

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM ÁGUA OZONIZADA
PARA HIGENIZAÇÃO DE ALFACE (*Lactuca sativa*)**

DANIEL AUGUSTO CAVALCANTE
Oficial da Aeronáutica

PROF. DR. MARCELO CRISTIANINI
Orientador

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Engenharia de
Alimentos para Obtenção do Título
de Mestre em Tecnologia de
Alimentos**

CAMPINAS
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C314a Cavalcante, Daniel Augusto
Avaliação do tratamento com água ozonizada para
higienização de alface (*Lactuca sativa*) / Daniel Augusto
Cavalcante. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Marcelo Cristianini
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Ozônio. 2. *Escherichia coli* 0157 : H7. 3. *Bacillus subtilis*. 4. Higienização. 5. Alface americana. 6. Vida de prateleira. I. Cristianini, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Treatment evaluation with ozone water for iceberg lettuce sanitization

Palavras-chave em inglês (Keywords): Ozone, *Escherichia coli* 0157 : H7, *Bacillus*

Subtilis, Sanitization, Iceberg lettuce,

Shelf life

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Marcelo Cristianini

Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Benedito Carlos Benedetti

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Prof. Dr. Benedito Carlos Benedetti

Prof. Dra. Lucia Regina Durrant

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO GERAL	x
GENERAL SUMMARY	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Referências Bibliográficas.....	5
OBJETIVOS	7
Objetivo Geral	7
Objetivos Específicos	7
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	8
1.1 Hortaliças Folhosas	8
1.2 O Ozônio	11
1.2.1 Geração do ozônio	13
1.2.2 Características físico-químicas do ozônio em solução	14
1.2.3 Efeitos antimicrobianos do ozônio	17
1.3 Referências Bibliográficas.....	21
CAPÍTULO 2 – INATIVAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> O157:H7 E <i>Bacillus subtilis</i> POR ÁGUA OZONIZADA	
Resumo.....	25
Abstract.....	26

2.1	Introdução	27
2.2	Material e Métodos	30
2.2.1	Microrganismos e Meios de Cultura	30
2.2.2	Preparo do Inóculo	30
2.2.3	Gerador de Ozônio	31
2.2.4	Determinação da Atividade Neutralizante do Tiosulfato de Sódio 10%	32
2.2.5	Método para Quantificação do Ozônio Dissolvido na Água	33
2.2.6	Inativação de Microrganismos com Tratamento de Ozônio	33
2.3	Resultados e Discussão	34
2.3.1	Atividade Neutralizante do Tiosulfato de Sódio 10%	34
2.3.2	Quantificação do Ozônio Dissolvido na Água	35
2.3.3	Inativação de <i>E.coli</i> O157:H7 e <i>B. subtilis</i> por água ozonizada... ..	36
2.4	Conclusões.....	41
2.5	Referências Bibliográficas	42

CAPITULO 3 – AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE *Escherichia coli* O157:H7 INOCULADA EM ALFACE AMERICANA (*Lactuca sativa*) POR MEIO DE TRATAMENTO COM ÁGUA OZONIZADA

	Resumo	44
	Abstract	45
3.1	Introdução	46
3.2	Material e Métodos	50
3.2.1	Natureza das Amostras	50
3.2.2	Preparo e Tratamento das Amostras.....	50
3.2.3	Microrganismos e Meios de Cultura	50

3.2.4	Preparo do Inóculo	51
3.2.5	Inoculação	52
3.2.6	Gerador de Ozônio	52
3.2.7	Avaliação da Qualidade Microbiológica da Alface Americana Disponível no Comercio	52
3.2.8	Inativação de <i>E. coli</i> O157:H7 Inoculada Intensionalmente nas alfaces	53
3.3	Resultados e Discussão.....	54
3.3.1	Avaliação da Qualidade Microbiológica das Alfaces Disponíveis no Comércio	54
3.3.2	Inativação de <i>E. coli</i> O157:H7 Inoculada em Alface Americana por meio de Tratamento com Água Ozonizada	58
3.4	Conclusões	61
3.5	Referências Bibliográficas	62

CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE ALFACE AMERICANA (*Lactuca sativa*) TRATADA COM ÁGUA OZONIZADA

	Resumo.....	66
	Abstract	67
4.1	Introdução	68
4.2	Material e Métodos	70
4.2.1	Natureza das Amostras	70
4.2.2	Preparo e Tratamento das Amostras.....	70
4.2.3	Gerador de Ozônio	71
4.2.4	Análises Microbiológicas e Meios de Cultura	71
4.2.5	Tratamento das Amostras de Alface com Água Ozonizada.....	72
4.3	Resultados e Discussão.....	72
4.4	Conclusões	82

4.5 Referências Bibliográficas	83
CONCLUSÕES GERAIS	85
ANEXO A – Vida de Prateleira de Alface Americana – Aeróbios Mesófilos	87
ANEXO B – Vida de Prateleira de Alface Americana – <i>Enterobacteriaceae</i>	88
ANEXO C – Vida de Prateleira de Alface Americana – Coliformes Totais	89
ANEXO D – Vida de Prateleira de Alface Americana – Coliformes Fecais	90
ANEXO E – Vida de Prateleira de Alface Americana – Bolores e Leveduras	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1	Inativação de bactérias com utilização de água ozonizada.....	19
TABELA 2.1	Avaliação da eficiência e inocuidade do agente neutralizante tiosulfato de sódio em relação à cepa <i>E.coli</i> O157:H7.....	34
TABELA 2.2	Teor residual de ozônio em diferentes etapas com concentração de 1mg L ⁻¹	35
TABELA 3.1	Avaliação microbiológica de amostras de alface minimamente processada.....	54
TABELA 3.2	Avaliação microbiológica de alface americana <i>in natura</i>	57
TABELA 3.3	Alfaces americanas contaminadas com <i>E.coli</i> O157:H7, expostas ao tratamento com água ozonizada à concentração de 1,0 mgL ⁻¹ minuto.....	59
TABELA 4.1	Número de reduções decimais da contaminação inicial da alface americana, após tratamento com 1,0 mg L ⁻¹ de água ozonizada.....	80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Formação do Ozônio.....	14
FIGURA 1.2	Ângulo de formação do Ozônio.....	15
FIGURA 2.1	Equipamento gerador de água ozonizada.....	32
FIGURA 2.2	Número de reduções de unidades formadoras de colônias <i>E.coli</i> O157:H7 em função do tempo de exposição às diferentes concentrações de água ozonizada.....	37
FIGURA 2.3	Número de reduções decimais de <i>B.subtilis</i> em função do tempo de exposição às diferentes concentrações de água ozonizada.....	39
FIGURA 3.1	Tratamento de alface americana na cuba contendo água ozonizada.....	53
FIGURA 4.1	Crescimento microbiano em alface americana após tratamento com água ozonizada na concentração de 1 mgL ⁻¹ /1 minuto.....	73
FIGURA 4.2	Crescimento microbiano em alface americana após tratamento com água ozonizada na concentração de 1 mgL ⁻¹ /2 minutos.....	75
FIGURA 4.3	Crescimento microbiano em alface americana após tratamento com água ozonizada na concentração de 1 mgL ⁻¹ /3 minutos.....	77
FIGURA 4.4	Alfaces estocadas a 2 ^o C para avaliação de vida de prateleira, após tratamento com 1,0 mg L ⁻¹ de água ozonizada.....	79

RESUMO GERAL

A etapa de sanitização é crítica e de suma importância para a qualidade microbiológica de vegetais. É importante que o sanitizante seja além de eficaz, seguro do ponto de vista toxicológico. O uso do ozônio durante o processamento de vegetais prolonga a vida de prateleira, preserva os atributos sensoriais e não produz resíduos tóxicos. O objetivo deste trabalho foi estudar a eficiência do ozônio como sanitizante em hortaliças folhosas. Em um primeiro momento foi verificada a ação do sanitizante *in vitro* em *Escherichia coli* O157:H7 e *Bacillus subtilis*. O ozônio foi utilizado nas concentrações de 0,6, 0,8 e 1,0 mg L⁻¹ nos tempos de 1, 3 e 5 minutos para cada concentração. Na seqüência observou-se a ação de água ozonizada durante um minuto na sanitização de alface americana inoculada com *E. coli* O157:H7 na concentração de 1,0 mgL⁻¹ e, para completar o estudo, foi verificado o comportamento da hortaliça durante dez dias de armazenamento a 2°C, sob ação de 1,0 mg L⁻¹ de água ozonizada nos tempos de 1, 2 e 3 minutos. No estudo *in vitro* a *E. coli* O157:H7 e o *Bacillus subtilis*, no tempo de 3 minutos de exposição a 1,0 mg L⁻¹ de água ozonizada, apresentaram uma redução de 6,6 e 6,3 ciclos logarítmicos, respectivamente. A atuação de 1,0 mgL⁻¹ de água ozonizada aplicada durante 1,0 minuto em alface americana inoculada intencionalmente com *E. coli* O157:H7 apresentou uma redução média de 3,2 ciclos logarítmicos. No trabalho de vida de prateleira a alface permaneceu com menos de 3 NMP g⁻¹ de Coliformes termotolerantes durante os 10 dias de tempo de estocagem nos tempos de 1, 2 e 3 minutos, após ser sanitizada com água ozonizada na concentração de 1,0 mgL⁻¹, enquanto que as alfaces tratadas apenas com água corrente apresentaram, no último dia de estocagem, uma população de 1,1x10⁴ NMP g⁻¹ do mesmo microorganismo. Os resultados demonstram que o ozônio na concentração de 1,0 mgL⁻¹ no tempo de 1 minuto é capaz de manter a qualidade microbiológica de alface americana dentro dos padrões higiênicos vigentes.

Palavras chaves: ozônio, *E. coli* O157:H7, *Bacillus subtilis*, sanitização, alface americana, vida de prateleira.

GENERAL SUMMARY

The sanitization is a critical stage for the microbiological quality of vegetables. It's important that the sanitizer has effectiveness, and most be safe of the toxicological point of view. The use of ozone during the process of vegetables contributes to extend their shelf life, to preserve their sensorial attributes without producing toxic residues. The objective of this work was to study the potential of ozone as sanitizer in vegetables. In a first moment, the action of the sanitizer in vitro was verified in *Escherichia coli* O157:H7 and *Bacillus subtilis*. The ozone was used at concentrations of 0,6, 0,8 and 1,0 mg L⁻¹ in times of 1, 3 and 5 minutes for each concentration. In the sequence the action of 1,0 mg L⁻¹ of ozone water was observed during one minute in the sanitization of iceberg lettuce inoculated with *E. coli* O157:H7 and, to complete, the behavior of the vegetable was verified during ten days of storage at 2°C, by the action of 1,0 mg L⁻¹ of ozone water in times of 1, 2 and 3 minutes. In the study in vitro, the *E. coli* O157:H7 and the *Bacillus subtilis*, exposed for 3 minutes to 1,0 mg L⁻¹ of ozone water, presented a reduction of 6,6 and 6,3 logarithmic cycles, respectively. The performance of 1,0 mg L⁻¹ of ozone water applied for 1,0 minutes in Iceberg lettuce inoculated intentionally with *E. coli* O157:H7 presented a medium reduction of 3,2 logarithmic cycles. Concerning to shelf life the lettuce stayed with less than 3 MPN g⁻¹ of *Coliforms thermotolerants* during the 10 days of storage in the times, after being sanitized with ozone water 1, 2 and 3 minutes in the concentration of 1,0mg L⁻¹. On the other hand, the lettuce treated only with current water presented, in the last day of storage, a population of 1,1x10⁴ MPN g⁻¹ of the same microorganism. The results demonstrate that the ozone in the concentration of 1,0 mg L⁻¹ in the time of 1 minute is capable to maintain the microbiological quality of iceberg lettuce inside of the effective hygienic patterns.

Keywords: ozone, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus subtilis*, sanitization, Iceberg lettuce, shelf life.

INTRODUÇÃO GERAL

As mudanças no estilo de vida de grande parte da população, nos últimos anos, têm causado profundas modificações nos hábitos alimentares. As pessoas buscam uma alimentação saudável, entendendo-se por isto alimentos frescos, nutritivos, contendo baixo valor calórico, baixa quantidade de lipídios, alto teor de fibras e, principalmente, seguros. Ao mesmo tempo, necessitam de produtos que sejam práticos, de preparo rápido e simples. Frutas e verduras são alimentos muito valorizados por preencherem as expectativas quanto à nutrição. Entretanto, especialmente as hortaliças folhosas, são pouco práticas, muito perecíveis, exigindo abastecimento freqüente e considerável trabalho de limpeza, quando adquiridas *in natura* (PORTO, 2001).

Nos últimos anos vem ocorrendo um aumento crescente no número de refeições fora do lar, em restaurantes institucionais ou em cadeias de refeições rápidas. Nesses estabelecimentos há necessidade de oferecer uma alimentação equilibrada, onde verduras façam parte do cardápio. A higienização de grandes volumes desse material é complexa, exigindo tempo, espaço e mão-de-obra. Para preencher essas necessidades surgiram os chamados “alimentos minimamente processados”. Estes produtos, por serem previamente higienizados e preparados, estão prontos para servir, são práticos e ao consumidor, resta apenas o trabalho de abrir a embalagem. Usualmente são consumidos crus, sendo o processo de higienização o único tratamento recebido entre o cultivo e o consumo.

Para ALZAMORA *et al.* (2000), o aspecto saudável e fresco desses produtos pode, no entanto, ser apenas aparente quanto à qualidade da matéria-prima. As condições do processo de higienização e as condições de conservação, seja de forma isolada ou combinada, permitem a contaminação, a sobrevivência e/ou a multiplicação de microrganismos, inclusive dos patogênicos.

Para os vegetais frescos em geral, a contaminação por microrganismos patogênicos pode ocorrer em diferentes fases, desde a sua produção até o consumo. Na fase de produção agrícola, a contaminação pode ter origem no solo

contaminado, na água de irrigação contaminada, no adubo orgânico, nos excrementos de animais, entre outros. Na colheita e no processamento, a contaminação pode ocorrer de forma cruzada entre os operadores, contêineres, equipamentos e durante o transporte. Já na fase de comercialização, os microrganismos presentes no vegetal embalado podem multiplicar-se e, dependendo do tempo e da temperatura de conservação, podem atingir níveis que comprometem a qualidade do produto e/ou a integridade física do consumidor (BEUCHAT, 1996).

No caso da alface, as etapas do processamento que contribuem para o controle microbiológico são: seleção, eliminação das folhas externas e partes danificadas, pré-lavagem para remover as sujidades e terras aderidas às folhas, lavagem, sanitização, centrifugação, embalagem (em alguns casos em atmosfera modificada ou a vácuo) e refrigeração (ARRUDA, 2002).

NGUYEN-the & CARLIN (1994) afirmaram que para reduzir a carga microbiana dos vegetais minimamente processados, a etapa de sanitização com solução clorada tem sido o principal recurso para a redução dos microrganismos patogênicos a níveis seguros, podendo ser aplicada nos vegetais íntegros ou cortados. A etapa de sanitização é crítica e de suma importância para a qualidade microbiológica de vegetais. Nesta fase é importante a seleção do sanitizante que, além de eficaz deve ser também seguro do ponto de vista toxicológico (NASCIMENTO, *et al.* 2003). Atualmente, o cloro é o único sanitizante permitido pela legislação brasileira para este fim, nas concentrações de 100-250 ppm (SÃO PAULO, 1999).

Os compostos clorados têm sido utilizados como sanitizantes no processamento de alimentos por várias décadas. Formulações químicas baseadas em cloro são usadas na desinfecção de produtos e superfícies nas plantas de processamento de alimentos, assim como na redução da população microbiana da água utilizada durante as operações de higienização e embalagem. Porém, nos últimos anos, tem aumentado a preocupação quanto a produção de compostos orgânicos clorados, como os trihalometanos, e seus impactos sobre a saúde

humana e segurança ambiental. Com isto, a aplicação de soluções cloradas em alimentos pode entrar em conflito com os padrões exigidos pela certificação de alimentos orgânicos e alternativas para o cloro devem ser investigadas. Mesmo assim, nas indústrias processadoras de alimentos, nos serviços de alimentação e a nível doméstico, os compostos clorados permanecem sendo utilizados pela sua conveniência e baixo custo (PARISH *et al.*, 2001).

Atualmente, segundo LEE *et al.* (2004), a maioria da produção de hortaliças folhosas e frutas é sanitizada com produto clorado (50 a 200 ppm de cloro ativo) para redução de níveis de microrganismo, porém, este tratamento resulta em uma redução microbiológica de até 2 ciclos logarítmicos de unidade formadora de colônia por grama de alimento (UFC g⁻¹). Também, o tratamento com soluções cloradas em altas concentrações pode produzir, como subprodutos, substâncias prejudiciais à saúde como cloraminas e trihalometanos. Portanto, são necessários tratamentos alternativos mais efetivos que o cloro para redução ou eliminação de patógenos humanos para produtos frescos.

Para eliminar a contaminação por esporos no ambiente de processamento de produtos frescos são comumente usados o peróxido de hidrogênio e o cloro. Recentemente foi recomendado como alternativa para estes sanitizantes o ozônio (KHADRE & YOUSEF, 2001). Menores concentrações e um menor tempo de contato com o alimento são requeridos por este sanitizante, se comparados ao cloro e outros agentes similares, na efetiva ação desinfetante sobre microrganismos resistentes (KIM *et al.*, 1980).

Estudos prévios indicam que o ozônio pode ser usado como um agente antimicrobiano seguro e efetivo em alimentos quando comparado ao cloro e outros desinfetantes. É também mais efetivo contra organismos resistentes como o cisto de *Entamoeba* e vírus. O uso de ozônio durante o processo ou estocagem prolonga a vida de prateleira de produtos como frutas e hortaliças, enquanto preserva seus atributos sensoriais além de não produzir resíduos tóxicos ao meio ambiente pós-tratamento (KIM *et al.*, 1999).

LEITÃO *et al.* (1981) constataram contagens elevadas de microrganismos aeróbios totais (10^8 UFC g^{-1}) e de coliformes totais (10^7 UFC g^{-1}) em alface comum (*Lactuca sativa*) no Brasil. LEITÃO & SILVEIRA (1991) isolaram *Aeromonas sp* em 65% das amostras de hortaliças analisadas e em 100% das amostras de água de rio analisadas do Estado de São Paulo. Em estudo realizado na região de Araraquara, SP, BONILHA (1992) não detectou *Salmonella sp* em amostras de alface. Entretanto, considerando o padrão de coliformes fecais de 10^3 UFC g^{-1} , observou que apenas 6% das amostras na horta estariam fora do limite, enquanto que 26% das amostras obtidas de estabelecimentos comerciais estariam acima deste. As etapas de manipulação pós-colheita foram apontadas como responsáveis por este aumento de contaminação (PORTO, 2001).

De acordo com a Subdiretoria de Abastecimento, organização do Comando da Aeronáutica responsável pela fiscalização das unidades de alimentação e nutrição das Bases Aéreas, foram consumidas durante o ano de 2004, 600 toneladas de hortaliças folhosas pelas tropas, sendo a alface o vegetal de maior consumo atingindo 210 toneladas (MINISTÉRIO DA DEFESA, 2004).

Em razão do alto consumo de hortaliças folhosas e do grande crescimento do mercado de vegetais minimamente processados, da contagem elevada de microrganismos envolvendo estes produtos, principalmente a alface, e das dificuldades para a eliminação destes microrganismos com os agentes sanitizantes atualmente disponíveis, faz-se necessária a busca por processos alternativos de sanitização para aumentar a segurança microbiológica e o tempo de vida de prateleira de produtos frescos prontos para o consumo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZAMORA, S.M., LÓPEZ-MALO, A., TAPI, M.S. Minimally processed fruits and vegetables: fundamental aspects and applications. **Gaitheersburg**: Aspen, 2000.

ARRUDA, G.A. **Manual de Boas Práticas – Vol. 2 - Unidade de Alimentação e Nutrição**. Ponto Crítico, São Paulo. 2ed., 2002.

BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.2, 1996.

BONILHA, P.R.M. Comparação das condições sanitárias entre as alfaces cultivadas e comercializadas na cidade de Araraquara. **Alimentos e Nutrição**. v.4, p.125-130, 1992.

KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E.. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.131-138, 2001.

KIM, C.K., GENTILE, D.M., SPROUL, O.J. Mechanism of ozone inactivation of bacteriophage f2. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, p.210-218, 1980.

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**, Des Moines, v. 62, n. 9, p.1071-1087, 1999.

LEE, S.Y., COSTELLO, M., KANG, D.H. Efficacy of Chlorine Dioxide Gas as a Sanitizer of Lettuce Leaves. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.67, n.7, p.1371-1376, 2004.

LEITÃO, M.F.F., MONTEIRO F.E., DELAZARI, I., ANGELUCCI, E. Eficiência de desinfetantes na redução da contaminação bacteriana da alface (*Lactuca sativa*). **Coletânea do ITAL**, v.18, n.2, p.201-226, 1981.

LEITÃO, M.F.F., SILVEIRA, N.F.A. *Aeromonas* sp. e *Plesiomonas shigelloides* na água, pescado e hortaliças no Estado de São Paulo. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v.21, n.1, p.89-99, 1991.

MINISTÉRIO DA DEFESA, Comando da Aeronáutica, Subdiretoria de Abastecimento. **Coletânea de Prestações de Contas**, São Paulo, 2004.

NASCIMENTO, M.S., SILVA, N.; CATANOZI, M.P.L.M. Emprego de sanitizantes na desinfecção de vegetais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.112, p.42-46, 2003.

NGUYEN-the,C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Lauderdale, v.34, n.4, 1994.

PARISH, M. E.; BEUCHAT, L. R.; SUSLOW, T. V.; HARRIS, L. J.; GARRET, E. H.; FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. In: **Comprehensive reviews in food science and food safety**. IFT/FDA, v.2, 204p, 2001.

PORTO, E. ***Listeria monocytogenes*: ocorrência em hortaliças, resistência aos sanificantes e sobrevivência em alface minimamente processada e acondicionada em atmosfera modificada**. Campinas, 2001. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SÃO PAULO. Portaria CVS-6 de 10 de março de 1999. Aprova o regulamento técnico sobre critérios e parâmetros para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, 12 mar 1999. v. 109 n.47, p 24-27, 1999.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito da água ozonizada como sanitizante para hortaliças folhosas.

Objetivos Específicos

Os principais objetivos específicos deste trabalho de pesquisa foram:

- Estudar a inativação *in vitro* de *Escherichia coli* O157:H7 e *Bacillus subtilis* por meio de água ozonizada;
- Avaliar a qualidade microbiológica da alface americana minimamente processada e *in natura* adquirida em vários pontos do comércio da cidade de Santo André, SP;
- Avaliar a inativação de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada em alface americana por meio de tratamento com água ozonizada;
- Acompanhar a vida de prateleira de alface americana tratada com água ozonizada e estocada a 2°C avaliando as populações de coliformes totais, coliformes fecais, contagem total em placas, bolores e leveduras.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

1.1 Hortaliças Folhosas

Frutas e hortaliças são parte essencial de dietas das pessoas em todo o mundo. Onde existe terra disponível, famílias cultivam hortifrutigranjeiros para o consumo próprio ou como fonte de renda. Por outro lado, nos grandes centros, os produtos são comprados em supermercados e feiras livres para a preparação, em casa ou restaurantes, de saladas, decorações ou como parte de pratos de carnes, aves e peixes (BEUCHAT, 1995).

Todas as frutas e hortaliças minimamente processadas são perecíveis e demonstram rápida deterioração na qualidade pós-colheita sob armazenamento ambiente. Estes produtos são mais perecíveis do que os produtos frescos não processados devido aos danos nos tecidos resultantes das operações do processamento. Estes danos físicos aumentam a respiração e a produção de etileno em minutos, que associados, aumentam as taxas de outras reações bioquímicas responsáveis por mudança de cor, odor, textura e qualidade nutricional.

O principal defeito na qualidade de vegetais folhosos são os sinais de murchamento. A natureza da demanda por produtos minimamente processados requer que eles sejam visualmente aceitáveis, com aparência de frescos, tenham qualidade uniforme fora da embalagem e sejam razoavelmente livres de defeitos (CANTWELL, 1995).

A qualidade e vida útil da alface processada variam dependendo da cultivar, condições culturais ou fatores pré-colheita, maturidade, procedimento no processamento e condições de armazenamento como temperatura, concentrações de O₂, de CO₂ e de etileno. O modo de preparo dessa hortaliça pode ter um grande efeito na sua qualidade e vida útil, devido às diferenças na quantidade de danos causados (BOLIN *et al.*, 1977). A estabilidade da alface é

afetada pela maneira como é cortada. O uso de lâminas afiadas duplica o seu tempo de vida útil se comparado com o corte usando facas não afiadas. A redução do tamanho do corte também reduz a vida útil da alface. O fatiamento do tecido que resulte em menor exsudação da seiva celular aumenta a vida de prateleira quando comparado ao corte em pedaços. Não somente a quantidade de cortes, mas também a direção do corte afeta a deterioração de frutas e hortaliças minimamente processadas (CANTWELL, 1995).

Para PARISH *et al.* (2001) existem diversos métodos físicos, químicos e biológicos sendo investigados e utilizados para a redução da carga microbiana de frutas e vegetais frescos, sendo que cada método apresenta vantagens e desvantagens distintas, dependendo do tipo de produto, fatores intrínsecos e extrínsecos e outras variáveis. A escolha do procedimento mais efetivo de descontaminação deve considerar a prevenção da contaminação dos alimentos com microrganismos patogênicos, níveis perigosos de resíduos químicos ou contaminantes físicos. Entretanto, isto não é sempre possível e a necessidade da limpeza e desinfecção de muitos tipos de produtos permanece de fundamental importância. Esses tratamentos são reconhecidos por reduzirem parcialmente a população microbiana e pela sua limitação, por necessitarem de emprego dentro de níveis que não causem impactos sensoriais inaceitáveis ao produto. Portanto, deve-se notar que após a contaminação das frutas e vegetais por microrganismos patogênicos, a limpeza e a desinfecção não irão eliminá-los totalmente.

Embora perigos químicos e físicos sejam preocupantes, os perigos específicos para vegetais minimamente processados residem principalmente nos contaminantes microbianos. Bolores, leveduras e bactérias conseguem se multiplicar rapidamente na superfície de vegetais e, por esta razão, os grupos de microrganismos encontrados nos produtos recém colhidos são bastante variados (BEUCHAT, 1998).

A maioria das bactérias que estão aderidas às superfícies dos vegetais são saprófitas e consistem de gêneros Gram-negativo. Alguns dos patógenos associados aos produtos agrícolas *in natura* incluem: *Yersinia enterocolitica*, espécies de *Salmonella*, espécies de *Shigella*, cepas enteropatogênicas de *Escherichia coli*, vírus da hepatite A, dentre outros (NGUYEN-the & CARLIN, 1994). Entretanto, como os vegetais folhosos estão em contato direto com o solo, bactérias Gram-positivas também podem estar presentes, como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes* (FRODER, 2005).

A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no sentido de aperfeiçoar as ações na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos para alimentos, adotou a Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 aprovando o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Segundo esta resolução o índice máximo de coliformes termotolerantes a 45°C g⁻¹ permitido em hortaliças, legumes e similares frescos, *in natura* ou preparadas e prontas para consumo direto é de 100 NMP g⁻¹, devendo a *Salmonella* estar ausente em 25g do produto (ANVISA, 2001).

Muito se tem estudado quanto à contaminação de hortaliças por coliformes. No Brasil, o conhecimento da poluição fecal de hortaliças data de 1945, quando Souto e colaboradores, citados por FRANCO & HOEFEL (1983), encontraram *E.coli* em 29,3% das 252 amostras de diversos vegetais analisados.

CHRISTÓVÃO (1958) demonstrou a constante poluição fecal das alfaces comercializadas em São Paulo. Alguns anos depois, GELLI (1979) evidenciou alta poluição fecal em várias hortaliças, tendo encontrado *E. coli* em quase 54% dos casos. No início da década de 80, LEITÃO *et al.* (1981) encontraram elevada incidência de coliformes e *E. coli* em trabalho sobre a eficiência de desinfetantes na redução da contaminação bacteriana de alface (FRANCO & HOEFEL, 1983).

Mais recentemente, SIQUEIRA (1997), analisando saladas cruas e servidas em restaurantes industriais de Belo Horizonte, MG, constatou que 44% das hortaliças apresentavam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Em trabalho realizado na região de São Paulo, SP, GOULARTE (2003) observou que alface minimamente processada apresentou populações de microrganismos aeróbios mesófilos que variaram entre $4,3 \times 10^4$ e $9,2 \times 10^6$ UFC g^{-1} , com predomínio de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* sp. BARBOSA NETA *et al.* (2004) evidenciaram que 80% das amostras de alface consumidas no restaurante universitário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte estavam em desacordo com a legislação vigente. FRODER (2005) em análise de 133 amostras de vegetais folhosos minimamente processados, adquiridos no comércio varejista da cidade de São Paulo encontrou $1,3 \times 10^6$ UFC g^{-1} de coliformes totais em alface crespa e $1,0 \times 10^6$ UFC g^{-1} em alface americana, demonstrando desta forma a real necessidade da sanitização adequada das hortaliças minimamente processadas.

1.2 O Ozônio

Soluções de hipoclorito de sódio e compostos de quaternário de amônio têm sido utilizadas nos processos de alimentos para controlar a contaminação por microrganismos, principalmente os patogênicos. O uso de alguns sanitizantes tem tido seu uso reduzido ou totalmente eliminado tendo em vista causarem danos à saúde. Por outro lado, a necessidade de um antimicrobiano potente tem aumentado nos últimos anos devido à contaminação dos alimentos por microrganismos emergentes. A indústria alimentícia está pesquisando desinfetantes que sejam efetivos contra estes patógenos e sejam seguros para o uso em suas plantas. Um dos candidatos é o ozônio que está sendo utilizado como sanitizante no tratamento de águas na Europa desde o início do século XX (KIM *et al.*, 1999B).

Em 1785, Van Marum, filósofo alemão, observou as características eletrostáticas do ar devido ao ozônio. Schombein, em 1801, reportou o odor

característico como sendo uma nova substância, de nome ozônio, e sugeriu que o gás ocorreria naturalmente na atmosfera. Na Alemanha, em 1875, Siemens criou o primeiro gerador de ozônio – ozonizador. Em 1891, verificou-se que o ozônio era capaz de destruir bactérias presentes na água. O primeiro experimento utilizando ozônio no tratamento da água foi realizado em 1893 em Leyde, na Holanda, no tratamento das águas do rio Reno. Em 1906, em Nice, na França, realizou-se o primeiro tratamento de vegetais com água ozonizada, em escala industrial (YANG & CHEN, 1979).

O ozônio exibe certas características que o fazem atrativos para o uso como um sanitizante no processo de alimentos. É um forte agente microbiano com alta reatividade e decomposição espontânea em produtos não tóxicos (KIM *et al.*, 1999A). Como se decompõe rapidamente em água, seu uso é seguro, pois dificilmente deixará resíduos nos alimentos. É utilizado com sucesso na inativação da microflora de carnes, lácteos, aves, peixes, frutas e vegetais (SHARMA & DEMIRCI, 2003). A *Food and Drug Administration*, dos Estados Unidos da América (EUA), recentemente aprovou o seu uso nas formas aquosa ou gasosa para utilização como sanitizante e em plantas de processamento de alimentos, quando combinado com a aplicação de boas práticas de fabricação, e teve sua utilização aprovada pelo departamento de agricultura dos EUA em 1997 (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004).

A suscetibilidade de microrganismos ao ozônio varia de acordo com o estado fisiológico das células, pH do meio, temperatura, umidade e a presença de aditivos, como ácidos, surfactantes e açúcares. Concentrações relativamente baixas de ozônio e um curto contato de tempo são suficientes para inativar suspensões puras de bactérias, mofos, leveduras, parasitas e vírus (KIM *et al.*, 1999B).

1.2.1 Geração do ozônio

O ozônio é uma modificação alotrópica do O_2 . É um gás azulado com odor forte e característico. Tem um peso molecular de 48, ponto de ebulição de $-111,9^\circ\text{C}$ e ponto de fusão de $-192,7^\circ\text{C}$ em 1atm. O potencial de oxidação do ozônio é alto (-2,07V) comparado ao ácido hipocloroso ($-1,49\text{V}$) ou ao cloro (1,36V). Apresenta maior estabilidade em solução diretamente proporcional ao aumento da acidez da água (KIM *et al.*, 1999B).

A formação do ozônio ocorre naturalmente na estratosfera em pequenas quantidades ($0,005\text{mg L}^{-1}$) pela ação da irradiação solar ultravioleta no oxigênio. Uma pequena quantidade de ozônio também é formada na troposfera como subproduto de reações fotoquímicas de hidrocarbonetos, oxigênio e nitrogênio (KIM & YOUSEF, 2000). Quando utilizado na indústria é geralmente gerado em sistemas fechados, sendo produzido em baixas concentrações ($0,003\text{mg L}^{-1}$) pelo oxigênio atmosférico ou pela radiação de 185 nm de comprimento de onda emitida por lâmpadas UV (KIM *et al.*, 1999B).

GUZEL-SEYDIM *et al.* (2004) explicam que para gerar ozônio, pelo método de descarga corona, é necessário que ocorra uma ruptura da molécula do oxigênio diatômico, formando dois fragmentos de oxigênio que podem reagir com outras moléculas também de oxigênio e formar a molécula de O_3 . No método de descarga corona há dois eletrodos, um de alta e outra de baixa tensão, formando um vão entre eles. Segundo KIM *et al.* (1999B), uma corrente alternada com alta voltagem é aplicada através deste vão, na presença de ar atmosférico ou oxigênio, onde ocorre a excitação dos elétrons de oxigênio que, então, induz a quebra das moléculas de O_2 . Os átomos quebrados combinam-se com outras moléculas de oxigênio diatômico e formam o ozônio. A produção de ozônio varia, dependendo da voltagem, da frequência da corrente, do vão de descarga elétrica e da pressão absoluta no interior do vão. O método de descarga corona tem sido largamente utilizado para produzir grandes quantidades de ozônio.

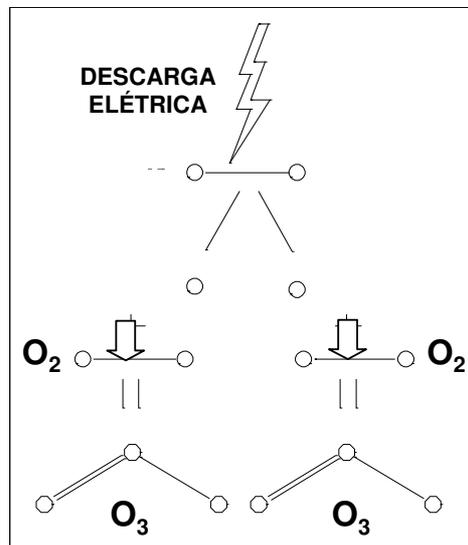


Figura 3.1 – Formação do Ozônio.

Para otimizar a produção de ozônio um eficiente sistema de remoção de calor é essencial. Ar seco é passado através de uma corrente de alta voltagem dentro do vão de descarga e, assim, convertendo O_2 em O_3 na concentração de 4%. O uso de O_2 puro é recomendado ao ar seco para maximizar a produção de ozônio (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004).

1.2.2 Características físico-químicas do ozônio em solução

Na temperatura de 112°C o ozônio condensa em um líquido azul escuro. O ozônio líquido é facilmente explosível. A explosão pode ser detonada por faíscas elétricas ou mudanças bruscas de pressão ou temperatura. Entretanto, em práticas usuais, a explosão do ozônio é extremamente rara. Os três átomos da molécula de oxigênio são arranjados em um ângulo obtuso de $116^\circ 49'$, onde um oxigênio central é atachado em dois átomos de oxigênio eqüidistantes e com comprimento de ligação de 1278 \AA (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004).

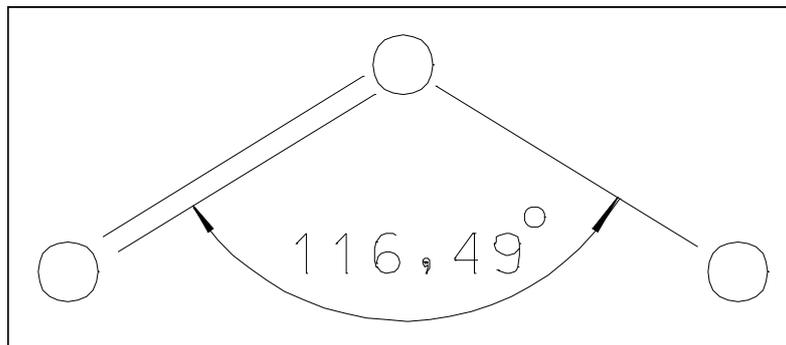


Figura 3.2 – Ângulo de formação do ozônio.

Com relação a solubilidade, o ozônio segue a lei de Henry, que afirma que um gás em solução, em uma dada temperatura, é linearmente proporcional a pressão parcial do gás. A taxa de solubilidade, segundo Bablon (1991) citado por KHADRE *et al.* (2001), aumenta conforme diminui a temperatura da água. O autor mostra um logaritmo negativo quando se relaciona a dissolução de ozônio em água com a temperatura variando na taxa de 0,5°C a 43°C.

A pureza e o pH da água afetam a solubilidade do ozônio em água. KIM (1998) borbulhou ozônio em água duplamente destilada, em água deionizada e em água de torneira com os pH de, respectivamente, 5,6; 5,9 e 8,23 . Observou que o alto pH da água de torneira pode ter desestabilizado o ozônio e a taxa de solubilização diminuiu. Observou-se, também, que a matéria orgânica existente na água de torneira consumiu o ozônio. Em outro experimento, KIM (1998) borbulhou ozônio em água com pH 5,0 a 9,0, e mediu a concentração do gás após 15 segundos. A estabilidade do ozônio em solução foi maior em pH 5,0 e diminuiu, conforme os valores de pH aumentaram. O autor observou também que a estabilidade do ozônio depende da fonte de água. Quanto maior a quantidade de matéria orgânica presente na água menor a estabilidade do gás. Borbulhou ozônio em água destilada e em água de torneira e monitorou as amostras a 25°C durante 8 minutos. A concentração de ozônio diminuiu em uma taxa mais acentuada na água de torneira em relação a água destilada, demonstrando que o ozônio degrada em maior proporção em água de torneira que em água pura. O

sanitizante é relativamente instável em solução aquosa, sendo o pH o principal fator que afeta esta instabilidade (KHADRE & YOUSEF, 2001).

Para KHADRE *et al.* (2001) a eficácia do ozônio aparenta diminuir em pH alcalino para rotavírus e poliovírus tipo 1. Apesar do ozônio ser mais estável em pH baixo, com relação à inativação de microrganismos o gás é mais eficiente em valores baixos de pH. Em pH ácido o ozônio, em solução aquosa, libera radicais que contribuem para a eficácia do sanitizante.

Em baixas concentrações o ozônio não é um gás tóxico, porém em altas concentrações pode ser letal ao homem. Depois de 1-2 horas de exposição de ozônio (0,65 ppm) cachorros demonstraram respiração ofegante, enquanto que longo tempo de exposição (4-6 semanas) na concentração de 0,2 ppm jovens ratos exibiram distensão no pulmão. A toxicidade do ozônio é o mais importante critério para sua aprovação nas plantas de processamento de alimentos. Em humanos, o primeiro alvo é o trato respiratório, sendo que os sintomas são dores de cabeça, vertigens, sensação de queimação dos olhos e garganta e tosse (Hoof, citado por GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004).

As regulamentações governamentais para os níveis do gás ozônio variam. Na Europa a exposição continuada ao ozônio é permitida até o máximo de 0,15 ppm. No Canadá os limites são de exposição máxima até 1,0 ppm. As regulamentações dos EUA determinam que um indivíduo não pode ficar exposto a concentração de 0,1 ppm por mais de 8 horas/dia e não pode ultrapassar de 10 minutos na exposição de 0,2 ppm (KHADRE *et al.*, 2001).

No Brasil a exposição ao gás ozônio segue a determinações do Ministério do Trabalho e Emprego através da Norma Regulamentadora 15, aprovada e com redação dada pela portaria N° 3214/78, que dispõe sobre os limites de tolerância do ozônio em atividades ou operações nas quais os trabalhadores ficam expostos. O limite do gás para trabalhos de até 48 horas semanais é de 0,08 ppm (partes de

gás por milhão de partes de ar contaminado) ou 0,16 mg/m³ (miligramas por metro cúbico de ar no ambiente).

1.2.3 Efeitos antimicrobianos do ozônio

A molécula de ozônio atua como um dipolo com propriedades eletrolíticas e nucleofílicas, reagindo, em soluções aquosas, com componentes orgânicos e inorgânicos (Bablon, citado por KHADRE *et al.*, 2001).

O sanitizante inativa microrganismos pela progressiva oxidação dos componentes vitais da célula. A superfície das células das bactérias é sugerida como o primeiro alvo de ozonização. Dois mecanismos foram identificados para inativação de microrganismos. Um dos mecanismos de inativação de microrganismos indica que o ozônio oxida os grupos sulfidrilas e os aminoácidos das enzimas, peptídeos e proteínas em peptídeos menores. A oxidação dos grupos sulfidrilas, que existem em abundância em enzimas microbianas, podem explicar a rápida inativação de microrganismos pelo sanitizante (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004). O ozônio oxida estes componentes selecionando as duplas ligações dos compostos insaturados aromáticos e alifáticos.

Um outro mecanismo indica que o ozônio oxida ácidos graxos polinsaturados em peróxi-ácidos. A degradação pelo ozônio de lipídeos insaturados na membrana celular resulta na ruptura da célula e, conseqüentemente, vazamento do conteúdo celular. As duplas ligações de lipídeos insaturados são particularmente vulneráveis aos ataques do ozônio. Em bactérias Gram-negativas as camadas de lipoproteínas e lipo-polissacarídeos são o primeiro local da destruição, resultando no aumento da permeabilidade celular e, eventualmente, quebra celular (KIM *et al.*, 1999B).

A reação com polissacarídeos ocorre lentamente com o ozônio atuando na condução das quebras das ligações glicosídicas e formação de aldeídos e ácidos alifáticos (Bablon, citado por KHADRE *et al.*, 2001). Este autor verificou que o

N-acetil glicosamina, um composto presente no peptidoglicano das células bacterianas e na cápsula dos vírus, foram resistentes a ação do ozônio em solução aquosa em pH 3 a 7. Esta observação pode explicar a maior resistência das bactérias Gram-positivas comparadas as Gram-negativas, tendo em vistas que estas tem menor quantidade de peptidoglicano na composição da membrana plasmática (NELSON & COX, 2002).

A reação do ozônio com ácidos graxos saturados ocorre lentamente, porém os insaturados são prontamente oxidados pelo sanitizante. Com relação aos nucleotídeos, principalmente, timina e guanina, o ozônio atua prontamente na oxidação destas bases liberando carboidratos e íons fosfato (KHADRE *et al.*, 2001).

RESTAINO *et al.* (1995) investigaram os efeitos antimicrobianos da água ozonizada contra microrganismos relacionados com alimentos e determinou que o ozônio efetivamente inativou bactérias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *B. cereus*, *Enterococcus fecalis*, assim como bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia enterocoliticas*. O pesquisador também determinou que ozônio inativa leveduras como *Candida albicans* e *Zygosaccharomyces bacieli* e esporos de *Aspergillus niger*. A destruição de bactérias pelo ozônio é alcançada pelo ataque das glicoproteínas e/ou glicolipídeos da membrana bacteriana.

Segundo KIM & YOUSEF (2000), a concentração de ozônio varia, por razões práticas, conforme diferentes microrganismos são testados. Para *E. coli* O157:H7 e *Pseudomonas fluorescens* obteve-se resultados diferentes. A quantidade de 0,2 ppm de ozônio inativou 0,9 ciclos logarítmicos de *P. fluorescens* em 30 segundos, enquanto 1,2 ppm diminuiu a população deste microrganismo em 5 ciclos logarítmicos em tratamento de tempo similar. Quando *E. coli* O157:H7 foi tratada com 0,3 e 1 ppm de ozônio por 25 segundos a contagem diminuiu em 1,3 e 3,8 ciclos logarítmicos, respectivamente.

A Tabela 1.1 apresenta microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, respectivos tempo de atuação e concentrações de água ozonizada.

Tabela 1.1 – Inativação de bactérias com utilização de água ozonizada.

Bactéria	Condições de Tratamento				Redução de ciclo de Log	Referências
	Ozônio (mg L ⁻¹)	Tempo (min)	pH	Temp. (°C)		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,3 - 3,8	0,5	5,9	25	1,3 - ~7	Kim e Yousef, 2000
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,2 - 1,8	0,5	5,9	25	0,7 - ~7	Kim e Yousef, 2000
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,1	10	7,2	25	60 - 70%	Lee <i>et al.</i> , 1998
<i>S. aureus</i>	0,3 - 1,97	10			4 - 6	Lezcano <i>et al.</i> , 1998
<i>S. aureus</i>		0,25	7,0	25	> 2,0	Burleson <i>et al.</i> , 1975
<i>Escherichia coli</i>	0,065	0,5			3,5	Katzenelson <i>et al.</i> , 1974
<i>E.coli</i>	0,004-0,8	0,5 - 2,0	6,9		0,5 - 6,5	Finch <i>et al.</i> , 1988
<i>E.coli</i>	0,23 - 0,26	1,67	7,0	24	4,0	Farooq e Akhlaque, 1983
<i>E.coli</i>	0,53	0,1	6,8	1	2,0	Fetner e Ingols, 1956
<i>E.coli</i> O 157:H7	0,3 - 1,0	< 0,5	5,9	25	1,3 - 3,8	Kim e Yousef, 2000
<i>Legionella pneumophila</i>	0,32	20	7,0	24	> 4,5	Edelstein <i>et al.</i> , 1982
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,5 - 6,5	0,5		25	0,6 - ~4	Dave, 1999
<i>S.typhimurium</i>	0,23 - 0,26	1,67	7,0	24	4,3	Farooq e Akhlaque, 1983
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,2 - 1,2	< 0,5	5,9	25	0,9 - 5	Kim e Yousef, 2000

(adaptado de KRADRE *et al.*, 2001)

GREENE *et al.* (1999) propuseram o uso de água ozonizada como um sanitizante para plantas de processamento de alimentos de produtos lácteos. Os autores compararam a eficiência da água ozonizada com o calor e o cloro na desinfecção de superfícies de ácido inoxidável inoculados com *Pseudomonas fluorescens*. Foi utilizado 0,6 ppm de ozônio por 10 minutos, 100 ppm de cloro por 2 minutos e 77 ± 1 °C por 5 minutos. Dez minutos de ozonização reduziu a população bacteriana em 7,3 ciclos logarítmicos, seguido por 5,4 ciclos

logarítmicos quando utilizado o calor e 3,07 ciclos logarítmicos pelo sanitizante clorado.

Em estudo realizado por SHARMA & DEMIRCI (2003), a população de *E.coli* O157:H7 foi reduzida em 2,2 ciclos logarítmicos UFC g⁻¹ quando brotos de alfafa foram tratados com uma concentração de 21 ppm de ozônio durante 2 minutos de exposição. Ainda foi observado que para se obter a redução de 2,0 ciclos logarítmicos UFC g⁻¹ de *E.coli* no mesmo produto seria necessário a utilização de 500 ppm de hipoclorito de sódio durante 2 minutos. O uso de altas concentrações de cloro podem resultar em subprodutos potencialmente problemáticos para saúde humana ou para o ambiente (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004).

KHADRE & YOUSEF (2001) estudaram esporos de *B. cereus* e *B. subtilis* com 11mg L⁻¹ de água ozonizada, produzida pelo borbulhamento do gás em água destilada, durante 1 minuto na temperatura de 22°C, seguido de neutralização com tiosulfato de sódio e observaram redução de 6,1 e 5,7 ciclos logarítmicos, respectivamente.

A ozonização é um tratamento altamente eficaz contra microrganismos patogênicos ou deterioradores encontrados em frutas e verduras frescas, além de estender a vida de prateleira destes produtos. De acordo com FOLEY *et al.* (2002) a sanitização de produtos frescos com água ozonizada é uma excelente ferramenta para reduzir a população de microrganismos e parasitas da superfície destes. Sua utilização em alta escala poderá reduzir o risco de doenças, porém é necessário avaliar a tolerância de frutas e hortaliças quanto à doses e tempos de exposição à água ozonizada.

1.3 Referências Bibliográficas

ANVISA. **Resolução 12 de 2 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil], Brasília, 2001.

BARBOSA NETA, R.X.; HOLLAND, N.; DAMASCENO, L.S.F.S.C. Análise dos perigos e pontos críticos de controle durante o preparo da alface servida no restaurante universitário da UFRN. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.126/127, p.36-43, 2004.

BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.2, p.204-216, 1995.

BEUCHAT, L.R. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes and lettuce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.10, 1998.

BOLIN, H.R., STAFFORD, A.E., KING Jr., A.D., HUXSOLL, C.C. Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, n.5, p.1319-1321, 1977.

CANTWELL, M. Fresh-cut product biology requirements. **Perishables Handling Newsletter**, University of California, Davis, v.81, 1995.

CRISTÓVÃO, D.A. **Contaminação da alface (*Lactuca sativa* L) por microrganismos de origem fecal**. São Paulo, 1958. Tese (Catedrático em Microbiologia e Imunologia Aplicada) – Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

FOLEY, D.M., DUFOUR, A., RODRIGUEZ, L., CAPORASO, F., PRAKASH, A. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in shredded iceberg lettuce by chlorination

and gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**. v.63, p.391-396. 2002.

FRANCO, B.D.G.; HOEFEL, J.L.M. Coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* em alfaces comercializadas em São Paulo. **Revista Ciências e Tecnologia de Alimentos da SBCTA**, Campinas, v.3, n.1, Jan-Jun.1983.

FRODER, H. **Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas**. São Paulo, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

GELLI, D.S. Condições higiênico-sanitária de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, SP, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz.**, São Paulo, v.39, n.1, p.37-43, 1979.

GOULARTE, L. **Aplicação de processos combinados – processamento mínimo e radiação ionizante (^{60}Co) – visando o aumento da segurança microbiológica de alface (*Lactuca sativa*, L.)**. São Paulo, 2003. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

GREENE, A.K., SMITH, G.W., KNIGHT, C.S. Ozone in dairy chilling water systems. **International Journal Dairy Technology**. v.52, n.4, p.126-128, 1999.

GUZEL-SEYDIM, Z.B., GREENE, A.K., SEYDIM, A.C. Use of ozone in the food industry. **Lebensm.-Wiss, u.-Technology** 37, p.453-460, 2004.

KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E.. Sporocidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.131-138, 2001.

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

KIM, J.G. **Ozone as an antimicrobial agent in minimally processed foods** (DPhil thesis). Columbus, Ohio: Ohio State University. p.50-199, 1998.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., CHISM. G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on Lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, p.17-37, 1999A.

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**, Des Moines, v.62, n.9, p.1071-1087, 1999B.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. **Journal of Food Science**. Chicago, v.65, n.3, p.521-528, 2000.

LEITÃO, M.F.F., MONTEIRO F.E., DELAZARI, I., ANGELUCCI, E. Eficiência de desinfetantes na redução da contaminação bacteriana da alface (*Lactuca sativa*). **Coletânea do ITAL**, Campinas, v.18, n.2, p.201-226, 1981.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 975p. 2002.

NGUYEN-the,C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Lauderdale, v.34, n.4, 1994.

PARISH, M. E.; BEUCHAT, L. R.; SUSLOW, T. V.; HARRIS, L. J.; GARRET, E. H.; FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. In: **Comprehensive reviews in food science and food safety**. IFT/FDA, v. 2, 204p., 2001.

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.

SHARMA, R.R., DEMIRCI, A. Application of ozone for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfafa sprouts. **Journal of Food Processing Preservation**. v.27, p.51-64. 2003.

SIQUEIRA, I.M.C. Avaliação microbiológica de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes industriais da Grande Belo Horizonte. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n.49, 1997.

YANG, P.P.W., CHEN, T.C. Stability of ozone and its germicidal properties on poultry meat microorganisms in liquid phase. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.2, 1979.

CAPITULO 2 - INATIVAÇÃO DE *Escherichia coli* O157:H7 E *Bacillus subtilis* POR ÁGUA OZONIZADA

RESUMO

O ozônio é um potente sanitizante para uso no processamento de alimentos, utilizado com sucesso para a inativação de microrganismos patogênicos e deterioradores. O objetivo deste trabalho foi estudar a eficiência da água ozonizada para a inativação de *Escherichia coli* O157:H7 e *Bacillus subtilis*. O sanitizante foi utilizado nas concentrações de 0,6, 0,8 e 1,0 mg L⁻¹ e tempos de contato de 1, 3 e 5 minutos. Para todo o experimento foi utilizada água de abastecimento público na temperatura de 22°C e pH de 7,6 e a neutralização do ozônio foi realizada pelo tiosulfato de sódio. A eficiência do sanitizante foi avaliada em função de contagens totais em placas para cada microrganismo alvo. Obteve-se para *E.coli* O157:H7, nas concentrações de 0,6, 0,8 e 1,0 mg L⁻¹, reduções de 1,9, 3,9 e 6,6 ciclos logarítmicos, respectivamente, para o tempo de contato de 1 minuto, sendo que a concentração inicial do microrganismo foi de aproximadamente 10⁸ UFC mL⁻¹. Nos demais tempos de exposição (3 e 5 minutos), na concentração de 1,0 mg L⁻¹, a inativação da *E. coli* O157:H7 foi total. Para o *B. subtilis*, no tempo de exposição de 1,0 minutos e com a concentração inicial de 10⁸ esporos mL⁻¹, as reduções foram de 2,5 e 5,3 ciclos logarítmicos nas concentrações de 0,6 e 1,0 mg L⁻¹, respectivamente. Para o tempo de 3 minutos os esporos foram inativados em até 5,8 ciclos logarítmicos na concentração de 1,0 mg L⁻¹. O sanitizante mostrou-se eficaz na inativação de *E. coli* O157:H7 e esporos de *B. subtilis*.

Palavras-chave: *Escherichia coli* O157:H7; *Bacillus subtilis*; água ozonizada

CHAPTER 2: *Escherichia coli* O157:H7 AND *Bacillus subtilis* INACTIVATION BY OZONE WATER

ABSTRACT

The ozone is a potent sanitizer for use in the processing of food products, used with success for the inactivation of pathogenic microorganisms and deteriorates. The ozone water efficiency in the for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Bacillus subtilis*, was the objective of this work. The sanitizer was used in the concentrations of 0,6, 0,8 and 1,0 mg L⁻¹ and, in all the concentrations, the times of contact with the microorganisms were of 1, 3 and 5 minutes. In these experiment was used current water in the temperature of 22°C and pH of 7,6 and the neutralization of the ozone was accomplished by the sodium thiosulfate. The efficiency of the sanitizer was evaluated in function of total enumeration in plates for each target microorganism. It was obtained for *E. coli* O157:H7 reductions varying of 1,9 to 6,6 logarithmic cycles for the time of 1 minute and the initial concentration of the microorganism was about 10⁸ CFU mL⁻¹. In the other times of exhibition (3 and 5 minutes), in the concentration of 1,0 mg L⁻¹, the inactivation of *E. coli* O157:H7 was total. For the *Bacillus subtilis*, in the time of exhibition of 1,0 minutes and with the initial concentration of 10⁸ spores mL⁻¹, the reductions varied of 2,9 to 6,3 logarithmic cycles in the concentrations of 0,6 to 1,0 mg L⁻¹. For the time of 3 minutes the spores were inactivated until 8,6 logarithmic cycles in the concentration of 1,0 mg L⁻¹. The sanitizer showed effective in the inactivation of *E. coli* O157:H7 and spores of *B. subtilis* in the concentrations and established times compared to the other methods of existent sanitization.

Key Words: *Escherichia coli* O157:H7; *Bacillus subtilis*; ozone water.

2.1 Introdução

A ozonização tem sido utilizada por anos na Europa para sanitizar água com destino ao consumo humano. Atualmente, outros usos comerciais são observados, incluindo tratamento de piscinas, sanitização de galões de água, superfícies de alimentos, plantas e equipamentos de processamento de alimentos e desinfecção de carcaças.

O ozônio apresenta certas características que o torna atrativo para o uso como um sanitizante no processo de alimentos. É um forte agente antimicrobiano, com alta reatividade e decomposição espontânea em produtos não tóxicos (KIM *et al.*, 1999A). Como se decompõe rapidamente em água, seu uso é seguro, pois dificilmente deixará resíduos nos alimentos. É utilizado com sucesso na inativação da microflora de carnes, lácteos, aves, peixes, frutas e vegetais (SHARMA & DEMIRCI, 2003). A *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos da América (EUA), recentemente aprovou o seu uso nas formas aquosa ou gasosa para utilização como sanitizante e em plantas de processamento de alimentos quando combinado com a aplicação de boas práticas de fabricação e teve sua utilização aprovada pelo departamento de agricultura dos EUA em 1997 (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004; SHARMA & DEMIRCI, 2003).

O ozônio é um sanitizante alternativo ao cloro e tem se mostrado muito eficaz na inativação de bactérias, vírus e cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium*, ambos protozoários resistentes ao cloro.

GUZEL-SEYDIM *et al.* (2004) explicam que para gerar ozônio é necessário que ocorra uma ruptura da molécula do oxigênio diatômico, formando dois fragmentos de oxigênio que podem reagir com outras moléculas também de oxigênio e formar a molécula de O₃. No método denominado descarga corona há dois eletrodos, um de alta e outra de baixa tensão, formando um vão entre eles. Segundo KIM *et al.*, (1999B), uma corrente alternada com alta voltagem é aplicada através deste vão, na presença de ar atmosférico ou oxigênio, onde ocorre a

excitação dos elétrons de oxigênio que, então, induz a quebra das moléculas de O₂. Os átomos quebrados combinam-se com outras moléculas de oxigênio diatômico e formam o ozônio. A produção de ozônio varia, dependendo da voltagem, da frequência da corrente, do vão de descarga elétrica e da pressão absoluta no interior do vão. O método de descarga corona tem sido largamente utilizado para produzir grandes quantidades de ozônio.

Como sanitizante, o ozônio atua primeiramente na membrana celular, reagindo com glicoproteínas ou glicolípídeos. Em adição, interage com substâncias presentes no citoplasma e no núcleo, degradando purinas e pirimidinas do DNA, sendo este um dos fatores responsáveis pela morte celular. Sendo assim, o ozônio deve primeiro se difundir através da superfície do microrganismo e então permear pela membrana e citoplasma, fazendo com que a taxa de transferência de massa seja afetada por diversas reações intra e extracelulares com biomoléculas (MACEDO, 2004).

A suscetibilidade de microrganismos ao ozônio varia de acordo com o estado fisiológico das células, pH do meio, temperatura, umidade e a presença de aditivos, como ácidos, surfactantes e açúcares. Concentrações relativamente baixas de ozônio e um curto contato de tempo são suficientes para inativar suspensões puras de bactérias, fungos, leveduras, parasitas e vírus (KIM *et al.*, 1999B).

A pureza e o pH da água afetam a solubilidade do ozônio em água. KIM (1998) borbulhou ozônio em água duplamente destilada, em água deionizada e em água de torneira com os pH de, respectivamente, 5,6; 5,9 e 8,23 . Observou que o alto pH da água de torneira pode ter desestabilizado o ozônio e a taxa de solubilização diminuiu. Observou-se, também, que a matéria orgânica existente na água de torneira consumiu o ozônio.

RESTAINO *et al.* (1995) investigaram os efeitos antimicrobianos da água ozonizada contra microrganismos relacionados com alimentos e determinaram

que o ozônio efetivamente inativou bactérias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus fecalis*, assim como bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia enterocoliticas*. Os pesquisadores também determinaram que ozônio inativa leveduras como *Candida albicans* e *Zygosaccharomyces bacieli* e esporos de *Aspergillus niger*. A destruição de bactérias pelo ozônio é alcançada pelo ataque às glicoproteínas e/ou glicolipídeos da membrana bacteriana.

KHADRE & YOUSEF (2001) estudaram esporos de *B. cereus* e *Bacillus subtilis* com 11mg L⁻¹ de água ozonizada, produzida pelo borbulhamento do gás em água destilada, durante 1 minuto na temperatura de 22°C, seguido de neutralização com tiosulfato de sódio e observaram redução de 6,1 e 5,7 ciclos logarítmicos, respectivamente.

Segundo KIM & YOUSEF (2000) a concentração de ozônio varia, por razões práticas, de acordo com os diferentes microrganismos testados. Para *Escherichia coli* O157:H7 e *Pseudomonas fluorescens* obtiveram resultados diferentes. A quantidade de 0,2 ppm de ozônio inativou 0,9 ciclos logarítmicos de *P. fluorescens* em 30s, enquanto 1,2 ppm diminuiu a população deste microrganismo em 5 ciclos logarítmicos em tratamento de tempo similar. Quando *E. coli* O157:H7 foi tratada com 0,3 e 1 ppm de ozônio por 25 segundos a contagem diminuiu em 1,3 e 3,8 ciclos logarítmicos, respectivamente.

A inativação de microrganismos por água ozonizada é possível seguindo diferentes cinéticas e dependendo da espécie de microrganismo a ser tratado. Antes de o ozônio ser aplicado com sucesso na indústria de alimentos, os comportamentos padrões dos microrganismos devem ser elucidados. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar a inativação de *E. coli* O157:H7 e *B. subtilis* por meio de tratamento por água ozonizada em diferentes concentrações e tempos.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Microrganismos e Meios de Cultura

As culturas de *E. coli* O157:H7 e *B. subtilis* ATCC 6633 utilizadas foram obtidas na Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz.

A cultura de *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 foi mantida à temperatura de 4°C em Ágar Triptico Soja (TSA) inclinado. Semanalmente a cultura foi repicada para manutenção da viabilidade das células (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1988).

A cultura de *B. subtilis* ATCC 6633 também foi mantida à temperatura de 4°C em Ágar Triptico Soja (TSA) inclinado, sendo a cultura repicada semanalmente para manutenção da viabilidade das células. Para preparação da suspensão de esporos, foi empregado Ágar Triptico Soja (TSA) adicionado de 3% de sulfato de manganês (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1988).

2.2.2 Preparo do Inóculo

As suspensões dos microrganismos foram preparadas utilizando-se tubos contendo 10 mL de meio de cultura Ágar Triptico Soja (TSA) inclinado, onde foram estriadas a cepa de *E. coli* O157:H7 e a de *B. subtilis* ATCC 6633, incubados a 32-35°C, por 24 horas. Empregando-se 3 mL de solução fisiológica estéril 0,1%, foi transferida a cultura de *E. coli* O157:H7 crescida sobre o ágar para uma garrafa de Roux contendo 250 mL do mesmo meio de cultura (TSA). O frasco de Roux foi incubado a 35°C por 24 horas. A cultura resultante na superfície do meio foi lavada com 50 mL de solução fisiológica 0,1% estéril, com o auxílio de pérolas de vidro.

Da mesma forma, para cultura de *B. subtilis* foi empregado 3 mL de solução fisiológica estéril 0,1%, para lavagem da cultura crescida sobre o ágar, que foi transferida para uma garrafa de Roux contendo 250 mL do mesmo meio de cultura adicionado de 3% de sulfato de manganês. O frasco de Roux foi incubado a 35°C

por 5 dias. A cultura resultante na superfície do meio foi lavada com 50 mL de solução fisiológica 0,1% estéril, com o auxílio de pérolas de vidro. Na padronização da suspensão procedeu-se em choque térmico, onde a suspensão foi centrifugada, o sedimento ressuspensão com aproximadamente 50 mL de solução fisiológica e aquecido por 30 minutos a 70°C. A viabilidade dos esporos foi assegurada por teste em placa.

Foram ajustadas as diluições de *E. coli* O157:H7 e *B. subtilis*, para obtenção de soluções com 60% de transmitância no comprimento de onda de 580 nm empregando-se espectrofotômetro UV/VIS. Os inóculos foram ajustados a fim de se obter suspensões com contagens de aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹ verificada pelo método de contagem em placa.

As suspensões foram mantidas em geladeira a 4°C até o momento da utilização (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1988).

2.2.3 Gerador de Ozônio

O equipamento utilizado na produção de ozônio (Figura 2.1) foi fabricado pela empresa Panozon, constando de gerador de ozônio modelo PNZ 714, concentrador de oxigênio (90 a 95% de pureza), tanque de contato e um sistema de injeção com bomba para filtração. O sistema possui também um tanque de gaseificação com a função de separar o ozônio que permaneceu na forma de gás e retirá-lo da tubulação, enviando o mesmo para um circuito interno onde é destruído (reduzido a oxigênio). A água ozonizada é recirculada em uma vazão de 20 L min⁻¹ para uma cuba de aço inoxidável com capacidade de 50 litros. O equipamento permite o controle da concentração de ozônio produzido de 0,6 mg L⁻¹ a 1,2mg L⁻¹.



Figura 2.1 – Equipamento gerador de água ozonizada.

2.2.4 Determinação da Atividade Neutralizante do Tiosulfato de Sódio 10%

A atividade e inocuidade da solução de tiosulfato de sódio a 10%, foram determinadas utilizando-se uma cepa de *E. coli* O157:H7.

Uma cultura de 24 horas da cepa de *E. coli* O157:H7 foi preparada e padronizada conforme item 2.2.3. A partir desta suspensão preparou-se uma solução de trabalho 1:100, transferindo-se uma alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana inicial para uma garrafa de diluição contendo 99 mL de soro fisiológico estéril e pérolas de vidro para facilitar a homogeneização da mesma, sendo sua população fixada em aproximadamente 10^6 UFC mL⁻¹. A partir da solução obtida foram preparadas 4 soluções denominadas A, B, C e D.

Para preparação das soluções A,B,C e D, alíquotas de 1 mL da diluição da suspensão bacteriana foram transferidas para erlenmeyers de 250 mL distintos, contendo respectivamente, 100 mL de água destilada (Solução A), 100 mL de água destilada e 0,2 mL de tiosulfato de sódio 10% (Solução B), 100 mL de água ozonizada e 0,2 mL de tiosulfato de sódio (Solução C) e 100 mL de água ozonizada (Solução D).

As soluções A,B,C e D tiveram suas densidades microbianas determinadas pelo método padrão de contagem (em placas), utilizando ágar TSA, após 3

minutos do preparo. O mesmo ensaio foi realizado em triplicata a fim de comprovar sua repetibilidade.

A utilização do tiosulfato de sódio está relacionada com a neutralização do ozônio nos experimentos *in vitro* para a avaliação da inativação dos microrganismos apresentados.

2.2.5 Método para Quantificação do Ozônio Dissolvido na Água

A concentração de ozônio livre foi determinada por meio de fotometria utilizando-se o Kit Ozônio 2 (Vacu-Vials) – CHEMetrics, Inc., que consistiu na preparação de um branco com água destilada e, em seguida, de uma leitura da amostra de água ozonizada recolhida em uma cubeta do equipamento. A quantificação dos resultados foi realizada a partir de leituras no fotômetro CHEMetrics, Inc. – Ozone2 – Tipo I-2015.

2.2.6 Inativação de Microrganismos com Tratamento de Ozônio

Os tratamentos com ozônio foram divididos em três grupos (OZ1, OZ2 e OZ3), que se diferenciaram pela concentração de ozônio utilizado de 0,6, 0,8 e 1,0 mg L⁻¹, respectivamente. Para cada grupo foi aplicado 3 tempos de exposição de 1, 3 e 5 minutos, com 3 repetições para cada tempo utilizando-se água ozonizada obtida do reservatório do equipamento de ozonização. Utilizou-se água de abastecimento público a 22°C e pH 7,6, transportada em erlenmeyer de 500 mL.

Para os tratamentos descritos, foram testadas as suspensões dos dois microrganismos escolhidos para o experimento e preparados conforme item 4.2.3. Após as exposições dos microrganismos à água ozonizada, em cada um dos tempos estabelecidos, a ação do ozônio foi interrompida com a adição de 0,1 mL de solução de tiosulfato de sódio 10%, permitindo, assim, que as amostras fossem analisadas e a densidade microbiana sobrevivente fosse determinada, sem que a ação residual do tratamento interferisse além do tempo pré determinado para cada ensaio.

As contagens dos microrganismos sobreviventes foram realizadas por plaqueamento e os resultados expressos em UFC mL⁻¹.

Foram realizados dois ensaios distintos, para cada microrganismo com finalidade de confirmação da eficiência do tratamento e os resultados obtidos foram expressos em número de reduções de unidades formadoras de colônias.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Atividade Neutralizante do Tiosulfato de Sódio 10%

A Tabela 2.1 apresenta os resultados que comprovam a eficiência e inocuidade do agente neutralizante tiosulfato de sódio. As concentrações iniciais para os ensaios 1 e 2 foram, respectivamente, $6,3 \times 10^6$ e $8,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e o tempo de exposição às suspensões foi de 3 minutos.

Tabela 2.1 - Avaliação da eficiência e inocuidade do agente neutralizante tiosulfato de sódio em relação à cepa de *E. coli* O157:H7.

Amostra	Ensaio 1	Ensaio 2
A (-)	$5,6 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
B (-)	$4,2 \times 10^6$	$6,3 \times 10^6$
C (-)	$3,7 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$
D (-)	< 10	< 10

A = Suspensão de células de *E.coli* em solução aquosa.

B = Suspensão de células de *E.coli* em solução aquosa em presença de tiosulfato de sódio 10%

C = Suspensão de células de *E.coli* em solução de água ozonizada (1 mg L⁻¹) em presença de tiosulfato de sódio 10%

D = Suspensão de células de *E.coli* em solução de água ozonizada (1 mg L⁻¹)

(-): As contagens foram efetuadas após 3 minutos de exposição .

Observou-se que nas suspensões A e B não houve alteração na contagem de *E. coli* O157:H7 após o tratamento com água e água com tiosulfato de sódio, respectivamente, demonstrando que estas soluções não possuem poder de sanitização. No ensaio C pode-se verificar que o tiosulfato neutralizou a ação do

ozônio, não permitindo a inativação do microrganismo alvo. Já no ensaio D o sanitizante, sem a presença do tiosulfato de sódio, inativou o microrganismo.

A utilização do tiosulfato de sódio é de extrema importância para neutralizar a atuação do ozônio e, com isso, verificar a eficiência do sanitizante no período de tempo especificado, sem incorrer no erro do fator residual.

Os resultados apresentados estão de acordo com aqueles observados por KHADRE *et al.* (2001) que utilizaram, em seu trabalho de inativação de microrganismos com água ozonizada, os mesmos parâmetros de neutralização para interromper a ação do tratamento com ozônio nos tempos determinados.

2.3.2 Quantificação do Ozônio Dissolvido na Água

A Tabela 2.2 apresenta o estudo da permanência do teor residual de ozônio após sua diluição em água, visando estabelecer a “meia-vida” do mesmo até sua neutralização.

Tabela 2.2 - Teor residual de ozônio em diferentes etapas com concentração de 1 mg L^{-1}

Etapas	Tempo (minutos)		
	5	20	60
E1	1 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}
E2	1 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	$0,82 \text{ mg L}^{-1}$
E3	1 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}

E1 = Água utilizada no estudo da cinética;

E2 = Água no tanque de tratamento das alfaces contaminadas intencionalmente;

E3 = Água circulante e recebendo folhas do vegetal.

Os resultados demonstram que o ozônio, sem renovação do sanitizante (E2), foi parcialmente consumido pela matéria orgânica após 60 minutos de exposição. Com o equipamento ligado e ocorrendo o tratamento com água circulante (E3), bem como o sanitizante em repouso em um béquer, sem a

presença de matéria orgânica (E1), não houve diminuição de concentração até 60 minutos.

Contrariando dados deste trabalho, MACEDO (2004) explica que na desinfecção de vegetais pode-se utilizar o ozônio com a vantagem de que ele não reage com a matéria orgânica presente na água, evitando a formação de compostos tóxicos como organoclorados e entende, ainda, como desvantagem, a “meia-vida” do ozônio, que é de apenas 20 minutos, o que não permite o seu estoque por períodos mais longos.

KIM & YOUSEF (2000) estudaram o resíduo de ozônio e o grau de inativação quando utilizado 0,3, 1,1 e 2,1 mg L⁻¹ de água ozonizada em uma suspensão com aproximadamente 10⁷ UFC mL⁻¹ de *Listeria mesenteroides* por 30 segundos e obtiveram uma inativação de, respectivamente, 4,8, 6,0 e 6,0 reduções logarítmicas, sendo que a quantidade de ozônio residual foi de 0,0; 0,5 e 0,9 mg L⁻¹, respectivamente. Os autores estimaram que a demanda de ozônio para 10⁷ UFC mL⁻¹ de *L. mesenteroides* foi de 0,83 mg L⁻¹ o que significa cerca de 10⁹ moléculas de ozônio são necessárias para cada célula da bactéria.

2.3.3 Inativação de *E.coli* O157:H7 e *B. subtilis* por água ozonizada

A Figura 2.2 mostra o número de reduções de unidades formadoras de colônias de *E. coli* O157:H7 por mL. As diferentes concentrações de ozônio foram aplicadas, com pH de 7,0 e a temperatura utilizada foi de 22°C. As concentrações iniciais de microrganismos utilizadas para os experimentos nas concentrações de 0,6, 0,8 e 1 mg L⁻¹ de água ozonizada foram de, respectivamente, 2,8 x 10⁸, 4,2 x 10⁸ e 6,9 x 10⁸ UFC mL⁻¹.

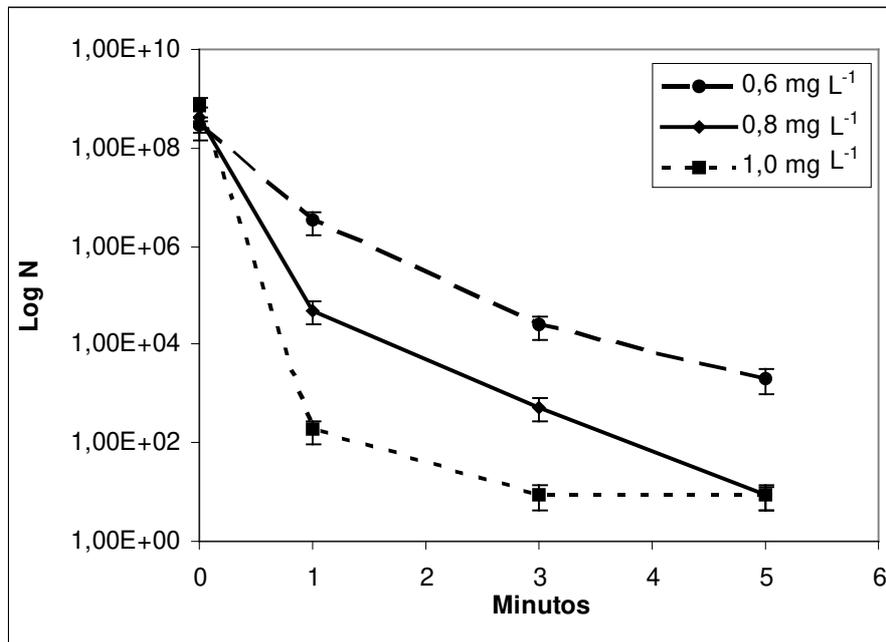


Figura 2.2 – Número de reduções de unidades formadoras de colônias de *E. coli* O157:H7 em função do tempo de exposição às diferentes concentrações de água ozonizada.

Observou-se que para as concentrações de 0,6; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹ de ozônio testadas para a cepa de *E. coli* O157:H7, no tempo de 1 minuto, houve uma redução de 1,9; 3,9 e 6,6 ciclos logarítmicos respectivamente. No tempo de 3 minutos, obtendo-se reduções de 4,0 e 5,9 ciclos logarítmicos para as concentrações de 0,6 e 0,8 mg L⁻¹. Para concentração de 1,0 mg L⁻¹ a eliminação do microrganismo foi maior que 10⁸ UFC mL⁻¹.

No tratamento de 5 minutos, na menor concentração (0,6 mg L⁻¹), a redução foi de 5,1 ciclos logarítmicos, seguida por 7,7 na concentração de 0,8 mg L⁻¹, e foi mantida a total destruição do microrganismo (10⁸ UFC mL⁻¹) com a concentração de 1 mg L⁻¹. Nota-se que para esta concentração obteve-se, para 1 minuto, uma inativação de 99,99% para a *E. coli* O155:H7.

ACHEN & YOUSEF (2001) inocularam maçãs com contagem de 10⁹ UFC mL⁻¹ de *E. coli* O157:H7 e mantiveram-nas armazenadas por 2,5 horas na temperatura de 22 a 25°C. Posteriormente, as frutas foram mergulhadas em uma

solução de 22 e 24 mg L⁻¹ de água ozonizada por 3 minutos e observaram-se uma redução de, respectivamente, 2,6 e 3,7 ciclos logarítmicos de UFC mL⁻¹. O ozônio foi gerado através do borbulhamento do gás em um bequer contendo 1000 mL de água deionizada. Para os autores a limitação da eficiência do sanitizante ocorreu devido a transferência da bactéria para o interior do fruto durante o período de inoculação, acarretando, desta forma, uma exposição ineficiente da *E. coli* O157:H7 a ação do ozônio borbulhado em água. Diferentemente da pesquisa realizada pelos autores, este trabalho estudou a inativação do referido microrganismo sem a presença de matéria-orgânica, onde foi encontrada uma redução de aproximadamente 8 ciclos logarítmicos em exposição por 3 minutos na concentração de 1,0 mg L⁻¹.

KIM & YOUSEF (2000) estudaram a inativação cinética de *P. fluorescens*, *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* com diferentes concentrações de água ozonizada. A quantidade de 0,2 mg L⁻¹ de ozônio inativou 0,9 ciclos logarítmicos de *P. fluorescens* em 30 segundos, enquanto 1,2 mg L⁻¹ diminuiu a população deste microrganismo em 5 ciclos logarítmicos em tratamento de tempo similar. Quando *E. coli* O157:H7 foi tratada com 0,3 e 1,0 mg L⁻¹ de ozônio por 25 segundos, a contagem diminuiu em 1,3 e 3,8 ciclos logarítmicos, respectivamente. Contagens de *L. monocytogenes* reduziram em 4,6 e 5,7 ciclos logarítmicos quando utilizado, respectivamente, 0,4 e 0,8 mg L⁻¹ de água ozonizada por 90 segundos de exposição. É interessante salientar que a suspensão inicial estava ajustada com 10⁸ UFC mL⁻¹ e após o tempo especificado a solução foi neutralizada com tiosulfato de sódio. Estes pesquisadores concluíram que os microrganismos testados mostraram similar inativação cinética. As maiores destruições ocorreram nos primeiros 30 segundos e a resistência das bactérias seguiu a seguinte ordem decrescente: *E. coli* O157:H7, *P. fluorescens* e *L. monocytogenes*. Os dados deste trabalho confirmam os resultados encontrados pelos autores acima referidos. Obteve-se no primeiro minuto uma destruição maior

e mais acentuada, alcançando reduções de até 6,6 ciclos logarítmicos na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

FINCH *et al.* (1988) determinaram a cinética de destruição de *E.coli* utilizando $4,4 \text{ mg L}^{-1}$ de ozônio em um tempo de contato de 30 e 120 segundos. Os autores encontraram uma redução de 0,5 e 6,5 ciclos logarítmicos de UFC mL^{-1} , respectivamente. Os dados deste trabalho não confirmam os encontrados pelos autores que utilizaram o dobro do tempo e uma concentração de ozônio 4,4 vezes maior para atingir a mesma redução de 6,5 ciclos logarítmicos.

A Figura 2.3 mostra o número de reduções decimais de esporos de *B. subtilis* submetida a um tratamento com água ozonizada. As diferentes concentrações de ozônio foram aplicadas, com pH de 7,0 e a temperatura utilizada foi de 22°C . As concentrações iniciais de microrganismos utilizadas para os experimentos nas concentrações de 0,6, 0,8 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de água ozonizada foram de $2,2 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$ e $3,7 \times 10^8$ UFC mL^{-1} .

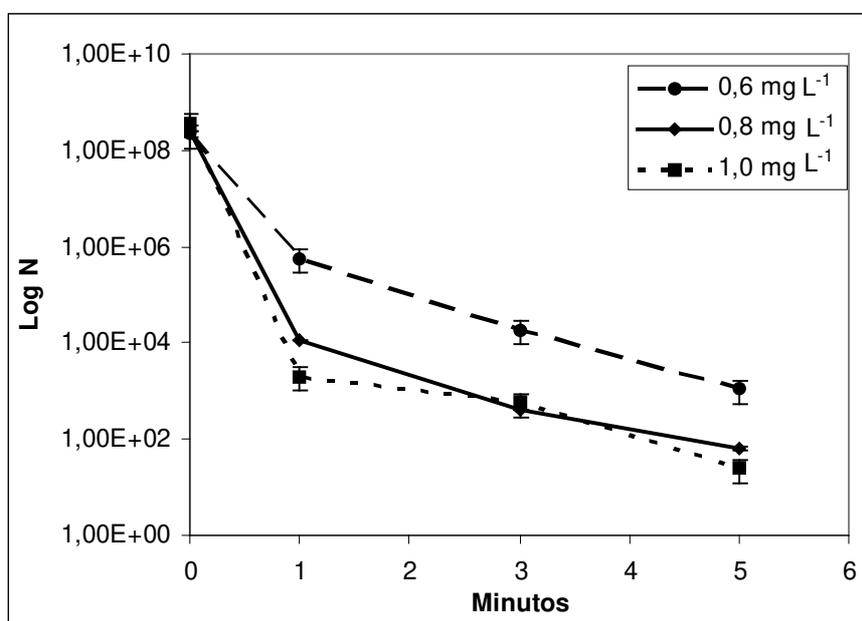


Figura 2.3 – Número de reduções decimais de *B. subtilis* em função do tempo de exposição às diferentes concentrações de água ozonizada.

Observou-se, que para o *B. subtilis* as concentrações de 0,6, 0,8 e 1,0 mg L⁻¹ de ozônio, no tempo de 1 minuto, houve uma redução de 2,5; 4,3 e 5,3 ciclos logarítmicos, respectivamente. No tempo de 3 minutos, foram obtidas reduções de 4,0; 5,8 e 5,8 ciclos logarítmicos para as concentrações de 0,6; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹, respectivamente. No tratamento durante 5 minutos, na menor concentração (0,6mg L⁻¹) a redução foi de 5,3 ciclos logarítmicos, seguida por 6,6 e 7,2 ciclos nas concentrações de 0,8 e 1,0 mg L⁻¹, respectivamente. A total inativação do microrganismo não ocorreu, provavelmente, pela forma de esporos mostrar-se mais resistente do que o outro microrganismo estudado.

Em função do estudo estar sendo realizado com esporos de *B.subtilis*, uma forma mais resistente, observou-se que nos tempos de exposição de 3 minutos a 5 minutos houve maior resistência do microrganismo para sua inativação, gerando um cruzamento das linhas de regressão na condição de 0,8 e 1,0 mg L⁻¹.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados por MACEDO (2004), que relatou a utilização de ozônio em amostras de água inoculadas com populações de 10⁶ esporos mL⁻¹ de *B. subtilis*, obtendo uma redução de 3,0 ciclos logarítmicos para concentrações de 0,35 a 0,70 mg L⁻¹.

Observou-se que, quando comparado com células vegetativas, os esporos de bactérias possuem maior resistência ao ozônio. Pode-se observar que a *E.coli* O157:H7 apresentou redução de 6,6 ciclos logarítmicos no tempo de 1 minuto e a uma concentração de 1 mg L⁻¹, enquanto o *B.subtilis*, nas mesmas condições, apresentou 5,3 ciclos logarítmicos. Para os tempos de 3 a 5 minutos na concentração de 1 mg L⁻¹ a *E.coli* O157:H7 apresentou reduções superiores a 8 ciclos logarítmicos, enquanto que o *B.subtilis* 5,8 e 7,2 ciclos logarítmicos, respectivamente.

BROADWATER *et al.* (1973) reportaram que na concentração de 0,12 mg L⁻¹ de água ozonizada o esporo de *Bacillus sp* apresentou inativação maior que 2,0 reduções logarítmicas de UFC mL⁻¹ em 5 minutos de exposição. Esporos de *B.*

cereus nas mesmas condições de tempo e em concentração de 2,29 mg L⁻¹ de água ozonizada também obtiveram um número de reduções decimais acima de 2,0 ciclos logarítmicos de UFC mL⁻¹.

KHADRE & YOUSEF (2001) compararam a ação do peróxido de hidrogênio e da água ozonizada em aproximadamente 1,3x10⁷ esporos mL⁻¹ de contagem inicial de *Bacillus sp.* Enquanto 11 mg L⁻¹ de água ozonizada, por 1 minuto, inativou até 6,1 ciclos logarítmicos, dependendo da espécie testada, 10% de peróxido de hidrogênio, no mesmo período de exposição, reduziu até 1,6 ciclos logarítmicos dos esporos. Os pesquisadores concluíram que o *B. subtilis* e o *B. cereus* são mais sensíveis aos sanitizantes que os *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus megaterium* e o *Bacillus polymyxa*. A inativação do *B. subtilis* e do *B. stearothermophilus* por água ozonizada foi de, respectivamente, 6,1 e 1,3 ciclos logarítmicos.

2.4 Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- a água ozonizada nas concentrações de 0,6, 0,8 e 1,0 mg L⁻¹ nos tempos de contato de 1, 3 e 5 minutos, é eficiente na inativação de *E. coli* O157:H7 e esporos de *B. subtilis* com reduções variando de 1,9 à inativação total de uma concentração inicial de aproximadamente 10⁸ UFC ou esporos mL⁻¹;
- observa-se que, quando comparado à células vegetativas, os esporos possuem uma resistência ligeiramente maior ao ozônio;
- o tiosulfato de sódio é uma excelente substância para ser utilizada como neutralizante da atuação do ozônio;
- a meia vida do ozônio gerado pelo equipamento, sem a presença de matéria orgânica, é superior a 1 hora.

2.5 Referências Bibliográficas

ACHEN, M., YOUSEF A.E. Efficacy of Ozone Against *Escherichia coli* O157:H7 on Apples. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 9, p.1380-1384, 2001.

BROADWATER, W.T., HOEHN, R.C., KING, P.H. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. **Applied Microbiology**. 26:391-393, 1973.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

FINCH, G.R., SMITH, D.W., STILES, M.E. Dose-response of *Escherichia coli* in ozone demand-free phosphate buffer. **Water res.**, 22:1563-1570, 1988.

GUZEL-SEYDIM, Z.B., GREENE, A.K., SEYDIM, A.C. Use of ozone in the food industry. **Lebensm.-Wiss, u.-Technology**, 37, p.453-460, 2004.

KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E.. Sporocidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p 131-138, 2001.

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

KIM, J.G. **Ozone as an antimicrobial agent in minimally processed foods** (DPhil thesis). Columbus, Ohio: Ohio State University. P.50-199. 1998.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., CHISM. G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on Lettuce. **Journal of Food Safety**, v. 19, p.17-37, 1999A.

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**, Des Moines, v. 62, n. 9, p.1071-1087, 1999B.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 65, n. 3, p.521-528, 2000.

MACEDO, J.A.B. **Águas e Águas**. Belo horizonte: Conselho regional de Química. 977p., 2004.

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.

SHARMA, R.R.; DEMIRCI, A. Application of ozone for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfafa sprouts. **Journal of Food Processing Preservation**. v. 27, p.51-64. 2003.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE *Escherichia coli* O157:H7 INOCULADA EM ALFACE AMERICANA POR MEIO DE TRATAMENTO COM ÁGUA OZONIZADA

RESUMO

O foco na segurança do alimento para produtos frescos tem aumentado recentemente. As hortaliças folhosas, especialmente a alface, tem sido identificadas como veículos significativos de patógenos relevantes em saúde pública. O objetivo deste trabalho foi avaliar, microbiologicamente, alfaces minimamente processada e *in natura* disponíveis no mercado e verificar a redução de *Escherichia coli* O157:H7 intencionalmente inoculada na alface através da sanitização por água ozonizada. Amostras *in natura* e minimamente processadas foram avaliadas quanto a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus aureus*, e determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes. Dez amostras de alface americana foram inoculadas com *E. coli* O157:H7 e submetidas à sanitização por 1,0 mg L⁻¹ de água ozonizada durante 1,0 minuto. As alfaces minimamente processadas disponíveis no mercado apresentaram contagens médias de 2,8x10⁵ UFC g⁻¹ e 3,2x10⁴ UFC g⁻¹ de populações de aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae*, respectivamente, enquanto para as alfaces *in natura* o valor médio das populações de aeróbios mesófilos foi de 2,2x10⁵ UFC g⁻¹ e de 8,2x10³ UFC g⁻¹ para *Enterobacteriaceae*. Para as amostras minimamente processada observou-se que os coliformes termotolerantes variaram de 2,1x10² a 1,1x10³. As amostras de alface americana inoculadas com *E. coli* O157:H7 e sanitizadas com água ozonizada apresentaram uma redução média de 3,2 ciclos logarítmicos.

Palavras-chave: ozônio, *E. coli* O157:H7, alface, alface processamento mínimo, sanitização.

CHAPTER 3: THE INACTIVATION OF *Escherichia coli* INOCULATED IN ICEBERG LETTUCE BY OZONE WATER

ABSTRACT

Recently it has been increasing the focus in alimentary safety for fresh products. The vegetables, especially the lettuce, have been identified as significant vehicles of important pathogens in public health. To evaluate, microbiological, lettuces processed and in available nature in the market and to verify the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 intentionally inoculated in the lettuce through the sanitization for ozone water was the objective of this study. Samples in nature and minimally processed were appraised as the enumeration of aerobics mesophilic bacteria, molds and yeasts, *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus aureus*, and determination of the most probable number (MPN), of total and thermotolerant coliforms. Ten samples of Iceberg lettuce were inoculated with *E. coli* O157:H7 and submitted the sanitization for 1,0 mg L⁻¹ of ozone water for 1,0 minute. The lettuces available processed in the market presented medium enumeration of 2,8x10⁵ CFU g⁻¹ and 3,2x10⁴ CFU g⁻¹ of populations of aerobics mesophilic and *Enterobacteriaceae*, respectively, while for the lettuces in nature the medium value of the populations of aerobics mesophilic was 2,2x10⁵ CFU g⁻¹ and 8,2x10³ CFU g⁻¹ for *Enterobacteriaceae*. For the samples processed minimally were observed that the thermotolerant coliforms varied from 2,1x10² to 1,1x10³ CFU g⁻¹. The samples inoculated with *E. coli* O157:H7 presented a medium reduction of 3,2 logarithmic cycles.

Keywords: ozone, *Escherichia coli* O157:H7, lettuce, minimally processing, sanitizer.

3.1 Introdução

Muito se tem pesquisado em vários países com relação a contaminação de frutas e hortaliças e surtos de toxinfecções alimentares associados a esses alimentos (BEUCHAT, 2001). Entre as hortaliças mais vendidas para consumo cru está a alface (*Lactuca sativa L*), bastante utilizada na confecção de sanduíches, saladas, sucos e decorações de pratos diversos (BERBARI *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, tem aumentado o foco na segurança de frutas e hortaliças e, em particular, métodos para reduzir ou eliminar patógenos destes produtos. Tecnologias tradicionais utilizam a água com ou sem um agente sanitizante para lavar frutas frescas e vegetais. O cloro é largamente utilizado para melhorar a qualidade microbiológica e o controle de patógenos nos produtos frescos, porém tem o seu efeito limitado para a destruição de bactérias na superfície dos vegetais (XU, 1999).

Segundo PARISH *et al.* (2001), existem diversos métodos físicos, químicos e biológicos sendo investigados e utilizados para a redução da carga microbiana de frutas e hortaliças frescas, sendo que cada método apresenta vantagens e desvantagens distintas, dependendo do tipo de produto, fatores intrínsecos e extrínsecos e outras variáveis. A escolha do procedimento mais efetivo de descontaminação deve considerar a prevenção da contaminação dos alimentos com microrganismos patogênicos, níveis perigosos de resíduos químicos ou contaminantes físicos. Entretanto, isto não é sempre possível e a necessidade da limpeza e desinfecção de muitos tipos de produtos permanece de fundamental importância. Esses tratamentos são reconhecidos por reduzirem parcialmente a população microbiana e pela sua limitação, por necessitarem de emprego dentro de níveis que não causem impactos sensoriais inaceitáveis ao produto. Portanto, deve-se notar que após a contaminação das frutas e hortaliças por microrganismos patogênicos, a limpeza e a desinfecção são improváveis de eliminá-los totalmente.

Embora perigos químicos e físicos sejam preocupantes, os perigos específicos para vegetais minimamente processados residem, principalmente, nos contaminantes microbianos. Bolores, leveduras e bactérias conseguem se multiplicar rapidamente na superfície de vegetais e, por esta razão, os grupos de microrganismos encontrados nos produtos recém colhidos são bastante variados (BEUCHAT, 1998). A presença de numerosos gêneros de esporos, bactérias, bolores e leveduras em produtos frescos têm sido estudados por vários anos. Vários surtos de gastroenterites humanas têm sido relacionados ao consumo de frutas e hortaliças contaminadas. Saladas de vegetais contaminadas foram identificadas como veículo de diarreia de viajantes causada principalmente por *Escherichia coli* O157:H7 (BEUCHAT, 1995). Ainda, de acordo com este autor, as hortaliças folhosas, especialmente a alface, têm sido identificadas como veículos significantes de patógenos relevantes em saúde pública, incluindo e, com destaque, a bactéria entero-hemorrágica *E. coli* O157:H7.

O significado da presença de *E. coli* em um alimento deve ser avaliado sobre dois ângulos. Inicialmente, *E. coli* por ser uma enterobactéria, uma vez detectada no alimento, indica que este alimento tem uma contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, está em condições higiênicas insatisfatórias. O outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente consideradas patogênicas para o homem e para animais (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos da América (EUA), a dose infecciosa para *E. coli* O157:H7 é desconhecida. No entanto, a compilação de dados de surtos indica que pode ser tão baixa quanto 10 células (FORSYTHE, 2005). Este autor ainda comenta que a maioria dos surtos infecciosos causados por *E. coli* entero-hemorrágicas foi ocasionado por Linhagem de *E. coli* O157:H7. Isso sugere que este sorotipo é mais virulento ou mais transmissível que outros. Contudo, ainda há diferentes sorotipos de *E. coli* entero-hemorrágicas que foram implicados em surtos, sendo que a incidência destes

casos parece estar aumentando. Mais de 50 casos desses sorotipos foram associados a diarréias sanguinolentas ou HUS (síndrome hemolítica urêmica) em humanos.

Novos surtos ocorreram nos últimos dez anos, sendo: em 1991, quando 23 pessoas foram atingidas nos EUA pelo consumo de suco de sidra de maçã não pasteurizada. Em 1995, 92 pessoas em Montana, EUA, foram atingidas por um surto provocado pelo consumo de alface contaminada com água de irrigação. Em 1996 também foram registrados 4 surtos em escolas primárias do Japão, envolvendo o consumo de saladas (SILVA *et al.*, 2003).

Soluções de hipoclorito e compostos de quaternário de amônio têm sido utilizados nos processos de alimentos para controlar a contaminação por microrganismos, principalmente os patogênicos. O uso de alguns sanitizantes tem tido seu uso reduzido ou totalmente eliminado tendo em vista causarem danos à saúde. Por outro lado, a necessidade de um antimicrobiano potente tem aumentado nos últimos anos devido à contaminação por microrganismos emergentes nos alimentos. A indústria alimentícia está pesquisando desinfetantes que sejam efetivos contra estes patógenos e sejam seguros para o uso em suas plantas. Um dos candidatos é o ozônio que está sendo utilizado como sanitizante no tratamento de águas na Europa desde o início do século XX (KIM *et al.*, 1999A).

O ozônio é uma potente substância antimicrobiana devido sua capacidade oxidante. Foi reconhecido como seguro pelo FDA para uso como sanitizante de alimentos e em plantas de processamento de alimentos quando combinado com a aplicação de boas práticas de fabricação e teve sua utilização aprovada pelo departamento de agricultura dos EUA em 1997 (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004).

Um dos importantes efeitos da utilização de ozônio em estocagens a baixas temperaturas é o efeito retardador do processo de amadurecimento de frutas e hortaliças através da oxidação do gás etileno produzido por estes produtos (RICE,

1999). Foi verificado por BEUCHAT (1998) que maçãs e laranjas tratadas com gás ozônio em temperatura ambiente tiveram suas vidas de prateleira estendidas.

O sanitizante tem sido extensivamente utilizado para sanitização de água para o consumo humano devido sua eficiência contra bactéria, bolores, leveduras e protozoários (RESTAINO *et al.*, 1995). Além do mais, a água ozonizada reduz a população de microrganismos e estende a vida de prateleira de frutas frescas fatiadas e vegetais (BEUCHAT, 1998). Portanto, o uso de água ozonizada tem sido sugerido com uma interessante alternativa para os sanitizantes tradicionais devido a sua eficiência em baixas concentrações em um curto período de tempo, bem como sua decomposição em produtos não tóxicos (RICE, 1999).

A concentração de ozônio varia, por razões práticas, de acordo com os microrganismos testados. Para *E. coli* O157:H7 e *Pseudomonas fluorescens* obteve-se resultados diferentes. A quantidade de 0,2 mg L⁻¹ de ozônio inativou 0,9 ciclos logarítmicos de *P. fluorescens* em 30 segundos, enquanto 1,2 mg L⁻¹ diminuiu a população deste microrganismo em 5 ciclos logarítmicos em tratamento de tempo similar. Quando *E. coli* O157:H7 foi tratada com 0,3 e 1,0 mg L⁻¹ de ozônio por 25 segundos a contagem diminuiu em 1,3 e 3,8 ciclos logarítmicos, respectivamente (KIM & YOUSEF, 2000).

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica da alface americana minimamente processada e *in natura* adquiridas em vários pontos do comércio da cidade de Santo André (SP), e verificar a inativação de *E. coli* O157:H7 inoculada intencionalmente em alface americana por tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de água ozonizada durante 1,0 minuto.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Natureza das Amostras

As amostras de alface americana para a realização deste trabalho foram adquiridas no comércio local de Santo André, SP, no período de fevereiro a junho de 2006. Foram adquiridas 15 amostras *in natura* e 15 minimamente processadas, para avaliação microbiológica dos produtos disponíveis no comércio.

Outras 10 amostras de alface americana foram preparadas (pesando 150 gramas cada) para serem inoculadas com *E. coli* O157:H7 e posteriormente tratadas com água ozonizada.

3.2.2 Preparo e Tratamento das Amostras

Os procedimentos utilizados para estudar a eficácia dos tratamentos com ozônio na descontaminação de alface foram aplicados simulando uma higienização das folhas em escala industrial.

Todos os utensílios e equipamentos utilizados nos experimentos foram lavados com detergente clorado, preparado conforme orientação do fabricante, e enxaguados com água corrente.

As alfaces tiveram folhas externas defeituosas e danificadas removidas, assim como os talos, recolhendo-se quantidade suficiente de alfaces para serem utilizadas nas próximas etapas.

Porções de alfaces foram colocadas em peneira de aço inox onde foram enxaguadas com água corrente.

3.2.3 Microrganismo e Meios de Cultura

A cultura de *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 foi obtida na Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz.

A cultura de *E. coli* O157:H7 foi mantida à temperatura de 4°C em Ágar Triptico Soja (TSA) inclinado. Semanalmente a cultura foi repicada para manutenção da viabilidade das células (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1988). Para contagem de Aeróbios Mesófilos, *Enterobacteriaceae* e bolores e leveduras foram utilizados Ágar Plate Count (PCA), Ágar Violet Red Bile Dextrose Ágar (VRBA) e Ágar Dextrose Acidificado (PDA), respectivamente. Para determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes foram utilizados os Caldos Lauril Sulfato de Sódio, Bile Verde Brilhante e EC. O *Staphylococcus aureus* foi isolado em Ágar Baird Parker (BP) e para isolamento da *Salmonella* foram utilizados o Caldo Seletivo Rappaport, o Ágar Verde Brilhante e o Ágar BPLS. A pesquisa de *E. coli* O157:H7 foi realizada partindo-se da inoculação em Caldo EC adicionado de novobiocina seguido de isolamento em Ágar Mac Conkey e Ágar Verde Brilhante (SPECK, 1984).

3.2.4 Preparo do Inóculo

A suspensão do microrganismo foi preparada utilizando-se um tubo contendo 10 mL de meio de cultura Ágar Triptico Soja (TSA) inclinado, onde foi estriada a cepa de *E. coli* O157:H7 e incubada a 32-35°C, por 24 horas. Empregando-se 3 mL de solução fisiológica estéril 0,1%, foi transferida a cultura de *E. coli* crescida sobre o ágar para uma garrafa de Roux contendo 250 mL do mesmo meio de cultura (TSA). O frasco de Roux foi incubado a 35°C por 24 horas. A cultura resultante na superfície do meio foi lavada com 50 mL de solução fisiológica 0,1% estéril, com o auxílio de pérolas de vidro. Foi ajustada a diluição para obter uma solução com 60% de transmitância no comprimento de onda de 580 nm empregando-se espectrofotômetro UV/VIS.

Os inóculos foram ajustados a fim de se obter suspensões com aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹ verificada pelo método de contagem em placa.

As suspensões foram mantidas em geladeira a 4°C até o momento da utilização (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1988).

3.2.5 Inoculação

As folhas de alfaces separadas, após a etapa de lavagem, foram levadas à uma câmara biossegura do tipo fluxo laminar, onde foram inoculadas com *E. coli* O157:H7. Para este procedimento 2,5 mL da cultura foi suspensa em 2,5 L de água previamente esterilizada e resfriada onde o vegetal foi imerso e movimentado suavemente por 5 minutos para distribuição uniforme do inóculo. Após a contaminação as folhas foram retiradas utilizando-se uma peneira de aço inox estéril, facilitando dessa maneira o escoamento do excesso de água e a remoção do vegetal do banho a que foi submetido. As alfaces tratadas atingiram uma contaminação aproximada de 10^6 UFC g⁻¹. Após o tratamento as alfaces foram estocadas a 7°C por 24 horas para uma melhor aderência do microrganismo nas folhas.

3.2.6 Gerador de Ozônio

O equipamento utilizado na produção de ozônio foi fabricado pela empresa Panozon, constando de gerador de ozônio modelo PNZ 714, concentrador de oxigênio (90 a 95% de pureza), tanque de contato e um sistema de injeção com bomba para filtração. O sistema possui também um tanque de gaseificação com a função de separar o ozônio que permaneceu na forma de gás e retirá-lo da tubulação, enviando o mesmo para um circuito interno onde é destruído (reduzido a oxigênio). A água ozonizada é recirculada em uma vazão de 20 L min⁻¹ para uma cuba de aço inoxidável com capacidade de 50 litros. O equipamento permite ajustar a concentração entre 0,6 mg L⁻¹ a 1,2 mg L⁻¹.

3.2.7 Avaliação da Qualidade Microbiológica de Alface Americana Disponível no Comércio

Quinze amostras *in natura* e quinze minimamente processadas foram avaliadas quanto a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, *Enterobacteriaceae* e *S. aureus*, e determinação do número mais

provável (NMP), de coliformes totais e termotolerantes, além da pesquisa de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* sp. Os ensaios foram realizados segundo SPECK (1984).

3.2.8 Inativação da *E. coli* O157:H7 Inoculada Intensionalmente nas Alfaces

As alfaces contaminadas com *E. coli* O157:H7 foram expostas ao tratamento com ozônio na concentração de 1,0 mg L⁻¹ por 1 minuto.

As amostras de aproximadamente 150g de alface foram colocadas no tanque para sanitização, conforme apresentado na Figura 3.1. Após o tempo de processo, as amostras submersas foram retiradas com auxílio de uma cesta de aço inoxidável, enxaguadas em água previamente fervida e resfriada e armazenadas em sacos plásticos para enumeração dos microrganismos sobreviventes. Os ensaios foram realizados em duplicata.



Figura 3.1 – Tratamento de alface americana na cuba contendo água ozonizada.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Avaliação da Qualidade Microbiológica das Alfaces Disponíveis no Comércio

A Tabela 3.1 apresenta a avaliação microbiológica de amostras de alface minimamente processadas adquiridas no comércio da cidade de Santo André, SP. O tempo de estocagem é referente ao dia de produção informado no rótulo do produto.

Tabela 3.1 - Avaliação microbiológica de amostras de alface minimamente processada.

Nº	Tempo Estocagem	Aeróbio Mesófilos	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coliformes Totais	Coliformes Termotolerantes	<i>S. aureus</i>	Bolores e Leveduras	<i>Salmonella</i>
	(Dias)	(UFC g ⁻¹)	(UFC g ⁻¹)	(NMP g ⁻¹)	(NMP g ⁻¹)	(UFC g ⁻¹)	(UFC g ⁻¹)	(em 25g)
1	1	1,1 x 10 ⁴	6,8 x 10 ⁴	4,6 x 10 ²	2,1 x 10 ²	1,5 x 10 ²	1,1 x 10 ³	Ausente
2	1	6,0 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	1,1 x 10 ³	1,5 x 10 ²	1,0 x 10 ²	2,9 x 10 ³	Ausente
3	2	2,3 x 10 ⁴	9,3 x 10 ³	1,1 x 10 ³	7,5 x 10 ²	7,0 x 10 ²	3,3 x 10 ³	Ausente
4	2	1,3 x 10 ³	8,0 x 10 ³	1,1 x 10 ³	4,6 x 10 ²	1,5 x 10 ²	2,5 x 10 ²	Ausente
5	2	1,3 x 10 ³	8,0 x 10 ³	1,1 x 10 ³	4,6 x 10 ²	1,5 x 10 ²	2,5 x 10 ²	Ausente
6	2	3,9 x 10 ⁴	8,2 x 10 ³	4,6 x 10 ²	2,3 x 10 ²	3,0 x 10 ²	9,8 x 10 ²	Ausente
7	3	1,2 x 10 ⁵	7,9 x 10 ⁴	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	5,0 x 10 ¹	1,7 x 10 ⁴	Ausente
8	3	2,2 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁵	2,4 x 10 ³	1,1 x 10 ³	3,0 x 10 ²	4,9 x 10 ⁴	Ausente
9	3	4,3 x 10 ⁵	3,2 x 10 ⁴	9,3 x 10 ²	4,6 x 10 ²	1,0 x 10 ²	8,1 x 10 ³	Ausente
10	3	1,9 x 10 ⁵	7,0 x 10 ⁴	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	1,5 x 10 ²	6,7 x 10 ²	Ausente
11	3	9,6 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴	4,6 x 10 ²	2,3 x 10 ²	1,5 x 10 ²	6,9 x 10 ³	Ausente
12	4	2,8 x 10 ⁵	9,8 x 10 ⁴	2,4 x 10 ³	9,3 x 10 ²	5,0 x 10 ²	1,7 x 10 ³	Ausente
13	4	8,1 x 10 ⁴	3,6 x 10 ³	2,4 x 10 ³	4,6 x 10 ²	1,0 x 10 ³	4,2 x 10 ³	Ausente
14	5	6,3 x 10 ⁵	4,1 x 10 ⁴	1,1 x 10 ³	4,3 x 10 ²	2,5 x 10 ²	7,2 x 10 ³	Ausente
15	5	5,1 x 10 ⁵	9,8 x 10 ³	4,6 x 10 ²	2,4 x 10 ²	3,5 x 10 ²	3,2 x 10 ³	Ausente

As análises microbiológicas da alface minimamente processada apresentaram variação de 1,3x10³ a 2,2x10⁶ UFC g⁻¹ de microrganismos aeróbios

mesófilos e para *Enterobacteriaceae* as contagens variaram de $3,6 \times 10^3$ a $1,1 \times 10^5$ UFC g⁻¹. Os coliformes totais e coliformes termotolerantes apresentaram variações de $4,6 \times 10^2$ a $2,4 \times 10^3$ e $1,5 \times 10^2$ a $1,1 \times 10^3$ NMP g⁻¹, respectivamente; a presença de *S. aureus* variou entre $5,0 \times 10$ e $1,0 \times 10^3$ UFC g⁻¹ e a variação para bolores e leveduras foi entre $2,5 \times 10^2$ e $4,9 \times 10^4$ UFC g⁻¹. Não foram detectadas *E.coli* O157:H7 e *Salmonella*.

A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adotou a Resolução – RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 para aprovar o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Segundo esta resolução o índice máximo de coliformes termotolerantes a 45°C g⁻¹ permitido em hortaliças, legumes e similares frescos, *in natura* ou preparadas e prontas para consumo direto é de 100 NMP g⁻¹, devendo a *Salmonella* estar ausente em 25g do produto. Assim, de acordo com a variação de coliformes termotolerantes apresentada na Tabela 5.1, todas as amostras avaliadas estavam em desacordo com a legislação vigente.

Os resultados das análises microbiológicas das alfaces minimamente processadas mostraram a necessidade de se realizar tratamentos reduzir a contaminação presente nas alfaces. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os níveis altos de contaminação encontrados nas amostras minimamente processadas indicam que os procedimentos de higienização do vegetal não foram satisfatórios, sugerindo processo insuficiente e/ou contaminação cruzada.

Vários estudos têm sido realizados no mundo quanto à contaminação de hortaliças, inclusive alface, por coliformes. No Brasil, o conhecimento da poluição fecal de hortaliças data de 1945, quando Souto e colaboradores e citados por FRANCO & HOEFEL (1983), encontraram *E. coli* em 29,3% das 252 amostras de diversos vegetais analisados. CHRISTÓVÃO (1958) demonstrou a constante poluição fecal das alfaces comercializadas em São Paulo. Alguns anos depois, GELLI (1979) evidenciou alta poluição fecal em várias hortaliças, tendo

encontrado *E. coli* em quase 54% dos casos. No início da década de 80 LEITÃO *et al.* (1981) encontraram elevada incidência de coliformes e *E. coli* em trabalho sobre a eficiência de desinfetantes na redução da contaminação bacteriana de alface (FRANCO & HOEFEL, 1983).

Mais recentemente, SIQUEIRA (1997), analisando saladas cruas e servidas em restaurantes industriais de Belo Horizonte, MG, constatou que 44% das hortaliças apresentavam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. SZABO *et al.* (2000), na Austrália, analisaram 120 amostras de alface minimamente processadas, adquiridas no comércio e observaram populações de microrganismos aeróbios totais entre 10^3 e 10^9 UFC g⁻¹. Em trabalho realizado na cidade de São Paulo, SP, GOULARTE (2003) observou que alface minimamente processada apresentou populações de microrganismos aeróbios mesófilos que variaram entre $4,3 \times 10^4$ e $9,2 \times 10^6$ UFC g⁻¹, com predomínio de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* sp. Os resultados deste trabalho confirmaram o de GOULARTE (2003) e de SZABO *et al.* (2000), demonstrando variações entre $1,3 \times 10^3$ UFC g⁻¹ e $2,2 \times 10^6$ UFC g⁻¹ para o mesmo grupo de microrganismo.

BARBOSA NETA *et al.* (2004) evidenciaram que 80% das amostras de alface consumidas no restaurante universitário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte estavam em desacordo com a legislação vigente. Os dados da presente pesquisa também confirmam os resultados de FRODER (2005) que em análise de 133 amostras de vegetais folhosos minimamente processados, adquiridos no comércio varejista da cidade de São Paulo, encontrou $1,3 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de Coliformes totais em alface crespa e $1,0 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de Coliformes totais em alface americana, demonstrando desta forma a real necessidade da sanitização adequada das hortaliças minimamente processadas.

Pode-se observar com esta pesquisa que o grande volume de vegetais manipulados, aliado muitas vezes à precariedade das instalações físicas locais onde são preparadas, impõe ao produto final qualidade higiênica sanitária

insatisfatória. As plantas de processamento de vegetais constituem-se também em foco significativo de contaminação cruzada, seja pela participação na composição das mesmas ou através das mãos de manipuladores, utensílios, superfícies e equipamentos que participam do processo, os quais os vegetais tiveram contato (BEUCHAT, 2001).

A Tabela 3.2 apresenta os resultados microbiológicos de amostras de alface americana *in natura* somente selecionadas e enxaguadas.

Tabela 3.2 - Avaliação microbiológica de alface americana *in natura*.

Amostra	Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas (UFC g⁻¹)	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC g⁻¹)
1	1,9 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴
2	5,2 x 10 ⁵	3,0 x 10 ⁴
3	2,8 x 10 ³	1,1 x 10 ³
4	4,3 x 10 ³	9,0 x 10 ²
5	1,2 x 10 ⁴	1,6 x 10 ³
6	3,3 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁴
7	2,0 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁵
8	6,7 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴
9	6,3 x 10 ⁴	4,6 x 10 ³
10	7,9 x 10 ⁴	5,0 x 10 ³
11	8,1 x 10 ³	1,2 x 10 ³
12	1,7 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁴
13	1,9 x 10 ⁵	7,0 x 10 ⁴
14	6,5 x 10 ⁴	6,3 x 10 ³
15	3,0 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴

As análises microbiológicas para o vegetal nessa condição apresentaram em média $2,2 \times 10^5$ UFC g⁻¹ de microrganismos aeróbios mesófilos com as populações variando entre $4,3 \times 10^3$ e $2,0 \times 10^6$ UFC g⁻¹ e em média $8,2 \times 10^3$ UFC g⁻¹ com variações entre $1,1 \times 10^3$ e $4,1 \times 10^5$ de *Enterobacteriaceae*.

Estes dados estão de acordo com os encontrados por KING *et al.* (1991) que constataram variação de $4,1 \times 10^3$ e $1,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹ em alface americana para microrganismos aeróbios mesófilos. GOULARTE (2003) encontrou populações de microrganismo aeróbios mesofilos que variaram entre $1,2 \times 10^3$ e $4,1 \times 10^7$ UFC g⁻¹ em 20 amostras de alface americana *in natura* na cidade de São Paulo, SP. O autor apresentou dados de *Enterobacteriaceae*, das mesmas 20 amostras, variando entre $1,1 \times 10^3$ e $6,6 \times 10^6$ UFC g⁻¹

Após os estudos, observou-se que, os níveis de microrganismos aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* encontrados em alfaces minimamente processadas (Tabela 3.1) foram semelhantes aos encontrados nas amostras de alfaces *in natura* (Tabela 3.2), o que sugere que a sanitização da alface não foi realizada de maneira adequada, ou que ocorreu multiplicação dos microrganismos que sobreviveram ao processamento ou que houve contaminação posterior ao processamento.

Estas considerações mostram que, de fato, boas práticas de fabricação de hortaliças são essenciais para se obter um produto aceitável em termos de qualidade microbiológica e que não prejudiquem a integridade física do consumidor. Os sanitizantes devem ser utilizados nos tempos e concentrações estabelecidos pelo fabricante.

3.3.2 Inativação de *E. coli* O157:H7 Inoculada em Alface Americana por meio de Tratamento com Água Ozonizada

A Tabela 3.3 apresenta o número de reduções decimais e as referidas porcentagens da contagem inicial de *E. coli* O157:H7 inoculada intencionalmente

em alface americana antes da aplicação de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de água ozonizada durante 1,0 minuto. A concentração microbiana utilizada para contaminação inicial das folhas foi de aproximadamente 10^8 UFC mL^{-1} , o pH foi 7,6 e a temperatura de 22°C .

Tabela 3.3 - Alfaces americanas contaminadas com *E.coli* O157:H7, expostas ao tratamento com água ozonizada à concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ minuto.

Amostra	Contagem inicial de <i>E.coli</i> O157:H7 (UFC g ⁻¹)	Ensaio <i>E.coli</i> O157:H7 (UFC g ⁻¹)	Número Redução Decimais*
1	$8,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	2,81
2	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^3$	3,00
3	$3,4 \times 10^6$	$8,1 \times 10^2$	3,62
4	$5,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^2$	4,49
5	$4,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^3$	3,61
6	$9,2 \times 10^5$	$3,7 \times 10^3$	2,40
7	$8,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	2,76
8	$7,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	2,75
9	$2,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^3$	3,32
10	$1,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^3$	3,24

* NRD = \log (concentração inicial) – \log (concentração final)

A tabela 3.3 mostra que a contaminação inicial das alfaces variou entre $7,9 \times 10^5$ e $5,6 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$ e as amostras após o tratamento com o sanitizante apresentaram os resultados variando entre $1,8 \times 10^2$ e $3,7 \times 10^3$ o que representa um número de reduções médio de 3,2 ciclos logarítmicos.

TAKEUCHI *et al.* (2000) observaram que as células de *E. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* aderem preferencialmente na região dos cortes, enquanto *P. fluorescens* o faz nas superfícies intactas e *Salmonella spp* adere tanto as superfícies intactas quanto a região dos cortes.

TAKEUCHI & FRANK (2000) evidenciaram que *E. coli* O157:H7 penetra nos tecidos atingindo uma profundidade de até 73µm e se aloja preferencialmente na junção das células da alface. Os autores demonstraram que na profundidade de 30 a 40 µm, 68% das células de *E. coli* O157:H7 sobrevivem ao tratamento com 200 mg de cloro livre por litro, com redução de apenas 0,4 a 0,5 ciclos logarítmicos. Além da barreira física, a matéria orgânica que envolve as células inativa o cloro (GOULARTE, 2003).

Estes estudos demonstrando que *E.coli* O157:H7 penetra nos tecidos internos da alface a partir das folhas e das raízes, explicam a ineficiência dos processos tradicionais de higienização e sanificação e evidenciam a importância da qualidade das águas de irrigação e dos adubos orgânicos empregados no cultivo da alface. Ou seja, quando estes materiais estiverem contaminados, a alface estará contaminada e o processamento mínimo seguido de sanitização não serão capazes de eliminá-la (GOULARTE, 2003).

Conforme observado na Tabela 5.3, o número de reduções decimais no referido tratamento variou entre 2,40 e 4,49 ciclos logarítmicos. VIJAYAKUMAR & HALL (2002) estudaram a ação de vinagre de maçã (0,3% de ácido acético) e 180mg L⁻¹ de solução de cloro e observaram uma redução de 2,7 e 1,6 ciclos logarítmicos após 10 minutos de exposição em uma temperatura de 21°C. Verifica-se que o ozônio possui um maior poder de sanitização demandando tempos e concentrações inferiores aos necessários para o cloro e ácido acético.

SILVA *et al.* (2003) encontrou 2,57 reduções decimais na população de *E. coli* O157:H7 utilizando 200 ppm de dicloroisocianurato de sódio por 15 minutos em temperatura ambiente. BEHRSING *et al.* (2000) avaliaram a eficiência do hipoclorito de cálcio contendo 100 mg de cloro livre por litro nos tempos de 2 e 5 minutos, pH de 6,5 e temperatura ambiente (25°C) e obtiveram de resultado a redução de 1,3 e 1,8 ciclos logarítmicos, respectivamente. Pode-se observar que

os sanitizantes clorados requerem maiores concentrações e tempos de contato quando comparados a sanitização por água ozonizada.

A inativação de *E. coli* O157:H7 inoculada em alface americana utilizando água ozonizada, apresentou resultados inferiores aos demonstrados no capítulo 2 deste trabalho, quando utilizado a concentração de 1 mg L^{-1} . Essa diferença pode estar relacionada ao fato da morfologia das folhas (presença de reentrâncias) que dificulta o contato dos microrganismos com o ozônio, bem como a presença de matéria orgânica (alface propriamente dita) a qual consome parte do sanitizante dissolvido na água.

3.4 Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- a alface americana minimamente processada, encontrada no comércio, da cidade de Santo André, SP, apresentou risco à integridade da saúde humana, pois demonstrou não atender a legislação vigente no critério microbiológico, além de ter a contaminação próxima da alface *in natura*, o que representa ausência de aplicação de boas práticas de fabricação;
- as altas cargas microbianas encontradas na alface disponível no mercado (minimamente processada e *in natura*) apresentam um desafio para os tratamentos de limpeza e sanitização utilizados atualmente;
- a utilização de água ozonizada mostra ser uma tecnologia promissora para sanitização de alface, uma vez que foi capaz de reduzir a contaminação de *E.coli* O157:H7 entre 2,40 e 4,49 ciclos logarítmicos com uma concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e um tempo de contato de 1,0 minuto.

3.5 Referências Bibliográficas

ANVISA. **Resolução 12 de 2 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil], Brasília, 2001.

BARBOSA NETA, R.X.; HOLLAND, N.; DAMASCENO, L.S.F.S.C. Análise dos perigos e pontos críticos de controle durante o preparo da alface servida no restaurante universitário da UFRN. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.126/127, p.36-43, 2004.

BEHRSING, J., WINKLER, S., FRANZ, P., PREMIER, R. Efficacy of chlorine for inactivation of *Escherichia coli* on vegetables. **Postharvest Biology and Technology**. v.19, p.187-192, 2000

BERBARI, S.A.G., PASCHOALINO, J.E., SILVEIRA, N.F.A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.2, p.197-201, 2001.

BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, v.59, n.2, p.204-216, 1995.

BEUCHAT, L.R. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes and lettuce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.10, 1998.

BEUCHAT, L.R. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, n.7, p.1079-1084, 2001.

CRISTÓVÃO, D.A. **Contaminação da alface (*Lactuca sativa* L) por microrganismos de origem fecal**. São Paulo, 1958. Tese (Catedrático em

Microbiologia e Imunologia Aplicada) – Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

FRANCO, B.D.G.; HOEFEL, J.L.M. Coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* em alfaces comercializadas em São Paulo. **Revista Ciências e Tecnologia de Alimentos da SBCTA**, Campinas, v.3, n.1, Jan-Jun.1983.

FRANCO, B.D.G.M.F., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p. 2003.

FRODER, H. Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas. **São Paulo, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.**

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 424p. 2005.

GELLI, D.S. Condições higiênico-sanitária de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, SP, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 39, n. 1, p.37-43, 1979.

GOULARTE, L. **Aplicação de processos combinados – processamento mínimo e radiação ionizante (60Co) – visando o aumento da segurança microbiológica de alface (*Lactuca sativa*, L.)**. São Paulo, 2003. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

GUZEL-SEYDIM, Z.B., GREENE, A.K., SEYDIM, A.C. Use of ozone in the food industry. **Lebensm.-Wiss, u.-Technol.** 37, p.453-460, 2004.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.3, p.521-528, 2000.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., CHISM. G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on Lettuce. **Journal of Food Safety**, v. 19, p.17-37, 1999A.

KING Jr., A.D., MAGNUSON, J.A., TÖRÖK, T., GOODMAN, N. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. *et al.* (1991) **Journal of Food Science**, v.56, n.2, p.456-461, 1991.

LEITÃO, M.F.F., MONTEIRO F.E., DELAZARI, I., ANGELUCCI, E. Eficiência de desinfetantes na redução da contaminação bacteriana da alface (*Lactuca sativa*). **Coletânea do ITAL**, Campinas, v. 18, n. 2, p.201-226, 1981.

PARISH, M. E.; BEUCHAT, L. R.; SUSLOW, T. V.; HARRIS, L. J.; GARRET, E. H.; FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. In: **Comprehensive reviews in food science and food safety**. IFT/FDA, v.2, 204p, 2001.

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.

RICE, R.G., FARQUHAR, W., BOLLYKY, L.J. Review of the application of ozone for increasing storage time for perishable foods. **Ozone Science Engineering**, v.4, n.1, p.147-163, 1982.

RICE, R.G. Ozone in the United States of America. **Ozone Science Engineering**, v.21, n.2, p.99-118, 1999.

SILVA, N., SILVEIRA, N.F.A., YOKOYA, F., OKAZAKI, M.M. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção

de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.2, p.167-173, 2003.

SIQUEIRA, I.M.C. Avaliação microbiológica de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes industriais da Grande Belo Horizonte. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n.49, 1997.

SPECK, M.L. Compendium of methods for microbiological examination of foods. Washington. **APHA/Technical Committee on Microbiological for Foods**. 914p. 1984.

SZABO, E.A., SCURRAH, K.J., BURROWS, J.M. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Lett. Applied Microbiology**, Oxford, v.30, n.6, p.456-460, 2000.

TAKEUCHI, K., FRANK, J.F. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63, n.3, p.434-440, 2000.

TAKEUCHI, K., MATUTE, C.M., HASSAN, A.N., FRANK, J.F. Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63, n.10, p.1433-1437, 2000.

VIJAYAKUMAR, C., HALL, C.E. Evaluation of household sanitizers for reducing levels of *Escherichia coli* on iceberg lettuce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.65, n.10, p.1646-1650, 2002.

XU, L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. **Food Technology** v.53, n.10, p.58-62, 1999.

CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE ALFACE AMERICANA (*Lactuca sativa*) TRATADA COM ÁGUA OZONIZADA

RESUMO

O consumo de saladas de vegetais vem aumentando nos últimos anos e a população encontra-se mais exigente no quesito qualidade destes produtos. O objetivo deste trabalho foi estudar a vida de prateleira de alface americana armazenada a 2 °C, durante dez dias, após ter sido sanitizada com água ozonizada na concentração de 1,0 mg L⁻¹ por 1, 2 e 3 minutos. Avaliou-se as populações de microrganismos aeróbios mesófilos, *Enterobactereace*, bolores e leveduras, coliformes totais e coliformes termotolerantes. Obtendo-se reduções, no tempo zero, imediatamente após o tratamento com o sanitizante, de 4,07, 3,36, 3,2, 2,18 e 2,18 ciclos logarítmicos, respectivamente, em 3 minutos de exposição. O estudo verificou que as amostras tratadas com água (controle) para o grupo de coliformes termotolerantes permaneceu, por todo o período de avaliação e nos três tempos de contato, com as populações acima de 10² NMP g⁻¹, condenando, desta forma, a utilização da água de abastecimento público para sanitizar a hortaliça; em contrapartida as amostras sanitizadas apresentaram, durante todo o período de estocagem, contagem menor que 3 NMP g⁻¹ para este microorganismo. Os bolores e leveduras, após 10 dias de estocagem no tempo de contato de 1, 2 e 3 minutos apresentaram populações de 7,23 x 10⁴, 5,57 x 10² e 3,3 x 10² UFC g⁻¹, respectivamente, enquanto que as amostras controle apresentaram populações de 1,19x10⁶, 1,17x10⁶ e 3,4x10⁶ UFC g⁻¹, respectivamente. Os resultados demonstraram que a alface tratada com água ozonizada, durante todo o período de estocagem, permaneceu dentro dos parâmetros da legislação.

Palavras-chave: vida de prateleira, alface americana, água ozonizada.

CHAPTER 4: SHELF LIFE EVALUATION OF THE ICEBERG LETTUCE TREATED WITH OZONE WATER

ABSTRACT

The consumption of vegetables salads comes increasing in the last years and the population became more demanding in the inquiry quality of these products. To study the shelf life of Iceberg lettuce storage at 2 °C , for ten days, after having been sanitized with ozone water in the concentration of 1, 0 mg L⁻¹ by 1, 2 and 3 minutes was the objective of this study. Evaluating populations of aerobic mesophilic bacteria, *Enterobactereace*, molds and yeasts, total and thermtolerants coliforms was obtained for these microorganisms reductions, in the time zero, immediately after the treatment with the sanitizer, of 4,07, 3,36, 3,2, 2,18 and 2,18 logarithmic cycles, respectively, in 3 minutes of exhibition. The study verified that the samples trated with water (it controls) for the thermtolerants coliforms group stayed, for the whole evaluation period and in the three times of contact, with the populations above 10² NMP g⁻¹, condemning, the use of public water to sanitize the vegetable, in the other hand the samples sanitized presented, during the whole storage period, smaller enumeration than 3 MPN g⁻¹ for this microorganism. The molds and yeasts, after 10 days of storage in the time of contact of 1, 2 and 3 minutes presented populations of 7,23x10⁴, 5,57x10² and 3,3x10² CFU g⁻¹, respectively, while the samples control presented populations of 1,19x10⁶, 1,17x10⁶ and 3,4x10⁶ CFU g⁻¹, respectively. The results demonstrated that the lettuce treated with ozone water, during the whole storage period, stayed inside of the foreseen of legislation.

keywords: shelf life, iceberg lettuce, ozone water

4.1 Introdução

O consumo de saladas de hortaliças e frutas tem aumentado em quantidade e variedade nos últimos anos. O segmento desses produtos que mais cresce no mercado é o produto lavado, descascado, cortado ou fatiado, embalado cru e armazenado sob refrigeração. Com o aumento do consumo observou-se uma maior freqüência de surtos de doenças associadas a frutas e verduras minimamente processadas.

Frutas e hortaliças são parte essencial de dietas das pessoas em todo o mundo. Onde existe terra disponível, famílias cultivam frutas e hortaliças para o consumo próprio. Por outro lado, nos grandes centros, os produtos são comprados em supermercados e feiras livres para o preparo, em casa ou restaurantes, de saladas ou como parte de pratos de carnes, aves e peixes (BEUCHAT, 1999). Foram consumidas, no Brasil, 600 toneladas de hortaliças folhosas em 2004 pelas tropas do Comando da Aeronáutica, sendo que a alface foi o vegetal de maior consumo atingindo 210 toneladas (MINISTÉRIO DA DEFESA, 2004).

Para os vegetais frescos em geral, a contaminação por microorganismos patogênicos pode ocorrer em diferentes fases, desde a sua produção até o consumo. Na fase de produção agrícola a contaminação pode ter origem no solo contaminado, na água de irrigação contaminada, no adubo orgânico, nos excrementos de animais, entre outros. Na colheita e no processamento, a contaminação pode ocorrer de forma cruzada entre os operadores, contêineres, equipamentos e durante o transporte. Já na fase de comercialização, os microorganismos presentes no vegetal embalado podem multiplicar-se e, dependendo do tempo e da temperatura de conservação, podem atingir níveis que comprometem a qualidade do produto e/ou a integridade física do consumidor (BEUCHAT, 1995).

No caso da alface, as etapas do processamento que contribuem para o controle microbiológico são: seleção, eliminação das folhas externas e partes danificadas, pré-lavagem para remover as sujidades e terras aderidas às folhas, lavagem, sanitização, centrifugação, embalagem (em alguns casos em atmosfera modificada ou a vácuo) e refrigeração (ARRUDA, 2002).

Atualmente, segundo LEE *et al.* (2004), a maioria da produção de hortaliças folhosas e frutas é sanitizada com produto clorado (50 a 200 ppm de cloro ativo). Porém, este tratamento resulta em uma redução microbiológica máxima de 2 ciclos logarítmicos de unidade formadora de colônia por grama de alimento (UFC g⁻¹). Também, o tratamento com soluções cloradas em altas concentrações pode produzir, como subprodutos, substâncias prejudiciais à saúde como cloraminas e trihalometanos. Portanto, são necessários tratamentos alternativos mais efetivos que o cloro para redução ou eliminação de patógenos humanos para produtos frescos.

Um caminho para manter ou melhorar a qualidade e a segurança de produtos frescos (opção para os sanitizantes clorados) é a utilização de água ozonizada. Dois tipos de sistemas podem ser utilizados para reduzir a contagem de microorganismos da superfície dos produtos. Um deles consiste em pulverizar o sanitizante no produto e o outro consiste em mergulhar o alimento em uma solução sanitizante. KIM *et al.* (1999) utilizaram água ozonizada para lavar alface cortada. Foi borbulhada 1,3 mM de ozônio em um fluxo de 0,5 L/min de água misturada com alface (1:20,p/v) com alta velocidade de agitação e obtido, após três minutos, uma redução de 2 log UFC g⁻¹ na contagem total de microorganismos.

No capítulo 3 deste trabalho verificou-se que 1,0 mg L⁻¹ com um tempo de contato de 1,0 minuto de água ozonizada, utilizada simulando uma produção industrial, foi capaz de reduzir em média, 3,2 ciclos logarítmicos em folhas de alface inoculadas de *E. coli* O157:H7.

Com o aumento atual no consumo de hortaliças e observando a alta carga de microorganismos prejudiciais a saúde pública nestes produtos, este trabalho objetivou avaliar as populações de coliformes totais, coliformes fecais, contagem total em placas e bolores e leveduras, acompanhando, durante 10 dias, a vida de prateleira da alface americana tratada com água ozonizada e mantida sob refrigeração a 2°C.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Natureza das Amostras

A alface americana, para a realização deste estudo, foi adquirida no comércio local de Santo André, SP, no período de fevereiro a junho de 2006.

Foram preparadas 63 amostras pesando 150 gramas cada, para avaliação da vida de prateleira, após ter recebido tratamento com ozônio e 63 amostras para controle, somente tratadas com a água.

4.2.2 Preparo e tratamento das amostras

Os procedimentos utilizados para estudar a eficácia dos tratamentos com ozônio na descontaminação de alface foram aplicados simulando uma higienização das folhas em escala industrial.

Todos os utensílios e equipamentos utilizados nos experimentos foram lavados com detergente clorado, preparado conforme fabricante, e enxaguados com água corrente.

As alfaces tiveram folhas externas defeituosas e danificadas removidas, assim como os talos, recolhendo-se quantidade suficiente de alfaces para serem utilizadas nas próximas etapas. As porções de alfaces foram colocadas em peneira de aço inox para o enxágüe com água corrente ou o tratamento com o sanitizante.

4.2.3 Gerador de Ozônio

O equipamento utilizado na produção de ozônio foi fabricado pela empresa Panozon, constando de gerador de ozônio modelo PNZ 714, concentrador de oxigênio (90 a 95% de pureza), tanque de contato e um sistema de injeção com bomba para filtração. O sistema possui também um tanque de gaseificação com a função de separar o ozônio que permaneceu na forma de gás e retirá-lo da tubulação, enviando o mesmo para um circuito interno onde é destruído (reduzido a oxigênio). A água ozonizada é transferida para uma cuba de aço inoxidável com capacidade de 50 litros.

4.2.4 Análises Microbiológicas e Meios de Cultura

A fim de acompanhar a eficiência de tratamentos para descontaminação de alfaces, foram realizadas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras e *Enterobacteriaceae*, determinação de coliformes totais e coliformes fecais (NMP) e pesquisa de *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli* e *Salmonella sp.*. Os ensaios foram realizados segundo SPECK (1984).

Para contagem de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae* e bolores e leveduras foram utilizados respectivamente Ágar Plate Count (PCA), Ágar Violet Red Bile Dextrose Ágar (VRBA) e Ágar Dextrose Acidificado (PDA). Para determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Fecais, foram utilizados os Caldos Lauril Sulfato de Sódio, Bile Verde Brilhante e EC. O *Staphylococcus aureus* foi isolado em Ágar Baird Parker (BP) e para isolamento da *Salmonella* foram utilizados o Caldo Seletivo Rappaport, o Ágar Verde Brilhante e o Ágar BPLS. A pesquisa de *E. coli* foi realizada partindo-se da inoculação em Caldo EC adicionado de novobiocina seguido de isolamento em Ágar Mac Conkey e Ágar Verde Brilhante.

4.2.5 Tratamento das Amostras de Alface com Água Ozonizada

Segundo os resultados apresentados no capítulo 2 deste trabalho, optou-se por utilizar a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ozônio para o estudo de vida de prateleira de alface americana. Foram processados os lotes de alface, promovendo-se a separação, enxágüe, tratamento e embalagem em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade, contendo 150g de produto em cada um, preparados para avaliação microbiológica. Os experimentos foram realizados nos tempos 1, 2 e 3 minutos. Foram utilizadas 21 amostras para cada um dos tempos pré- estabelecidos.

O tempo de vida de prateleira foi determinado a partir de análises microbiológicas, realizadas em triplicata, nos tempos de zero, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após o tratamento de desinfecção com água ozonizada, com as amostras mantidas sob refrigeração a 2°C . Para efeito de comparação foram utilizadas amostras como controle (21 amostras para cada tempo de exposição), ou seja, mergulhadas somente em água e acompanhadas, em paralelo, por análises microbiológicas, nas mesmas condições anteriormente descritas.

A etapa de higienização por imersão das folhas das alfaces, em água ozonizada na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, inclui enxágüe posterior em água fervida (abastecimento público) e resfriada.

4.3 Resultados e Discussão

A Figura 4.1 apresenta os resultados de crescimento microbiano em alface americana sanitizada por água ozonizada na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ por minuto.

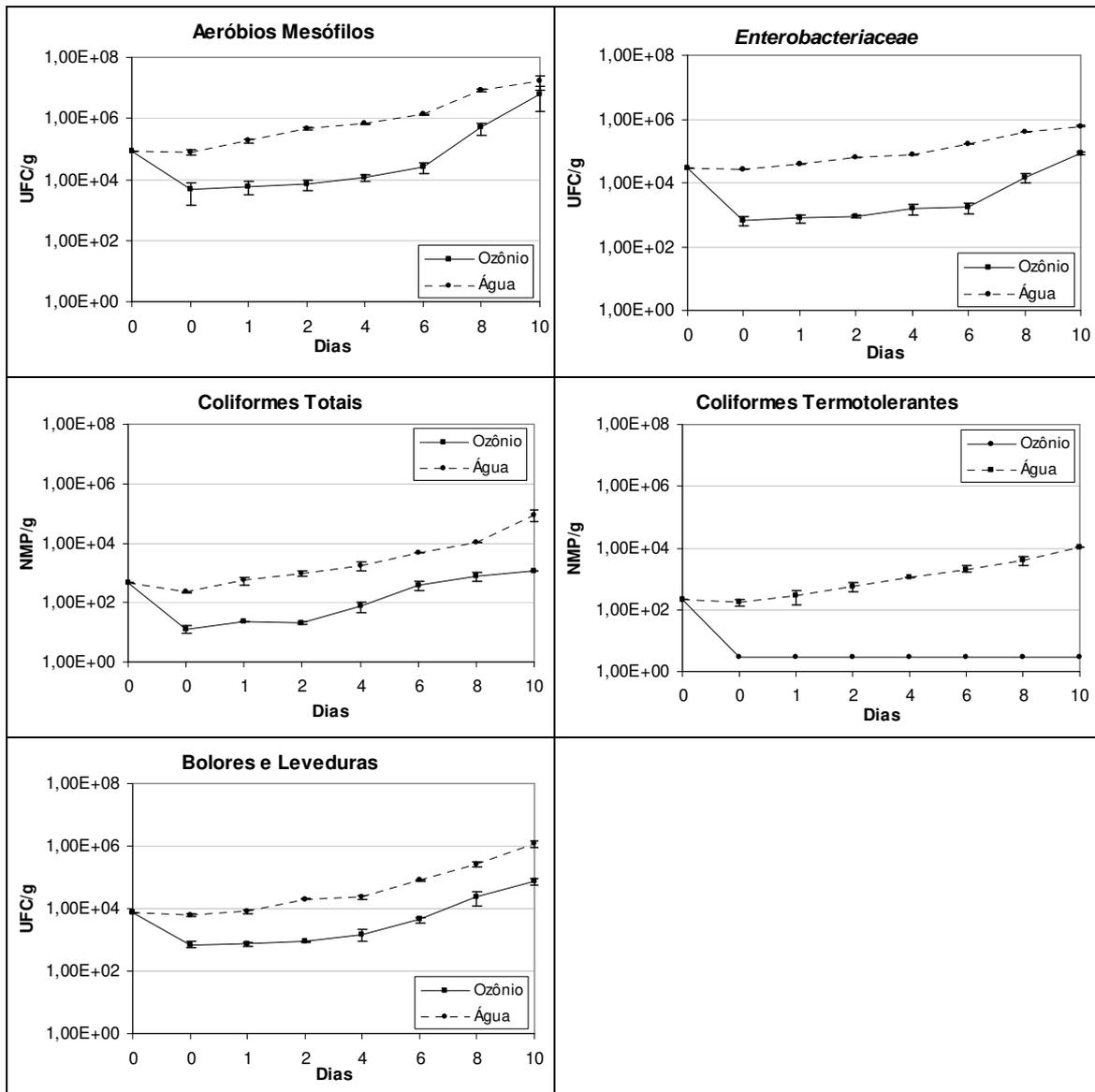


Figura 4.1 – Crescimento microbiano em alface americana após tratamento com água ozonizada na concentração de 1 mg.L^{-1} por 1 minuto.

Pode-se observar que todas as alfaces sanitizadas com ozônio apresentaram uma redução significativa em relação a carga inicial.

Os microrganismos aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* apresentaram um crescimento mais acentuado após o sexto dia de estocagem. Já os coliformes termotolerantes, durante todo o período de estocagem das amostras sanitizadas, apresentaram contagens inferiores a 3 NMP g⁻¹. Nas amostras somente enxaguadas com água observou-se um ligeiro acréscimo dos microrganismos atingindo, no décimo dia a contagem, 1,1x10⁴ NMP g⁻¹.

Como não foi detectada *Salmonella* em nenhuma amostra analisada e os coliformes termotolerantes permaneceram todo o período de avaliação abaixo de 3 NMP g⁻¹, pode-se afirmar que a concentração 1,0 mg L⁻¹ por 1 minuto atende a RDC 12 da ANVISA (2001). Porém as altas contagens de microrganismos deterioradores, ou seja, aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae* e bolores e leveduras, nas amostras tratadas com água corrente, a partir do sexto dia fizeram com que as alfaces apresentassem mudanças na coloração, prejudicando a aparência visual do produto. Segundo MORETTI (1999), os microrganismos deteriorantes predominantes na alface são representados por bactérias psicotróficas, produtoras de enzimas pectinolíticas capazes de provocar colapso do tecido colonizado, alterando rapidamente a textura e a coloração e exercendo grande influência sobre a deterioração.

A Figura 4.2 apresenta os resultados de crescimento microbiano em alface americana sanitizada por água ozonizada na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ por 2 minutos.

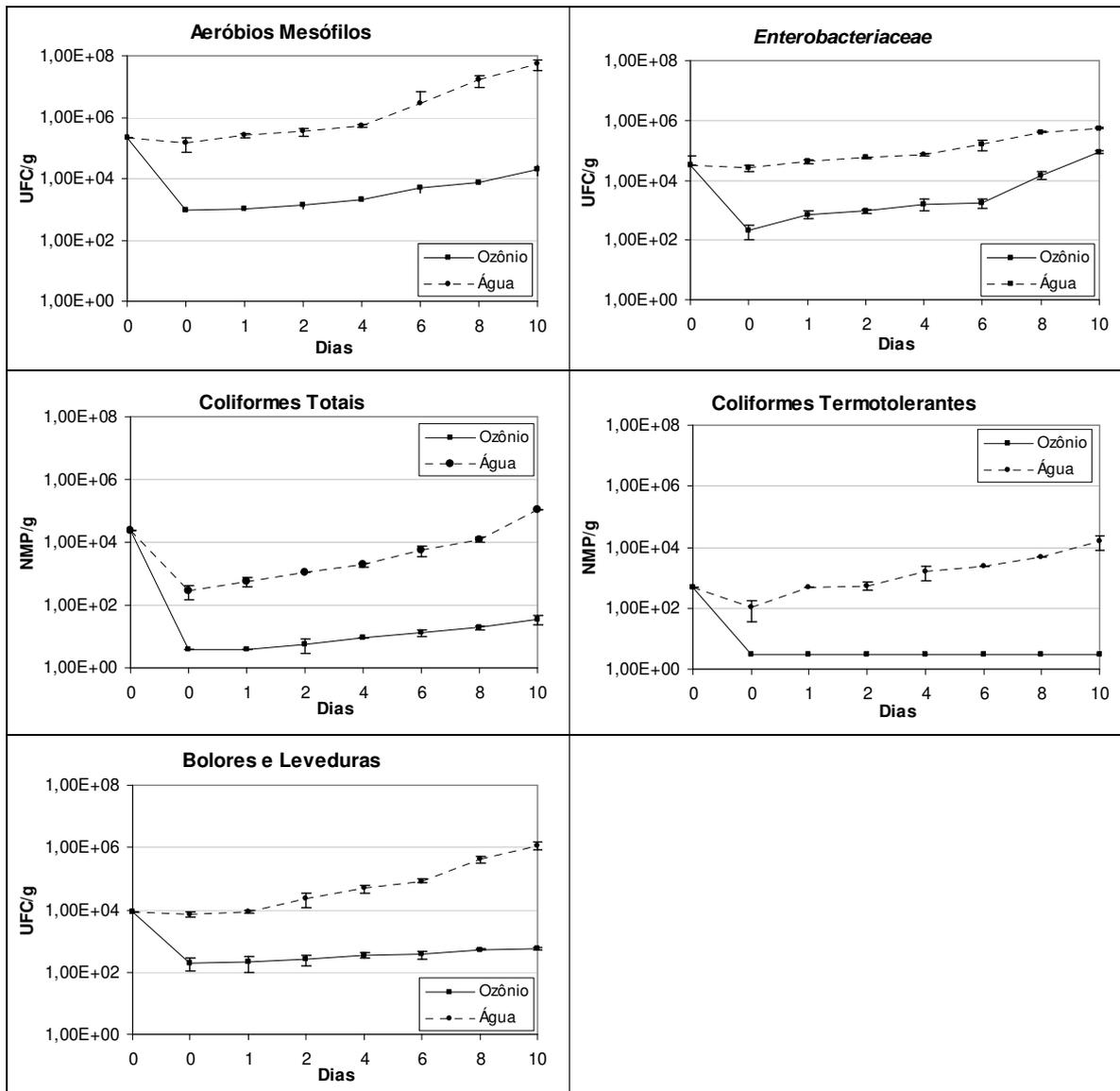


Figura 4.2 Crescimento microbiano em alface americana após tratamento com água ozonizada na concentração de 1,0 mg L⁻¹ por 2 minutos.

Pode-se observar que ocorreu no décimo dia uma redução em relação às amostras enxaguadas com água de 3,45, 0,82 e 3,32 ciclos logarítmicos, para, respectivamente, os microrganismos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae* e bolores e leveduras. Os aeróbios mesófilos e os bolores e leveduras, na amostra tratada, apresentaram contagens de 1,97x10⁴ e 5,57x10² UFC g⁻¹, respectivamente no décimo dia de avaliação.

Não foram observadas alterações visuais no produto sanitizado em relação a cor e textura. No entanto as amostras controle, a partir do oitavo dia, devido as concentrações de aeróbios mesófilos estarem acima de $1,63 \times 10^7$ UFC g^{-1} e as contagens de *Enterobacteriaceae* e bolores e leveduras apresentaram valores acima de $4,1 \times 10^5$ UFC g^{-1} , apresentaram alterações na cor das amostras.

Para o grupo dos coliformes, observa-se na figura 4.2 um ganho ao décimo dia de estocagem, de amostras sanitizadas em relação às amostras enxaguadas com água de 3,71 e 3,48 ciclos logarítmicos para coliformes termotolerantes e totais, respectivamente. A contagem inicial de coliformes termotolerantes está fora do previsto na legislação vigente e permanece acima de 10^2 NMP g^{-1} durante todo o período avaliado, para as amostras controle, alcançando a contagem de $1,53 \times 10^4$ NMP g^{-1} no décimo dia. Em contrapartida, como não foi detectado *Salmonella* em nenhuma amostra, as alfaces tratadas com água ozonizada permaneceram dentro dos parâmetros microbiológicos cobrados na RDC 12 (ANVISA, 2001).

A Figura 4.3 apresenta os resultados de crescimento microbiano em alface americana sanitizada por água ozonizada na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ por 3 minutos.

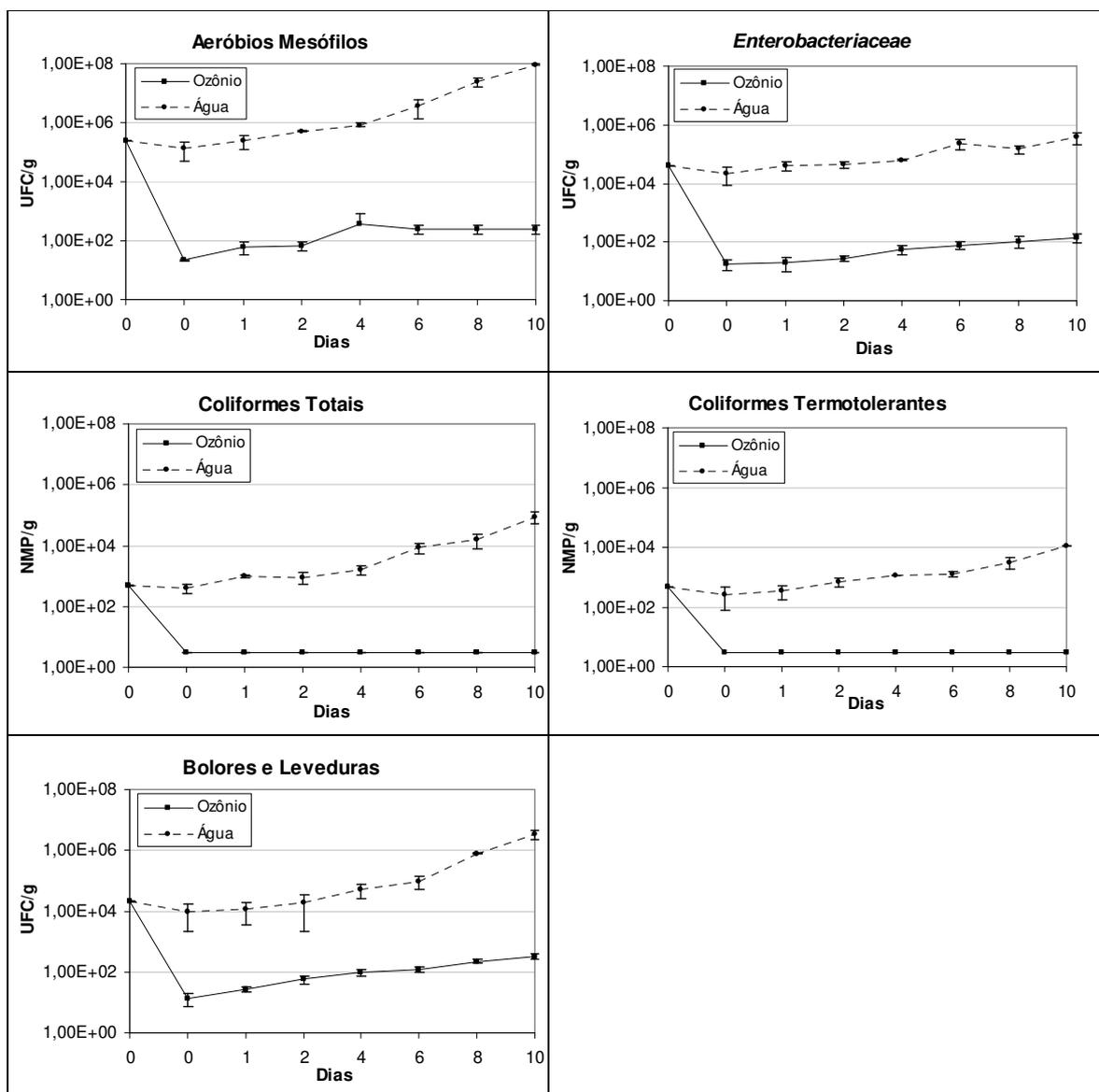


Figura 4.3 - Crescimento microbiano em alface americana após tratamento com água ozonizada na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ por 3 minutos.

Observa-se que o tratamento com água ozonizada, reduziu em 4 ciclos logarítmicos as populações de microrganismos aeróbios mesófilos no primeiro dia de armazenamento e que, após quatro dias a 2°C, se mantiveram constantes. No final do período de estocagem a redução, em comparação às folhas não tratadas foi de 5,56 ciclos logarítmicos.

Para as populações de *Enterobacteriaceae* pode-se observar que as contagens de $4,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹ foram reduzidas em 3,31 ciclos logarítmicos, após o tratamento, e se mantiveram até o final do estudo.

Para o grupo dos coliformes, o efeito do tratamento apresentou uma eficácia ainda maior, reduzindo as populações coliformes totais e termotolerantes para menos de 3 NMP g⁻¹ na alface tratada no primeiro dia de estudo, mantendo-se com esta contagem até o final do período de estocagem. O ganho em relação a amostra controle foi de 3,56 ciclos logarítmicos para os coliformes termotolerantes, no último dia de estocagem.

Neste estudo, os bolores e leveduras apresentaram uma redução de população de $2,1 \times 10^4$ UFC g⁻¹ para 13 UFC g⁻¹ nos primeiros dias de estocagem, mantendo-se baixo (10^2 UFC g⁻¹) até o final da avaliação. O ganho em relação às amostras enxaguadas em água foi de 4,01 ciclos logarítmicos no último dia de estocagem.

A figura 4.3 apresenta, ainda, que as populações de microrganismos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, coliformes e bolores e leveduras, encontradas nas populações iniciais das alfaces adquiridas no comércio para avaliação da vida de prateleira, foram semelhantes às encontradas nas alfaces minimamente processadas e *in natura* apresentadas no Capítulo 5.

Foi observado o aspecto geral das folhas após o tratamento de 1,0 mg L⁻¹ por três minutos, incluindo atributos de cor, escurecimento da nervura central e das bordas. Os vegetais mantiveram-se com boa aparência, sem modificações significativas até o décimo dia de estocagem. Já os vegetais sem tratamento, no sexto dia de estocagem à mesma temperatura de 2°C e à mesma condição de embalagem, apresentaram comprometimento na textura das folhas, amolecimento e alteração na cor, notando-se uma grande e gradativa diminuição na sua qualidade.

Para as amostras tratadas com água ozonizada todos os microrganismos apresentaram contagens abaixo de 10^3 UFC g^{-1} , porém verificou-se para as amostras controles contagens acima de 10^7 UFC g^{-1} de aeróbios mesófilos após 8 dias de avaliação.



Figura 4.4 – Alfaces estocadas a 2º C para avaliação de vida de prateleira, pós-tratamento com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de água ozonizada.

Segundo ROLLE & CHISM (1987) a perda do valor comercial de produtos frescos ocorre quando a contagem de microrganismos deterioradores atinge um nível populacional de 10^6 a 10^8 UFC g^{-1} , o que geralmente não excede 5 a 7 dias sob temperaturas variando de 5 a 7ºC.

CANTWELL (1996), estudando diferentes cultivares de alface, verificou que o amolecimento e a descoloração generalizada foram as principais injúrias causadas pelo aumento das concentrações de CO_2 no interior das embalagens. A autora relatou que a exposição da alface a teores elevados de CO_2 pode causar desordem denominada mancha marrom, aparecendo primeiramente na superfície da nervura central da folha como área amarelada e umedecida, com tamanho variável, tornando-se mais definida e marrom com o passar dos dias.

FOLEY *et al.* (2002) irradiaram alface americana com 0,55kGy durante 3,0 minutos e obtiveram uma redução de 2,5, 2,14 e 5,0 ciclos logarítmicos para bolores e leveduras, aeróbios mesófilos e *E. coli* O157:H7, respectivamente, sem causar efeitos nos atributos sensoriais por 10 dias. As amostras foram tratadas com 200 mg/mL de hipoclorito de sódio por três minutos antes da irradiação e a carga inicial de *E. coli* O157:H7 era de aproximadamente 10^7 UFC g⁻¹.

A Tabela 4.1 apresenta os números de reduções decimais (NRD) para os microrganismos estudados após serem tratados com 1,0 mg L⁻¹ de água ozonizada no tempo de contato de 1, 2 e 3 minutos. As amostras foram analisadas imediatamente após a exposição ao tratamento.

TABELA 4.1 – Número de reduções decimais da contaminação inicial da alface americana, após tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de água ozonizada.

Tempo (min)	Número de reduções decimais*					
	1		2		3	
	Ozônio	Água	Ozônio	Água	Ozônio	Água
Aeróbios mesófilos	1,29	0,05	2,33	0,14	4,07	0,25
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,66	0,06	3,19	0,09	3,36	0,27
Coliformes totais	1,55	0,31	2,06	0,19	2,18	0,07
Coliformes termotolerantes	1,84	0,09	1,88	0,33	2,18	0,25
Bolores e Leveduras	1,05	0,06	1,65	0,09	3,20	0,34

* NRD = log (concentração inicial) – log (concentração final)

A Tabela 4.1 demonstra que o tratamento com água (amostras controle) não obteve resultados significativos de redução de carga em relação às amostras tratadas com ozônio. A redução de coliformes termotolerantes foi de 1,84, 1,88 e 2,18 ciclos logarítmicos, respectivamente, para os tempos 1, 2 e 3 minutos e foi o suficiente, nos três tempos, para manter durante os 10 dias de estocagem as alfaces com contagem menor que 3 NMP g⁻¹. Com relação aos aeróbios mesófilos

verificou-se uma variação de 1,29 para 4,07 ciclos logarítmicos nos tempos 1 e 3 minutos, respectivamente. Estes números mostram a melhor qualidade visual observada nas hortaliças durante o período de armazenagem.

SINGH *et al.* (2002) estudaram a aplicação de dióxido de cloro e água ozonizada, utilizados em conjunto, em alfaces romanas e cenouras inoculadas com aproximadamente 10^8 UFC g^{-1} de *E. coli* O157:H7. A água ozonizada foi utilizada na concentração de $9,7 \text{ mg L}^{-1}$ por 10 minutos e o dióxido de cloro aquoso na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ por 10 minutos, ambos sanitizantes utilizados em temperatura ambiente (22°C). A água ozonizada seguida do dióxido de cloro proporcionou uma redução de 3,75 e 3,99 ciclos logarítmicos para alface e cenoura, respectivamente, e a solução de dióxido de cloro seguida da água ozonizada reduziu a alface e a cenoura em 3,83 e 4,34 ciclos logarítmicos.

ZHANG & FARBER (1996) reportaram que a máxima redução de *L. monocytogenes* em alfaces cortadas tratadas com 200 mg L^{-1} de cloro por 5 minutos foi de 1,7 ciclos logarítmicos. BEUCHAT (1999) afirma que sanitizantes clorados na concentração de 50 a 200 mg L^{-1} são amplamente utilizados na indústria de alimentos para frutas e hortaliças frescas, porém o tratamento somente reduz a população de bactérias em menos de dois ciclos logarítmicos. Em adição, o autor afirma que o cloro possui eficácia limitada pois possivelmente pode formar compostos cancerígenos. Neste presente trabalho, embora não tendo utilizado *L. monocytogenes* como microrganismo indicador, utilizando-se concentrações e tempos de contato efetivamente menores ($1,0 \text{ mg}^{-1}\text{L}$ de ozônio por 1 minuto) foram encontradas até 2,18 reduções decimais de coliformes termotolerantes.

4.4 Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- A água ozonizada na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ no tempo de 3 minutos foi capaz de reduzir em até 4,07, 3,36, 3,20, 2,18 e 2,18 ciclos logarítmicos de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras, coliformes totais e coliformes termotolerantes, respectivamente, mantendo a qualidade microbiológica da alface americana dentro do previsto na legislação vigente, para todos os microrganismos pesquisados.
- A água ozonizada na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ nos tempos de 1 e 2 minutos, foi capaz de manter a qualidade microbiológica da alface americana no que tange às exigências da legislação, porém com altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae* e bolores e leveduras, após 8 dias de estocagem;
- A sanitização de alface americana disponível do comércio com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de água ozonizada por 2 e 3 minutos mantém o produto dentro das exigências legais, por dez dias, desde que estocado a 2°C .
- As amostras tratadas com água (controle) para o grupo de coliformes fecais permaneceu, por todo o período de avaliação e nos três tempos de contato, com as populações acima de 100 NMP g^{-1} , condenando, desta forma, a utilização da água de abastecimento público para sanitizar a hortaliça.

4.5 Referências Bibliográficas

ANVISA. **Resolução 12 de 2 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil], Brasília, 2001.

ARRUDA, G.A. **Manual de Boas Práticas – Vol. 2 - Unidade de Alimentação e Nutrição**. Ponto Crítico, São Paulo. 2ed., 2002.

BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.2, p.204-216, 1995.

BEUCHAT, L.R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, p.845-849, 1999.

CANTWELL, M. Fresh-cut product biology requirements. **Perishables Handling Newsletter**, University of California, Davis, v.81, 1996.

FOLEY, D.M.; DUFOUR, A.; RODRIGUEZ, L.; CAPORASO, F.; PRAKASH, A. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in shredded iceberg lettuce by chlorination and gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**. v.63, p.391-396. 2002.

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**, Des Moines, v.62, n.9, p.1071-1087, 1999.

LEE, S.Y., COSTELLO, M., KANG, D.H. Efficacy of Chlorine Dioxide Gas as a Sanitizer of Lettuce Leaves. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.67, n.7, p.1371 –1376, 2004.

MINISTÉRIO DA DEFESA, Comando da Aeronáutica, Subdiretoria de Abastecimento. **Coletânea de Prestações de Contas**, São Paulo, 2004.

MORETTI, C.L. Processamento mínimo de hortaliças: alternativa viável para a redução de perdas pós-colheita e agregação de valor ao agronegócio brasileiro. **Horticultura Brasileira**. v.17, n.2, 1999.

ROLLE, R., CHISM, G.M. Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, v. 43, p. 274-276, 1987.

SINGH, N., SINGH, R.K., BHUNIA, A.K., STROSHINE, R.L. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on Lettuce and baby carrots. **Lebensm.-Wiss, u.-Technology** 35, p.720-729, 2002.

SPECK, M.L. Compendium of methods for microbiological examination of foods. Washington. **APHA/Technical Committee on Microbiological for foods**. 914p. 1984.

ZHANG, S., FARBER, J.M. The effects of various disinfectantes against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. **Food Microbiology**, v.13, p.311-321, 1996.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- O tiosulfato de sódio foi eficiente na neutralização do ozônio durante os ensaios *in vitro* de inativação de *E. coli* O157:H7 e *B. subtilis* e não funcionou como agente sanitizante.
- Não houve alteração, na ausência de matéria orgânica, na quantidade de ozônio dissolvido em água em até 60 minutos.
- Verificou-se que 1,0 mg L⁻¹ de água ozonizada no tempo de 1 minuto, na ausência de matéria orgânica, é suficiente para reduzir, no mínimo, 6,57 e 5,27 ciclos logarítmicos de *E. coli* O157:H7 e esporos de *B. subtilis*, respectivamente.
- As populações de aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* nas alfaces *in natura* e minimamente processada foram semelhantes, demonstrando que os processos de sanitização utilizados foram ineficientes ou que ocorreu contaminação cruzada ou recontaminação pós-processamento.
- As populações de coliformes termotolerantes em todas as amostras de alface americana minimamente processada foram superior a 100 NMP g⁻¹, condenando, desta forma, segundo a legislação vigente, a qualidade microbiológica da hortaliça.
- A água ozonizada na concentração de 1,0 mg L⁻¹, durante 1,0 minuto de tempo de contato, reduziu entre 2,40 e 4,49 ciclos logarítmicos as populações de *E. coli* O157:H7 inoculada artificialmente em alface americana.

- As populações de coliformes termotolerantes, sanitizadas com 1,0 mg L⁻¹ de água ozonizada, permaneceram, durante 10 dias de estocagem da alface americana a 2°C, menores que 3 NMP g⁻¹ nos três tempos estudados.
- A sanitização de alface americana por 1,0 mg L⁻¹ de água ozonizada, nos três tempos deste estudo, foi capaz de manter o produto dentro do previsto pela legislação vigente.
- As amostras tratadas por água corrente não reduziram as populações iniciais dos microorganismos estudados, mantendo o produto impróprio para o consumo desde o primeiro dia de estocagem.
- Não foi encontrada *Salmonella* sp em nenhuma amostra analisada.

ANEXO A – Vida de Prateleira de Alface Americana

Aeróbios Mesófilos

Concentração inicial: $8,90 \times 10^4$

OZÔNIO - 1 minuto						ÁGUA - 1 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$7,60 \times 10^3$	$1,40 \times 10^3$	$4,80 \times 10^3$	$4,60 \times 10^3$	$3,10 \times 10^3$	$8,20 \times 10^4$	$9,50 \times 10^4$	$6,30 \times 10^4$	$8,00 \times 10^4$	$1,61 \times 10^4$
1	$8,90 \times 10^3$	$3,60 \times 10^3$	$5,20 \times 10^3$	$5,90 \times 10^3$	$2,72 \times 10^3$	$1,50 \times 10^5$	$2,00 \times 10^5$	$1,90 \times 10^5$	$1,80 \times 10^5$	$2,65 \times 10^4$
2	$9,10 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$6,70 \times 10^3$	$6,77 \times 10^3$	$2,30 \times 10^3$	$4,90 \times 10^5$	$4,00 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$4,63 \times 10^5$	$5,51 \times 10^4$
4	$1,40 \times 10^4$	$8,70 \times 10^3$	$1,10 \times 10^4$	$1,12 \times 10^4$	$2,66 \times 10^3$	$7,20 \times 10^5$	$6,50 \times 10^5$	$6,20 \times 10^5$	$6,63 \times 10^5$	$5,13 \times 10^4$
6	$3,20 \times 10^4$	$2,90 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$2,53 \times 10^4$	$9,07 \times 10^3$	$1,30 \times 10^6$	$1,30 \times 10^6$	$1,40 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6$	$5,77 \times 10^4$
8	$6,80 \times 10^5$	$5,30 \times 10^5$	$2,60 \times 10^5$	$4,90 \times 10^5$	$2,13 \times 10^5$	$8,10 \times 10^6$	$7,50 \times 10^6$	$9,60 \times 10^6$	$8,40 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6$
10	$9,40 \times 10^6$	$8,70 \times 10^6$	$9,60 \times 10^5$	$6,35 \times 10^6$	$4,68 \times 10^6$	$1,00 \times 10^7$	$2,50 \times 10^7$	$1,30 \times 10^7$	$1,60 \times 10^7$	$7,94 \times 10^6$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $4,01 \times 10^{-1}$

Concentração inicial: $2,10 \times 10^5$

OZÔNIO - 2 minuto						ÁGUA - 2 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$9,60 \times 10^2$	$1,00 \times 10^3$	$8,70 \times 10^2$	$9,43 \times 10^2$	$6,66 \times 10^1$	$1,90 \times 10^5$	$1,80 \times 10^5$	$6,30 \times 10^4$	$1,44 \times 10^5$	$7,06 \times 10^4$
1	$1,00 \times 10^3$	$1,20 \times 10^3$	$9,40 \times 10^2$	$1,05 \times 10^3$	$1,36 \times 10^2$	$2,20 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5$	$2,80 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5$	$3,00 \times 10^4$
2	$1,10 \times 10^3$	$1,70 \times 10^3$	$1,20 \times 10^3$	$1,33 \times 10^3$	$3,21 \times 10^2$	$3,10 \times 10^5$	$4,50 \times 10^5$	$2,70 \times 10^5$	$3,43 \times 10^5$	$9,45 \times 10^4$
4	$2,20 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$1,90 \times 10^3$	$2,03 \times 10^3$	$1,53 \times 10^2$	$6,00 \times 10^5$	$5,50 \times 10^5$	$4,90 \times 10^5$	$5,47 \times 10^5$	$5,51 \times 10^4$
6	$5,60 \times 10^3$	$5,80 \times 10^3$	$3,30 \times 10^3$	$4,90 \times 10^3$	$1,39 \times 10^3$	$7,20 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	$3,70 \times 10^5$	$2,92 \times 10^6$	$3,73 \times 10^6$
8	$7,10 \times 10^3$	$8,00 \times 10^3$	$6,50 \times 10^3$	$7,20 \times 10^3$	$7,55 \times 10^2$	$2,40 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$	$1,00 \times 10^7$	$1,63 \times 10^7$	$7,09 \times 10^6$
10	$1,90 \times 10^4$	$2,70 \times 10^4$	$1,30 \times 10^4$	$1,97 \times 10^4$	$7,02 \times 10^3$	$6,50 \times 10^7$	$7,00 \times 10^7$	$3,00 \times 10^7$	$5,50 \times 10^7$	$2,18 \times 10^7$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $3,45 \times 10^0$

Concentração inicial: $2,50 \times 10^5$

OZÔNIO - 3 minuto						ÁGUA - 3 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
	Concentração inicial			$2,50 \times 10^5$		Concentração inicial			$2,50 \times 10^5$	
0	$2,20 \times 10^1$	$1,90 \times 10^1$	$2,30 \times 10^1$	$2,13 \times 10^1$	$2,08 \times 10^0$	$2,40 \times 10^5$	$8,40 \times 10^4$	$9,40 \times 10^4$	$1,39 \times 10^5$	$8,73 \times 10^4$
1	$8,90 \times 10^1$	$3,60 \times 10^1$	$5,20 \times 10^1$	$5,90 \times 10^1$	$1,36 \times 10^1$	$3,90 \times 10^5$	$1,40 \times 10^5$	$2,10 \times 10^5$	$2,47 \times 10^5$	$1,29 \times 10^5$
2	$9,10 \times 10^1$	$4,50 \times 10^1$	$6,70 \times 10^1$	$6,77 \times 10^1$	$3,21 \times 10^1$	$5,50 \times 10^5$	$5,20 \times 10^5$	$4,90 \times 10^5$	$5,20 \times 10^5$	$3,00 \times 10^4$
4	$1,40 \times 10^2$	$8,70 \times 10^2$	$1,10 \times 10^2$	$3,73 \times 10^2$	$1,53 \times 10^2$	$9,70 \times 10^5$	$7,60 \times 10^5$	$8,30 \times 10^5$	$8,53 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5$
6	$3,20 \times 10^2$	$2,90 \times 10^2$	$1,50 \times 10^2$	$2,53 \times 10^2$	$1,39 \times 10^1$	$5,00 \times 10^6$	$9,20 \times 10^5$	$5,10 \times 10^5$	$3,67 \times 10^6$	$2,38 \times 10^6$
8	$3,20 \times 10^2$	$2,90 \times 10^2$	$1,50 \times 10^2$	$2,53 \times 10^2$	$7,55 \times 10^1$	$3,10 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$	$2,90 \times 10^7$	$2,50 \times 10^7$	$8,72 \times 10^6$
10	$3,20 \times 10^2$	$2,90 \times 10^2$	$1,50 \times 10^2$	$2,53 \times 10^2$	$7,02 \times 10^1$	$9,80 \times 10^7$	$9,40 \times 10^7$	$8,70 \times 10^7$	$9,30 \times 10^7$	$5,57 \times 10^6$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $5,56 \times 10^0$

ANEXO B – Vida de Prateleira de Alface Americana

Enterobacteriaceae

Concentração inicial: $3,00 \times 10^4$

OZÔNIO - 1 minuto						ÁGUA - 1 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$8,30 \times 10^2$	$7,20 \times 10^2$	$4,10 \times 10^2$	$6,53 \times 10^2$	$2,18 \times 10^2$	$2,90 \times 10^4$	$1,80 \times 10^4$	$3,20 \times 10^4$	$2,63 \times 10^4$	$7,37 \times 10^3$
1	$8,70 \times 10^2$	$9,10 \times 10^2$	$5,40 \times 10^2$	$7,73 \times 10^2$	$2,03 \times 10^2$	$3,60 \times 10^4$	$3,20 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$	$3,77 \times 10^4$	$6,66 \times 10^3$
2	$9,30 \times 10^2$	$1,00 \times 10^3$	$7,70 \times 10^2$	$9,00 \times 10^2$	$1,18 \times 10^2$	$6,40 \times 10^4$	$5,70 \times 10^4$	$7,00 \times 10^4$	$6,37 \times 10^4$	$6,51 \times 10^3$
4	$1,60 \times 10^3$	$2,20 \times 10^3$	$9,20 \times 10^2$	$1,57 \times 10^3$	$6,40 \times 10^2$	$7,80 \times 10^4$	$6,90 \times 10^4$	$8,10 \times 10^4$	$7,60 \times 10^4$	$6,24 \times 10^3$
6	$1,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$1,30 \times 10^3$	$1,77 \times 10^3$	$6,43 \times 10^2$	$1,00 \times 10^5$	$1,30 \times 10^5$	$2,90 \times 10^5$	$1,73 \times 10^4$	$1,02 \times 10^5$
8	$1,00 \times 10^4$	$1,90 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$1,47 \times 10^4$	$4,51 \times 10^3$	$3,90 \times 10^5$	$3,50 \times 10^5$	$4,40 \times 10^5$	$3,93 \times 10^5$	$4,51 \times 10^4$
10	$8,10 \times 10^4$	$7,90 \times 10^4$	$9,50 \times 10^4$	$8,50 \times 10^4$	$8,72 \times 10^3$	$6,00 \times 10^5$	$6,20 \times 10^5$	$6,10 \times 10^5$	$6,10 \times 10^5$	$1,00 \times 10^4$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $8,56 \times 10^{-1}$

Concentração inicial: $3,10 \times 10^4$

OZÔNIO - 2 minuto						ÁGUA - 2 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$3,00 \times 10^2$	$2,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^2$	$2,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^2$	$3,10 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$2,50 \times 10^4$	$2,53 \times 10^4$	$5,51 \times 10^3$
1	$7,00 \times 10^2$	$9,10 \times 10^2$	$5,40 \times 10^2$	$7,17 \times 10^2$	$1,86 \times 10^2$	$4,20 \times 10^4$	$4,90 \times 10^4$	$3,60 \times 10^4$	$4,23 \times 10^4$	$6,51 \times 10^3$
2	$9,30 \times 10^2$	$1,00 \times 10^3$	$7,70 \times 10^2$	$9,00 \times 10^2$	$1,18 \times 10^2$	$5,90 \times 10^4$	$6,00 \times 10^4$	$5,50 \times 10^4$	$5,80 \times 10^4$	$2,65 \times 10^3$
4	$1,60 \times 10^3$	$2,20 \times 10^3$	$9,20 \times 10^2$	$1,57 \times 10^3$	$6,40 \times 10^2$	$7,20 \times 10^4$	$6,50 \times 10^4$	$7,80 \times 10^4$	$7,17 \times 10^4$	$6,51 \times 10^3$
6	$1,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$1,30 \times 10^3$	$1,77 \times 10^3$	$6,43 \times 10^2$	$1,50 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	$2,30 \times 10^5$	$1,60 \times 10^5$	$5,56 \times 10^4$
8	$1,00 \times 10^4$	$1,90 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$1,47 \times 10^4$	$4,51 \times 10^3$	$4,10 \times 10^5$	$3,90 \times 10^5$	$4,30 \times 10^5$	$4,10 \times 10^5$	$2,00 \times 10^4$
10	$8,10 \times 10^4$	$7,90 \times 10^4$	$9,50 \times 10^4$	$8,50 \times 10^4$	$8,72 \times 10^3$	$5,50 \times 10^5$	$6,00 \times 10^5$	$5,30 \times 10^5$	$5,60 \times 10^5$	$3,61 \times 10^4$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $8,19 \times 10^{-1}$

Concentração inicial: $4,00 \times 10^4$

OZÔNIO - 3 minuto						ÁGUA - 3 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$2,20 \times 10^1$	$1,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$1,73 \times 10^1$	$6,43 \times 10^0$	$3,60 \times 10^4$	$1,80 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$2,17 \times 10^4$	$1,29 \times 10^4$
1	$3,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^1$	$2,50 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$4,30 \times 10^4$	$3,97 \times 10^4$	$1,33 \times 10^4$
2	$3,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^1$	$2,67 \times 10^1$	$5,77 \times 10^0$	$3,10 \times 10^4$	$4,90 \times 10^4$	$4,70 \times 10^4$	$4,23 \times 10^4$	$9,87 \times 10^3$
4	$8,00 \times 10^1$	$5,00 \times 10^1$	$4,00 \times 10^1$	$5,67 \times 10^1$	$2,08 \times 10^1$	$6,60 \times 10^4$	$5,80 \times 10^4$	$6,50 \times 10^4$	$6,30 \times 10^4$	$4,36 \times 10^3$
6	$1,00 \times 10^2$	$6,00 \times 10^1$	$7,00 \times 10^1$	$7,67 \times 10^1$	$2,08 \times 10^1$	$1,50 \times 10^5$	$2,20 \times 10^5$	$3,30 \times 10^5$	$2,33 \times 10^4$	$9,07 \times 10^4$
8	$1,60 \times 10^2$	$8,00 \times 10^1$	$8,00 \times 10^1$	$1,07 \times 10^2$	$4,62 \times 10^1$	$1,00 \times 10^5$	$1,90 \times 10^5$	$1,50 \times 10^5$	$1,47 \times 10^5$	$4,51 \times 10^4$
10	$2,00 \times 10^2$	$1,10 \times 10^2$	$1,10 \times 10^2$	$1,40 \times 10^2$	$5,20 \times 10^1$	$3,10 \times 10^5$	$5,50 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5$	$3,70 \times 10^5$	$1,59 \times 10^5$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $3,42 \times 10^0$

ANEXO C – Vida de Prateleira de Alface Americana

Coliformes Totais

Concentração inicial: $4,60 \times 10^2$

OZÔNIO - 1 minuto						ÁGUA - 1 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$9,00 \times 10^0$	$1,50 \times 10^1$	$1,50 \times 10^1$	$1,30 \times 10^1$	$3,46 \times 10^0$	$2,30 \times 10^2$	$2,10 \times 10^2$	$2,30 \times 10^2$	$2,23 \times 10^2$	$1,15 \times 10^1$
1	$2,30 \times 10^1$	$2,30 \times 10^1$	$2,30 \times 10^1$	$2,30 \times 10^1$	$1,00 \times 10^1$	$4,60 \times 10^2$	$7,50 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$5,57 \times 10^2$	$1,67 \times 10^2$
2	$2,00 \times 10^1$	$2,30 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$2,10 \times 10^1$	$1,73 \times 10^0$	$7,50 \times 10^2$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$9,83 \times 10^2$	$2,02 \times 10^2$
4	$4,30 \times 10^1$	$9,30 \times 10^1$	$9,30 \times 10^1$	$7,63 \times 10^1$	$2,89 \times 10^1$	$1,10 \times 10^3$	$2,10 \times 10^3$	$2,10 \times 10^3$	$1,77 \times 10^3$	$5,77 \times 10^2$
6	$2,40 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$3,87 \times 10^2$	$1,27 \times 10^2$	$4,60 \times 10^3$	$4,60 \times 10^3$	$4,60 \times 10^3$	$4,60 \times 10^3$	$0,00 \times 10^0$
8	$4,60 \times 10^2$	$9,30 \times 10^2$	$9,30 \times 10^2$	$7,73 \times 10^2$	$2,71 \times 10^2$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$0,00 \times 10^0$
10	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,00 \times 10^1$	$4,60 \times 10^4$	$1,10 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$	$8,87 \times 10^4$	$3,70 \times 10^4$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $1,91 \times 10^0$

Concentração inicial: $2,30 \times 10^4$

OZÔNIO - 2 minuto						ÁGUA - 2 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
Concentração inicial						Concentração inicial $2,30 \times 10^4$				
0	$4,00 \times 10^0$	$4,00 \times 10^0$	$4,00 \times 10^0$	$4,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$2,30 \times 10^2$	$1,90 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$2,93 \times 10^2$	$1,46 \times 10^2$
1	$4,00 \times 10^0$	$4,00 \times 10^0$	$4,00 \times 10^0$	$4,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$4,60 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$7,50 \times 10^2$	$5,57 \times 10^2$	$1,67 \times 10^2$
2	$4,00 \times 10^0$	$9,00 \times 10^0$	$4,00 \times 10^0$	$5,67 \times 10^0$	$2,89 \times 10^0$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$0,00 \times 10^0$
4	$9,00 \times 10^0$	$9,00 \times 10^0$	$9,00 \times 10^0$	$9,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$1,50 \times 10^3$	$2,10 \times 10^3$	$2,10 \times 10^3$	$1,90 \times 10^3$	$3,46 \times 10^2$
6	$1,50 \times 10^1$	$9,00 \times 10^0$	$1,50 \times 10^1$	$1,30 \times 10^1$	$3,46 \times 10^0$	$4,30 \times 10^3$	$4,30 \times 10^3$	$7,50 \times 10^3$	$5,37 \times 10^3$	$1,85 \times 10^3$
8	$1,50 \times 10^1$	$2,10 \times 10^1$	$2,10 \times 10^1$	$1,90 \times 10^1$	$3,46 \times 10^0$	$1,10 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$1,23 \times 10^4$	$2,31 \times 10^3$
10	$2,30 \times 10^1$	$4,30 \times 10^1$	$4,30 \times 10^1$	$3,63 \times 10^1$	$1,15 \times 10^1$	$1,10 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$	$0,00 \times 10^0$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $3,48 \times 10^0$

Concentração inicial: $4,60 \times 10^2$

OZÔNIO - 3 minuto						ÁGUA - 3 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$2,40 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$3,87 \times 10^2$	127×10^2
1	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$9,30 \times 10^2$	$9,30 \times 10^2$	$1,10 \times 10^3$	$9,87 \times 10^2$	$9,81 \times 10^1$
2	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$4,60 \times 10^2$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$8,87 \times 10^2$	$3,70 \times 10^2$
4	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$1,10 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$2,10 \times 10^3$	$1,57 \times 10^3$	$5,03 \times 10^2$
6	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$4,60 \times 10^3$	$9,30 \times 10^3$	$1,10 \times 10^4$	$8,30 \times 10^3$	$3,32 \times 10^3$
8	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$2,40 \times 10^4$	$1,53 \times 10^4$	$7,51 \times 10^3$
10	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$4,60 \times 10^4$	$1,10 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$	$8,87 \times 10^4$	$3,70 \times 10^4$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $4,47 \times 10^0$

ANEXO D – Vida de Prateleira de Alface Americana

Coliformes Termotolerantes

Concentração inicial: $2,10 \times 10^2$

OZÔNIO - 1 minuto						ÁGUA - 1 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$1,50 \times 10^2$	$1,50 \times 10^2$	$2,10 \times 10^2$	$1,70 \times 10^2$	$3,46 \times 10^1$
1	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$2,10 \times 10^2$	$2,10 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$2,93 \times 10^2$	$1,44 \times 10^2$
2	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$4,60 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$7,50 \times 10^2$	$5,57 \times 10^2$	$1,67 \times 10^2$
4	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,00 \times 10^1$
6	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$2,40 \times 10^3$	$2,40 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$2,10 \times 10^3$	$5,20 \times 10^2$
8	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$4,60 \times 10^3$	$4,60 \times 10^3$	$2,40 \times 10^3$	$3,870 \times 10^3$	$1,278 \times 10^3$
10	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$1,00 \times 10^1$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $3,56 \times 10^0$

Concentração inicial: $4,60 \times 10^2$

OZÔNIO - 2 minuto						ÁGUA - 2 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$1,50 \times 10^2$	$2,30 \times 10^1$	$1,50 \times 10^2$	$1,08 \times 10^2$	$7,33 \times 10^1$
1	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$4,60 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$0,00 \times 10^0$
2	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$4,60 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$7,50 \times 10^2$	$5,57 \times 10^2$	$1,67 \times 10^2$
4	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$2,40 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,53 \times 10^3$	$7,51 \times 10^2$
6	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$2,40 \times 10^3$	$2,40 \times 10^3$	$2,40 \times 10^3$	$2,40 \times 10^3$	$0,00 \times 10^0$
8	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$4,60 \times 10^3$	$4,60 \times 10^3$	$4,60 \times 10^3$	$4,60 \times 10^3$	$0,00 \times 10^0$
10	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$2,40 \times 10^4$	$1,53 \times 10^4$	$7,51 \times 10^3$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $3,71 \times 10^0$

Concentração inicial: $4,6 \times 10^2$

OZÔNIO - 3 minuto						ÁGUA - 3 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$2,30 \times 10^2$	$9,30 \times 10^1$	$4,60 \times 10^2$	$2,61 \times 10^2$	$1,85 \times 10^2$
1	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$4,60 \times 10^2$	$1,50 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$5,57 \times 10^2$	$1,79 \times 10^2$
2	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$9,30 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$7,50 \times 10^2$	$7,13 \times 10^2$	$2,37 \times 10^2$
4	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$0,00 \times 10^0$
6	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$1,50 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,23 \times 10^3$	$2,31 \times 10^2$
8	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$4,60 \times 10^3$	$2,40 \times 10^3$	$2,40 \times 10^3$	$3,13 \times 10^3$	$1,27 \times 10^3$
10	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$3,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$0,00 \times 10^0$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $3,56 \times 10^0$

ANEXO E – Vida de Prateleira de Alface Americana

Bolores e Leveduras

Concentração inicial: $7,20 \times 10^3$

OZÔNIO - 1 minuto						ÁGUA - 1 minuto				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$8,30 \times 10^2$	$7,90 \times 10^2$	$5,20 \times 10^2$	$7,13 \times 10^2$	$1,69 \times 10^2$	$7,10 \times 10^3$	$5,60 \times 10^3$	$6,10 \times 10^3$	$6,27 \times 10^3$	$7,64 \times 10^2$
1	$7,80 \times 10^2$	$8,10 \times 10^2$	$6,00 \times 10^2$	$7,30 \times 10^2$	$1,14 \times 10^2$	$9,10 \times 10^3$	$6,70 \times 10^3$	$8,50 \times 10^3$	$8,10 \times 10^3$	$1,25 \times 10^3$
2	$8,10 \times 10^2$	$8,40 \times 10^2$	$9,50 \times 10^2$	$8,67 \times 10^2$	$7,37 \times 10^1$	$2,10 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$2,03 \times 10^4$	$5,77 \times 10^2$
4	$1,20 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$2,30 \times 10^3$	$1,53 \times 10^3$	$6,66 \times 10^2$	$2,40 \times 10^4$	$1,90 \times 10^4$	$2,50 \times 10^4$	$2,27 \times 10^4$	$3,21 \times 10^3$
6	$3,50 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$4,90 \times 10^3$	$4,47 \times 10^3$	$8,39 \times 10^2$	$7,50 \times 10^4$	$8,10 \times 10^4$	$8,50 \times 10^4$	$8,03 \times 10^4$	$5,03 \times 10^3$
8	$1,40 \times 10^4$	$3,50 \times 10^4$	$2,10 \times 10^4$	$2,33 \times 10^4$	$1,07 \times 10^4$	$2,20 \times 10^5$	$3,10 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5$	$2,60 \times 10^5$	$4,58 \times 10^4$
10	$5,60 \times 10^4$	$9,20 \times 10^4$	$6,90 \times 10^4$	$7,23 \times 10^4$	$1,82 \times 10^4$	$8,80 \times 10^5$	$1,20 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	$1,19 \times 10^6$	$3,10 \times 10^5$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $1,22 \times 10^0$

Concentração inicial: $9,00 \times 10^5$

OZÔNIO - 2 minutos						ÁGUA - 2 minutos				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$1,30 \times 10^2$	$1,70 \times 10^2$	$3,00 \times 10^2$	$2,00 \times 10^2$	$8,89 \times 10^1$	$8,50 \times 10^3$	$7,90 \times 10^3$	$5,40 \times 10^3$	$7,27 \times 10^3$	$7,061,64$
1	$1,40 \times 10^2$	$1,50 \times 10^2$	$3,20 \times 10^2$	$2,03 \times 10^2$	$1,01 \times 10^2$	$1,00 \times 10^4$	$8,50 \times 10^3$	$8,30 \times 10^3$	$8,93 \times 10^3$	$9,29 \times 10^3$
2	$1,80 \times 10^2$	$2,20 \times 10^2$	$3,50 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$	$8,89 \times 10^1$	$3,60 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$1,80 \times 10^4$	$2,30 \times 10^4$	$1,14 \times 10^4$
4	$3,10 \times 10^2$	$3,10 \times 10^2$	$4,30 \times 10^2$	$3,50 \times 10^2$	$6,93 \times 10^1$	$6,30 \times 10^4$	$4,30 \times 10^4$	$3,90 \times 10^4$	$4,83 \times 10^4$	$1,29 \times 10^4$
6	$4,00 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$	$4,70 \times 10^2$	$3,73 \times 10^2$	$1,12 \times 10^2$	$9,80 \times 10^4$	$7,00 \times 10^4$	$8,50 \times 10^4$	$8,43 \times 10^4$	$1,40 \times 10^4$
8	$5,40 \times 10^2$	$4,90 \times 10^2$	$5,10 \times 10^2$	$5,13 \times 10^2$	$2,72 \times 10^1$	$3,60 \times 10^5$	$3,50 \times 10^5$	$5,20 \times 10^5$	$4,10 \times 10^5$	$9,54 \times 10^4$
10	$5,50 \times 10^2$	$5,20 \times 10^2$	$6,00 \times 10^2$	$5,57 \times 10^2$	$4,04 \times 10^1$	$1,00 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$1,17 \times 10^6$	$2,89 \times 10^6$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $3,32 \times 10^0$

Concentração inicial: $2,10 \times 10^4$

OZÔNIO - 3 minutos						ÁGUA - 3 minutos				
Dias	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média	DP
0	$1,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^1$	$1,33 \times 10^1$	$5,77 \times 10^0$	$1,80 \times 10^4$	$5,60 \times 10^3$	$4,90 \times 10^3$	$9,50 \times 10^3$	$7,37 \times 10^3$
1	$3,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$2,67 \times 10^1$	$5,77 \times 10^0$	$2,10 \times 10^4$	$6,90 \times 10^3$	$7,20 \times 10^3$	$1,17 \times 10^4$	$8,06 \times 10^3$
2	$6,00 \times 10^1$	$4,00 \times 10^1$	$7,00 \times 10^1$	$5,67 \times 10^1$	$1,53 \times 10^1$	$3,80 \times 10^4$	$9,50 \times 10^3$	$8,70 \times 10^3$	$1,87 \times 10^4$	$1,67 \times 10^4$
4	$1,20 \times 10^2$	$8,00 \times 10^1$	$9,00 \times 10^1$	$9,67 \times 10^1$	$2,08 \times 10^1$	$7,80 \times 10^4$	$3,30 \times 10^4$	$4,10 \times 10^4$	$5,07 \times 10^4$	$2,40 \times 10^4$
6	$1,40 \times 10^2$	$1,20 \times 10^2$	$1,00 \times 10^2$	$1,20 \times 10^2$	$2,00 \times 10^1$	$1,50 \times 10^5$	$6,80 \times 10^4$	$7,10 \times 10^4$	$9,63 \times 10^4$	$4,65 \times 10^4$
8	$2,30 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$	$1,90 \times 10^2$	$2,23 \times 10^2$	$3,06 \times 10^1$	$7,40 \times 10^5$	$8,00 \times 10^5$	$8,10 \times 10^5$	$7,83 \times 10^5$	$3,79 \times 10^4$
10	$3,50 \times 10^2$	$4,00 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$	$3,33 \times 10^2$	$7,64 \times 10^1$	$2,20 \times 10^6$	$3,90 \times 10^6$	$4,20 \times 10^6$	$3,43 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6$

Redução do microrganismo em relação às amostras enxaguadas com água no décimo dia: $4,01 \times 10^0$