslin M, Davies R. Assessment of cleaning and disinfection in *Salmonella*-contaminated poultry layer houses using qualitative and semi-quantitative culture techniques. *Veterinary Microbiology*. 2006;116:283–293 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.026>