

Sensibilidade *Salmonella* spp. ao Dicloro Isocianurato de Sódio

Sensitivity *Salmonella* spp. to Sodium Dichloroisocyanurate

RESUMO

O Brasil é um grande fornecedor de carne de frango, sendo necessário um controle microbiológico eficiente para que não ocorra a contaminação desse produto. O principal microrganismo responsável por essa contaminação são bactérias do gênero *Salmonella* spp. Esse trabalho teve como objetivo testar a sensibilidade de *Salmonella* spp. ao Dicloro Isocianurato de Sódio (NaDCC) em banho gelado com e sem ultrassom. Os inóculos foram submetidos a concentrações de 0, 15, 30 e 60 mg/L do composto entre 5 a 15 min. Entre as cepas avaliadas, apenas a *S. Heidenberg* se mostrou sensível ao NaDCC na maior concentração testada no tempo de 10 e 15 min. Neste experimento não foi possível observar a interferência do ultrassom, visto que os resultados foram similares na presença ou ausência dele.

PALAVRAS-CHAVE: Carne de frango. *Salmonella* spp. Dicloro Isocianurato de Sódio.

ABSTRACT

The Brazil its a great provider of chicken meat, in this way it's necessary an efficient microbiological control for do not occur an contamination of this product. The Principal microorganism responsible fot this contamination are the bacterias genre *Salmonella* spp. This coursework had the objetive to test the sensibility of *Salmonella* spp. to Sodium Dichloroisocyanurate (NaDCC) in cold water with and without ultrasound . The inoculum were submitted to consentration of 0, 15, 30 and 60 mg/L of compound bettween 15 minutes. Of the strains evaluated, just *S. Heidenberg* shows sensible to NaDCC in he bigger concentration tested in time of 10 and 15 minutes. In this experiment is not been possible to observe the interference of ultrasound, whereas the results were been similas in presence or abcense of him.

KEYWORDS: Chicken meat. *Salmonella* spp. Sodium Dichoroisocyanurate.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

O controle microbiológico é de fundamental importância para a produção de carne de frango. O Brasil é um grande consumidor, produtor e exportador desse produto. No relatório anual de 2018 da ABPA, tem-se que o Brasil produziu em 2017 13,05 milhões de toneladas de carne de frango, 66,9 % foi para abastecer o mercado interno e 33,1% para exportações, a produção dessa carne ficou atrás apenas dos EUA e o Paraná foi o estado que mais abateu frangos nesse período. Para se manter nessa posição no mercado mundial é preciso constantemente buscar a segurança alimentar, que inclui a redução da contaminação microbiana (NICOLAU, 2016, p. 17). Dentre os principais microrganismos que podem causar essa contaminação inclui-se *Salmonella* spp., bactéria do tipo bastonete e Gram negativo (MANUAL TÉCNICO, 2011, p.7). *Salmonella* spp. são patogênicas para humanos, e estão presentes em todas as espécies animais, especialmente nas aves e nos suínos (HOLT et al., 1994 apud CORTEZ et al., 2006, p.157).

O que desencadeia a ocorrência de *Salmonella* spp. em maior ou menor grau na carne, são as técnicas e condições de manejo durante a criação do animal, e posterior higiene nas operações de abate e manipulação de carcaças (CARVALHO E CORTEZ, 2005, p.1465-1466). Um dos motivos dessa ocorrência, segundo Nicolau (2016, p.17), é pelo fato desses microrganismos patogênicos estarem presentes em aves saudáveis, sem causar nenhum problema para o hospedeiro e, durante o abate, entrarem em contato com as carcaças e equipamentos, causando a contaminação.

Para o controle dessa bactéria nos frangos, cada país possui a sua regulamentação, definindo o que pode ser utilizado, a concentração e a etapa da produção. A seleção de cepas de *Salmonella* spp. resistentes é comum, e isso é agravado pela utilização de antibióticos em rações animais, principalmente por promotores de crescimento (CORTEZ et al, 2006, p.158). De acordo com Reis et al (1995 apud CORTEZ et al, 2006, p.158), o emprego de antibióticos para promover o crescimento, tem contribuído para aumentar a distribuição de *Salmonella* spp. resistentes nas aves, ampliando o risco de intoxicação em humanos por essa bactéria.

O método com o ultrassom já é utilizado na indústria de alimentos, tanto para processamento quanto para conservação do produto (VERRUCK E PRUDENCIO, 2018, p.1). Esse método se fundamenta pela capacidade do ultrassom de romper células biológicas, e se combinado com tratamento térmico, pode ser mais eficiente na esterilização dos alimentos. A morte microbiana nesse sistema acontece pelo afinamento das membranas celulares, aquecimento localizado e produção de radicais livres (BUTZ E TAUSCHER, 2002 apud VERRUCK E PRUDENCIO, 2018, p.33).

A inativação de microrganismo utilizando o ultrassom tem como a principal característica a ocorrência de cavitação acústica. As bolhas de cavitação instáveis, cheias de gás, provocam choques mecânicos capazes de desestruturar componentes celulares até desintegrar a célula (RAMPELOTTO, 2012, p.21-22).

Esse trabalho teve como objetivo avaliar cepas de *Salmonella* spp. expostas em diferentes concentrações de Dicloro Isocianurato de Sódio, afim de testar sua resistência ou sensibilidade a esse composto, submetendo esses inóculos ao banho gelado e banho gelado com ultrassom.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos testados

No teste foram utilizadas as cepas padrões *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028), *S. enterica* sorovar Enteritidis (ATCC 13076) e *S. enterica* sorovar Heidelberg (ATCC 8326).

Dicloro Isocianurato de Sódio (NaDCC)

O Dicloro Isocianurato de Sódio ($C_3Cl_2N_3NaO_3$) é um composto organoclorado de massa molar 219,95 g/mol, solúvel em água e incolor. Ele é regulamentado pela ANVISA como desinfetante de água para consumo humano.

Para o teste preparou-se uma solução em água destilada estéril de NaDCC 1000 mg/L, e diluiu-se na proporção 1:10 em peptona caseína 0,1% estéril, preparando a solução 100 mg/L. A cepa foi testada para as concentrações de 0, 15, 30 e 60 mg/L, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1- Concentrações testadas do Dicloro Isocianurato de Sódio

NaDCC (mg/L)	Solução 100 mg/L (mL)	Peptona caseína 0,1% (mL)
0	0	20
15	3	17
30	6	14
60	12	8

Fonte: Autoria própria (2019)

Em cada concentração foram preparados cinco tubos de ensaio com 20 mL de solução 100 mg/L e peptona caseína 0,1% (quatro para o experimento e um para medir o pH).

O pH foi medido com o pHmetro (TECNAL TEC-2 mp), previamente calibrados com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, utilizando os tubos de ensaio preparados sem a cepa de *Salmonella* spp.

Meios de cultura

O caldo BHI (Brain Heart Infusion) foi preparado com água destilada, conforme a quantidade especificada na embalagem, e posteriormente esterilizado antes de seu uso. Na preparação da peptona caseína 0,1% calculou-se a quantidade do meio e de água destilada necessária para alcançar essa concentração, após foi esterilizada para sua utilização. O meio de cultura seletivo ágar SS foi da marca TM MEDIA, sua preparação foi com água destilada e a quantidade conforme recomendações da embalagem. Foi esterilizado e colocado aproximadamente 15 mL em placa de Petri estéril.

Teste clorado

A cepa a ser testada, foi ativada em caldo BHI estéril, incubadas por 24-48 horas, a 37 °C. Em seguida transferida em placa com Ágar TSA e incubada novamente por 24-48 horas em estufa a 37°C. A colônia isolada foi re-inoculada em caldo BHI por 24-48 horas a 37 °C para obter o inóculo do experimento. Uma alíquota do inóculo foi diluída até a leitura do espectrofotômetro em 620 nm atingir absorbância entre 0,08 e 0,100, que corresponde a 10⁸ UFC/mL. Foram transferidos 20 µL da cepa diluída em cada tubo contendo Dicloro Isocianurato nas

concentrações 0, 15, 30 e 60 mg/L. Os tubos foram introduzidos em banho com a água gelada e em água gelada com ultrassom (modelo Eco-sonics da Ultrasonic com frequência de 45 kHz), em duplicata. Após 0, 5, 10 e 15 minutos de incubação em cada teste, 20 uL da amostra foi transferida para uma microplaca contendo 150 uL de caldo BHI estéril em cada poço.

A microplaca foi incubada por 24-48 horas a 37 °C. Nos poços em que não foi detectada a turvação, foi retirado uma alíquota de 50 uL que foram inoculados em placa de Petri com ágar SS estéril, para confirmar se houve o crescimento de *Salmonella* spp.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 2 representa as concentrações onde as cepas apresentaram-se sensíveis entre os 15 minutos de teste com e sem a utilização do ultrassom. As cepas escolhidas para o teste têm um impacto comercial, pois os sorovares *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis são reconhecidos como causadores de doença de saúde pública (ZABOT, 2016, p.50). E a *Salmonella* Heidelberg, de acordo com Zabot (2016, p.50), por ser a cepa mais recorrente em frigoríficos, onde 82% das cepas isoladas entre 2014 e 2016 eram dessa espécie.

Tabela 2- Sensibilidade de *Salmonella* spp. expostas ao Dicloro Isocianurato de Sódio em banho gelado com e sem ultrassom

<i>Salmonella</i> spp.	Tempo (min)	Dicloro Isocianurato de Sódio (mg/L)			
		0	15	30	60
<i>S. Typhimurium</i>	5	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	15	+	+	+	+
<i>S. Enteritidis</i>	5	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	15	+	+	+	+
<i>S. Heidelberg</i>	5	+	+	+	+
	10	+	+	+	Nd
	15	+	+	+	Nd

Fonte: Autoria própria (2019)

Sendo resultado +: crescimento positivo; Nd: turbidez não detectada e crescimento no ágar SS negativo.

De acordo com a tabela 2, as cepas *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* apresentaram crescimento em todas as concentrações e tempos do teste, o inóculo *S. Heidelberg* foi o único a se mostrar sensível ao NaDCC na concentração de 60 mg/L entre o tempo de 10 e 15 minutos, pois não houve crescimento no caldo BHI e nem no Ágar SS após o experimento.

Mediu-se o pH de todas as concentrações antes de começar os testes com os inóculos. A tabela 3 mostra os valores médios de pH das soluções nas concentrações testadas.

Tabela 3- Valores médios do pH das soluções de Dicloro Isocianurato de Sódio

NaDCC (mg/L)	pH
0	7,85±0,05
15	7,41±0,2
30	6,65±0,2
60	6,25±0,3

Fonte: Autoria própria (2019)

A reação do NaDCC com a água forma o ácido hipocloroso (HClO). Esse ácido apresenta pKa igual a 7,497, e em valores de pH normais em tratamento de água ele se dissocia. No pH de 7,5 50% do ácido hipocloroso se dissocia e é convertido em íon hipoclorito (ClO⁻). No processo de desinfecção o ácido hipocloroso é mais ativo que o seu íon.

Outra característica do NaDCC é que em contato com a água não há uma alteração significativa de seu pH. Isso foi percebido quando realizou-se a medição do pH, pois esses valores não apresentaram uma grande variação se comparado apenas com o pH da água destilada (pH água destilada e pura é 7,0) e da peptona caseína 0,1% (pH de 7,85±0,05), pois o pKa do ácido não é muito baixo e a demora na dissociação do NaDCC pode ter influenciado esses valores, já que o menor pH obtido foi 6,25±0,3 na concentração de 60 mg/L no começo do teste, sendo um dos motivos de apenas a maior concentração apresentar eficiência na inibição do crescimento da cepa *S. Heidelberg*.

Uma alternativa para ver a demora na dissociação do NaDCC e o tempo necessário até ela atingir uma liberação de ácido hipocloroso eficiente no controle de *Salmonella* spp. seria realizar a medição do pH em todos os tempos de teste, e não apenas no começo. Nesse experimento não foi observado efeito adicional do ultrassom na inibição do crescimento de *Salmonella* spp. quando combinado com NaDCC, pois os resultados do teste com e sem ultrassom foram similares.

CONCLUSÃO

Apenas a cepa *S. Heidelberg* se mostrou sensível ao Dicloro Isocianurato de Sódio na maior concentração testada. A tolerância dessas bactérias a compostos clorados precisa ser discutida e apresentadas medidas alternativas para o controle desse microrganismo. Devido a lenta dissolução do NaDCC, o uso do ultrassom combinado com o NaDCC será testado com tempo de exposição maior, afim de se avaliar a possibilidade de inibição em concentrações menores do composto químico.

AGRADECIMENTOS

A UTFPR pela oportunidade de vivenciar essa experiência enriquecedora. Aos professores por me avaliarem e ajudarem a melhorar o trabalho.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA. **Relatório anual 2018**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>> Acesso: jul. 2019

NICOLAU, J.P. **Controle de *Salmonella* sp. em carcaças de frango pelo uso de descontaminantes químicos durante o processo de abate e as consequências na qualidade da carne**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista, 2016. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/141505/nicolau_jp_dr_araca.pdf?sequence=3> Acesso: jul. 2019

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp.** Brasília, DF, 2011. 64p.

CORTEZ, A.L.L. et al. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. **Arg. Inst. Biol**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 157-163, 2006. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arg/V73_2/cortez.PDF> Acesso: jul. 2019

CARVALHO, A. C. de F.B. de; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, 2005. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/29329/S0103-84782005000600040.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso: jul. 2019

VERRUK, S.; PRUDENCIO, E. S. **Ultrassom na Indústria de Alimentos: aplicações no processamento e conservação**. Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018. Disponível em: <<https://www.atenaeditora.com.br/wp-content/uploads/2018/09/E-book-Ultrassom-na-ind%C3%BAstria-de-alimentos-2.pdf>> Acesso: jul. 2019

RAMPELOTTO, C. **Pasteurização de salsichas com ultrassom e micro-ondas**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/5725/RAMPELOTTO%2c%20CRISTINE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso: jul. 2019

ZABOT, S. **Atividade antimicrobiana de ácidos orgânicos e compostos clorados sobre micro-organismos patogênicos em carne de frango**. Dissertação (mestrado)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.