



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**INATIVAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* E *Salmonella* Typhimurium  
COM ÁGUA OZONIZADA REFRIGERADA**

**ANTÔNIO JOSÉ DE REZENDE**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**

**MARÇO/2022**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**INATIVAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* E *Salmonella* Typhimurium  
COM ÁGUA OZONIZADA REFRIGERADA**

**ANTÔNIO JOSÉ DE REZENDE**

**ORIENTADOR: PROF. DR. ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR**  
**CO-ORIENTADORA: PROFESSORA DRA. MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**  
**MARÇO/2022**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**ANTÔNIO JOSÉ DE REZENDE**

**INATIVAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* E *Salmonella Typhimurium*  
COM ÁGUA OZONIZADA REFRIGERADA**

APROVADA POR:

---

ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR, Dr. Professor Associado UFV - DEA  
(Orientador)

---

NARA OLIVEIRA SILVA SOUZA, Dra. Professora Adjunta UnB - FAV  
EXAMINADOR INTERNO

---

ELIANA DOS SANTOS LEANDRO, Dra. Professora Adjunta UnB - FS  
EXAMINADOR INTERNO

---

LÊDA RITA D'ANTONINO FARONI, Dra. Professora Titular UFV - DEA  
EXAMINADOR EXTERNO

**BRASÍLIA/DF**

**MARÇO/2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Rezende, Antônio José de

Inativação de *Listeria Monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium Com Água Ozonizada Refrigerada / Antônio José de Rezende; orientação de Ernandes Rodrigues de Alencar. Brasília, 2022.

89p.:il.

Tese de Doutorado (D) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2022

1. Ozonização. 2. *Salmonella* Typhimurium. 3. *Listeria monocytogenes*  
4. Inativação bacteriana. 5. Patógenos em alimentos.

Ernandes, R. A. Ph. D

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

REZENDE, A. J. Inativação de *Listeria Monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium Com Água Ozonizada Refrigerada. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2022. 89p. Tese de Doutorado.

## CESSÃO DE DIREITOS

**AUTOR:** Antônio José de Rezende

**TÍTULO:** Inativação de *Listeria Monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium Com Água Ozonizada Refrigerada

**GRAU:** Doutor

**ANO:** 2022

É concedida à Universidade de Brasília de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

---

Nome: Antônio José de Rezende

E-mail: tonimrezende@gmail.com

## DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus pais, Arani Amélia e Sebastião,  
que sempre se preocuparam em nos dar  
a melhor educação os melhores ensinamentos o que foi indispensável  
para esta tão sonhada conquista.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por toda sua proteção, pelo dom da vida, por minha saúde e por ter permitido todas as conquistas em minha vida.

Agradeço ao meu pai, Sebastião, que mesmo na sua simplicidade sempre me apoiou e esteve ao meu lado e por todos os ensinamentos.

À minha mãe, Arani Amélia, mulher de grande sabedoria, que tem uma participação grande nesta conquista, pois sempre apoiou incondicionalmente celebrando e comemorando comigo todas as minhas conquistas e realizações.

Aos meus irmãos, Karina e Thiago, pelo o amor, apoio e compreensão quando precisava ficar ausente.

Um grande agradecimento à minha esposa Renata Costa Fortes, pelo o amor, carinho e cuidado, e por ser minha grande incentivadora para buscar esta conquista.

Ao Professor Dr. Ernandes Rodrigues Alencar por todo conhecimento compartilhado, por toda ajuda na realização dos trabalhos, pelo grande apoio no laboratório e por ter contribuído enormemente para o meu crescimento profissional.

À Professora Dra. Márcia de Aguiar Ferreira, pelos ensinamentos, pela paciência e disponibilidade em sempre responder as minhas perguntas e por ter disponibilizar o laboratório local que me traz boas lembranças.

À Jaqueline Lamounier, pela a ajuda na parte prática, por sempre estar disposta a investigar quando algo não estava dando certo pelos os bate papos descontraídos.

Ao amigo e Professor Dr. Márcio Antônio Mendonça por todo o tempo de convivência no laboratório de bromatologia e em outros locais da UnB.

Ao Wallas Fellipe, pela a amizade, ajuda e muito conhecimento compartilhado.

À Universidade de Brasília (UnB), local de onde só tenho boas lembranças, a todos os seus professores que foram fundamentais para a minha formação.

Ao Professor Luiz Antônio Borgo, pela a amizade e por ter me incentivado a seguir a carreira de docente.

O meu muito obrigado!

*“Existe uma coisa que uma  
Longa existência me  
ensinou: toda a nossa  
ciência, comparada a  
realidade, é primitiva e  
inocente; e, portanto, é o  
que temos de mais valioso.”*

*(Albert Einstein)*

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	v
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xiv
<b>RESUMO GERAL</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1 Microrganismos patogênicos em alimentos .....	4
2.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	5
2.2.2 <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	7
2.3 Higienização dos alimentos .....	8
2.4 Características do ozônio .....	9
2.5 Ozônio como agente sanitizante .....	11
2.6 Uso do ozônio no processamento de alimentos .....	15
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	17
<b>CAPÍTULO I</b> .....	24
<b>RESUMO</b> .....	25
<b>ABSTRACT</b> .....	26
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
2.1 Cepa bacteriana e preparação do inóculo .....	29
2.2 Geração do gás ozônio e obtenção da água ozonizada .....	29
2.3 Avaliação da água ozonizada com diferentes pH's iniciais na inativação de <i>L. monocytogenes</i> .....	32
2.4 Determinação da concentração residual do ozônio na água com diferentes pH's iniciais e cinética de decomposição .....	32
2.5 Procedimento Experimental .....	34
<b>3. RESULTADOS</b> .....	34
3.1 Contagem de <i>L. monocytogenes</i> em função de diferentes combinações de pH inicial e tempo de armazenamento da água ozonizada e tempo de contato .....	34
3.2 Concentração residual do ozônio na água com diferentes pH's iniciais e cinética de decomposição a 7 °C .....	36

3.3 pH e potencial redox da água ozonizada com diferentes pH's iniciais e armazenados a 7 °C .....	38
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	39
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	42
CAPÍTULO II.....	50
<b>RESUMO</b> .....	51
<b>ABSTRACT</b> .....	52
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	53
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	55
2.1 Cepa bacteriana e preparação do inóculo .....	55
2.2 Geração do gás ozônio e obtenção da água ozonizada .....	55
2.3 Avaliação da água ozonizada com diferentes pH's iniciais na inativação de <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	56
2.4 Determinação da concentração residual do ozônio na água com diferentes pH's iniciais e cinética de decomposição.....	56
2.5 Procedimento experimental.....	57
<b>3. RESULTADOS</b> .....	58
3.1 Contagem de <i>Salmonella</i> Typhimurium em função de diferentes combinações de pH inicial e tempo de armazenamento da água ozonizada e tempo de contato .....	58
3.2 Concentração residual do ozônio na água com diferentes pH's iniciais e cinética de decomposição a 7 °C .....	60
3.3 pH e potencial redox da água ozonizada com diferentes pH's iniciais e armazenadas a 7 °C .....	63
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Geração do ozônio através do processo corona 10

### CAPÍTULO I

Figura 1. Gerador de Ozônio Modelo O&L 3.0-O2 RM, da Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil. Acervo pessoal. 28

Figura 2. Fluxograma de obtenção de água ozonizada armazenada a 7°C e controle de *Listeria monocytogenes*. Fonte: Elaborado pelo o autor. 28

Figura 3. Fotômetro SAM CHEMetrics. 30

Figura 4. Curvas de regressão da concentração de ozônio residual ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em água com diferentes pH's e armazenada a 7 °C, por até 24 h. 34

### CAPÍTULO II

Figura 1. Fluxograma de obtenção de água ozonizada armazenada a 7 °C e controle de *Salmonella* Typhimurium. Fonte: Elaborado pelo o autor. 53

Figura 2. Curvas de regressão de concentração residual do ozônio do ozônio ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em água com diferentes pH's iniciais e armazenadas por 24 h, a 7°C. 58

Figura 3. Curvas de regressão referentes ao modelo cinético de primeira ordem para concentração residual do ozônio do ozônio ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em água com diferentes pH's iniciais e armazenadas por 24 h, a 7 °C. 60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação de agentes oxidantes.	9
Tabela 2. Comparação das características dos processos de cloração e ozonização.	11
Tabela 3. Principais propriedades físico-químicas do ozônio.	12

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Equação integrada e linearizada para modelo cinético de segunda ordem e respectiva meia-vida.	31
Tabela 2. Contagens de <i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/mL) exposta a água ozonizada com diferentes pH's e armazenada a 7°C, por até 24 h, e com diferentes tempos de contato.	32
Tabela 3. Equações de regressão referentes à concentração do ozônio em água com diferentes pH's e armazenada a 7°C, em função do tempo de armazenamento (x, h).	34
Tabela 4. Equações de regressão do modelo cinético de segunda ordem para concentração de ozônio residual e meia-vida em água com diferentes pH's em função do tempo de armazenamento a 7 °C (x, h).	35
Tabela 5. Valores médios de pH e potencial redox da água com diferentes pH's iniciais ozonizada e armazenada a 7 °C, por até 24 h.	36

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Modelo de cinética de decomposição de ordem 1 e respectiva equação integrada e linearizada e respetiva meia-vida.	55
Tabela 2. Contagem de <i>Salmonella</i> Typhimurium (log UFC/mL) exposta a água ozonizada com diferentes pH's armazenada a 7 °C, por até 24 h, em diferentes tempos de contato.	57
Tabela 3. Equações de regressão e respectivos coeficientes de determinação para concentração residual do ozônio do ozônio (mg L <sup>-1</sup> ) em água com diferentes pH's iniciais e armazenadas por 24 h, a 7 °C.	58
Tabela 4. Modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem e respectivos coeficientes de determinação, para concentração residual do	59

ozônio ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em águas com diferentes pH's iniciais e armazenadas por 24 h, a 7 °C.

Tabela 5. Média dos valores de pH e potencial redox de água ozonizada com diferentes valores de pH iniciais armazenadas por até 24 h. 61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
$C_6H_8O_7$	Ácido cítrico
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramma
GRAS	Generally Recognized as Safe
L	Litro
min	Minuto
mg	Miligramma
MS	Ministério da Saúde
mV	Milivolts
NaCl	Cloreto de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
ppm	Partes por milhão
s	Segundos
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
US	Ultrassom

## RESUMO GERAL

Este estudo teve por objetivo avaliar a eficácia do gás ozônio em meio aquoso na inativação de células de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium em diferentes valores de pH inicial da água, tempos de contato e tempos de armazenamento da água ozonizada refrigerada a 7 °C. Foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento utilizou-se água da rede de abastecimento, com pH's ajustados para 4,0, 7,0 e 8,2 e armazenada a 7 °C. Para a obtenção da água ozonizada, adotou-se concentração de entrada do gás de 21 mg L<sup>-1</sup> e uma vazão de 1,0 L min<sup>-1</sup>, por 15 min. A suspensão de *Listeria monocytogenes* foi de aproximadamente 3,0 x 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Foi utilizado Delineamento Inteiramente Casualizado, com três repetições. Adotou-se esquema fatorial 6 x 2 x 5. No segundo experimento utilizou-se água destilada, com pH's ajustados para 6,0, 7,0 e 8,2 e uma água com pH sem ajuste com valor de 6,2 e armazenada a 7 °C. Para a obtenção da água ozonizada, no segundo experimento, adotou-se concentração de entrada do gás de 30 mg L<sup>-1</sup> e uma vazão de 0,5 L min<sup>-1</sup>, por 15 min. A suspensão de *Salmonella* Typhimurium foi de aproximadamente 3,0 x 10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Foi utilizado Delineamento Inteiramente Casualizado, com três repetições. Adotou-se esquema fatorial 8 x 2 x 5. A cinética de decomposição do ozônio foi avaliada nos dois experimentos. Nos dois ensaios, os tempos de armazenamento da água ozonizada foram de 0, 6, 12, 18 e 24 h. A eficácia da água ozonizada na inativação dos microrganismos foi testada em cada um destes tempos. Quando era necessário elevar o pH da água foi utilizado bicarbonato de sódio e para reduzir o valor do pH inicial utilizou-se ácido cítrico. Todas as águas eram esterilizadas a 121 °C por 15 min antes da ozonização. Os tempos de contato das células bacterianas com a água ozonizada, nos dois experimentos, foram de 3 e 6 min. No primeiro experimento observou-se uma redução acentuada na concentração de ozônio na água com pH 4,0, com meia vida do ozônio de 13,20 min. No segundo experimento, não foi observado o mesmo comportamento, pois a água com pH inicial de 6,0, apresentou um tempo de meia vida do ozônio de 7,50 h (450 min) quando se utilizou o modelo cinético de primeira ordem. No que se refere aos pH's no primeiro experimento, verificou-se a elevação para 7,5 imediatamente depois da ozonização da água com o pH inicial 7,0, mas este valor reduziu durante o armazenamento por 24 h, a 7 °C. No segundo experimento também se observou essa

elevação no valor de pH da água para 7,6 e 6,7, logo após a ozonização, nas águas com pH's iniciais de 7,0 e 6,2, respectivamente, com redução para o valor inicial após armazenamento por 24 h, a 7 °C. Nos dois experimentos conclui-se que o pH inicial da água afeta a eficácia da água ozonizada no controle de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium. Além disso, pode-se afirmar que é viável a utilização de água ozonizada armazenada a 7 °C, por até 24 h, para a inativação de células de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium, quando adotados pH's iniciais de 7,0 e 8,2, utilizando-se água da rede de abastecimento ou água destilada.

**Palavras-chave:** Ozonização; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* Typhimurium; Inativação Bacteriana; Efeito do pH; Concentração de ozônio.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effectiveness of ozone gas in aqueous medium for the inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium cells at different values of initial pH of water, contact times and storage times of ozonated water refrigerated at 7 °C. Two experiments were carried out; In the first experiment, water from the supply system was used, with pH's adjusted to 4.0, 7.0 and 8.2 and stored at 7 °C. To obtain the ozonated water, a gas inlet concentration of 21 mg L<sup>-1</sup> and a flow rate of 1.0 L min<sup>-1</sup> was adopted for 15 minutes. The suspension of *Listeria monocytogenes* had approximately 3.0 x 10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. A completely randomized design was used, with three replications. A 6 x 2 x 5 factorial scheme was adopted. In the second experiment, distilled waters with pH's adjusted to 6.0, 7.0 and 8.2 and a water with unchanged pH of 6.2 and stored at 7 °C were used. In order to obtain the ozonated water, in the second experiment, a gas inlet concentration of 30 mg L<sup>-1</sup> and flow rate of 0.5 L min<sup>-1</sup> was adopted for 15 minutes. The suspension of *Salmonella* Typhimurium had approximately 3.0 x 10<sup>4</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. A completely randomized design was used, with three replications. An 8 x 2 x 5 factorial scheme was adopted. The kinetics of ozone decomposition was evaluated in both experiments. In both trials, the storage times of ozonated water were 0, 6, 12, 18 and 24 h. The inactivation effectiveness of ozonized water was tested at each of these spaces of time. When it was necessary to raise the initial pH of the water, sodium bicarbonate was used. To reduce the initial pH value, citric acid was used. All waters were sterilized at 121°C for 15 min before ozonation. The contact times of bacterial cells with ozonated water in both experiments were 3 and 6 min. In the first experiment, a marked reduction in ozone concentration was observed in the pH 4.0 water, with ozone half-life of 13.20 min. In the second experiment, the same behavior was not observed, as water with an initial pH of 6.0 had an ozone half-life of 7.50 h (450 min) when using the first-order kinetic model. Regarding the pH value in the first experiment, the increase to 7.5 was highlighted immediately after the ozonation of the water with the initial pH 7.0, but this value reduced during storage for 24 hours at 7 °C. In the second experiment, this increase in the pH value of the water to 7.6 and 6.7 was also observed, soon after ozonation, in waters with initial pH's of 7.0 and 6.2, respectively, observing a reduction to the initial value after storage for 24 hours at 7 °C. In both experiments, it was

concluded that the initial pH of the water affects the effectiveness of ozonated water regarding the control of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. In addition, it can be stated that it is feasible to use ozonated water stored at 7 °C for up to 24 hours for the inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium cells, when initial pH's of 7.0 and 8.2 are adopted, using water from the supply system or distilled water.

**Keywords:** ozonation; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* Typhimurium; Bacterial Inactivation; pH effects; ozone concentration.

## 1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças podem ser transmitidas por água e alimentos contaminados, sendo os principais agentes as bactérias, os fungos, os vírus, os protozoários e os helmintos. A produção de alimentos em larga escala, a falta de um bom controle nas lavouras e, principalmente, na manipulação e processamento contribuem para o surgimento de um grande número de surtos de doenças de origem alimentar (MACHADO e COSTA, 2017).

Segundo Ministério da Saúde (MS), no período compreendido entre janeiro de 2016 a dezembro de 2019, foram notificados no Brasil 2.504 surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar. Do total de surtos, 14,3% não apresentaram dados referentes ao número de indivíduos acometidos, 65,3% acometeram entre 2 e 10 indivíduos e 25,1% entre 11 e 50 indivíduos. No período analisado (2016-2019), houve média de 626 surtos relatados por ano (média de 9.312 indivíduos acometidos) e um total de 37.247 doentes no período, com 21,6% tiveram os agentes etiológicos identificados, sendo os mais prevalentes *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2020).

Entre 2000 e 2015, Ferreira (2017) realizou levantamento das DTA's no Brasil e constatou que, neste período, foram registrados 11.524 surtos, o que culminou em 219.909 indivíduos afetados e 167 óbitos. Na maioria dos surtos (57,8%) não houve a identificação do agente etiológico. No entanto, quando o agente etiológico foi identificado, a *Salmonella* spp. foi o agente mais frequente (14,4%), sendo que 36,6% dos surtos ocorreram em residências. Shinohara et al. (2008) relataram que o perfil das DTA's se alterou com a globalização, as mudanças de hábitos alimentares e o aumento do consumo de industrializados. No Brasil, as doenças infecciosas, parasitárias e do aparelho digestório correspondem a 9,2% do total dos casos de mortalidade.

Frutas e hortaliças são importantes para a manutenção de uma boa alimentação e saúde, entretanto, algumas espécies são altamente perecíveis, o que demanda cuidados especiais nas várias etapas da cadeia produtiva, dentre estes cuidados inclui-se prevenir a contaminação e sanitização para eliminar a contaminação já existente (OLIVEIRA et al., 2013).

Segundo a Instrução Normativa nº 16 (DIVISA/DF, 2017), desinfecção é a operação que busca a redução parcial do número de microrganismos por métodos físico e ou químico, tanto de microrganismos patógenos quanto os deteriorantes dos alimentos. Para minimizar a contaminação dos alimentos, deve-se realizar a sanitização, operação onde se faz uso de algum agente sanitizante capaz de reduzir a contaminação microbiana em níveis seguros para o consumo humano. Esta redução da contaminação também contribui para aumentar a vida de prateleira dos alimentos.

No Brasil, os compostos clorados estão entre os sanitizantes mais utilizados, porém, tem se tornado cada vez menos atrativo, pois alguns patógenos apresentam resistência a estes compostos além da formação de subprodutos da cloração toxicamente potencial ao ser humano como a formação de compostos organoclorados, trihalometanos (THMs) e ácido haloacéticos, que são mutagênicos, tóxicos e carcinogênicos (SILVA et al., 2011; BERMÚDEZ-AGUIRRE e BARBOSA-CÁNOVAS, 2013; COELHO et al., 2015)

Luo et al. (2020) afirmaram que o mecanismo de resistência das bactérias ao cloro ainda não foi completamente elucidado e relataram existir dois possíveis mecanismos. O primeiro mecanismo seria a ação do próprio cloro dentro da célula bacteriana, que gera um aumento na expressão de muitos genes, incluindo o reparo de DNA, bomba de efluxo, secreção de enzimas antioxidantes, regulação das proteínas da membrana celular e o próprio reparo da parede celular. O outro mecanismo seria a maior secreção de polímeros extracelulares, que variam não só em quantidade, mas também em composição e peso molecular gerando maior resistência ao cloro por algumas espécies bacterianas.

O ozônio surge como opção de agente sanitizante que não gera resíduos, tem alta reatividade e penetrabilidade e se decompõe em produtos não tóxicos como oxigênio (O<sub>2</sub>). Apresenta alta eficácia mesmo em baixas concentrações e com pouco tempo de contato. Em 1982 foi reconhecido pela Food and Drug Administration (FDA) como substância segura "General Recognized as Safe" (GRAS). Pode ser utilizado também para a eliminação de micotoxinas e resíduos de defensivos em alimentos e na água de lavagem de equipamentos de pulverização (SILVA et al., 2011; NATH et al., 2014; COELHO et al., 2015).

Como alternativa aos métodos convencionais de cloração da água nas estações de tratamento, a ozonização começou a ser utilizada no Brasil na década de

80 (SILVA et al., 2011). Desde a sua aprovação pelo FDA, o ozônio vem sendo pesquisado e utilizado com alternativa às substâncias tradicionalmente utilizadas no controle de contaminantes em alimentos, tais como compostos clorados e amônia quaternária (KIM; YOUSEF e DAVE, 1999).

No processo produtivo de alimentos, os agentes envolvidos têm grande responsabilidade, já que os alimentos são suscetíveis a diversos tipos de contaminações, tais como físicas, químicas e biológicas. Destaca-se, nesse sentido, os microrganismos patogênicos capazes de ocasionar prejuízos à saúde dos consumidores. A adoção de medidas preventivas e corretivas são relevantes, tais como a sanitização dos vegetais que visam assegurar a inocuidade do alimento, com o intuito de garantir a segurança para o consumo, sem riscos para a população (MOUTA et al., 2014).

Apesar de serem encontrados na literatura diversos estudos em foram avaliados a eficiência do ozônio em meio aquoso sobre microrganismos, normalmente as análises são realizadas imediatamente depois da ozonização da água. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência do ozônio em meio aquoso na inativação de *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* por meio da inoculação de suspensões destas espécies em água ozonizada em diferentes valores de pH, diferentes tempos de exposição e períodos de armazenamento da água sob refrigeração.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Microrganismos patogênicos em alimentos

Apesar dos esforços para prevenir as doenças de origem alimentar, estas são consideradas um sério problema de saúde pública. Aproximadamente 250 agentes podem provocar doenças de origem alimentar, sendo muitas destas provocadas pela presença de microrganismos patogênicos. Considera-se um surto de DTA quando dois ou mais indivíduos apresentam sintomas similares após a ingestão de alimento contaminado com microrganismos ou suas toxinas. No caso de patógenos com alta virulência, tais como *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli* O157:H7, apenas um caso já é considerado como surto (OLIVEIRA, et al., 2010; RITTER e TONDO, 2014)

Nos Estados Unidos, há relatos de que o custo econômico das doenças de origem alimentar é superior a 50 bilhões por ano. Alguns dos microrganismos patogênicos encontrados em alimentos frescos e associados com surtos de doenças de origem alimentar são: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Listeria monocytogenes* (BERMÚDEZ-AGUIRRE e BARBOSA-CÁNOVAS, 2013).

Em sua maioria, os surtos ocorrem após a ingestão de alimentos que não apresentam características organolépticas alteradas visíveis. Esta característica tem relação com o fato de que a dose infectante de patógenos alimentares necessária para provocar a doença geralmente é menor do que a quantidade dos microrganismos deteriorantes. Quando os alimentos já apresentam características organolépticas alteradas a quantidade de microrganismos deteriorantes estão na ordem de  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ , o que naturalmente ira inibir o consumo devido as perceptíveis alterações provocadas pelas espécies deteriorantes (OLIVEIRA et al., 2010).

Em 2018, na EUROPA, o European Food Safety Authority (EFSA) e European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) apresentaram os resultados de zoonoses ocorridas em 2018 nos 36 países do continente europeu. A primeira e a segunda zoonoses comumente reportadas em humanos foi a campilobacteriose e salmonelose, respectivamente (EFSA, 2018).

Lanni et al. (2022) relatam que 23 milhões de casos de doenças relacionadas a alimentos ocorrem na Europa a cada ano com 4,7 mil mortes. Estas doenças têm um impacto significativo na sociedade devido aos altos gastos com tratamentos hospitalares e as perdas de alimentos. Os dados epidemiológicos da Autoridade

Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) confirmam que a tendência de surtos de doenças transmitidas por alimentos está aumentando constantemente na Europa, tendência essa atribuída, em parte, a falhas nas boas práticas de fabricação na indústrias alimentícias que em conjunto com a análise de perigos são necessários para a segurança dos alimentos.

### 2.2.1 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativas, não formadora de esporos que se adapta facilmente às mudanças nas condições ambientais. A capacidade de crescer em uma ampla faixa de temperaturas, pH e salinidade determina a presença do patógeno na água, esgoto, solo, vegetação em decomposição e ração animal. *L. monocytogenes* é o fator etiológico da listeriose, doença especialmente perigosa para idosos, gestantes e recém-nascidos. A principal fonte de *L. monocytogenes* para humanos são os alimentos, incluindo produtos frescos e defumados. Sua alta prevalência em alimentos está associada à adaptação bacteriana ao ambiente de processamento de alimentos, formando estruturas chamadas de biofilmes. Uma vez que o número de casos de listeriose vem aumentando progressivamente, uma erradicação eficiente do patógeno é crucial. A compreensão dos mecanismos de adaptação bacteriana ao estresse ambiental contribuirá significativamente para o desenvolvimento de novos métodos eficazes de controle de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos (WIKTORCZYK-KAPISCHKE et al., 2021).

É um microrganismo saprófita e patógeno do ser humano e animais. Esta bactéria pode entrar no ambiente de processamento de alimentos com a matéria prima contaminada, funcionários e pragas que podem carregar esta bactéria colonizando o ambiente de processamento de alimentos com posterior contaminação, especialmente de alimentos prontos para o consumo (GRAY et al., 2021)

Os alimentos de origem animal são os mais frequentemente contaminados com *L. monocytogenes*, visto que é uma espécie que persiste nos ambientes de processamento de alimentos e tem grande habilidade de formar biofilmes em utensílios, pisos e equipamentos, o que culmina com a contaminação cruzada de diversos alimentos. Este patógeno, embora classificado como uma espécie mesófila,

consegue crescer bem mesmo em temperaturas de refrigeração e permanece viável em vários produtos até o fim do prazo de validade (CAMARGO et al., 2017).

A listeriose, doença ocasionada pela *L. monocytogenes*, tem uma incidência menor do que outras doenças entéricas, mas gera quadros mais graves, tais como abortos, septicemia, meningite e nos casos mais graves pode levar ao óbito (SILVA et al., 2016). A *L. monocytogenes* é considerada um patógeno oportunista e embora possa afetar indivíduos saudáveis os mais atingidos são os recém-nascidos, gestantes, idosos e imunocomprometidos. A listeriose tem mais propensão a hospitalizações e fatalidades e requer tratamento com antibioticoterapia. Esta espécie pode acometer o ser humano e outros mamíferos. A eliminação de *L. monocytogenes* dos ambientes de manipulação e processamento de alimentos é um desafio e exige adequada limpeza e operações de sanitização eficientes (SILVA et al., 2016; CAMARGO et al., 2017; GRAY et al., 2021).

A *L. monocytogenes* difere da maioria das espécies bacterianas patogênicas, pois consegue sobreviver em ambiente hostil tais como: ampla faixa de temperatura de 1 – 45 °C, ampla faixa de pH de 4,5 a 9,6, concentração de sal entre 10 a 15% e se multiplica em atividade de água de até 0,94. Os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b da *L. monocytogenes* são responsáveis por levar a quadros graves de saúde, como meningite, septicemia, aborto e nascimento de natimorto com uma taxa de letalidade de 20% a 30% podendo ser superior em indivíduos mais susceptíveis (VALLIM et al., 2015).

No Laboratório de Zoonoses do Instituto Oswaldo Cruz, isolados de *Listeria* spp., coletados em 12 estados brasileiros, foram analisados para a caracterização das espécies e dos sorotipos. Dos 5953 isolados, 2248 (38,9%) eram de *L. monocytogenes*, sendo que 99 isolados foram obtidos de amostras de alimentos de origem vegetal. Como é difícil a eliminação completa desta espécie devido à capacidade de se adaptar às condições adversas e diante dos resultados, os autores enfatizaram a importância de melhorar as medidas de controle deste patógeno por meio da monitorização e redução dos riscos de contaminação de alimentos (VALLIM et al., 2015).

### 2.2.2 *Salmonella* Typhimurium

*Salmonella* spp. é um patógeno de origem alimentar considerado um problema de saúde pública, sendo uma espécie disseminada globalmente e frequentemente envolvida em surtos de toxiiinfecções. Na União Europeia, tornou-se a causa mais frequentemente notificada de surtos de doenças relacionadas a alimentos, resultando em um total de 95.548 casos confirmados de salmonelose humana em 2011. Enquanto isso em 2013, vários recalls de alimentos e surtos foram investigados pela FDA e pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (WANG et al., 2013).

A nomenclatura da *Salmonella enterica* evoluiu para uma convenção de nomenclatura baseada no reconhecimento de antígenos por anticorpos específicos. Este esquema de sorotipagem levou à definição de mais de 2.500 sorovares. Atualmente, a *Salmonella* é classificada em duas espécies: *Salmonella bongori* (originalmente classificada como *Salmonella enterica* subespécie V), raramente associada à infecção humana e *Salmonella entérica* que infecta e coloniza muitos animais, incluindo humanos. A classificação de *S. entérica*, baseou-se na bioquímica, para definir 6 subespécies: I - enterica, II - salamae, IIIa - arizonae, IIIb - diarizonae e IV - hountenae. A maioria das infecções humanas relaciona-se com serovares pertencentes a subespécie I (CHATTAWAY; LANGRIDGE e JOHN, 2021).

*Salmonella* Typhimurium é uma maneira simplificada e a forma mais utilizada na literatura científica para se referir à espécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium. Por ser um sorovar e não o nome da espécie, Typhimurium é escrito com letra maiúscula, mas não em itálico (BRASIL, 2011).

O gênero *Salmonella* é distribuído em três grupos: as espécies que infectam somente o ser humano, como *S. typhi* e *S. paratyphi*; espécies adaptadas ao hospedeiro (alguns podem ser patógenos ao homem) como *S. gallinarum*, *S. dublin*, *S. abortus-equi*, *S. abortus-ovis* e *S. choleraesuis*; e sorovares não adaptados (sem preferência de hospedeiros) patogênicos aos humanos e animais, incluindo muitos causadores de infecções alimentares (JAY, 2005). Elas representam 14,4% dos surtos notificados de DTA's no Brasil (FERREIRA, 2017).

A maioria dos casos de gastroenterites ocorrem sem necessidade de hospitalizações e frequentemente sem a identificação do agente causal. Isso implica em acreditar que os casos de salmoneloses em seres humanos sejam subestimados,

sendo a subnotificação de casos de surtos de doenças de origem alimentar um problema mundial (SHINOHARA et al., 2008).

Embora seu hábitat primário seja o trato intestinal de animais, homens e até insetos, ocasionalmente, a *Salmonella* pode ser encontrada em outras partes do corpo. As células são excretadas pelas fezes e podem ser transmitidas para um grande número de locais. Quando alimentos ou águas contaminadas são consumidos por humanos e animais estes microrganismos são novamente eliminados com as fezes dando continuidade ao ciclo desta espécie na natureza (FAÚLA; SOARES e DIAS, 2015).

A infecção é causada pela ingestão de alimentos que contenham números elevados de células, em torno de  $10^7$  a  $10^9$  células/g, embora existam relatos de salmoneloses provocadas pela ingestão de alimentos com 100 a 15.000 células/g. Os sintomas surgem entre 12 a 14 horas e consistem em náuseas, vômitos, dores abdominais, cefaleia, calafrios e diarreia. A severidade da doença é dependente da espécie e do indivíduo afetado, sendo crianças, idosos e imunodeprimidos mais sensíveis (CARNEIRO et al., 2015).

No Brasil, *Samonella enteritidis* é a espécie mais comum em surtos de DTA's, principalmente associadas a produtos avícolas (CARNEIRO et al., 2015). Na Bahia, Miranda et al. (2017) analisaram 91 isolados, sendo 36 isolados de alimentos e 55 de amostras clínicas. Dos isolados provenientes de amostras de alimentos, *S. infantis* e *S. enteritidis* foram as mais frequentes, respectivamente, com 16,5% e 13,7% das amostras e *S. Typhimurium* foi encontrada em 5,6% dos isolados de alimentos.

### 2.3 Higienização dos alimentos

Além de reduzir a vida útil dos alimentos, a contaminação microbiana pode provocar casos de toxinfecções alimentares. É muito importante que se implemente medidas para eliminar ou reduzir esta contaminação em níveis seguros para os consumidores, o que constitui um dos desafios para a segurança alimentar (SÃO JOSÉ, 2017). Logo, a lavagem dos alimentos seguida da aplicação de soluções desinfetantes é considerada uma etapa crítica para se alcançar a segurança destes alimentos (COSSU et al., 2017). Segundo a RDC 216, a higienização de alimentos compreende o processo de lavagem seguido da desinfecção seja por agente químico ou físico (BRASIL, 2004).

Dentre os microrganismos patogênicos que podem ser veiculados por alimentos, destacam-se *Salmonella* spp., cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp., *Clostridium botulinum* (SÃO JOSÉ, 2017). A sanitização de alimentos pode ser realizada por agentes químicos como compostos clorados, amônia quaternária, ácido peracético e ozônio e agentes físico como o calor, radiação ultravioleta e uso de altas pressões.

Os compostos clorados estão entre os mais utilizados pelas indústrias de alimentos, pois são relativamente baratos, de fácil acesso e manuseio, no entanto, atribui-se a estes compostos uma diminuição da eficiência microbiológica e toxidade potencial de subprodutos da cloração, como compostos tóxicos e cancerígenos (organoclorados), trihalometanos e ácidos haloacéticos. Estes agentes vêm sofrendo restrições quanto a sua utilização (COELHO et al., 2015).

#### 2.4 Características do ozônio

O ozônio é um gás que foi descoberto pelo químico suíço, Christian Friedrich Schönbein, em 1839. Em temperatura ambiente e em baixas concentrações é incolor, em altas concentrações apresenta cor azulada. Possui odor penetrante e facilmente detectável em concentrações baixas de 0,01 a 0,05 ppm (KIM; YOUSEF e DAVE, 1999; COELHO et al., 2015). O ozônio se destaca quando comparado a outros agentes sanificantes pelo elevado potencial de oxidação, o que lhe confere o alto poder de desinfecção (Tabela 1) (SCHIAVON; ANDRADE; PARAISO, 2013).

Tabela 1. Comparação de agentes oxidantes

Agente Oxidante	Potencial de Oxidação
Flúor	3,06 mV
Ozônio	2,07 mV
Peróxido de hidrogênio	1,77 mV
Ácido Hipocloroso	1,49 mV
Cloro	1,36 mV

Fonte: SCHIAVON; ANDRADE; PARAISO (2013).

O gás ozônio está naturalmente presente na estratosfera resultante da alta energia da radiação ultravioleta que promove sua formação, no entanto, em pequenas quantidades ( $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ). Comercialmente, o ozônio é obtido pelo método corona que consiste na passagem do ar ou do oxigênio puro por dois eletrodos onde há uma elevada diferença de potencial. Este processo dissocia a molécula de oxigênio com posterior formação do ozônio (Figura 1) (SILVA et al., 2011; NATH et al., 2014).

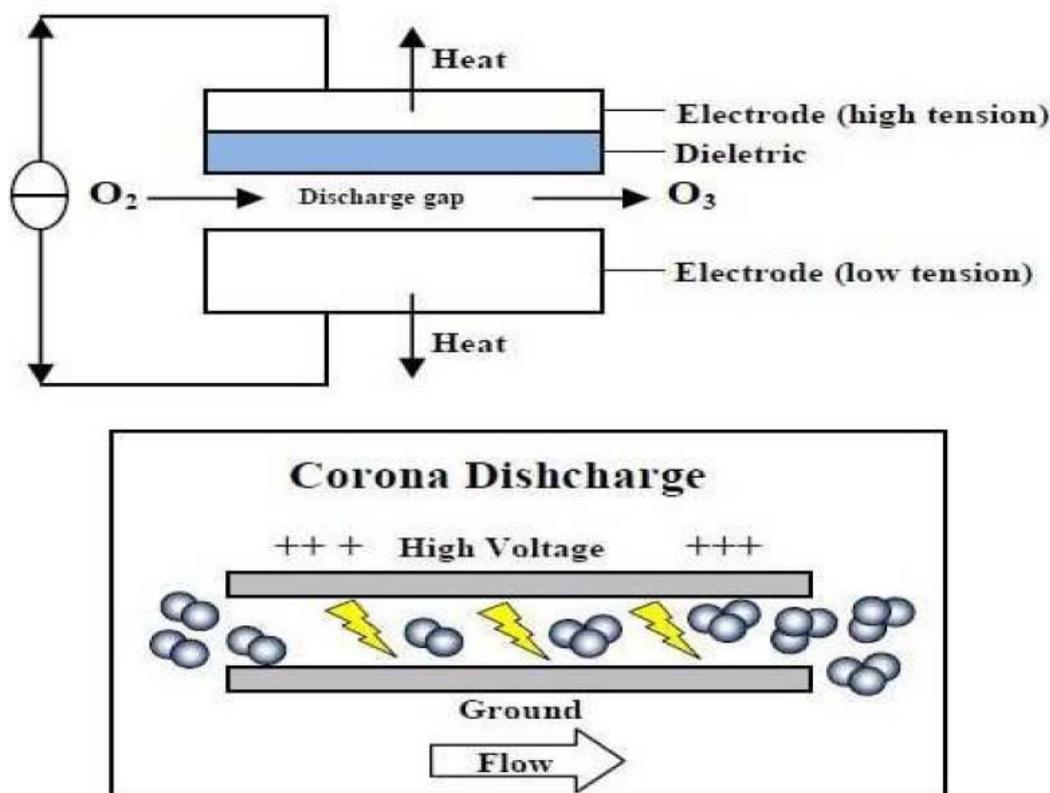


Figura 1 - Esquema do método de descarga Corona. Fonte: NATH et al. (2014).

Em meio aquoso, tem-se que faixa de pH elevado favorece a decomposição do ozônio, sendo que quando o pH alcança o valor de 8,0 metade do ozônio introduzido é decomposto em várias formas intermediárias em 10 min. Temperatura elevada, radiação UV, catalisadores a base de paládio, manganês e óxido de níquel, assim como metais, hidróxidos e peróxidos também aceleram a decomposição. Não tem efeito residual. A solubilidade em água aumenta com a redução da temperatura, sendo influenciada também pela presença de matéria orgânica. Os produtos da decomposição do ozônio mantêm capacidade sanitizante e promove a inativação por efeito indireto, ou seja, quando não é o próprio gás que age sob as células microbianas (SILVA et al., 2011; COELHO et al., 2015).

## 2.5 Ozônio como agente sanitizante

Diante dos problemas decorrentes da utilização dos compostos clorados, se torna interessante a busca por sanitizantes alternativos que não gerem substâncias e/ou resíduos tóxicos. Neste sentido, o ozônio surge como opção de sanitizante que não gera resíduos, sendo considerado um potente agente microbicida, altamente reativo e alta penetrabilidade. Este gás se decompõe a produtos não tóxicos, sendo um tratamento economicamente viável, além de ser útil na inativação de micotoxinas e de resíduos de defensivos agrícolas (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999; NATH et al., 2014).

Segundo Nath et al. (2014), o ozônio é mais eficiente do que o cloro. Este gás tem grande potencial para sanitização tendo mostrado maior eficácia como desinfetante além de agir sob um espectro muito mais amplo de microrganismos do que o cloro ou outros agentes sanitizantes e se decompõem em produtos não tóxicos ao seu humano. É capaz de inativar bactérias, fungos, leveduras, parasitas e vírus.

Na Tabela 2 se faz uma comparação entre os processos de cloração e ozonização avaliando-se vários aspectos, tais como: segurança, capacidade de inativação dos diferentes microrganismos, formação de resíduos, subprodutos, custo e investimento.

Tabela 2. Comparação das características dos processos de cloração e ozonização

Características	Cloração	Ozonização
Segurança	+	++

Remoção de bactérias	++	++
Remoção de vírus	+	++
Remoção de protozoários	-	++
Residual tóxico	+++	+
Subprodutos	+++	+
Custos operacionais	+	++
Custos de investimento	++	+++

- , nenhum; +, baixo; ++, médio; +++, alto.

Fonte: LAZAROVA et al., (1999) apud SILVA et al., (2011).

Em 1909, o ozônio foi usado pela primeira vez como sanificante para a carne em câmaras frias de estocagem. A primeira aplicação do ozônio na indústria de alimentos nos EUA foi limitada, principalmente para remoção de ferro, manganês, cor, gostos e odores e como sanificante de água engarrafada em 1982 (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999; COELHO et al., 2015). A Tabela 3 apresenta as propriedades físico-químicas do ozônio.

Tabela 3. Principais propriedades físico-químicas do ozônio

Propriedades físico-químicas do ozônio	
Massa molar	48 Da
Massa específica (0°C e 101,3 kPa)	2,154 kg m <sup>-3</sup>
Ponto de ebulição	-111,9°C
Ponto de fusão	-192,5°C
Solubilidade em água a 0°C	20 g m <sup>-3</sup>
Solubilidade em água a 20°C	1,5 g m <sup>-3</sup>
Temperatura crítica	-12,1°C
Pressão crítica	5,53 MPa

Fonte: SCHIAVON; ANDRADE; PARAISO (2013).

O ozônio inativa os microrganismos por processos de oxidação de componentes celulares vitais, sugere-se que, a superfície celular bacteriana seja o principal alvo da ozonização. Dois mecanismos principais de destruição foram identificados: o primeiro é a oxidação do grupo sulfidril e aminoácidos de enzimas, peptídeos e proteínas. O segundo é que o ozônio oxida ácidos graxos poli-insaturados liberando ácidos e peróxidos. Este mecanismo resulta na ruptura celular e subsequente vazamento do conteúdo celular (KIM et al., 1999). O ozônio inativa diversas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, formas vegetativas e esporuladas, age sobre componentes do envoltório celular afetando esporos fúngicos e capsídeos virais (SILVA et al., 2011).

Há também limitações na utilização deste gás como agente sanitizante. Quando utilizado para o tratamento de água não possui efeito residual como o cloro, pode ocorrer a formação de compostos bromados quando íons brometo estiverem presentes na água. Quando o ozônio é aplicado diretamente e em altas concentrações pode alterar os alimentos, é um gás instável, a sua produção só é viável no local em

que for utilizado. Ao se trabalhar com o ozônio, deve-se levar em consideração a sua toxicidade ao ser humano, pois a exposição por 1 hora a concentrações de 2, 4, 15 e 95 mg L<sup>-1</sup> pode desenvolver efeitos sintomáticos, irritantes, tóxicos e letais respectivamente (SILVA et al., 2011).

Embora seja um gás que se decompõem em compostos não tóxicos, para a utilização do ozônio em indústria de alimentos, deve existir um sistema seguro que inclui detectores e destruidores de ozônio. No local de utilização deve-se instalar um detector que seja capaz de medir a concentração deste gás entre 0,01 e 100 ppm. Outro equipamento indispensável é um sistema de destruição do ozônio que pode ser térmico ou catalítico e instalado na saída do sistema (KADRE et al., 2001).

Apesar do ozônio ser uma molécula promissora para a conservação de alimentos, a sua utilização apresenta resultados variados. Alexandre et al. (2012) demonstrou que morangos tratados em água ozonizada tiveram menor perda de firmeza durante armazenamento refrigerado, no entanto, a quantidade de antocianinas e ácido ascórbico diminuíram significativamente. Aguayo et al. (2013) observaram que o tratamento com ozônio não afetou significativamente o pH, acidez total, sólidos solúveis totais ácidos orgânicos e os atributos sensoriais de frutos de tomate.

Segundo Restaino et al. (1995), estudos preliminares já foram realizados para verificar o efeito do ozônio na inativação microbiana, tanto utilizando-se culturas puras como alimentos e água naturalmente contaminados.

Broadwater et al. (1973) avaliaram a concentração letal mínima para três espécies bacterianas: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Bacillus megaterium*. Foi utilizado somente um tempo de contato (5 minutos). Os autores observaram que, para as células vegetativas de *B. megaterium* e *E. coli*, a concentração letal de ozônio na água foi de 0,19 mg L<sup>-1</sup>. A concentração letal de ozônio na água foi de 0,12 mg L<sup>-1</sup> para *B. cereus*. Neste estudo observou-se que uma concentração residual de ozônio maior é necessária para promover a inativação dos esporos de *B. cereus* e *B. megaterium* quando se compara às células vegetativas. Uma concentração residual de ozônio da ordem de 2,29 mg L<sup>-1</sup> foi demandada para inativação de esporos das duas espécies, demonstrando assim que bactérias na forma vegetativa apresentam sensibilidade superior ao efeito bactericida do ozônio.

## 2.6 Uso do ozônio no processamento de alimentos

O consumidor está cada vez mais em busca de alimentos seguros e saudáveis. As indústrias de alimentos possuem tecnologia e conhecimento suficientes para o processamento de alimentos seguros e saudáveis e atender a expectativa do consumidor. A produção de alimentos seguros inclui a análise minuciosa de toda a cadeia de produção, inibir o crescimento microbiano e eliminar os deteriorante e principalmente os microrganismos patogênicos (NATH, et al., 2014).

Tradicionalmente os métodos de processamento de alimentos utilizados são os que usam calor, como a pasteurização e esterilização, no entanto, estes métodos geralmente provocam alterações nas características organolépticas e perda de valor nutricional. Além destas alterações, a eficiência do tratamento térmico depende da temperatura e do tempo de aquecimento e têm por objetivo a inativação das formas vegetativas e de alguns esporos e é sabido que existe a possibilidade de sobrevivência de esporos bacterianos (NATH, et al., 2014).

A indústria de alimentos não tem apenas a preocupação de processar alimentos seguros, com as menores alterações possíveis e preservando ao máximo seus nutrientes. Quando a etapa de higienização do ambiente de processamento na indústria não é realizada de forma eficiente, os microrganismos residuais podem formar biofilmes fortemente aderidos à superfície, que são um aglomerado de células bacterianas protegidas por uma camada de polissacarídeos. A eficácia dos tratamentos com os sanitizantes usuais, tais como: hipoclorito, cloreto de benzalcônio e hidróxido de sódio, fica muito comprometido, mesmo com vários minutos de tratamento, por vezes, a capacidade de redução destes microrganismos alcança no máximo 2 ciclos logarítmicos (KAAVYA et al., 2021).

Neste sentido, o ozônio vem se tornando cada vez mais um importante método para o processamento de alimentos. O ozônio pode ser utilizado tanto na forma de gás como em fase aquosa. A inativação microbiana se deve ao efeito direto do ozônio sob as células ou pelos produtos de sua decomposição, efeito indireto. Devido a sua alta reatividade e poder de penetração consegue uma elevada inativação microbiana em curto tempo e concentrações relativamente baixas (CHACHA et al., 2021).

Song et al. (2015) verificou o efeito do ozônio gasoso na inativação de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* em suco de maçã com diferentes valores de pH. Estes patógenos foram inoculados nos sucos e os pH's utilizados foram de 3,0, 4,0 e 5,0. O ozônio foi aplicado na vazão de 3,0 L min<sup>-1</sup> e concentrações de 2,0 e 3,0 ppm por até 4 min. O tratamento por 4 min resultou em reduções de *E. coli* O157:H7 de >5,35, 5,12 e 1,86 log UFC/mL, respectivamente para os pH's 3,0, 4,0 e 5,0. *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* apresentaram reduções semelhantes. Segundo os autores, valores mais baixos de pH proporcionou maior inativação microbiana sem alterar as características sensoriais do suco.

O efeito da combinação de tratamentos térmicos com o uso de ozônio gasoso na inativação de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* em suco de maçã com diferentes conteúdos de sólidos solúveis também foram estudados. Sucos com 18, 36 e 72 °Brix foram inoculados com estes patógenos e submetidos ao ozônio na vazão de 3,0 L min<sup>-1</sup> e concentrações de 2,0 e 3,0 ppm. As temperaturas dos tratamentos térmicos foram de 25, 45, 50 e 55 °C e a duração destes tratamentos foram de 20, 40 e 60 segundos. Os tratamentos térmicos e a aplicação do ozônio ocorreram simultaneamente. A população inicialmente inoculada foi de aproximadamente 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC/mL. A redução variou de 0,0 até 4,75 log UFC/mL na população de *E. coli* O157:H7 quando somente o calor foi aplicado. Quando se combinou o ozônio às temperaturas de 25 e 45 °C por 1 min a redução foi de 0,93 e 3,87 log UFC/mL na população de *E. coli* O157:H7, respectivamente e nas temperaturas de 50 e 55 °C a contagem foi inferior a 1,0 log UFC/mL, sendo que para os demais microrganismos encontrou-se resultados semelhantes. Os autores afirmaram que neste estudo encontraram um efeito sinérgico entre calor e ozônio que não provocou diferenças significativas nos sucos de maçã e sugeriram que a combinação do tratamento com ozônio e o tratamento térmico poderia ser utilizado para o processamento destes sucos (SONG et al., 2014).

## REFERÊNCIAS

AGUAYO, E.; ESCALONA, V. H.; SILVEIRA, A. C.; ARTÉS, F. Quality of tomato slices disinfected with ozonated water. **Food Science and Technology International**, v.1, p.1-9, 2013.

ALEXANDRE, E. M. C.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. Efficacy of nonthermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries. **Journal Food Engineering**, v.108, p.417-426, 2012.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. **Food Control**, v. 29, p.82-90, 2013.

BRASIL. **Resolução RDC nº216. de 15 de setembro de 2004**. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial da União. Brasília. DF. 16 setembro. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp**. Brasília, DF. 2011. 60 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico N° 32**. Brasília, DF, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/arquivos/doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-dtha/informe-sobre-surtos-notificados-de-doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos-2013-brasil-2016-2019.pdf/view>>. Acesso em 04 de abril de 2022.

BROADWATER, W. T.; HOEHN, R. C.; KING, F. H. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. **Appl. Microbiol**, v. 26, p. 391–393, 1973.

CAMARGO, A. C.; WOODWARD, J. J.; CALL, D. R.; NERO, L. A. *Listeria monocytogenes* in Food-Processing Facilities, Food Contamination, and Human Listeriosis: The Brazilian Scenario. **Foodborne pathogens and disease**, v. 20, n. 20, p. 1-14, 2017.

CARNEIRO, M. R. P.; CABELLO, P. H.; ALBURQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; JAIN, S.; CANDIDO, A. L. Characterization of a foodborne outbreak caused by *Salmonella enteritidis* in Aracaju, State of Sergipe, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 334-337, 2015.

CHACHA, J. S.; ZHANG, L.; OFOEDU, C. E.; SULEIMAN, R. A.; DOTTO, J. M.; ROOBAB, U.; AGUNBIADE, A. O.; DUGUMA, H. T.; MKOJERA, B. T.; HOSSAINI, S. M.; RASAQ, W. A.; SHORSTKII, I.; OKPALA, C. O. R.; KORZENIOWSKA, M.; GUINÉ, R. P. F. Revisiting Non-Thermal Food Processing and Preservation Methods-Action Mechanisms, Pros and Cons: A Technological Update (2016-2021). **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1-26, 2021.

CHATTAWAY, M. A.; LANGRIDGE, G. C.; WAIN, J. Salmonella nomenclature in the genomic era: a time for change. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2021.

COELHO, C. C. de S.; SILVA-FREITAS, O.; CAMPOS, R. da S.; BEZERRA, V. S.; CABRAL, L. M. C. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 4, p. 369-375, 2015.

COSSU, A.; LE, YOUNG, P. G. M.; NITIN, N. Assessment of sanitation efficacy against *Escherichia coli* O157:H7 by rapid measurement of intracellular oxidative stress, membrane damage or glucose active uptake. **Food Control**, v. 71, p. 293-300, 2017.

DIVISA/SVS/SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 16, DE 23 DE MAIO DE 2017**. REGULAMENTO TÉCNICO DE BOAS PRÁTICAS PARA ESTABELECIMENTOS COMERCIAIS DE ALIMENTOS E PARA SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). **The European Union One Health 2018 Zoonoses Report**. 19 November 2019. Disponível em: <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5926>>. Acesso em 10 de março de 2022.

FAÚLA, L. L.; SOARES, A. C. C.; DIAS, R. S. Panorama dos surtos de doença de transmissão alimentar (DTA) ocorridos em minas gerais, brasil, no período de 2010 a 2014. **Revista de Saúde Pública do SUS/MG**, v. 3, n. 1, p. 84-92.

FERREIRA, J. A. F. **Panorama das doenças transmitidas por alimentos no Brasil entre 2000 e 2015**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2017.

GRAY, J. A.; CHANDRY, P. S.; KAUR, M.; KOCHARUNCHITT, C.; BOWMAN, J. P.; FOX, E. M. Characterisation of *Listeria monocytogenes* food-associated isolates to assess environmental fitness and virulence potential. **International Journal of Food Microbiology**, v. 16, p. 1-10, 2021.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6° ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 711 p.

KAAVYA, R.; PANDISELVAM, R.; ABDULLAH, S.; SRUTHI, N. U.; JAYANATH, Y.; ASHOKKUMAR, C.; KHANASHYAM, A. C.; KOTHAKOTA, A.; RAMESH, S.V. Emerging non-thermal technologies for decontamination of *Salmonella* in food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 400-418, 2021.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; CHISM, G. W. Use of Ozone to Inactivate Microorganisms on Lettuce. **Journal of Food Safety**, v. 19, p. 17-34, 1998.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1071-1087, 1999.

LANNI, L.; MORENA, V.; SCATTAREGGIA, M. A.; DESTRO, G.; FERIOLI, M.; CATELLANI, P.; GIACCONE, V. Challenge Test as Special Tool to Estimate the Dynamic of *Listeria monocytogenes* and Other Foodborne Pathogens. **Foods**, v. 11, n. 32, p. 1-22, 2021.

LUO, L. W.; WU, Y. H.; YU, T.; WANG, Y. H.; CHEN, G. Q.; TONG, X.; BAI, Y.; XU, C.; WANG, H. B.; IKUNO, N.; HU, H. Y. Evaluating method and potential risks of chlorine-resistant bacteria (CRB): A review. **Water Research**, v. 188, p. 1-64, 2020.

MACHADO, J. de C; COSTA, P. D. Contaminação bacteriana em hortaliças comercializadas em feiras livres. **Revista Educação, Meio Ambiente e Saúde**, v. 7, n. 03, p. 69-77, 2017.

MIRANDA, A. L.; CORDEIRO, S. M.; REIS, J. N.; CARDOSO, L. G.; GUIMARÃES, A. G. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* spp. isolated from foods and clinical samples in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p. 1143-1153, 2017.

MOUTA, R.; MELO, M.; ARAÚJO, A.; AGUIAR, F.; RAQUEL, F. Qualidade microbiológica do sushi comercializado na cidade de Sobral-CE. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 12, n. 2, p. 277-284, 2014.

NATH, A.; MUKHIM, K.; SWER, T.; DUTTA, D.; VERMA, N.; DEKA, B.C.; GANGWAR, B. A Review on Application of Ozone in the Food Processing and Packaging. **Journal of Food Product Development and Packaging**, v. 1, p. 07-21, 2014.

OLIVEIRA, A. B. A; PAULA, C. M. D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. I., TONDO, E. C. Doenças Transmitidas por Alimentos, Principais Agentes Etiológicos e Aspectos Gerais: Uma Revisão. **Revista HCPA**. V. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, D. C. R de; LEAL, P. A. M.; HONÓRIO, S. L.; SOARES, E. K. B. Sensory quality attributes of lettuce obtained using different harvesting performance systems. **Food Science and Technology**, v. 33(2), p. 239-244, 2013.

RESTAINO, L.; FRAMPTON, E. W.; HEMPHILL, J. B.; PALNIKAR, P. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 9, p. 3471-3475, 1995.

RITTER, A. C.; TONDO, E. C. Foodborne illnesses in Brazil: control measures for 2014 FIFA World Cup travellers. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 3, p.254-257, 2014.

SÃO JOSÉ, J. F. B. Estratégias na higienização de frutas e hortaliças. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 3, p. 630-640, 2017.

SCHIAVON, G. J.; ANDRADE, C. M.; JORGE, L. M. M.; PARAÍSO, P. **Projeto de análise de um sistema gerador de ozônio para a remoção de cor em efluente têxtil**. Disponível em: < <https://docplayer.com.br/19861473-Projeto-e-analise-de-um-sistema-gerador-de-ozonio-para-remocao-de-cor-de-efluente-textil.html>>. Acesso em 13 de março de 2022.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. de C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. de L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13(5), p. 1675-1683, 2008.

SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. de M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Ciências Agrárias**, v. 32, n.2, p. 659-682, 2011.

SILVA, H. R.; GIANOGLU, F. M.; CAMPOS, M; F.; GRACIANO, E. M. A.; TOLEDO, R. C. C. Listeriose: uma doença de origem alimentar pouco conhecida no brasil. **Higiene Alimentar** - v.30, n. 262/263, p. 17-20, 2016

SONG, W. J.; SHIN, J. Y., RYU, S.; KANG, D. H. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in apple juice at different pH levels by gaseous ozone treatment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 2, p. 465-474, 2015.

SONG, W. J.; SUNG, H. J.; KANG, D. H. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in apple juices with different soluble solids content by combining ozone treatment with mild heat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 1, p. 112-122, 2014.

VALLIM, D. C.; HOFER, C. B.; LISBÔA, R. C.; BARBOSA, A. V.; RUSAK, C. M. F. dos R.; HOFER, E. Twenty Years of Listeria in Brazil: Occurrence of Listeria Species and *Listeria monocytogenes* Serovars in Food Samples in Brazil between 1990 and 2012. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-8.

WANG, H.; DING, S.; WANG, G.; XU, X.; ZHOU, G. 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, 2013.

WIKTORCZYK-KAPISCHKE, N.; SKOWRON, K.; GRUDLEWSKA-BUDA, K.; WAŁECKA-ZACHARSKA, E.; KORKUS, J.; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E. Adaptive Response of *Listeria monocytogenes* to the Stress Factors in the Food Processing Environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1-18, 2021.

## CAPÍTULO I

### **CONTROLE DE *Listeria monocytogenes* EM ÁGUA OZONIZADA E REFRIGERADA**

de REZENDE, A. J.; de ALENCAR, E. R.; FERREIRA, M. de A.; FERREIRA, W. F. de S. Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated Ozonated Water. **Ozone: Science & Engineering**, 2021.

doi: <https://doi.org/10.1080/01919512.2021.1912586>

## CONTROLE DE *Listeria monocytogenes* EM ÁGUA OZONIZADA E REFRIGERADA

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia da água ozonizada no controle de *Listeria monocytogenes* (ATCC® 49594), adotando-se diferentes combinações de pH, tempo de contato e tempo de armazenamento sob refrigeração. Utilizou-se água com pH's de 4,0, 7,0 e 8,2 e armazenada a 7 °C. Para a obtenção da água ozonizada, adotou-se concentração de entrada do gás de 21 mg L<sup>-1</sup> e uma vazão de 1,0 L min<sup>-1</sup>, por 15 min. Os tempos de armazenamento da água ozonizada avaliados foram 0, 6, 12, 18 e 24 h. A cinética de decomposição do ozônio foi avaliada. Os tempos de contato de *L. monocytogenes* com a água ozonizada foram 3 e 6 min. A redução acentuada na concentração do ozônio foi observada na água com pH 4,0, com meia vida de 13.20 min. Para os pH's de 7,0 e 8,2, as meias vidas foram de 64.80 e 45.60 min, respectivamente. A água ozonizada e armazenada a 7 °C se mostrou eficaz no controle de *L. monocytogenes*, sobretudo nos valores de pH da água de 7,0 e 8,2. Conclui-se que o pH inicial da água afeta a eficácia da água ozonizada no controle de *L. monocytogenes*. Além disso, pode-se afirmar que é viável a utilização de água ozonizada armazenada a 7 °C, por até 24 h, para inativação de *L. monocytogenes*, quando adotados pH's iniciais 7,0 e 8,2.

**Palavras-chave:** Ozonização; *Listeria monocytogenes*; inativação bacteriana; efeito do pH; concentração de ozônio.

## CONTROL OF *Listeria monocytogenes* IN REFRIGERATED OZONATED WATER

### ABSTRACT

The present work aimed at the effectiveness of ozonated water in the control of *Listeria monocytogenes* (ATCC® 49594), adopting different combinations of pH, contact time, and storage time under refrigeration. To obtain ozonated water, the dose applied was 21 mg L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, for 15 min. Samples of 1.0 L of water were ozonated at the inlet ozone concentration of 21 mg L<sup>-1</sup> and a flow rate of 1.0 L min<sup>-1</sup>. The initial concentrations of ozone dissolved in water were equal to 5.81 mg L<sup>-1</sup> at pH 4.0, 5.20 mg L<sup>-1</sup>, at pH 7.0, and 7.20 mg L<sup>-1</sup> at pH 8.2. Samples of ozonated water with different initial pH's were used and stored at 7 °C for up to 24 h. The storage times of the ozonated water under refrigeration were 0, 6, 12, 18, and 24 h. The contact times of *L. monocytogenes* with ozonated water were 3.0 and 6.0 min. Ozone decomposition kinetics was evaluated. Ozonated water stored at 7 °C proved effective in controlling *L. monocytogenes*, especially in water pH values of 7.0 and 8.2. The initial pH of the water affects the effectiveness of ozonated water regarding the control of *L. monocytogenes*. The sharp reduction in ozone concentration was observed in water with pH 4.0, with a half-life of 13 min. For pH's of 7.0 and 8.2, the half-lives were 65 and 45 min, respectively. It is viable to use ozonated water stored at 7 °C, for up to 24 h, to inactivate *L. monocytogenes*, when adopting initial pH's of 7.0 and 8.2, adjusted with sodium bicarbonate.

**Key-words:** Ozonation; *Listeria monocytogenes*; bacterial inactivation; pH effect; ozone concentration

## 1. INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, capaz de invadir células de animais e de humanos. Esta espécie bacteriana provoca a listeriose, que é uma grave infecção associada a encefalites, abortos, meningites e septicemias, sendo os alimentos importantes fontes de veiculação, tanto os de origem animal quanto vegetais frescos (NALÉRIO et al., 2009). A listeriose apresenta menor incidência quando comparada a outras doenças entéricas, mas é capaz de gerar quadros mais graves e requer tratamento com antibioticoterapia (SILVA et al., 2016). Essa doença está associada a alto número de hospitalização e apresenta taxa de letalidade entre 20 a 30%. Entre 2013 e 2017, na União Europeia, foi observado significativo aumento de casos desta doença (DYGICO et al., 2019).

A eliminação de *L. monocytogenes* dos ambientes de manipulação e de processamento de alimentos é um desafio e exige adequada limpeza e processo de sanitização eficiente (SILVA et al., 2016; CAMARGO et al., 2017). Além da capacidade de resistir a condições adversas, existem cepas de *L. monocytogenes* persistentes, capazes de sobreviver por longos períodos no ambiente de processamento de alimentos, gerando o risco de contaminar os alimentos. A colonização de superfícies é denominada de biofilmes, sendo que vários fatores contribuem para a sua formação, tais como temperatura, tipo de superfície, disponibilidade de nutrientes e umidade (NALÉRIO et al., 2009; DYGICO et al., 2019; RIPOLLES-AVILA et al., 2020).

Nesse cenário, tem-se que é fundamental a implementação de medidas para eliminar ou reduzir a contaminação por microrganismos a níveis seguros, em especial por *L. monocytogenes*, o que constitui um dos desafios para a segurança dos alimentos (SÃO JOSÉ, 2017). Destaca-se que a Instrução Normativa nº 60 (BRASIL, 2019), no Anexo II, estabelece tolerância de  $10^2$  UFC/25 g ou mL para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo e deve estar ausente quando esses alimentos são destinados a lactentes ou para fins especiais.

A operação de sanitização é muito importante no processamento de alimentos, especialmente para o controle de microrganismos que provocam doenças transmitidas por alimentos. Substâncias como hipoclorito e amônia quaternária são amplamente utilizadas com esse propósito (EVRENDILEK e OZDEMIR, 2019). No entanto, devido o surgimento de cepas resistentes a essas substâncias e maior

incidência de outros patógenos de origem alimentar, tem-se crescente demanda por agentes antimicrobianos que sejam mais eficientes. Além destes fatores, tem-se a redução da eficácia do cloro em presença de matéria orgânica e a potencial formação de trihalometanos e ácidos haloacéticos, o que pode comprometer a segurança dos alimentos, o que implica em aumento na demanda por tecnologias alternativas (KIM; YOUSEF e DAVE, 1999; COELHO et al., 2015). A ozonização tem sido apresentada como uma técnica alternativa aos métodos tradicionais de controle de microrganismos em alimentos e em plantas de processamento.

O ozônio é um gás, que se destaca pelo elevado potencial oxidativo e alta reatividade, além de se decompor em composto não tóxico ( $O_2$ ), sendo um agente comprovadamente capaz de inativar diferentes grupos de microrganismos (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999; EVRENDILEK e OZDEMIR, 2019). Baixas concentrações e reduzido tempo de contato são eficientes para inativar bactérias, fungos, leveduras, parasitas e vírus de alimentos podendo ser aplicada nos alimentos na forma gasosa ou dissolvida em água (KIM; YOUSEF e KHADRE, 2003; ALWI e ALI, 2014; FERREIRA et al., 2017; ZHANG et al., 2011). Outra característica importante do ozônio é que sua aplicação é viável na forma gasosa ou dissolvido em água, e em ambos os casos a decomposição do gás é relativamente rápida. Em meio aquoso, variáveis como pH, temperatura, radiação UV, catalisadores como paládio, manganês e óxido de níquel aceleram a decomposição do gás. Dependendo das características do meio, os produtos secundários da decomposição do ozônio podem manter a capacidade sanitizante e promover a inativação por efeito indireto, ou seja, quando não é o próprio gás que age sob as células microbianas (COELHO et al., 2015; SILVA et al., 2011). De acordo com KIM, YOUSEF e KHADRE (2003), em meio aquoso, o ozônio sofre rápida decomposição à medida que se eleva o pH, com expressiva formação de radicais hidroxilas, quando se tem meio alcalino. Esses radicais também atuam na inativação dos microrganismos.

Apesar de serem encontrados diversos trabalhos na literatura em que é avaliada a eficácia do ozônio em meio aquoso no controle de microrganismos, inclusive patogênicos como *L. monocytogenes*, em geral a avaliação é feita imediatamente depois da ozonização da água. Souza et al. (2019) realizaram trabalho com água ozonizada e verificou-se inativação de *E. coli* O157:H7 de aproximadamente 4,5 ciclos de log com tempo de contato de 5 min. Então, objetivou-

se com este estudo avaliar a eficácia da água ozonizada, adotando-se diferentes combinações de pH, tempo de contato e tempo de armazenamento sob refrigeração, no controle de *L. monocytogenes*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cepa bacteriana e preparação do inóculo

Foi utilizada a cepa de *Listeria monocytogenes* (ATCC® 49594), proveniente da coleção do Laboratório de Análise de Leite e Derivados armazenada a -80 °C. Três tubos eppendorfs estéreis contendo uma mistura de 30% de glicerol e 70% de Caldo Trypticase Soja (TSB, pH 7,3 ±0,2) foram inoculados por esgotamento de alça de 10 µL com a cepa de *L. monocytogenes*. Estes tubos foram acondicionados em caixa de fibra de papelão armazenada a -80 °C e usada exclusivamente para este estudo. As células foram reativadas em caldo TSB a 37 °C, por 24 h. Após reativação a cultura foi inoculada por esgotamento de alça de 10 µL, em placa contendo Ágar Trypticase Soja (TSA) (Marca KASVI, USA) enriquecido com 0,6% de extrato de levedura (YE) e incubada a 37 °C por 24 h para crescimento das colônias.

Para o preparo dos inóculos, colônias formadas no ágar TSA foram transferidas, com auxílio de uma alça de inoculação, para tubos contendo solução salina estéril 0,85% (cloreto de sódio a 0,85%) até atingir o grau de turvação correspondente ao tubo 1 da escala nefelométrica de McFarland (Nefelobac®, Probac Brasil), que corresponde a aproximadamente a  $3,0 \times 10^8$  UFC/mL. Diluições decimais sucessivas foram realizadas também em solução salina 0,85% (0,85% de cloreto de sódio - NaCl) estéril, até a obtenção de concentração de aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  UFC/mL.

### 2.2 Geração do gás ozônio e obtenção da água ozonizada

O gás ozônio foi produzido por um gerador com concentrador de oxigênio acoplado (Modelo O&L 3.0-O2 RM, da Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil), que produz o gás baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica (DBD). A concentração de entrada do gás foi de 21 mg L<sup>-1</sup> e vazão de 1,0 L min<sup>-1</sup> (Figura 1).



Figura 1. Gerador de Ozônio Modelo O&L 3.0-O2 RM, da Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil. Acervo pessoal.

Para a obtenção da água ozonizada (Figura 2), amostras de 1000 mL de água da rede de abastecimento de Brasília, Distrito Federal (cor aparente  $<15$  mg Pt-Co/L; turbidez  $<5,0$  NTU; ausência de *Escherichia coli*), foram acondicionadas em frascos esterilizados e mantidas refrigeradas ( $7^{\circ}\text{C}$ ) até o momento das análises. O pH da água foi aferido com pHmetro (Modelo K39-0014PA marca KASVI), obtendo-se valor médio de 6,6.

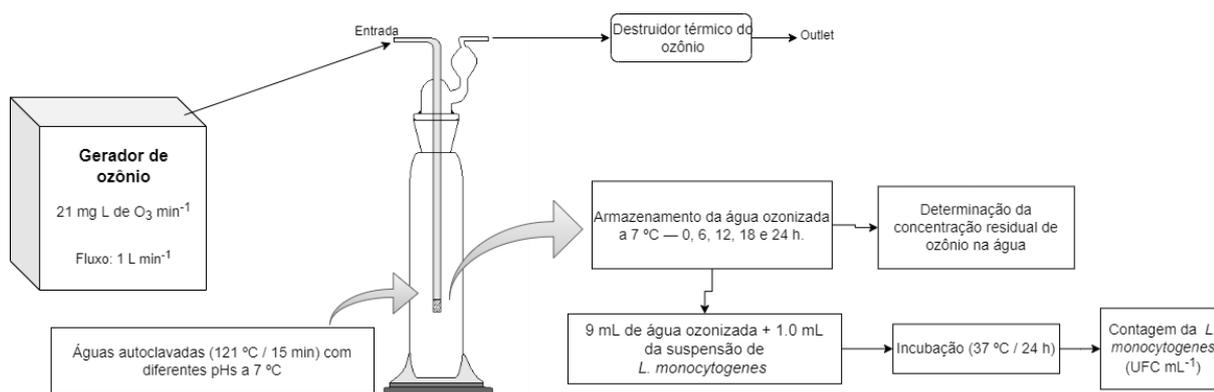


Figura 2. Fluxograma de obtenção de água ozonizada armazenada a 7 °C e controle de *Listeria monocytogenes*. Fonte: Elaborado pelo o autor.

Adotaram-se três valores de pH da água para a ozonização: 4,0, 7,0 e 8,2. Para ajustar o pH da água em 4,0, utilizou-se ácido cítrico p.a. (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) e bicarbonato de sódio p.a. (NaHCO<sub>3</sub>) para ajustar os pH's da água para 7,0 e 8,2; após isso, as amostras de água foram autoclavadas a 121 °C, por 15 min e mantidas refrigeradas (7 °C). Os valores de pH e do potencial redox foram medidos antes e depois da ozonização. Quantificou-se o potencial redox em medidor ORP/Redox (Modelo ORP-169E) com faixa de sensibilidade entre 0,00 a 1999 mV (Guangzhou Juanjuan Electronic Technology Co. Ltd., China)

Para a ozonização da água com os diferentes pH's, utilizou-se coluna de vidro, com capacidade de 1,5 L e dispositivo de entrada e saída do gás. Antes da ozonização da água, efetuava-se a sanitização da coluna com ozônio gasoso por 15 min, na concentração de entrada de 21 mg L<sup>-1</sup> e vazão de 1,0 L min<sup>-1</sup>. As amostras de água com os diferentes pH's foram ozonizadas, borbulhando-se ozônio na concentração de entrada de 21 mg L<sup>-1</sup> e vazão de 1,0 L min<sup>-1</sup>, por 15 min. Durante a ozonização das amostras, a coluna contendo água permaneceu em recipiente isotérmico e com gelo retornável, de forma a manter a temperatura da água em torno de 7 °C. Na saída do sistema de ozonização, instalou-se destruidor térmico catalítico necessário para a decomposição do ozônio residual. Finalizada a ozonização, as amostras de água eram acondicionadas em frascos esterilizados e armazenadas a 7 °C. Para os tratamentos controles, efetuou-se borbulhamento com ar atmosférico, por 15 min, nas amostras de água com os diferentes pH's.

### 2.3 Avaliação da água ozonizada com diferentes pH's iniciais na inativação de *L. monocytogenes*

Para a avaliação da eficácia do ozônio dissolvido na água no controle de *L. monocytogenes*, alíquotas de 1,0 mL da suspensão com aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  UFC/mL eram transferidas para tubos contendo 9,0 mL de água ozonizada, nas diferentes combinações de pH (4,0, 7,0 e 8,2) e tempo de armazenamento (0, 6, 12, 18 e 24 h) da água a 7 °C. Em seguida, efetuava-se a homogeneização por 15 segundos em agitador de tubos. Para os tratamentos controles, adotou-se procedimento similar, utilizando-se água com os pH's igualmente ajustado, mas não ozonizada, obtida por borbulhamento com ar atmosférico. Adotaram-se os tempos de contato de 3,0 e 6,0 min. Para a contagem de *L. monocytogenes*, utilizou-se plaqueamento em superfície em Ágar Oxford Listeria (Marca NEOGEN, USA) e posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C com avaliação depois de 24 h de incubação.

### 2.4 Determinação da concentração residual do ozônio na água com diferentes pH's iniciais e cinética de decomposição

Imediatamente depois da ozonização e a cada 6 h até 24 h, quantificou-se a concentração do ozônio dissolvido na água com os diferentes pH's. Adicionalmente e baseado em testes preliminares, para a água com pH inicial de 4,0, quantificou-se a concentração do ozônio depois de 2 e 4 h de armazenamento. A concentração de ozônio dissolvido na água foi medida usando um fotômetro SAM CHEMetrics modelo I-2019 (Figura 3), com faixa de sensibilidade de 0,01 a 5,00 mg L<sup>-1</sup>. Quando a concentração de ozônio dissolvido na água excedia o limite máximo de detecção do equipamento, efetuava-se diluição em volume igual (1:1) de água não ozonizada, com características iniciais similares (FERREIRA et al., 2020).



Figura 3. Fotômetro SAM CHEMetrics. Acervo pessoal.

Aos dados de concentração residual do ozônio na água, ajustou-se ao modelo cinético de segunda ordem (WRIGHT, 2004). Apresentam-se, na Tabela 1, a equação diferencial e a equação integrada e linearizada referentes ao modelo de cinética de segunda ordem, e respectiva meia-vida.

Tabela 1. Equação integrada e linearizada para modelo cinético de segunda ordem e respectiva meia-vida

Ordem	Equação	Equação Integrada e	Meia-vida
	Diferencial	Linearizada	
2	$\frac{dC}{dt} = -kC^2$	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$	$t_{1/2} = \frac{1}{kC_0}$

C = concentração de O<sub>3</sub> (mg L<sup>-1</sup>); t = tempo (h); k = constante da taxa de decomposição (L mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>); e; C<sub>0</sub> = Concentração inicial de O<sub>3</sub> (mg L<sup>-1</sup>).

## 2.5 Procedimento Experimental

Adotou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado, com três repetições. Na avaliação da eficácia da água ozonizada no controle de *L. monocytogenes*, adotou-se esquema fatorial 6 x 2 x 5, sendo seis tratamentos (água ozonizada com os pH's 4,0, 7,0 e 8,2, e os respectivos controles), dois tempos de contato (3,0 e 6,0 minutos) e cinco tempos de armazenamento (0, 6, 12, 18 e 24 h), além de estatística descritiva na análise dos dados. Para a obtenção das equações de regressão e plotagem dos gráficos referentes à cinética de decomposição do ozônio na água, utilizou-se o Software SigmaPlot v.10 (Systat Software Inc., Alemanha).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Contagem de *L. monocytogenes* em função de diferentes combinações de pH inicial e tempo de armazenamento da água ozonizada e tempo de contato

Na Tabela 2 são apresentados os valores médios referentes às contagens de *L. monocytogenes* (log UFC/mL) exposta a água ozonizada com diferentes pH's e armazenada por até 24 h, na temperatura de 7 °C, e com tempos de contato de 3 e 6 min. Observou-se diferença expressiva na eficácia da água ozonizada no controle de *L. monocytogenes*, quando se analisaram os resultados obtidos, considerando os diferentes pH's iniciais e o tempo de armazenamento.

Tabela 2. Contagens de *Listeria monocytogenes* (log UFC/mL) exposta a água ozonizada com diferentes pH's e armazenada a 7 °C, por até 24 h, e com diferentes tempos de contato

Tempo de armazenamento (h)	Tempo de contato (min)			
	3,0		6,0	
	Controle	Água ozonizada	Controle	Água ozonizada
pH 8,2				
0	5,53±0,05	<1,0*	5,56±0,02	<1,0*
6	5,49±0,05	<1,0*	5,55±0,02	<1,0*
12	5,56±0,04	<1,0*	5,55±0,04	<1,0*
18	5,50±0,04	<1,0*	5,51±0,05	<1,0*
24	5,52±0,03	<1,0*	5,49±0,03	<1,0*
pH 7,0				
0	5,42±0,02	<1,0*	5,39±0,03	<1,0*
6	5,37±0,04	<1,0*	5,44±0,04	<1,0*
12	5,43±0,03	<1,0*	5,47±0,02	<1,0*
18	5,41±0,03	<1,0*	5,43±0,02	<1,0*
24	5,30±0,02	<1,0*	5,38±0,02	2,33±0,35
pH 4,0				
0	5,44±0,05	<1,0*	5,47±0,03	<1,0*
6	5,38±0,04	4,38±0,02	5,40±0,02	4,44±0,01
12	5,49±0,02	4,50±0,04	5,49±0,02	4,47±0,06
18	5,42±0,11	4,52±0,07	5,50±0,02	4,52±0,03
24	5,41±0,04	4,44±0,02	5,47±0,02	4,50±0,01

\* Dados estimados.

A contagem inicial de *L. monocytogenes* permaneceu igual ou superior a 5,30 log UFC/mL em todas as combinações de pH inicial da água e tempo de armazenamento, nos tratamentos controle (Tabela 2). Por outro lado, as contagens de *L. monocytogenes* foram inferiores a 1,0 log UFC/mL, quando se utilizou água ozonizada com pH inicial de 8,2, armazenada por até 24 h a 7 °C, e para tempos de contato de 3 e 6 min. Resultados similares foram verificados para a água ozonizada com pH inicial de 7,0, exceto para o tempo de armazenamento de 24 h e tempo de

contato de 3 min. Nessa condição, verificou-se contagem de *L. monocytogenes* igual a  $2,33 \pm 0,35$  log UFC/mL, implicando em redução de aproximadamente 3,0 ciclos log, quando se comparou com a contagem inicial. No que se refere à eficácia da água ozonizada com pH inicial de 4,0, observou-se redução expressiva, com contagem inferior a 1,0 log UFC/mL, quando se utilizou a água imediatamente depois da ozonização (0 h). Para as diferentes combinações de tempos de armazenamento, a partir de 6 h, e tempos de contato de 3,0 e 6,0 min, a água com pH inicial de 4,0 apresentou crescimento expressivo de colônias, com reduções de aproximadamente 1,0 ciclo log se comparado com as médias dos tratamentos controles.

### 3.2 Concentração residual do ozônio na água com diferentes pH's iniciais e cinética de decomposição a 7 °C

Na Figura 4 e na Tabela 3, são apresentadas as tendências referentes à concentração residual do ozônio na água com diferentes pH's e armazenada na temperatura de 7 °C, por 24 h. Verificou-se redução mais acentuada da concentração residual do ozônio na água com pH inicial de 4,0. A concentração de ozônio na água com pH inicial de 4,0, imediatamente depois da ozonização, foi equivalente a 5,64 mg L<sup>-1</sup>. Entretanto, depois de 6 h de armazenamento na temperatura de 7 °C, a concentração estimada de ozônio residual na água com pH inicial a 4,0 foi de aproximadamente 0,09 mg L<sup>-1</sup>. Por outro lado, reduções menos acentuadas na concentração residual de ozônio durante o armazenamento foram observadas nas águas com pH's iniciais de 7,0 e 8,2. Depois de 6 h de armazenamento, a 7 °C, as concentrações estimadas de ozônio residual nas águas com pH's iniciais de 7,0 e 8,2 foram equivalentes a 1,99 e 1,48 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

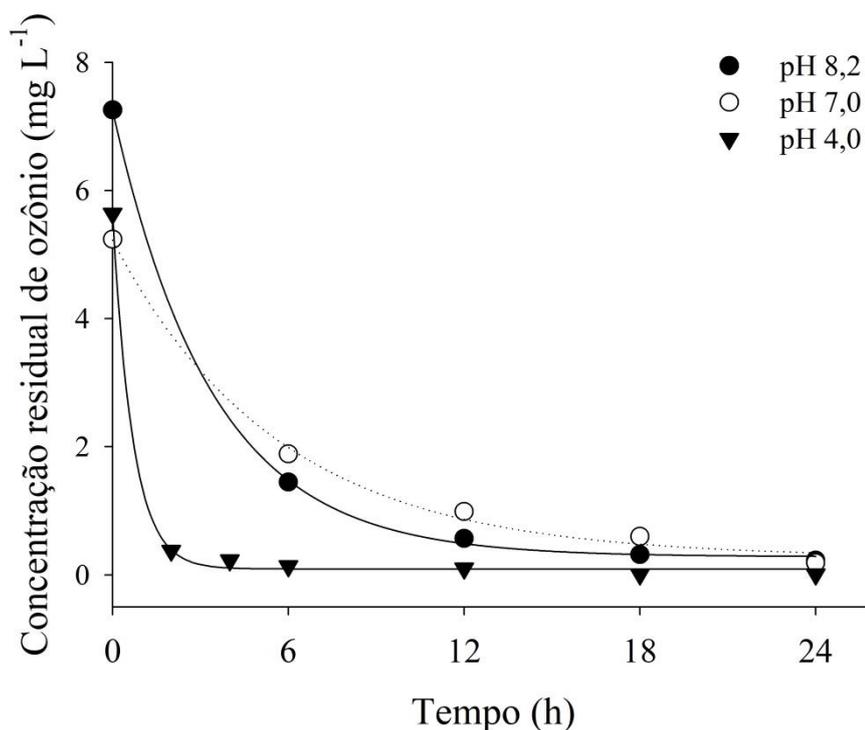


Figura 4. Curvas de regressão da concentração de ozônio residual (mg L<sup>-1</sup>) em água com diferentes pH's e armazenada a 7 °C, por até 24 h.

Tabela 3. Equações de regressão referentes à concentração do ozônio em água com diferentes pH's e armazenada a 7 °C, em função do tempo de armazenamento (x, h)

pH inicial	Regressão ajustada	R <sup>2</sup>	EPE
8,2	$\hat{y}=0,283+6,975e^{-0,294x}$	0,99	0,074
7,0	$\hat{y}=0,275+4,947e^{-0,177x}$	0,99	0,178
4,0	$\hat{y}=0,092+5,548e^{-1,456x}$	0,99	0,088

EPE – Erro padrão da estimativa

n – três repetições

A Tabela 4 contém as equações de regressão referentes aos modelos cinéticos de segunda ordem para concentração residual do ozônio em água com diferentes pH's em função do tempo de armazenamento na temperatura de 7 °C. A menor meia vida do ozônio foi observada na água com pH inicial de 4,0, sendo equivalente a 0,22 h (13,20 min), considerando-se o modelo cinético de segunda ordem e concentração

inicial de ozônio de 5,64 mg L<sup>-1</sup>. Por outro lado, para os pH's iniciais da água iguais a 7,0 e 8,2, as meias vidas do ozônio foram equivalentes a 1,08 h (64,80 min) e 0,76 h (45,60 min), respectivamente. Ressalta-se que para o cálculo das meias vidas do ozônio referentes aos pH's iniciais de 7,0 e 8,2, utilizaram-se as concentrações do gás dissolvido na água imediatamente depois da ozonização, que foram equivalentes a 5,80 e 7,26 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tabela 4. Equações de regressão do modelo cinético de segunda ordem para concentração de ozônio residual e meia-vida em água com diferentes pH's em função do tempo de armazenamento a 7 °C (x, h)

pH inicial	Regressão ajustada	R <sup>2</sup>	EPE	Meia vida (h)
8,2	$\hat{y} = -0,1602 + 0,1809x$	0,98	0,282	0,76
7,0	$\hat{y} = -0,3758 + 0,1592x$	0,84	0,724	1,08
4,0	$\hat{y} = 0,8435 + 0,7996x$	0,98	0,615	0,22

EPE – Erro padrão da estimativa

n – três repetições

\* Significativo a 5% de probabilidade

### 3.3 pH e potencial redox da água ozonizada com diferentes pH's iniciais e armazenados a 7 °C

Os valores médios do pH e do potencial redox das águas com diferentes pH's iniciais ozonizadas e armazenadas por até 24 h, à 7 °C são apresentados na Tabela 5. No que se refere à variável pH, destacou-se a elevação para 7,5 depois da ozonização, na água com pH inicial 7,0. Para esse tratamento, entretanto, observou-se redução do pH durante o armazenamento da água, sendo equivalente a 7,0 depois de 24 h. No que se refere ao potencial redox, verificou-se valores maiores que 1999 mV (limite máximo de equipamento) na água ozonizada com pH inicial 7,0 e armazenada por 24 h, a 7 °C. Por outro lado, foi possível observar redução do potencial redox durante o armazenamento da água, para os pH's iniciais de 8,2 e 4,0.

Destaca-se que a redução mais acentuada no potencial redox foi observada na água com pH inicial de 4,0.

Tabela 5. Valores médios de pH e potencial redox da água com diferentes pH's iniciais ozonizada e armazenada a 7 °C, por até 24 h

pH Inicial	Tempo de armazenamento (h)				
	0	6	12	18	24
pH					
8,2	8,3±0,05	8,3±0,05	8,2±0,05	8,2±0,08	8,2±0,05
7,0	7,5±0,05	7,4±0,05	7,5±0,05	7,1±0,05	7,0±0,05
4,0	3,8±0,05	3,8±0,05	3,8±0,08	3,9±0,08	3,9±0,05
Potencial redox (mV)					
8,2	> 1999,00*	> 1999,00	1272,00±0,82	1475,00±0,47	1323,00±0,82
7,0	> 1999,00	> 1999,00	> 1999,00	> 1999,00	> 1999,00
4,0	> 1999,00	1376,00±1,7	1163,00±0,47	1006,00±0,47	999,00±0,47

\* Dados estimados; limite máximo do equipamento – 1999 mV.

n = 3 repetições da amostra.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se a eficácia da água ozonizada com diferentes pH's iniciais e armazenada sob refrigeração (7 °C) por até 24 h, no controle de *L. monocytogenes*, além da decomposição do ozônio na água. A água ozonizada e armazenada a 7 °C, por até 24 h, se mostrou eficaz no controle de *L. monocytogenes*, sobretudo quando se adotaram os pH's iniciais de água de 7,0 e 8,2 (Tabela 2). Deve-se destacar os resultados obtidos para o pH inicial de 8,2, em que a contagem de *L. monocytogenes* foi inferior a 1,0 log UFC/mL, depois da exposição por 3 ou 6 min à água ozonizada armazenada por até 24 h. Para o pH inicial da água 7,0, resultados similares foram obtidos quando se adotou tempo de contato de 6 min para até 24 h de armazenamento da água ozonizada. Esses resultados indicam que é possível a utilização de água ozonizada nessas condições e armazenada a 7 °C, por até 24 h.

Diversos autores já relataram a eficácia do uso do ozônio sob os diferentes grupos de microrganismos, tais como fungos, bactérias e vírus (KIM et al., 1999; KHADRE et al., 2001; ALENCAR et al., 2012; FERREIRA et al., 2017; OLIVEIRA et

al., 2020; TIZAOUI, 2020), tanto expostos ao ozônio gasoso como à água ozonizada, Dentre as espécies de bactérias que já foram estudadas, destacam-se *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *L. innocua* e *L. monocytogenes* (BROADWATER et al., 1973; RESTAINO et al., 1995; SONG et al., 2015; COUTO et al., 2016; KORANY et al., 2018; GIBSON et al., 2019; SKOWRON et al., 2019; SOUZA et al., 2019; CHANG et al., 2020),

No que se refere à aplicação de ozônio em meio aquoso no controle de *L. monocytogenes*, alguns trabalhos realizados têm comprovado o efeito dessa técnica sobre a bactéria presente em biofilmes (ROBBINS et al., 2005; KORANY et al., 2018; MARINO et al., 2018) ou em alimentos (WADE et al., 2003; KIM et al., 2006; YUK et al., 2007). Entretanto, nessas pesquisas, a água foi utilizada imediatamente depois da ozonização, diferentemente da metodologia adotada no presente estudo.

A inativação dos microrganismos está associada a alterações na permeabilidade da membrana e integridade celular, podendo ocorrer a lise e conseqüentemente, comprometimento da viabilidade da célula microbiana (THANOMSUB et al., 2002). O ozônio é capaz de oxidar constituintes vitais, tais como ácidos graxos insaturados da membrana celular ou parede celular, além de elementos do conteúdo celular, como ácidos nucléicos e enzimas (PASCUAL et al., 2007; CULLEN et al., 2009),

É importante destacar, todavia, que a inativação de *L. monocytogenes* por água ozonizada se mostrou dependente do pH inicial (Tabela 2). Enquanto que para o pH inicial de 8,2 foi possível controlar satisfatoriamente *L. monocytogenes* com a água ozonizada e armazenada por até 24 h, a 7 °C, para os períodos de exposição de 3 e 6 min, a mesma eficácia não foi observada para a água com pH inicial 4,0. Para a água com pH inicial 4,0, o controle efetivo de *L. monocytogenes* foi possível somente quando se utilizou a água imediatamente depois da ozonização. Esse comportamento pode ser justificado pela redução mais acentuada da concentração do ozônio na água com pH inicial 4,0, durante o tempo de armazenamento a 7 °C (Figura 1 e Tabela 3). Além disso, para o pH inicial 4,0, observou-se redução expressiva do potencial redox durante o armazenamento da água ozonizada sob refrigeração (Tabela 5). É importante salientar que, de acordo com Jardim (2004), maior potencial redox na água

pode ser justificado pelas maiores concentrações de ozônio na água ozonizada armazenada sob refrigeração, quando se adotaram os pH's iniciais de 8,2 e 7,0.

Conforme mostrado na Figura 1, houve diferença expressiva na redução da concentração de ozônio na água quando se compararam as curvas referentes aos diferentes pH's iniciais. É importante mencionar que a decomposição do ozônio em meio aquoso é influenciada por diversos fatores, dentre os quais temperatura e pH, além de reagentes ou soluções tampão utilizados para atingir os diferentes pH's (GARDONI et al., 2012),

Ressalta-se que no presente estudo, a água ozonizada foi armazenada na temperatura de 7 °C, sendo que à medida que se reduz a temperatura, o processo de decomposição do ozônio na água se torna mais lento (HEWES e DAVIDSON, 1971; GARDONI et al., 2012). Dessa forma, a temperatura de armazenamento contribuiu para a decomposição mais lenta do ozônio na água.

Um fator que certamente contribuiu para acentuar as diferenças nas taxas de decomposição do ozônio na água e conseqüentemente nas meias vidas (Tabela 4) foram os compostos utilizados para ajustar os pH's iniciais na água, A decomposição mais acelerada do ozônio na água com pH inicial 4,0 justifica os resultados obtidos no que se refere ao controle de *L. monocytogenes* (Tabela 2). Para ajustar o pH 4,0 foi utilizado ácido cítrico, e para os pH's 7,0 e 8,2, utilizou-se bicarbonato de sódio.

A tendência observada no presente estudo no que se refere à decomposição do ozônio na água, para os pH's iniciais da água de 8,2 e 7,0, seguiu o indicado pelos relatos encontrados na literatura. Tem-se que à medida que se eleva o pH, a decomposição do ozônio na água é acelerada (STAEHELIN; HOIGNE 1985; HOIGNE, 1988; GARDONI et al., 2012). Essa tendência foi verificada quando se compararam as meias vidas do ozônio obtidas nas águas com pH 7,0 (1,08 h) e pH 8,2 (0,76 h). Por outro lado, a menor meia vida do ozônio foi obtida para a água com pH inicial de 4,0 (0,22 h). Esses resultados podem ser justificados pelo fato de se utilizar bicarbonato de sódio para ajustar os pH's da água de 7,0 e 8,2 (BELTRÁN, 2004; RODRIGUEZ et al., 2008),

Hoigné (1988) afirmou que o ozônio é mais estável em água contendo íons bicarbonato. Esses íons são classificados como inibidores, no que se refere ao mecanismo de decomposição do ozônio em meio aquoso (GARDONI et al., 2012). Ainda de acordo com esses autores, essas substâncias classificadas como inibidores

reagem com radical hidroxila ( $\text{OH}^*$ ), mas não convertem esses radicais em  $\text{O}_2^*/\text{OH}_2^*$  (radicais superóxidos). Por outro lado, para ajustar o pH da água em 4,0, utilizou-se ácido cítrico. Apesar de que Hirahara et al. (2019) afirmaram que o ácido cítrico pode prolongar a meia vida do ozônio em meio aquoso, os resultados obtidos no presente estudo indicaram maior meia vida na água com pH mais alto, ajustado com bicarbonato de sódio,

Outro fator que é importante ser destacado é que no presente estudo foi utilizada água do sistema de distribuição e classificada como potável, de acordo com a legislação brasileira. Em geral, água destilada foi utilizada nas pesquisas já realizadas e que apresentam certa similaridade metodológica com o presente estudo. De acordo com a legislação brasileira, para água tratada disponível no sistema de distribuição (reservatório e rede), são considerados os parâmetros, tais como, cor aparente ( $<15 \text{ mg Pt-Co/L}$ ) e turbidez ( $<5,0 \text{ NTU}$ ) (BRASIL, 2017),

## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que: i) o pH inicial da água afeta a eficácia da água ozonizada no controle de *L. monocytogenes*; ii) a água ozonizada com pH 4,0 não é efetiva para a inativação de *L. monocytogenes*, quando armazenada a  $7 \text{ }^\circ\text{C}$ , por período igual ou superior a 6 h; é viável a utilização de água ozonizada armazenada a  $7 \text{ }^\circ\text{C}$ , por até 24 h, para inativação de *L. monocytogenes*, quando adotados pH's iniciais 7,0 e 8,2, ajustados com bicarbonato de sódio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D.; SOARES, N. F. F. SILVA, W. A.; CARVALHO, M. C. S. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 899-905, 2012.

ALWI, N. A.; ALI, A. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. Typhimurium populations on fresh-cut bell pepper using gaseous ozone. **Food Control**, v. 46, p. 304-311, 2014.

BELTRÁN, F. J. **Ozone Reaction Kinetics for Water and Wastewater Systems**. 1st ed., Boca Raton: CRC Press., 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019**. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Publicado em: 26/12/2019 no DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO.

BROADWATER, W. T.; HOEHN, R. C.; KING, F. H. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. **Appl. Microbiol**, v. 26, p. 391–393, 1973.

CAMARGO, A. C.; WOODWARD, J. J.; CALL, D. R.; NERO, L. A. *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the brazilian scenario. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.14, n.11, p. 623-636, 2017.

CHANG, R.; PANDEY, P.; Li, Y.; VENKITASAMY, C.; CHEN, Z.; GALLARDO, R.; WEIMER, B.; JAY-RUSSELL, M.; WEIMER, B. Assessment of gaseous ozone

treatment on *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 reductions in poultry litter. **Waste Management**, v. 117, p. 42-47, 2020.

COELHO, C. C. de S.; SILVA-FREITAS, O.; CAMPOS, R. da S.; BEZERRA, V. S. CABRAL, L. M. C. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 4 p. 369-375, 2015.

COUTO, E. P.; ALENCAR, E. R.; GONÇALVES, V. S. P.; SANTOS, A. J. P.; RIBEIRO, J. L.; FERREIRA, M. A. Effect of ozonation on the *Staphylococcus aureus* inoculated in milk. **Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 1911-1918, 2016.

CULLEN, P. J.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 3-4, p. 125-136, 2009.

DYGICO, L. K.; GAHAN, C. G. M.; GROGAN, H.; BURGESS, C. M. The ability of *Listeria monocytogenes* to form biofilm on surfaces relevant to the mushroom production environment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 16, p. 1-50, 2019.

EVRENDILEK, G.; OZDEMIR, P. Effect of various forms of non-thermal treatment of the quality and safety in carrots. **LWT - Food Science and Technology**, v. 105, p. 344-354, 2019.

FERREIRA, W. F. de S.; ALENCAR, E. R.; ALVES, H.; RIBEIRO, J. L.; SILVA, C. R. Influence of pH on the efficacy of ozonated water to control microorganisms and its effect on the quality of stored strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 6, p. 692-700, 2017.

FERREIRA, W. F. de S.; ALENCAR, E. R.; BLUM, L. E. B.; FERREIRA, M. A.; MENDONÇA, M. A.; RACANICCI, A. M. C.; URRUCHI, W. M. I. Ozonation of brazil nuts in aqueous media at different pH levels: ozone decomposition, *Aspergillus flavus* inactivation, and effects on nut color and crude oil lipid profile. **Ozone: Science & Engineering**, v. 43, p. 1-12, 2021.

GARDONI, D.; VAILATI, A.; CANZIANI, R. Decay of Ozone in Water: A Review. **Ozone Science and Engineering**, v.34 n.4 p. 233-242, 2012.

GIBSON, K. E.; ALMEIDA, G.; JONES, S. L.; WRIGHT, K.; LEE, J. A. Inactivation of bacteria on fresh produce by batch wash ozone sanitation. **Food Control**, 106, 2019,

HEWES, C. G.; DAVISON, R. R. Kinetics of ozone decomposition reaction with organics in water. **AIChE Journal**, v. 17, n. 1, p. 141-147, 1971.

HIRAHARA, Y.; IWATA, K.; NAKAMURO, K. Effect of citric acid on prolonging the half-life of dissolved ozone in water. **Food Safety**, v. 7, n. 4, p. 90–94, 2019.

HOIGNÉ, J. 1988. The chemistry of ozone in water. in: **Process Technologies for Water Treatment**, Earlier Brown Boveri Symposia, Springer, Boston, MA.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; KHADRE, M. A. Ozone and its current and future application in the food industry. **Advances in Food & Nutrition Research**, v. 45, p. 167-218, 2003.

KIM, B. S.; KWON, J. Y.; KWON, K. H.; CHA, H. S.; JEONG, J. W.; KIM, G.H. Antimicrobial effect of cold ozonated water washing on fresh-cut lettuce. **Acta Horticulturae**, v.699, p. 235-242, 2006.

KORANY, A. M.; HUA, Z.; GREEN, T.; HANRAHAN, I.; EL-SHINAWY, S. H.; EL-KHOLY A.; HASSAN, G.; ZHU, M. Efficacy of ozonated water, chlorine, chlorine dioxide, quaternary ammonium compounds and peroxyacetic acid Against *Listeria monocytogenes* biofilm on polystyrene surfaces. **Front Microbiol**, v.12 p.1-10, 2018.

MARINO, M. MAIFRENI, M. BAGGIO, A.; INNOCENTE, N. Inactivation of Foodborne Bacteria Biofilms by Aqueous and Gaseous Ozone. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-12, 2018.

NALÉRIO, É. S.; ARAÚJO, M. R.; MENDONÇA, K. S.; BASSANI, M. T.; SILVA, W.P. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29 n. 3, p. 626-630, 2009.

de OLIVEIRA, J. M.; de ALENCAR, E. R.; BLUM, L. E. B.; FERREIRA, W. F. S.; BOTELHO, S. C. C.; RACANICCI, A. M. C.; SANTOS, E. L.; MENDONÇA, M. A.; MOSCON, E. S.; BIZERRA, L. V. A. S.; da SILVA, C.R. Ozonation of Brazil nuts: decomposition kinetics, control of *Aspergillus flavus* and the effect on color and on raw oil quality. **LWT-Food Science and Technology**, v. 123, 2020.

PASCUAL, A.; LLORCA, I.; CANUT, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 29-35, 2006.

RESTAINO, L.; FRAMPTON, E. W.; HEMPHILL, J. B.; PALNIKAR, P. Efficacy of Ozonated Water against Various Food-Related Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.9, p. 3471–3475, 1995.

RIPOLLES-AVILA, C.; RAMOS-RUBIO, M.; HASCOËT, CASTILLO, A. S. M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. New approach for the removal of mature biofilms formed by wild strains of *Listeria monocytogenes* isolated from food contact surfaces in an Iberian pig processing plant. **International Journal of Food Microbiology**, v. 323. p. 1-9, 2020.

RODRÍGUEZ, A. R.; ROSAL, J. A.; PERDIGÓN-MELÓN, M.; MEZCUA, A.; AGÜERA, M. D.; HERNANDO, P.; LETÓN, A. R.; FERNÁNDEZ-ALBA.; GARCÍA-CALVO, E. “Ozone-based technologies in water and wastewater treatment.” In **The Handbook of Environmental Chemistry**, edited by D. Barceló and A. Kostianoy, 127–75. Berlin: Springer. 2008.

SÃO JOSÉ, J. F. B. Estratégias na higienização de frutas e hortaliças. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 40, n. 3, p. 630-640, 2017

SILVA, H. R.; GIANOGLU, F. M.; CAMPOS, M. F.; GRACIANO, E. M. A.; TOLEDO, R. C. C. Listeriose: uma doença de origem alimentar pouco conhecida no Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 30, n. 262/263, p. 17-20, 2016.

SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. de M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Ciências Agrárias**, 32(2):659-682. 2011.

SKOWRON, K.; WAŁECKA-ZACHARSKA, E.; GRUDLEWSKA, K.; BIAŁUCHA, A.; WIKTORCZYK, N.; BARTKOWSKA, A.; KOWALSKA, M.; KRUSZEWSKI, S.; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E. Biocidal Effectiveness of Selected Disinfectants Solutions Based on Water and Ozonated Water against *Listeria monocytogenes* Strains. **Microorganisms**, v. 7, n. 127, p. 1-18, 2019.

SONG, W. J.; SHIN, J. Y., RYU, S.; KANG, D. H. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in apple juice at different pH levels by gaseous ozone treatment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 2, p. 465-474, 2015.

SOUZA, S. M. de O.; de ALENCAR, E. R.; RIBEIRO J. L.; FERREIRA, M. A. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by ozone in different substrates. **Braz J Microbiol.**, v. 50, n. 1, p. 247-253, 2019.

STAEHELIN, J.; HOIGNÉ, J. "Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions." **Environmental Science and Technology**, v. 19, n. 12, p. 1206–13. 1985.

THANOMSUB, B.; ANUPUNPISIT, V.; CHANPHETCH. S.; WATCHARACHAIPONG, T.; POONKHUM, R.; SRISUKONTH, C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.48, n.4, p.193-199, 2002.

VALLIM, D.C.; HOFER, C.B.; LISBÔA, R. C.; BARBOSA, A. V.; RUSAK, C. M. F. dos R.; HOFER, E. Twenty years of *Listeria* in Brazil: Occurrence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* Serovars in food samples in Brazil between 1990 and 2012. **BioMed Research International**, 2015:1-8. 2015.

WADE, W. N.; SCOUTEN, A. J.; MCWATTERS, K. H.; WICK, R. L.; DEMIRCI, A.; FETT, W. F.; BEUCHAT, L. R. Efficacy of ozone in killing *Listeria monocytogenes* on alfalfa seeds and sprouts and effects on sensory quality of sprouts. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 1, p. 44-51, 2003.

WRIGHT, M.R. **An Introduction to Chemical Kinetics**, 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons. 441 p. 2004.

TIZAOUI, C. Ozone: A Potential Oxidant for COVID-19 Virus (SARS-CoV-2). **Ozone: Science & Engineering**, p. 1-9, 2020.

ZHANG, Y. Q.; WU, Q. P.; ZHANG, J. M.; YANG, X. H. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 1006-1015, 2011.

YUK, Hyun-Gyun, YOO, Mee-Young, YOON, Jae-Won, MARSHALL, D. L.; OH, Deog-Hwan. Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on enoki mushroom. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 548-553, 2007.

## CAPÍTULO II

### ÁGUA OZONIZADA ARMAZENADA SOB REFRIGERAÇÃO NA INATIVAÇÃO DE *Salmonella* Typhimurium

# ÁGUA OZONIZADA ARMAZENADA SOB REFRIGERAÇÃO NA INATIVAÇÃO DE *Salmonella* Typhimurium

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a eficácia da água ozonizada no controle de *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 14028), adotando-se diferentes combinações de pH, tempo de contato e tempo de armazenamento sob refrigeração. Utilizou-se água com pH's de 6,0, 6,2, 7,0 e 8,2 e armazenada a 7 °C. Para a obtenção da água ozonizada, adotou-se concentração de entrada do gás de 30 mg L<sup>-1</sup> e uma vazão de 0,5 L min<sup>-1</sup>, por 15 min. Os tempos de armazenamento da água ozonizada avaliados foram 0, 6, 12, 18 e 24 h. A cinética de decomposição do ozônio foi avaliada. Os tempos de contato de *Salmonella* Typhimurium com a água ozonizada foram 3 e 6 min. A água com pH 7,0 apresentou o menor tempo de meia vida do ozônio que foi de 3,84 h (230,4 min) e a água com pH de 6,0 apresentou a maior meia vida de 7,50 h (450 min). Em geral a água ozonizada e armazenada a 7 °C se mostrou eficaz no controle de *Salmonella* Typhimurium, sobretudo nos valores de pH da água de 8,2 e 7,0. Conclui-se que o pH inicial da água afeta a eficácia da água ozonizada no controle de *Salmonella* Typhimurium. Além disso, pode-se afirmar que é viável a utilização da água ozonizada armazenada a 7 °C, por até 24 h, na inativação de *Salmonella* Typhimurium, quando adotados pH's iniciais de 7,0 e 8,2.

**Palavras-chave:** Ozonização; *Salmonella* Typhimurium; Inativação Bacteriana; Efeito do pH; Concentração de ozônio.

OZONATED WATER STORED UNDER REFRIGERATION IN INACTIVATION OF  
*Salmonella* Typhimurium

**ABSTRACT**

The present study aimed to verify the effectiveness of ozonated water regarding the control of *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 14028), adopting different pH, contact time and storage time combinations, under refrigeration. Waters with pH's of 6.0, 6.2, 7.0 and 8.2 and stored at 7 °C were used. To obtain the ozonated water, a gas inlet concentration of 30 mg L<sup>-1</sup> and flow rate of 0,5 L min<sup>-1</sup> was used for 15 min. The storage times of the ozonated water evaluated were 0, 6, 12, 18 and 24 h. The kinetics of ozone decomposition was evaluated. The contact times of *Salmonella* Typhimurium with the ozonated water were 3 and 6 min. Water with pH 7.0 had the shortest half-life of ozone, which was 3.84h (230.4 min) and water with pH 6.0 had the longest half-life of 7.50 h (450 min). In general, ozonated water stored at 7 °C proved to be effective in controlling *Salmonella* Typhimurium, especially in pH of 8.2 and 7.0 waters. It is concluded that the initial pH of the water affects the effectiveness of the ozonated water in controlling *Salmonella* Typhimurium. In addition, it can be said that it is feasible to use ozonated water stored at 7 °C for up to 24 hours aiming the inactivation of *Salmonella* Typhimurium when initial pH's of 7.0 and 8.2 are adopted.

**Keywords:** Ozonation; *Salmonella* Typhimurium; Bacterial Inactivation; pH effect; ozone concentration.

## 1. INTRODUÇÃO

*Salmonella* spp. é um dos mais importantes patógenos de origem alimentar, são bactérias Gram-negativas e não formadoras de esporos. *Salmonella* Typhimurium é o sorotipo mais frequentemente isolado, representando aproximadamente 35% dos isolados humanos relatados. A *Salmonella* Typhimurium é um dos principais sorovares generalistas, frequentemente isolado de carnes suína, bovina, aves e pescados em todos os continentes (NGUYEN et al., 2014).

No Brasil, a *Salmonella* tem sido o primeiro ou segundo patógeno mais isolados em casos de surtos de doenças de origem alimentar (SERIBELLI et al., 2021). O CDC (Centers for Disease Control and Prevention) estima que ocorrem anualmente nos Estados Unidos 1,35 milhões de infecções, com 26.500 internações e 420 mortes devido a ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella* (CDC 2016). A maioria dos casos de gastroenterites ocorrem sem necessidade de hospitalizações e frequentemente sem a identificação do agente causal, o que leva a acreditar que os casos de salmoneloses em seres humanos sejam subestimados, sendo a subnotificação de casos de surtos de doenças de origem alimentar um problema mundial (SHINOHARA et al., 2008).

Embora seu hábitat primário, seja o trato intestinal de animais, homens e até insetos, ocasionalmente, a *Salmonella* pode ser encontrada em outras partes do corpo. As células são excretadas pelas fezes e podem ser transmitidas para um grande número de locais. Quando alimentos ou águas contaminadas são consumidos por humanos e animais estes microrganismos são novamente eliminados com as fezes dando continuidade ao ciclo desta espécie na natureza (FAÚLA; SOARES e DIAS, 2015),

A infecção é causada pela ingestão de alimentos que contenham números elevados de células, em torno de  $10^7$  a  $10^9$  células/g, embora existam relatos de salmoneloses provocadas pela ingestão de alimentos com 100 a 15.000 células/g. Os sintomas surgem entre 12 a 14 h e consistem em náuseas, vômitos, dores abdominais, cefaleia, calafrios e diarreia. A severidade da doença é dependente da espécie e do indivíduo afetado, sendo crianças, idosos e imunodeprimidos mais sensíveis (CARNEIRO et al., 2015).

Além da patogenicidade a *Salmonella* também tem habilidade de formar biofilmes nos locais de processamento de alimentos nas indústrias alimentícias. Estes biofilmes podem diferentes problemas no ambiente de processamento e se torna uma permanente fonte de contaminação dos alimentos por espécies patogênicas como a *Salmonella* (NGUYEN e YUK, 2013; PANEBIANCO; RUBIOLA e DI CICCIO, 2022). Biofilmes é um complexo ecossistema microbiano formado por uma ou mais espécies em função do tipo de indústria e os componentes presentes nestas estruturas ajuda na adesão à superfície e contribui para que os microrganismos presentes nos biofilmes tenham uma alta persistência e resistências aos agentes sanificantes normalmente utilizados (GALIÉ et al., 2018; PANEBIANCO; RUBIOLA e DI CICCIO, 2022).

Diante do aumento da resistência dos microrganismos presentes em biofilmes aos sanificantes tradicionalmente utilizados em indústrias, alternativas para a prevenção e eliminação dos biofilmes tem sido pesquisadas e o ozônio (potente oxidante), tem se mostrado um agente químico com uma alta eficiência na inativação de diferentes microrganismos, incluindo aqueles presentes em biofilmes (GALIÉ et al., 2018; PANEBIANCO; RUBIOLA e DI CICCIO, 2022).

Tendo em vista a patogenicidade das espécies do gênero *Salmonella*, é fundamental que sejam utilizados métodos de inativação desses microrganismos. Dentre os métodos tradicionais de inativação dos microrganismos, destaca-se o uso de compostos clorados (SHINOHARA, et al., 2008; SILVA et al., 2011; NATH et al., 2014). No entanto, os compostos clorados podem formar resíduos que são prejudiciais à saúde, tais como: trihalometanos, ácidos haloacéticos, compostos organoclorados e diminuição da eficiência sob alguns microrganismos (SÃO JOSÉ, 2017). Como alternativa a esse método, tem-se a ozonização, que tem sido testada para inativação de microrganismos em alimentos de origem animal, vegetal, sanitização de equipamentos, dentre outros (KIM, YOUSEF e DAVE, 1999; SILVA et al., 2011). O ozônio é considerado um sanitizante ecologicamente correto, pois se decompõem em produtos atóxicos, não deixando resíduos em alimentos e superfícies e apresenta baixo impacto ambiental (PANEBIANCO; RUBIOLA e DI CICCIO, 2022).

O ozônio se destaca pelo seu elevado potencial oxidativo (2,07 mV), apresentando comprovada eficácia na inativação de bactérias, fungos, vírus, parasitas

além de inativação de toxinas e moléculas de defensivos agrícolas (SILVA et al., 2011; NATH et al., 2014; KAAVYA et al., 2021). O ozônio pode ser utilizado na forma gasosa ou em meio aquoso, destacando-se pela sua instabilidade e degradação em composto não tóxico, que é o oxigênio (KIM, YOUSEF e DAVE, 1999; NATH et al., 2014). Em meio aquoso, algumas variáveis são importantes para a instabilidade do ozônio, tais com pH, temperatura e presença de matéria orgânica (KIM, YOUSEF e DAVE, 1999; SILVA et al., 2011).

Apesar de serem encontrados na literatura diversos relatos sobre o uso do ozônio no controle de microrganismos em meio aquoso, em geral os estudos são restritos ao uso da água imediatamente depois da ozonização. Há somente um relato em que foi avaliado o efeito de água ozonizada e armazenada sob refrigeração no controle de *Listeria monocytogenes*, bactéria Gram-positiva, realizado por Rezende et al. (2021). Diante do exposto, objetivou-se com esse estudo determinar a eficácia da água ozonizada e armazenada sob refrigeração na inativação de *Salmonella* Typhimurium, em função de diferentes combinações de pH da água, tempo de armazenamento e tempo de contato.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Cepa bacteriana e preparação do inóculo**

Foi utilizada cepa de *Salmonella* Typhimurium (ATCC<sup>®</sup> 14028), proveniente da coleção do Laboratório de Análise de Leite e Derivados armazenada a -80 °C. Três tubos eppendorfs estéreis contendo uma mistura de 30% de glicerol e 70% de Caldo Trypticase Soja (TSB, pH 7,3 ± 0,2) foram inoculados por esgotamento de alça de 10 µL com a cepa de *Salmonella* Typhimurium. Estes tubos foram acondicionados em caixa de fibra de papelão armazenada a -80 °C e usada exclusivamente para este estudo. As células foram reativadas em caldo TSB a 37 °C, por 24 h.

Após a montagem da coleção da cepa de *Salmonella* Typhimurium para este estudo o preparo do inóculo foi realizado conforme o descrito em 2.1 do Capítulo I.

### **2.2 Geração do gás ozônio e obtenção da água ozonizada**

O gás ozônio foi produzido por um gerador com concentrador de oxigênio acoplado (Modelo O&L 3,0-O2-RM, da Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil), que produz o gás baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica (DBD). A concentração de entrada do gás foi de 30 mg L<sup>-1</sup> e vazão de 0,5 L min<sup>-1</sup>.

Para a obtenção da água ozonizada procedeu-se como o descrito no item 2.2 do Capítulo I. Ressalta-se que no presente estudo foi utilizada água destilada em substituição à água da rede de abastecimento. Adotaram-se quatro valores de pH da água para a ozonização: 6,0, 6,2, 7,0 e 8,2. Para ajustar o pH da água em 6,0, utilizou-se ácido cítrico p.a. (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) e bicarbonato de sódio p.a. (NaHCO<sub>3</sub>) para ajustar os pH's da água para 7,0 e 8,2.

### 2.3 Avaliação da água ozonizada com diferentes pH's iniciais na inativação de *Salmonella* Typhimurium

Para a avaliação da eficácia do ozônio dissolvido na água no controle de *Salmonella* Typhimurium, alíquotas de 1,0 mL da suspensão com aproximadamente 3,0 x10<sup>4</sup> UFC/mL foram transferidas para tubos contendo 9,0 mL de água ozonizada, nas diferentes combinações de pH (6,0, 6,2, 7,0 e 8,2) e tempo de armazenamento (0, 6, 12, 18 e 24 h) da água. Para a contagem de *Salmonella* Typhimurium, utilizou-se plaqueamento em superfície em Ágar *Salmonella Shigella* (Marca KASVI, Espanha) de uma alíquota de 0,1 mL. O procedimento de homogeneização, inoculação e incubação foi realizado como o descrito no item 2.3 do Capítulo I.

### 2.4 Determinação da concentração residual do ozônio na água com diferentes pH's iniciais e cinética de decomposição

A determinação da concentração residual de ozônio foi realizado conforme descrito no item 2.4 do Capítulo I. Neste estudo, os dados de concentração residual do ozônio na água, ajustou-se aos modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem (WRIGHT, 2004). As equações diferenciais, as equações integradas e linearizadas referentes aos três modelos e respectivas meia-vidas, apresentam-se na Tabela 1.

Tabela 1. Modelo de cinética de decomposição de ordem 1 e respectiva equação integrada e linearizada e respetiva meia-vida

Ordem	Equação		Meia-vida
	Diferencial	Equação Integrada e Linearizada	
0	$\frac{dC}{dt} = -k$	$C = C_0 - kt$	$t_{1/2} = \frac{C_0}{2k}$
1	$\frac{dC}{dt} = -kC$	$\ln C = \ln C_0 - kt$	$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$
2	$\frac{dC}{dt} = -kC^2$	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$	$t_{1/2} = \frac{1}{kC_0}$

C = concentração de O<sub>3</sub> (mg L<sup>-1</sup>); t = tempo (h); k = constante da taxa de decomposição; e; C<sub>0</sub> = Concentração inicial de O<sub>3</sub> (mg L<sup>-1</sup>).

## 2.5 Procedimento experimental

Adotou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado, com três repetições. Na avaliação da eficácia da água ozonizada no controle de *Salmonella* Typhimurium, adotou-se esquema fatorial 8 x 2 x 5, sendo oito tratamentos (água ozonizada com os pH's 6,0, 6,2, 7,0 e 8,2, e os respectivos controles), dois tempos de contato (3,0 e 6,0 minutos) e cinco tempos de armazenamento (0, 6, 12, 18 e 24 h), além de estatística descritiva na análise dos dados. Para a obtenção das equações de regressão e plotagem dos gráficos referentes à cinética de decomposição do ozônio na água, utilizou-se o Software SigmaPlot v.10 (Systat Software Inc., Alemanha).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Contagem de *Salmonella* Typhimurium em função de diferentes combinações de pH inicial e tempo de armazenamento da água ozonizada e tempo de contato

Os valores médios (log UFC mL<sup>-1</sup>) da contagem de *Salmonella* Typhimurium após a exposição a água ozonizada (3 e 6 min) ajustada a diferentes valores de pH, armazenada por até 24 h sob refrigeração a 7 °C são apresentados na Tabela 2. As menores contagens de *Salmonella* Typhimurium (Tabela 2) foram obtidas, sobretudo nas águas ozonizadas com pH's ajustados com bicarbonato de sódio (8,2 e 7,0). Nestes valores de pH, obteve-se contagem inferior a 1,0 log UFC mL<sup>-1</sup>. Esses resultados indicaram redução superior a 2,0 ciclos log na contagem da *Salmonella* Typhimurium.

Nos tratamentos controle, considerando todos os valores de pH, combinações de período de armazenamento e tempo de contato, foram obtidas contagens igual ou superior a 3,10 log UFC mL<sup>-1</sup>. Reduções inferiores a 1,0 log UFC mL<sup>-1</sup> foram encontradas quando se adotou os pH's iniciais de 6,2 (sem ajuste) e 6,0 (ajustado com ácido cítrico).

Tabela 2. Contagem de *Salmonella* Typhimurium (log UFC/mL) exposta a água ozonizada com diferentes pH's armazenada a 7 °C, por até 24 h, em diferentes tempos de contato

Tempo de armazenamento (h)	Tempo de contato (min)			
	3,0		6,0	
	Controle	Água ozonizada	Controle	Água ozonizada
pH 8,2				
0	3,49 ± 0,06	<1,0*	3,57 ± 0,02	<1,0*
6	3,37 ± 0,03	<1,0*	3,43 ± 0,02	<1,0*
12	3,23 ± 0,05	<1,0*	3,35 ± 0,05	<1,0*
18	3,31 ± 0,01	<1,0*	3,36 ± 0,04	<1,0*
24	3,24 ± 0,03	<1,0*	3,24 ± 0,01	<1,0*
pH 7,0				
0	3,41 ± 0,00	<1,0*	3,39 ± 0,01	<1,0*
6	3,36 ± 0,04	<1,0*	3,42 ± 0,04	<1,0*
12	3,38 ± 0,01	<1,0*	3,38 ± 0,02	<1,0*
18	3,39 ± 0,02	<1,0*	3,42 ± 0,02	<1,0*
24	3,29 ± 0,03	<1,0*	3,33 ± 0,03	<1,0*
pH 6,2				
0	3,38 ± 0,02	<1,0*	3,44 ± 0,01	<1,0*
6	3,39 ± 0,02	<1,0*	3,40 ± 0,01	<1,0*
12	3,37 ± 0,01	<1,0*	3,39 ± 0,01	<1,0*
18	3,37 ± 0,01	2,22 ± 0,09	3,35 ± 0,01	2,09 ± 0,06
24	3,37 ± 0,02	2,59 ± 0,04	3,37 ± 0,02	2,53 ± 0,05
pH 6,0				
0	3,12 ± 0,08	<1,0*	3,10 ± 0,10	<1,0*
6	3,38 ± 0,02	<1,0*	3,40 ± 0,02	<1,0*
12	3,49 ± 0,01	<1,0*	3,49 ± 0,04	<1,0*
18	3,48 ± 0,04	<1,0*	3,50 ± 0,02	<1,0*
24	3,41 ± 0,03	2,73 ± 0,04	3,47 ± 0,01	2,73 ± 0,03

\* Dados estimados.

### 3.2 Concentração residual do ozônio na água com diferentes pH's iniciais e cinética de decomposição a 7 °C

Na Figura 2, são apresentadas as curvas de regressão referentes às concentrações residuais do ozônio na água com diferentes pH's iniciais e armazenadas por 24 h, a 7 °C. Verificou-se redução da concentração residual do ozônio, sendo essa tendência menos acentuada na água com pH inicial de 6,0, ajustado com ácido cítrico. Apresentam-se na Tabela 3, as equações de regressão para concentração residual de ozônio na água ozonizada com diferentes pH's iniciais e armazenada por 24 h, a 7 °C e os respectivos coeficientes de determinação.

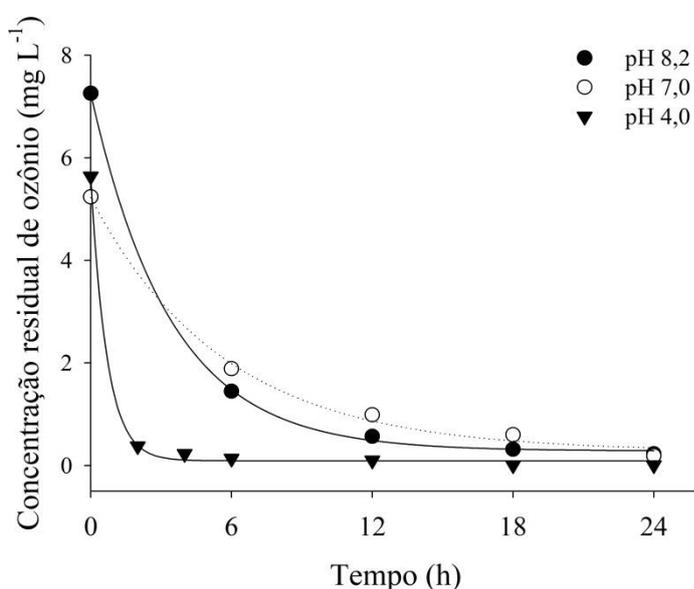


Figura 2. Curvas de regressão de concentração residual do ozônio (mg L<sup>-1</sup>) em água com diferentes pH's iniciais e armazenadas por 24 h, a 7 °C.

Tabela 3. Equações de regressão e respectivos coeficientes de determinação para concentração residual do ozônio do ozônio (mg L<sup>-1</sup>) em água com diferentes pH's iniciais e armazenadas por 24 h, a 7 °C

pH inicial	Equações de regressão	R <sup>2</sup>	EPE
6,2 (sem ajuste)	$\hat{y} = 5,5337e^{(-0,1499^* x)}$	0,99	0,1788
6,0 (ajustado ácido cítrico)	$\hat{y} = 7,2566e^{(-0,0788^* x)}$	0,98	0,4400
7,0 (ajustado bicarbonato de sódio)	$\hat{y} = 5,4413e^{(-0,2315^* x)}$	0,99	0,1183
8,2 (ajustado bicarbonato de sódio)	$\hat{y} = 6,7072e^{(-0,2068^* x)}$	0,99	0,3715

EPE – Erro padrão da estimativa

n – três repetições

\* Significativo a 5% de probabilidade

Na Tabela 4 são apresentadas as equações de regressão para concentração residual de ozônio referentes aos modelos de cinéticos de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem, considerando-se diferentes pH's, combinações de período de armazenamento e tempo de contato.

O modelo cinético de primeira ordem foi o que apresentou melhor ajuste aos dados de concentração residual do ozônio, nas diferentes condições, considerando-se o coeficiente de determinação. Na Figura 3, tem-se as curvas de regressão referentes ao modelo cinético de primeira ordem para concentração residual do ozônio.

Tabela 4. Modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem e respectivos coeficientes de determinação, para concentração residual do ozônio (mg L<sup>-1</sup>) em águas com diferentes pH's iniciais e armazenadas por 24 h, a 7 °C

pH inicial	Ordem	Equações de regressão	R <sup>2</sup>	EPE	Meia-vida (h)
6,2 (sem ajuste)	0	$\hat{y} = 4,3133 - 0,2017*x$	0,78	1,1861	13,83
	1	$\hat{y} = 1,5455 - 0,1190*x$	0,97	0,2245	5,82
	2	$\hat{y} = -0,0955 + 0,1219*x$	0,94	0,3217	1,47
6,0 (ajustado ácido cítrico)	0	$\hat{y} = 6,6400 - 0,2659*x$	0,96	0,5804	13,31
	1	$\hat{y} = 2,0658 - 0,0923*x$	0,97	0,1747	7,50
	2	$\hat{y} = -0,0018 + 0,0436*x$	0,89	0,1650	3,24
7,0 (ajustado bicarbonato de sódio)	0	$\hat{y} = 3,8740 - 0,1995^{ns}x$	0,69	1,4528	13,66
	1	$\hat{y} = 1,5264 - 0,1807*x$	0,98	0,2222	3,84
	2	$\hat{y} = -0,3297 + 0,2585*x$	0,91	0,7932	0,71
8,2 (ajustado bicarbonato de sódio)	0	$\hat{y} = 4,8400 - 0,2358*x$	0,68	1,7590	14,33
	1	$\hat{y} = 1,5882 - 0,1286*x$	0,95	0,3151	4,82
	2	$\hat{y} = -0,1739 + 0,1437x$	0,94	0,4018	1,03

EPE – Erro padrão da estimativa

n – três repetições

\* Significativo a 5% de probabilidade

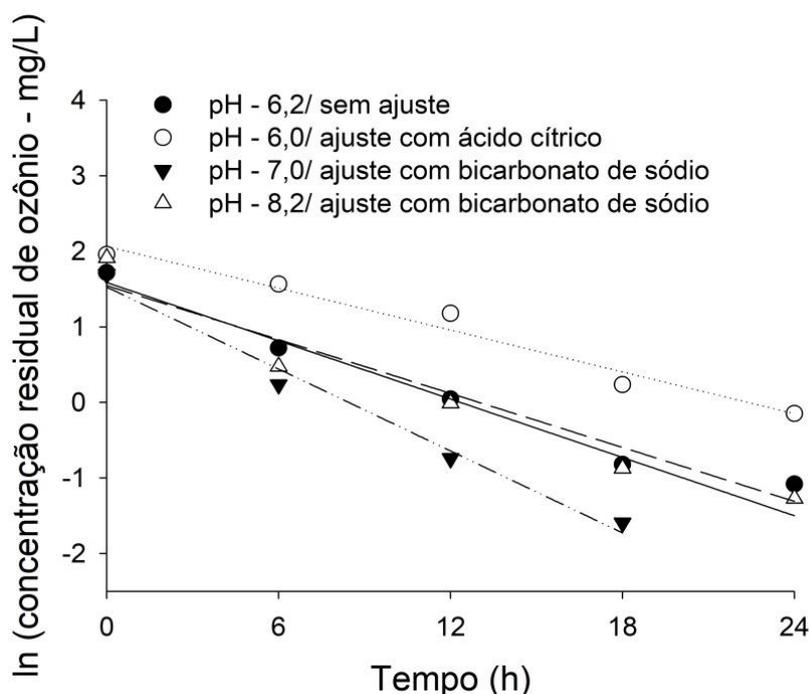


Figura 3. Curvas de regressão referentes ao modelo cinético de primeira ordem para concentração residual do ozônio do ozônio ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em água com diferentes pH's iniciais e armazenadas por 24 h, a  $7^\circ\text{C}$ .

A maior meia vida foi obtida na água onde se adotou o pH inicial de 6,0 (ajustado com ácido cítrico), sendo equivalente a 7,50 h (450 min) (Tabela 4). Por outro lado, a menor meia vida do ozônio foi verificada na água em que se adotou pH inicial de 7,0 (ajustado bicarbonato de sódio), sendo igual a 3,84 h (230,4 min).

É importante mencionar que para os cálculos de meia vida referentes aos modelos de ordem zero e de segunda ordem, foram consideradas as concentrações iniciais do ozônio obtidas e equivalentes a 5,58, 7,08, 5,45 e  $6,76 \text{ mg L}^{-1}$ , para os pH's iniciais da água de 6,0, 6,2, 7,0 e 8,2, respectivamente.

### 3.3 pH e potencial redox da água ozonizada com diferentes pH's iniciais e armazenadas a $7^\circ\text{C}$

Na Tabela 5 são apresentados os valores médios do pH e do potencial redox das águas ozonizadas, considerando todos os valores de pH e período de armazenamento à  $7^\circ\text{C}$  por até 24 h. Verificou-se elevações nos valores de pH para 7,6 e 6,7, nas águas com pH's iniciais de 7,0 e 6,2, respectivamente, imediatamente após a ozonização. Verificou-se valores de pH iguais a 7,0 e 6,0 para as águas com

pH inicial de 7,0 e 6,2, respectivamente, após 24h de armazenamento refrigerado. No que se refere ao potencial redox, verificou-se valores maiores do que 1999 mV (limite máximo do equipamento) em todas as amostras de águas logo após a ozonização. Em geral, houve redução do potencial redox da água submetida a ozonização durante o armazenamento a 7 °C, exceto quando se adotou pH inicial de 6,0 (ajustado com bicarbonato de sódio). Nessa condição, o potencial redox da água permaneceu maior que 1999 mV.

Tabela 5. Média dos valores de pH e potencial redox de água ozonizada com diferentes valores de pH iniciais armazenadas por até 24 h

pH inicial	Tempo de armazenamento (h)				
	0	6	12	18	24
pH					
8,2	7,9 ± 0,1	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1	8,1 ± 0,1	8,1 ± 0,1
7,0	7,6 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1
6,2	6,7 ± 0,1	6,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1
6,0	5,7 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1
Potencial redox (mV)					
8,2	>1999*	>1999*	>1999*	1442 ± 0,1	1323 ± 1,4
7,0	>1999*	>1999*	1881 ± 0,5	1712 ± 0,1	1501 ± 0,5
6,2	>1999*	>1999*	>1999*	1941 ± 0,1	1883 ± 0,1
6,0	>1999*	>1999*	>1999*	>1999*	>1999*

\* Dados estimados; limite máximo do equipamento – 1999 mV.

n = 3 repetições da amostra.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se a eficácia da água ozonizada com diferentes pH's iniciais e armazenada sob refrigeração (7 °C) por até 24 h, no controle de *Salmonella* Typhimurium, além da cinética de decomposição do gás ozônio na água. As águas ozonizadas e armazenadas a 7 °C, por até 24 h, apresentaram eficácia na inativação de células de *Salmonella* Typhimurium, sobretudo nos tratamentos com as águas com pH's iniciais de 8,2 e 7,0 (Tabela 2). Destaca-se que os valores na contagem de *Salmonella* Typhimurium permaneceram abaixo de 1,0 log UFC/mL nestes tratamentos, independentemente do tempo de exposição (3 ou 6 min). Esses resultados são similares aos obtidos por Rezende et al. (2021) que determinaram a eficácia da água ozonizada e armazenada sob refrigeração no controle de *Listeria monocytogenes*, em função do pH. Esses autores verificaram maior eficácia quando adotaram pH inicial da água de 8,2 e 7,0. Ressalta-se que no presente estudo foi utilizada água destilada, diferentemente da pesquisa realizada por Rezende et al. (2021) que utilizaram água da rede de distribuição, que possuía cloro residual livre.

A capacidade do ozônio de inativar microrganismos pode ser explicada pela ação desse gás na membrana e na parede celular, ocasionando alterações na permeabilidade dessas estruturas e podendo provocar lise celular, e conseqüentemente extravasamento do conteúdo celular (THANOMSUB et al., 2002; KIM et al., 1999). Diversos autores já comprovaram o potencial do ozônio de inativar bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, formas vegetativas e esporuladas (KIM et al., 1999; KHADRE et al., 2001; SILVA et al., 2011; PHAEPHIPHAT e MAHAKARNCHANAKUL, 2018; SUN et al., 2022).

Os resultados obtidos no estudo confirmaram a viabilidade do uso de água ozonizada armazenada sob refrigeração para a inativação de *Salmonella* Typhimurium. Nesse sentido, a água ozonizada refrigerada e armazenada por até 24 h apresenta potencial para uso na sanitização de alimentos ou na superfície de equipamentos na indústria de alimentos, em especial no controle de microrganismos que são capazes de aderir a superfícies e formar biofilmes. Destaca-se que *Salmonella* Typhimurium é uma das espécies bacterianas que se destaca pela capacidade de aderir a superfícies e formar biofilmes, em materiais tais como acrílico e aço inoxidável (NGUYEN et al., 2014).

É importante mencionar os resultados obtidos quando se utilizaram água ozonizada com pH inicial 6,2 (sem ajuste de pH) e 6,0 (ajustada com ácido cítrico). Nessas condições, a água ozonizada não se mostrou promissora no que se refere ao controle de *Salmonella* Typhimurium, quando se adota período de armazenamento de 24 h. Esses resultados podem ser justificados pelo efeito do pH na decomposição do ozônio em meio aquoso. O mecanismo de decomposição do ozônio na água ainda não foi completamente elucidado, sendo que alguns cenários já estudados indicaram estabilidade/decomposição do ozônio em radicais hidroxila e oxigênio (GARDONI et al., 2012). No que se refere ao efeito do pH, quando se tem um meio ácido, a ação do ozônio molecular é predominante. Por outro lado, à medida que se eleva o pH, a formação de radicais é favorecida, em especial de radicais hidroxila (KIM et al., 1999; GOTTSCHALK et al., 2000; KHADRE et al., 2001; GARDONI et al., 2012). Salienta-se que, quando se utilizou água com pH 7,0 (ajustado com bicarbonato de sódio), apesar do menor tempo de meia vida do ozônio no meio, verificou-se controle efetivo de *Salmonella* Typhimurium. Em faixas de pH acima de 7,5, a formação de radicais hidroxila é favorecida, o que pode contribuir para a inativação dos microrganismos (KIM et al., 1999).

Outros fatores são determinantes para a estabilidade do ozônio no meio aquoso e conseqüentemente a eficácia no controle de microrganismos, tais como presença de carbono orgânico e inorgânico e sais solúveis inorgânicos (GARDONI et al., 2012). No presente estudo foram utilizados bicarbonato de sódio e ácido cítrico para ajustar o pH da água.

O bicarbonato de sódio faz parte do grupo de substâncias classificadas como inibidores, no que se tange ao mecanismo de decomposição do ozônio em meio aquoso (GARDONI et al., 2012). No que tange ao ácido cítrico, Hirahara et al. (2019) afirmaram que esse composto pode prolongar a meia vida do ozônio no meio aquoso. Destaca-se que os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com Hirahara et al. (2019). Maior meia vida do ozônio foi obtida quando se utilizou ácido cítrico para ajustar o pH da água em 6,0. Por outro lado, Rezende et al. (2021) obtiveram menor meia vida do ozônio em água acidificada com ácido cítrico (pH = 4,0), em comparação com águas com pH's iniciais 8,2 e 7,0. Esses autores justificaram esse resultado pelo fato de terem utilizado água da rede de distribuição, que continha cloro residual livre, que influencia a cinética de decomposição do ozônio

no meio aquoso. É importante mencionar que no presente estudo foi utilizada água destilada.

Quanto os pH e potencial redox da água ozonizada e armazenada a 7 °C (Tabela 5), verificou-se tendência semelhante à observada por Rezende et al. (2021). Na água com pH inicial 7,0 (ajustado com bicarbonato de sódio), verificou-se elevação do pH imediatamente depois da ozonização com posterior redução para 7,0, durante o armazenamento. Por outro lado, na água com pH inicial 6,0 (ajustado com ácido cítrico), observou-se redução para 5,6 e manutenção desse valor por 24 h. Essa tendência observada na água com pH inicial de 6,0 pode ser explicada pelos resultados referentes ao potencial redox. A ozonização da água implica em aumento do potencial redox e redução durante o armazenamento em determinadas condições (FERREIRA et al., 2021; REZENDE et al. 2021). Salienta-se que de acordo com Stumm e Morgan (1996), há uma relação inversa entre pH e potencial redox em meio aquoso. Nesse contexto, menciona-se que não foi observada redução do potencial redox somente na água com pH inicial 6,0, com os valores permanecendo superiores a 1.999 mV. Isso pode justificar a manutenção do pH em 5,6 durante o armazenamento da água.

## 5. CONCLUSÕES

Com este estudo é possível concluir que: i) o pH inicial da água afeta a eficácia da água ozonizada no controle de *Salmonella* Typhimurium; ii) que é viável a utilização de água ozonizada armazenada a 7 °C, por até 24 h, para inativação de *Salmonella* Typhimurium, quando adotados pH's iniciais 7,0 e 8,2, ajustados com bicarbonato de sódio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARNEIRO, M. R. P.; CABELLO, P. H.; ALBURQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; JAIN, S.; CANDIDO, A. L. Characterization of a foodborne outbreak caused by *Salmonella enteritidis* in Aracaju, State of Sergipe, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 334-337, 2015.

FAÚLA, L. L.; SOARES, A. C. C.; DIAS, R. S. Panorama dos surtos de doença de transmissão alimentar (DTA) ocorridos em Minas Gerais, Brasil, no período de 2010 a 2014. **Revista de Saúde Pública do SUS/MG**, v. 3, n. 1, p. 84-92, 2015.

FERREIRA, W. F. de S.; ALENCAR, E. R.; BLUM, L. E. B.; FERREIRA, M. A.; MENDONÇA, M. A.; RACANICCI, A. M. C.; URRUCHI, W. M. I. Ozonation of brazil nuts in aqueous media at different pH levels: ozone decomposition, *Aspergillus flavus* inactivation, and effects on nut color and crude oil lipid profile. **Ozone: Science & Engineering**, v. 43, p. 351-362, 2021.

GALIÉ, S.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J. LOMBÓ, F. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. **Frontiers Microbiology**, v. 9, p. 1-18, 2018.

GARDONI, D.; VAILATI, A.; CANZIANI, R. Decay of Ozone in Water: A Review. **Ozone Science and Engineering**, v.34 n.4 p. 233-242, 2012.

GOTTSCHALK, C.; LIBRA, A. J.; SAUPE, A. 2000. **Ozonation of water and wastewater: a practical guide to understanding ozone and its applications**. (2a ed.). Hardcover. 378p.

HIRAHARA, Y.; IWATA, K.; NAKAMURO, K. Effect of citric acid on prolonging the half-life of dissolved ozone in water. **Food Safety**, v. 7, n. 4, p. 90–94, 2019.

KAAVYA, R.; PANDISELVAM, R. ABDULLAH, S.; SRUTHI, N. U. JAYANATH, Y.; ASHOKKUMAR, C.; KHANASHYAM, A. C.; KOTHAKOTA, A.; RAMESH, S.V. Emerging non-thermal technologies for decontamination of *Salmonella* in food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 400-418, 2021.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; CHISM, G. W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. **Journal of Food Safety**, v. 19, n. 1, p. 17-34, 1999.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1071-1087, 1999.

NATH, A.; MUKHIM, K.; SWER, T.; DUTTA, D.; VERMA, N.; DEKA, B.C.; GANGWAR, B. A Review on Application of Ozone in the Food Processing and Packaging. **Journal of Food Product Development and Packaging**, v. 1, p. 07-21, 2014.

NGUYEN, H. D. N.; YANG, Y. S; YUK. H. G. Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 383-388, 2014.

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

PANEBIANCO, F.; RUBIOLA, S.; DI CICCIO, P. A. The Use of Ozone as an Eco-Friendly Strategy against Microbial Biofilm in Dairy Manufacturing Plants: A Review. **Microorganisms**, v. 10, n. 162, p. 1-18, 2022.

PHAEPHIPHAT, A.; MAHAKARNCHANAKUL, W. Surface decontamination of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* on sweet basil by ozone microbubbles. **Cogent Food & Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2018.

de REZENDE, A. J.; de ALENCAR, E. R.; FERREIRA, M. de A.; FERREIRA, W. F. de S. Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated Ozonated Water. **Ozone: Science & Engineering**, 2021.

SÃO JOSÉ, J. F. B. Estratégias na higienização de frutas e hortaliças. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 3, p. 630-640, 2017.

SERIBELLI, A. A.; da SILVA, P.; da CRUZ, M. F.; de ALMEIDA, F.; FRAZÃO, M. R.; MEDEIROS, M.; RODRIGUES, D.; KICH, J. D.; BENEVIDES, J. L.; SOARES, S. C.; ALLARD, M. W.; FALCÃO, J. P. Insights about the epidemiology of *Salmonella* Typhimurium isolates from different sources in Brazil using comparative genomics. **Gut pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2021.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. de C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. de L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. de M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Ciências Agrárias**, v. 32, n.2, p. 659-682, 2011.

STUMM, W.; MORGAN, J. J. **Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters**. New York: Wiley-Interscience. 1996.

SUN, Y.; WU, Z.; ZHANG, Y.; WANG, J. Use of aqueous ozone rinsing to improve the disinfection efficacy and shorten the processing time of ultrasound-assisted washing of fresh produce. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 83, p. 1-12, 2022.

THANOMSUB, B.; ANUPUNPISIT, V.; CHANPHETCH, S.; WATCHARACHAIPONG, T.; POONKHUM, R.; SRISUKONTH, C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. **J Gen Appl Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 193-199, 2002.