

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS SÃO PAULO**

CARLA MARIA ZORDAN GERALDO DE MORAES

**EFEITO ANTIBACTERIANO DA ÁGUA OZONIZADA SOBRE
AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR
ALIMENTOS**

**ANTIBACTERIAL EFFECT OF OZONIZED WATER ON ETIOLOGICAL
AGENTS OF FOOD-BORNE DISEASES**

**SÃO PAULO – SP
2024**

CARLA MARIA ZORDAN GERALDO DE MORAES

**EFEITO ANTIBACTERIANO DA ÁGUA OZONIZADA SOBRE
AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR
ALIMENTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutora em Engenharia Biomédica.

Prof(a). Dr(a). Dora Inés Kozusny-Andreani
Orientador(a)

Prof(a). Dr(a). Carla Roberta Tim
Coorientador(a)

SÃO PAULO –SP
2024

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).**

M819e MORAES, Carla Maria Zordan Geraldo de.

Efeito antibacteriano da água ozonizada sobre agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos / Carla Maria Zordan Geraldo de Moraes -- São Paulo: Universidade Brasil, 2024.

68 f. il. color.

Tese de doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Dra. Dora Inés Kozusny-Andreani.

Coorientação: Profa. Dra. Carla Roberta Tim.

1. Escherichia coli O157:H7. 2. Salmonella Enterica. 3. Tomates. 4. Contaminação. 5. Ozônio. I. Kozusny-Andreani, Dora Inés. II. Tim, Carla Roberta. III. Título.

CDD 620.82



UNIVERSIDADE
BRASIL

TERMO DE APROVAÇÃO

CARLA MARIA ZORDAN GERALDO DE MORAES

"EFEITO ANTIBACTERIANO DA ÁGUA OZONIZADA SOBRE AGENTES ETIOLÓGICOS DE
DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS."

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Dora Inês Kozuany Androsini

Prof.(a) Dr.(a) Dora Inês Kozuany Androsini (Presidente-Orientador)

Prof.(a). Dr(a). Rosimeire da Silva (Membro Interno)

Prof.(a) Dr.(a) Ricardo Scarpa Navarro (Membro Interno)

Prof.(a) Dr.(a) Marília Flávia Pereira Di-Talno (Membro Externo)

Prof.(a) Dr.(a) Patrícia de Carvalho Damy Benedetti (Membro Externo)

Campus Itaquera
Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030
WhatsApp: (11) 4858-6272
www.ub.edu.br

**FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA
UNIVERSIDADE BRASIL E CATÁLOGO DE TESES E DISSERTAÇÕES DA
CAPES E REPRODUÇÃO DO TRABALHO**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ter me dado força pelas provas que tenho passado, pois assim me fez acreditar que tudo seria possível para alcançar os meus objetivos necessários e por sempre estar presente em minha vida material e principalmente espiritual.

A meu esposo Fernando Moraes, pela paciência, incentivo, esperança, meu querido companheiro, amigo, sempre me ajudando a conseguir a conquistar os meus objetivos sem medir esforços, amo você.

Aos meus filhos Joaquim Fernando e Maria Luíza Moraes, razão maior de todos os meus esforços e conquistas.

Aos meus pais, Carlos e Ivane Geraldo (*in memoriam*), pela minha existência e perseverança na minha formação pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Dora Inês Kozusny-Andreani que me orientou com destreza e muita paciência, dedicação, carinho, apoio e firmeza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, porque sei que Ele está à frente de cada vitória conquistada. Por ter me fornecido o suporte para superar os obstáculos ao longo desta caminhada, me dando sempre o necessário para realização dos meus sonhos.

Ao meu esposo Fernando Moraes e meus filhos, Joaquim Fernando e Maria Luíza Moraes por todo amor, compreensão e companheirismo emanados durante toda a minha caminhada.

Aos meus pais, Carlos e Ivane Geraldo (*in memoriam*), por estarem presentes em todos os momentos, por todo amor e dedicação, exemplos de vida, me ensinando que a educação é o maior bem que posso ter, sempre segurando em minhas mãos nos momentos de alegrias e dificuldades, acreditando sempre...

Aos meus irmãos, Cíntia e Carlos César Geraldo, que mesmo longe, sempre me apoiaram e acreditaram nos meus sonhos.

A todos os meus familiares, pelo carinho, presença e apoio, por entenderem a minha ausência, quando necessário.

À minha orientadora, Profa. Dra. Dora Inês Kozusny-Andreani por sua dedicação, paciência, carinho, apoio científico e confiança, mesmo nos momentos de tormenta, sempre acreditando no meu potencial e incentivando minhas ideias, meus sinceros agradecimentos.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Carla Roberta Tim por sua dedicação, paciência, carinho, apoio científico meus sinceros agradecimentos.

A todos que, direta ou indiretamente, me incentivaram, me auxiliando nos momentos difíceis desta caminhada.

Muito obrigada a todos por possibilitarem essa experiência enriquecedora e gratificante, de grande importância para meu crescimento pessoal e profissional.

EPÍGRAFE

*Escolha um trabalho que você ame e
não terá de trabalhar um único dia em sua vida.*

Confúcio

*O que sabemos é uma gota.
O que ignoramos é um oceano.*

Isaac Newton

EFEITO ANTIBACTERIANO DA ÁGUA OZONIZADA SOBRE AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

RESUMO

Os vegetais frescos têm sido frequentemente identificados como fonte de patógenos bacterianos que podem causar doenças transmitidas por alimentos. Os patógenos microbianos podem aderir e formar biofilmes nas superfícies das frutas cruas e de hortaliças folhosas e podem ser difíceis de remover. Diferentes sanitizantes químicos são empregados para higienização de alimentos, no entanto o ozônio, devido ao seu poder oxidativo, tem amplo efeito antibacteriano em uma variedade de espécies, incluindo esporos, células vegetativas e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O ozônio é uma ferramenta importante na sanitização de vegetais e desempenha um papel relevante na melhoria da qualidade alimentar e da segurança microbiana, pois o controle da deterioração e microrganismos patogênicos é fundamental em toda a cadeia de produção de cultivo, processamento, distribuição e consumo. Objetivou-se nesta pesquisa avaliar a eficácia da água ozonizada na inativação de *Salmonella* Enterica sorovar *Typhimurium* (TTC 14028) e *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888) em tomates da variedade Sweet grape. Para realização dos experimentos a viabilidade bacteriana em suspensão e em tomates inoculados, o inóculo foi preparado em caldo trépticasina de soja, e incubado a 37 °C por 24 horas e ajustado para 10^6 UFC mL⁻¹. Os tomates foram inoculados colocando 10 unidades em recipiente de vidro autoclavado contendo 500mL do inóculo de cada bactéria e agitados suavemente por 10 min, e depositados em cabine de biossegurança por 12 horas para facilitar a fixação bacteriana, posteriormente foram retirados e secos ao ar por 10 min, em cabine de biosegurança. A ozonização da água foi produzido por um gerador de ozônio comercial operando com efeito corona e alimentado por oxigênio puro (1,0 L minuto⁻¹). A concentração do gás limitada pelo equipamento, calibrado teve uma vazão de O₃ de 17mg. L⁻¹. As suspensões bacterianas e os tomates inoculados foram expostos ao O₃ diretamente pelo borbulhamento permanente em uma temperatura do ambiente controlada de 20°C. Amostras de 0,1 mL foram coletadas em diferentes períodos de tempo (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 minutos), e inoculadas em ágar eosina azul de metileno e ágar xilose lisina desoxicolato, incubadas a 37°C por 24-48 horas quando as colônias foram contadas. Para análise dos dados foi utilizada estatística descritiva das contagens microbianas. Foi aplicado o Teste de Análise de Variância (ANOVA) com teste de comparação múltipla de Tukey para verificar possíveis diferenças significativas entre as contagens microbianas ao longo do tempo de exposição dos tomates à água ozonizada. Foi observada inativação de *Salmonella* enterica sorovar *Typhimurium* (ATCC 14028) e de *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888) em suspensão em 90 minutos e 120 minutos, respectivamente. *E. coli* foi mais resistente à ação da água ozonizada, pois sua contagem microbiana foi nula a 15 minutos de exposição dos tomates inoculados. Enquanto que os tomates contaminados com *S. typhimurium* precisaram somente de 10 minutos em exposição à água ozonizada para serem considerados livres de contaminação. A aplicação de ozônio aquoso na modalidade dinâmica apresentou efeitos antimicrobianos na taxa de inativação das células bacterianas em suspensão e ligadas (biofilme) à superfície dos tomates.

Palavras-chave: *Escherichia coli* O157:H7; *Salmonella* Enterica; tomates; contaminação; ozônio.

ANTIBACTERIAL EFFECT OF OZONIZED WATER ON ETIOLOGICAL AGENTS OF FOOD-BORNE DISEASES

SUMMARY

Fresh vegetables have been frequently identified as a source of bacterial pathogens that can cause foodborne illnesses. Microbial pathogens can adhere and form biofilms on the surfaces of raw fruits and leafy vegetables and can be difficult to remove. Different chemical sanitizers are used for food sanitization, however ozone, due to its oxidative power, has a broad antibacterial effect on a variety of species, including spores, vegetative cells and Gram-positive and Gram-negative bacteria. Ozone is an important tool in vegetable sanitization and plays a relevant role in improving food quality and microbial safety, since the control of spoilage and pathogenic microorganisms is essential throughout the production chain of cultivation, processing, distribution and consumption. The aim of this study was to evaluate the efficacy of ozonated water in the inactivation of *Salmonella Enterica* serovar Typhimurium (TTC 14028) and *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888) in Sweet Grape tomatoes. To perform the experiments on bacterial viability in suspension and in inoculated tomatoes, the inoculum was prepared in tryptic soybean broth and incubated at 37 °C for 24 hours and adjusted to 10^6 CFU mL⁻¹. The tomatoes were inoculated by placing 10 units in an autoclaved glass container containing 500 mL of the inoculum of each bacteria and gently shaken for 10 min, and deposited in a biosafety cabinet for 12 hours to facilitate bacterial fixation, subsequently they were removed and air-dried for 10 min in a biosafety cabinet. The ozonation of the water was produced by a commercial ozone generator operating with corona effect and fed by pure oxygen (1.0 L minute⁻¹). The gas concentration limited by the calibrated equipment had an O₃ flow rate of 17 mg. L⁻¹. The bacterial suspensions and the inoculated tomatoes were exposed to O₃ directly by permanent bubbling at a controlled room temperature of 20°C. Samples of 0.1 mL were collected at different time periods (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 minutes), and inoculated on eosin methylene blue agar and xylose lysine deoxycholate agar, incubated at 37°C for 24-48 hours when the colonies were counted. Descriptive statistics of the microbial counts were used for data analysis. The Analysis of Variance (ANOVA) test with Tukey's multiple comparison test was applied to verify possible significant differences between the microbial counts over the time of exposure of the tomatoes to ozonated water. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028) and *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888) in suspension was observed in 90 minutes and 120 minutes, respectively. *E. coli* was more resistant to the action of ozonated water, since its microbial count was zero 15 minutes after exposure of the inoculated tomatoes. Meanwhile, tomatoes contaminated with *S. typhimurium* needed only 10 minutes of exposure to ozonated water to be considered free of contamination. The application of aqueous ozone in the dynamic mode showed antimicrobial effects on the inactivation rate of bacterial cells in suspension and attached (biofilm) to the surface of the tomatoes.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7; *Salmonella* Enterica; tomatoes; Contamination; ozone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Configuração do sistema utilizado para realizar a ozonização dos tomates inoculados.....	40
Figura 2 – Comportamento da carga microbiana em relação ao tempo de exposição à água ozonizada.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Média±desvio padrão (Mediana) da contagem microbiana do <i>Salmonella</i> Enterica sorovar <i>Typhimurium</i> (ATCC 14028) e <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (ATCC 43888) submetidas à água ozonizada e sem ozonizar em diferentes tempos mim de exposição.....	47
Tabela 2- Média±desvio padrão (Mediana) das contagens microbianas dos tomates de acordo com o tempo de exposição em água ozonizada.....	48
Tabela 3- Média±desvio padrão (Mediana) da variação percentual (%) da contagem microbiana para ambos os microrganismos avaliados.....	50
Tabela 4- O pH de frutos de tomates tratados e não tratados com água ozonizada.....	51
Tabela 5- Avaliação da firmeza e da presença de lesões em frutos de tomates tratados e não tratados com água ozonizada.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPA	Boas Práticas Agrícolas
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
<i>E. col</i>	<i>Escherichia col</i>
<i>S.e</i>	<i>Salmonella</i> Enterica
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 ALIMENTOS VULNERÁVEIS À CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA	21
3.2 A IMPORTÂNCIA DA SANITIZAÇÃO DE ALIMENTOS.....	22
3.3 O USO DE ÁGUA OZONIZADA E DO GÁS OZÔNIO NA SANITIZAÇÃO DE ALIMENTOS.....	24
3.4 SANITIZAÇÃO DE ALIMENTOS COM OZÔNIO EM GERAL E COM TOMATE PARTICULAR.....	26
3.5 <i>Escherichia coli</i> , UM CASO EM PARTICULAR.....	28
3.6 <i>SALMONELLA</i> E A SALMONELOSE.	31
3.6.1 Prevalência e Impacto da Salmonella e E. coli	33
3.6.2 Mecanismos de Infecção	35
3.6.3 Estratégias de controle	36
3.6.4 Desafios e Perspectivas Futuras	37
4 MATERIAL E MÉTODO	39
4.1 INATIVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> E <i>SALMONELLA</i>	39
4.1.1 Cepas bacterianas e meios de cultura.....	39
4.1.2 Geração de ozônio.....	39
4.1.3 Viabilidade Bacteriana.....	40
4.2 EFEITO DA ÁGUA OZONIZADA NA SANITIZAÇÃO DE TOMATES CONTAMINADOS EXPERIMENTALMENTE COM <i>ESCHERICHIA COLI</i> e <i>SALMONELLA</i> ENTÉRICA.....	41
4.2.1 Preparação de Suspensão Bacteriana.....	41
4.2.2 Variedade e preparação de tomates para inoculação.....	41
4.2.3 Preparação de microrganismos para inoculação de tomates.....	41
4.2.4 Inoculação dos tomates e ozonização.....	41
4.3 EFEITO DA ÁGUA OZONIZADA NAS CARACTERÍSTICAS DE TOMATES CONTAMINADOS EXPERIMENTALMENTE COM <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7 e <i>SALMONELLA</i> ENTERICA.....	44

4.3.1 Determinação do pH de tomates.....	44
4.3.2 Teste da vida útil de frutos de tomate.....	44
4.3.3 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS	45
5.1 INATIVAÇÃO <i>IN VITRO</i> de <i>ESCHERICHIA COLI</i> e <i>SALMONELLA</i> ENTÉRICA.....	45
5.2 EFEITO DA ÁGUA OZONIZADA NA SANITIZAÇÃO DE TOMATES CONTAMINADOS EXPERIMENTALMENTE COM <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> enterica	48
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE A – Título do apêndice A.....	59

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos é uma preocupação central para a saúde pública, uma vez que alimentos contaminados são veículos de diversos patógenos que podem causar surtos de doenças, impactando significativamente a saúde da população (WIEDMAN et al., 2015; FAOUR-KLINGBEIL et al., 2016; MSIMANGO et al., 2023). A qualidade microbiológica dos alimentos é, portanto, um aspecto crucial a ser controlado para garantir a segurança do alimento para o consumo. No Brasil, assim como em outros países, a vigilância sanitária desempenha um papel fundamental na prevenção de contaminações, através da aplicação rigorosa de legislações específicas e da promoção de práticas seguras na cadeia de produção e distribuição de alimentos (CDC, 2020; ANVISA 2022). Assim, ressalta-se a importância de compreender e abordar os diversos fatores que influenciam a contaminação alimentar, desde a produção até o consumo final.

Nesse sentido, a segurança microbiológica de alimentos é um pilar muito importante para a proteção da saúde pública, uma vez que a presença de microrganismos patogênicos em alimentos pode causar surtos de doenças graves. As medidas de controle, portanto, são projetadas para prevenir a contaminação e garantir que os alimentos sejam seguros para o consumo. No Brasil, a legislação que regulamenta a segurança microbiológica dos alimentos é bastante robusta, com normas específicas que estabelecem os limites aceitáveis para diferentes tipos de microrganismos. Essas regulamentações são formuladas com base em uma ampla gama de estudos científicos e são continuamente atualizadas para incorporar novos conhecimentos e tecnologias (SCHREINER, 2020).

Nesse contexto, a regulamentação de segurança alimentar é fundamental para garantir a integridade de toda a cadeia de produção, desde a colheita até a distribuição. Internacionalmente, as normas de segurança microbiológica estabelecem parâmetros rigorosos para o controle de microrganismos patogênicos em alimentos. As regulamentações globais são essenciais para prevenir a presença de microrganismos perigosos como *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* frequentemente associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos. (SIQUEIRA, 2022). Essas normas exigem que os alimentos

cumpram critérios específicos para garantir a segurança do consumidor, destacando a importância de monitorar e controlar a contaminação microbiológica ao longo de toda a cadeia de produção (WHO, 2022).

O cumprimento dessas normas, no entanto, vai além da simples adesão aos padrões estabelecidos. Ele requer uma compreensão detalhada dos riscos microbiológicos específicos de cada tipo de alimento. Os alimentos de origem vegetal, como frutas e hortaliças, são mais suscetíveis à contaminação por microrganismos presentes no solo, na água de irrigação ou durante o manuseio pós-colheita (ITURRIAGA et al., 2007; HINTZ et al., 2010; ZHOU et al., 2014).

A contaminação pode ocorrer diretamente, pela irrigação com água contaminada por dejetos humanos ou animais, ou indiretamente, durante o transporte, armazenamento ou manipulação dos alimentos em condições inadequadas. *Salmonella*, por exemplo, pode sobreviver em superfícies como plástico, madeira e aço inoxidável por dias ou até semanas, dependendo das condições de umidade e temperatura (YARON; ROMLING, 2014). Além disso, a *Escherichia coli* pode persistir no solo por até 90 dias, representando um risco contínuo de contaminação durante o cultivo (WIEDEMAN et al., 2015). Portanto, as práticas sanitárias precisam ser adaptadas para cada situação específica, considerando fatores como a natureza do alimento, o ambiente de produção e as condições de armazenamento (OLAIMAT; HOLLEY, 2012).

Além disso, a aplicação eficaz das regulamentações exige a implementação de boas práticas de fabricação (BPF) e programas de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC). Essas abordagens ajudam a identificar os pontos mais vulneráveis da cadeia de produção, onde a contaminação microbiológica pode ocorrer, e a implementar medidas preventivas adequadas (AWUCHI, 2023). A utilização de tecnologias avançadas de sanitização, como a ozonização, pode complementar essas práticas, proporcionando uma camada adicional de proteção contra microrganismos patogênicos (CHANG et al., 2022).

Os alimentos de origem vegetal são particularmente suscetíveis à contaminação microbiológica devido à sua exposição constante a fatores ambientais, como solo, água e práticas de manuseio durante e após a colheita. Estes fatores criam um ambiente propício para a introdução e proliferação de microrganismos patogênicos, incluindo *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*

Listeria monocytogenes, entre outros. Esses microrganismos podem estar presentes de forma natural no ambiente, sendo transportados para os alimentos através de práticas inadequadas de cultivo, irrigação com água contaminada, fertilizantes orgânicos mal compostados e manuseio inadequado durante a colheita e processamento (GUO et al., 2017; HANNING, et al. 2009; KUMAR, MRITUNJAY, 2015; BALALI et al., 2020). Assim, novas estratégias para conservar tais hortaliças como o tomate, que é uma hortaliça amplamente consumida e sustentável à contaminação microbiológica, devido à sua superfície irregular e de alta umidade, é um dos exemplos do produto que se beneficia com o uso de novas estratégias para garantir a segurança e o frescor desses alimentos.

A remoção de patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes das superfícies de produtos frescos tem se mostrado difícil. A aderência superficial das bactérias pode servir para aumentar a sobrevivência das bactérias durante o processo de lavagem ou higienização (RAJWAR et al., 2016). Por esta razão, diferentes técnicas de desinfecção, inativação ou destruição de microrganismos são implementadas para melhorar o prazo de validade das frutas e hortaliças, que podem causar doenças de origem alimentar ou alterações indesejáveis nos alimentos (MENDOZA et al., 2022). O método convencional e amplamente utilizado para descontaminar alimentos de origem vegetal é a aplicação de desinfetantes químicos. Esses desinfetantes são usados para lavagem de frutas e hortaliças para reduzir o risco de contaminação microbiana. Contudo, é necessário compreender que diversos fatores, como concentração, tempo de contato, temperatura, carga orgânica, pH, tipo e carga de microrganismos afetam a eficácia antimicrobiana de desinfetantes. Os compostos químicos utilizados na indústria alimentícia são desinfetantes oxidativos e não oxidantes (VIVEK et al., 2019). Os desinfetantes podem ser oxidantes, como os compostos de cloro e ácido peroxiacético (ZAMUNER et al., 2020; SINGH et al., 2018), e os desinfetantes não oxidantes mais representativos são os compostos de quaternários de Amônio (KWÁSNIIEWSKA et al., 2020).

Por sua vez, o tomate uma das hortaliças mais consumidas mundialmente também faz parte da dieta brasileira, muito apreciado pelas suas atraentes qualidades sensoriais, destaca-se pelo seu sabor, aroma, textura, brilho, tamanho e ausência de defeitos e podridões. Possui excelente fonte de

vitaminas, sais minerais, carboidratos, fibras e substâncias antioxidantes, além de compostos que previnem o câncer. O Brasil passou a ocupar lugar de destaque entre os maiores produtores globais de tomate, devido a participação ativa de grandes indústrias e impulsionado pela exigência de padrões de qualidade elevados (EMBRAPA, 2022; CONAB, 2024).

Assim, novas estratégias para conservar tais hortaliças como o tomate, incluem técnicas avançadas e componentes utilizados em procedimentos de desinfecção. Por exemplo, recentemente métodos de desinfecção desenvolvidos têm recebido atenção em vários estudos de contaminações comuns devido à seu impacto mínimo na saúde e no meio ambiente. Esses métodos propõem uma abordagem mais sustentável para este problema e estão divididos em métodos de tratamento com calor e sem calor. Os métodos de tratamento não térmico são: ozônio (SHEZI et al., 2020), água eletrolisada (WU et al., 2018), tecnologia de plasma frio (LAROQUE, 2022), alta pressão hidrostática (BALASUBRAMANIAM et al., 2015), ultravioleta (GUO et al., 2017), ultrassom (BHILWADIKAR et al., 2019) e surfactantes microbianos (GUTIÉRREZ-CHÁVEZ et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

- Avaliar a eficácia da água ozonizada na inativação de *Salmonella* Enterica sorovar *Typhimurium* (TTC 14028) e *Escherichia coli* O157:H7 em tomates da variedade Sweet grape.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 - Avaliar a atividade antibacteriana da água ozonizada sobre *Salmonella* Enterica sorovar *Typhimurium* (TTC 14028) e *Escherichia coli* O157:H7 em suspensão (planctônica).

2.2.2 - Avaliar a eficácia da água ozonizada na sanitização de tomates da variedade Sweet grape.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ALIMENTOS VULNERÁVEIS À CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A contaminação microbiológica de alimentos de origem vegetal representa um risco significativo para a saúde pública, uma vez que muitos desses alimentos são consumidos crus ou minimamente processados. *Escherichia coli* O157:H7, é uma cepa de particular preocupação devido à sua capacidade de causar infecções graves, incluindo a síndrome hemolítico-urêmica, que pode ser fatal. *Salmonella*, por sua vez, é um dos principais agentes causadores de surtos de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, estando frequentemente associada a produtos como água de irrigação e esterco utilizados para irrigar e adubar as plantações como alface, espinafre e brotos de vegetais (BOPP et al., 2003; CHANG; FANG, 2007, CHANG, 2022).

Para mitigar esses riscos, é essencial a implementação de boas práticas agrícolas (BPA), que incluem o uso de água de irrigação de qualidade adequada, a gestão correta de fertilizantes e a higienização adequada dos equipamentos de colheita. A pós-colheita também exige atenção especial, com práticas que minimizem a manipulação excessiva dos produtos e garantam condições adequadas de armazenamento. A manutenção de um sistema de refrigeração pode reduzir a proliferação de microrganismos durante o transporte e armazenamento de vegetais frescos (HITCHINS et al., 2016; STEARNS et al., 2023).

Além das boas práticas agrícolas, o controle microbiológico de alimentos de origem vegetal requer uma vigilância constante e uma análise rigorosa em todas as etapas da cadeia produtiva. O sistema APPCC continua a ser uma ferramenta fundamental para identificar e gerenciar possíveis pontos de contaminação. Conforme descrito por Awuchi (2023) em "*HACCP, quality, and food safety management in food and agricultural systems*", o APPCC tem se mostrado altamente eficaz na redução de patógenos em alimentos. No entanto, os autores enfatizam que "*sua aplicação deve ser rigorosamente adaptada às especificidades de cada tipo de alimento e ao ambiente de produção*" para garantir a máxima eficácia na segurança do alimento (AWUCHI, 2023).

Estudos sobre a microbiota de alimentos de origem vegetal são cruciais para o entendimento dos padrões de contaminação e para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes. Essas pesquisas ajudam a identificar quais microrganismos estão mais presentes em certos tipos de alimentos e como eles interagem com os diferentes ambientes de produção (ALLENDE et al., 2008, GIAOURIS et al.; 2018). A compreensão da ecologia microbiana de alimentos como folhas verdes pode levar ao desenvolvimento de novos métodos de sanitização que são mais eficazes contra os patógenos comumente encontrados nesses produtos (GUTIÉRREZ-CHAVEZ. et al., 2021).

Portanto, garantir a segurança microbiológica de alimentos de origem vegetal não apenas protege a saúde dos consumidores, mas também assegura a sustentabilidade e a qualidade da produção agrícola. A integração de boas práticas agrícolas, vigilância rigorosa e inovação tecnológica são essenciais para mitigar os riscos associados à contaminação microbiológica desses alimentos (ALEGBELEYE, et al., 2018; MARTINELLI et al., 2017).

3.2 A IMPORTÂNCIA DA SANITIZAÇÃO DE ALIMENTOS

A sanitização de alimentos é uma etapa crucial no controle de patógenos e na prevenção de surtos de doenças alimentares, representando uma das principais medidas para garantir a segurança do consumidor. Este processo é fundamental para reduzir a carga microbiana em alimentos, o que não apenas contribui para a segurança microbiológica, mas também prolonga a vida útil dos produtos, preservando suas qualidades sensoriais e nutricionais. De acordo com Vasiliev et al. (2021), *"a sanitização eficaz é vital para eliminar ou inativar microrganismos patogênicos presentes em alimentos, evitando assim a transmissão de doenças e a deterioração do produto"*. A adoção de métodos apropriados de sanitização é, portanto, essencial para proteger a saúde pública e assegurar a qualidade dos alimentos consumidos.

Diversas tecnologias e métodos de sanitização são aplicados na indústria alimentícia, com variações significativas dependendo do tipo de alimento e do risco microbiológico identificado. A lavagem com água clorada é um dos métodos mais comuns e tradicionais, amplamente utilizada por sua eficácia em reduzir a

contaminação microbiana superficial, especialmente em vegetais frescos. Contudo, este método apresenta limitações, como a necessidade de controle rigoroso da concentração de cloro e o potencial de formação de subprodutos tóxicos, como os trihalometanos. Segundo Oliveira et al. (2020), *"a lavagem com cloro é eficaz, mas sua eficácia pode ser comprometida se não for cuidadosamente controlada, e ainda existem preocupações com a formação de compostos potencialmente perigosos"*. Dessa maneira, é fundamental considerar alternativas e tecnologias complementares para garantir a segurança dos alimentos (OLIVEIRA et al. 2020).

Diante dessas limitações, tecnologias emergentes têm sido desenvolvidas e adotadas na indústria para melhorar a eficácia da sanitização, minimizando os impactos negativos sobre os alimentos e o meio ambiente. O uso do ozônio, tanto na forma de gás quanto dissolvido em água, tem se destacado como uma alternativa promissora. O ozônio é um agente oxidante poderoso, capaz de inativar uma ampla gama de microrganismos patogênicos de forma rápida e eficiente, sem deixar resíduos químicos nos alimentos. Segundo Bialka e Demirci (2018): *"o ozônio é altamente eficaz na inativação de microrganismos em alimentos frescos e é considerado seguro e ambientalmente correto, pois se decompõe rapidamente em oxigênio"*. Essa característica torna o ozônio uma opção viável para a sanitização na indústria alimentícia (BIALKA e DEMIRCI, 2018).

Apesar das vantagens associadas ao uso do ozônio, sua aplicação também exige cuidados específicos, como o controle das concentrações utilizadas e o tempo de exposição, para evitar danos ao alimento e garantir a segurança dos operadores. Além disso, *"a aplicação do ozônio enfrenta desafios relacionados à regulamentação e à aceitação por parte da indústria e dos consumidores"*, conforme destacado por Farkas e Pinter (2021). Esses aspectos são cruciais para garantir que os benefícios do ozônio sejam plenamente aproveitados, sem comprometer a segurança dos alimentos (FARKAS e PINTER (2021).

A escolha do método de sanitização mais adequado deve considerar as características específicas do alimento, o tipo e nível de contaminação microbiana, e as condições de processamento e armazenamento. Por exemplo, alimentos frescos e minimamente processados, como frutas e vegetais, requerem métodos que preservem sua qualidade sensorial e nutritiva, ao mesmo

tempo em que garantam a eliminação eficaz dos patógenos. Nesse contexto, a combinação de diferentes tecnologias de sanitização, como o uso sequencial de água clorada e ozônio, pode oferecer uma abordagem mais robusta e eficaz (MARVASI et al.,2014).

Além dos métodos mencionados, outras tecnologias, como a radiação ultravioleta (UV) e os ácidos orgânicos, também têm sido exploradas como alternativas ou complementos aos processos tradicionais de sanitização. *"A radiação UV é uma técnica não térmica que pode inativar microrganismos na superfície dos alimentos, preservando sua qualidade e integridade"*, conforme discutido por O'Donnell et. al. (2017). Essa abordagem oferece uma maneira eficaz de melhorar a segurança alimentar sem comprometer as características sensoriais dos produtos (O'DONNELL et. al. 2017).

Em síntese, a sanitização de alimentos é uma etapa indispensável na produção de alimentos seguros, e a escolha do método mais apropriado deve ser baseada em uma avaliação cuidadosa dos riscos e benefícios. A contínua pesquisa e inovação na área de tecnologias de sanitização são essenciais para enfrentar os desafios emergentes na segurança alimentar e para responder às crescentes demandas por alimentos seguros e de alta qualidade no mercado global.

3.3 O USO DE ÁGUA OZONIZADA E DO GÁS OZÔNIO NA SANITIZAÇÃO DE ALIMENTOS

O uso de água ozonizada e do gás ozônio na sanitização de alimentos tem se tornado uma alternativa promissora e eficaz no controle microbiológico, ganhando destaque tanto na pesquisa científica quanto na aplicação industrial. O ozônio, devido à sua natureza como um dos mais potentes agentes oxidantes disponíveis, é capaz de inativar uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias, vírus e fungos, de maneira rápida e eficiente. Segundo Pereira et. al. (2021), *"o ozônio é altamente eficaz na inativação de microrganismos em alimentos frescos, apresentando uma vantagem significativa sobre outros sanitizantes tradicionais devido à sua capacidade de oxidar rapidamente componentes celulares críticos dos patógenos"* (PEREIRA et. al. 2021).

A aplicação de ozônio em alimentos de origem vegetal, em particular, tem mostrado resultados promissores na redução de patógenos, como *Escherichia coli* e *Salmonella*, contribuindo significativamente para a melhoria da segurança do alimento. Estudos indicam que o tratamento com ozônio pode reduzir a carga microbiana em vegetais frescos sem comprometer a qualidade sensorial dos produtos, como cor, textura e sabor. *"O uso de água ozonizada na sanitização de vegetais é eficaz na redução de patógenos e mantém as propriedades sensoriais dos alimentos, o que é uma grande vantagem em relação a outros métodos"*, afirmam Gonçalves et. al. (2021).

Além de sua eficácia na eliminação de microrganismos, o uso do ozônio como agente sanitizante é amplamente considerado uma tecnologia verde. Isso se deve à natureza não residual do ozônio, que se decompõe rapidamente em oxigênio após sua aplicação, não deixando resíduos químicos prejudiciais nos alimentos ou no meio ambiente. De acordo com Ponce et. al. (2021), *"o ozônio é um sanitizante ambientalmente amigável, pois não gera subprodutos tóxicos e sua decomposição em oxigênio elimina qualquer risco de contaminação química residual"*.

Essa característica torna o ozônio uma opção atraente para indústrias que buscam atender às demandas crescentes por práticas de produção sustentável e pela redução de impactos ambientais negativos. Ao contrário de outros sanitizantes, como o cloro, que pode formar compostos tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente, o ozônio oferece uma solução limpa e eficiente. *"A sanitização com ozônio é uma alternativa sustentável ao uso de cloro, evitando a formação de subprodutos prejudiciais e contribuindo para práticas de segurança alimentar ambientalmente responsáveis"* (BINTSIS et al, 2019).

Apesar das suas vantagens, a aplicação do ozônio na sanitização de alimentos ainda enfrenta desafios práticos, como a necessidade de sistemas de geração de ozônio *in situ* e o controle rigoroso das concentrações e do tempo de exposição para garantir a eficácia sem comprometer a integridade dos alimentos. *"A implementação de sistemas de ozônio requer um entendimento técnico e um controle preciso para maximizar a eficácia enquanto se mantém a qualidade do produto"* (FARKAS e PINTER, 2021).

Por fim, o uso de água ozonizada e gás ozônio na sanitização de alimentos representa uma evolução significativa nas práticas de controle microbiológico, oferecendo uma solução eficaz, segura e sustentável. Com a contínua inovação tecnológica e o aprimoramento das práticas de aplicação, o ozônio tem o potencial de se tornar uma das principais ferramentas na busca por alimentos mais seguros e ambientalmente responsáveis.

3.4 SANITIZAÇÃO DE ALIMENTOS COM OZÔNIO EM GERAL E COM TOMATE EM PARTICULAR

A sanitização de alimentos com ozônio tem ganhado relevância como uma tecnologia avançada e eficiente para garantir a segurança microbiológica de diversos produtos alimentares. O ozônio, devido à sua poderosa ação oxidante, é capaz de eliminar uma ampla gama de microrganismos patogênicos, incluindo bactérias, vírus e fungos. Essa tecnologia se destaca por sua eficácia na redução da carga microbiana sem a necessidade de aditivos químicos residuais, o que a torna uma alternativa atrativa para a indústria alimentícia, especialmente em tempos de crescente demanda por produtos mais seguros e ecologicamente sustentáveis (PONCE et al., 2021).

No caso dos alimentos de origem vegetal, como frutas e legumes, o ozônio tem se mostrado particularmente eficaz. A aplicação de água ozonizada ou gás ozônio durante a sanitização não apenas ajuda a prolongar a vida útil dos produtos, como também mantém suas propriedades sensoriais, como cor e textura, sem comprometer a qualidade. O tomate, uma hortaliça amplamente consumida e suscetível à contaminação microbiológica devido à sua superfície irregular e à alta umidade, é um exemplo de produto que se beneficia do uso de ozônio para garantir sua segurança e frescor (GONÇALVES et al., 2021).

Estudos demonstram que a sanitização de tomates com ozônio pode reduzir significativamente a presença de microrganismos como *Escherichia coli* e *Salmonella*, que são frequentemente associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos. Além disso, a aplicação de ozônio em tomates tem sido eficaz na inativação de fungos que podem causar deterioração precoce, como *Botrytis cinerea*, contribuindo para uma vida de prateleira mais longa e com menos perdas pós-colheita. A eficiência do ozônio no controle de patógenos e

na preservação da qualidade dos tomates é um ponto crucial para produtores e distribuidores que buscam alternativas às práticas tradicionais de sanitização (PEREIRA et al., 2021).

Além de sua eficácia microbiológica, o uso de ozônio na sanitização de tomates também é considerado uma prática sustentável. Diferente de outros métodos que utilizam agentes químicos, o ozônio se decompõe rapidamente em oxigênio após a aplicação, eliminando o risco de resíduos prejudiciais tanto para os consumidores quanto para o meio ambiente. Essa característica faz do ozônio uma tecnologia limpa e alinhada com as crescentes exigências por práticas agrícolas mais ecológicas e menos dependentes de substâncias químicas (PONCE et al., 2021).

Sintetizando, a sanitização de alimentos com ozônio, com um foco específico no tomate, representa uma solução moderna e eficiente para os desafios de segurança alimentar e preservação de qualidade. Com a contínua adoção dessa tecnologia, espera-se que o ozônio se torne uma ferramenta padrão na indústria de alimentos, ajudando a garantir produtos mais seguros, frescos e ambientalmente responsáveis, ao mesmo tempo em que atende às demandas de um mercado cada vez mais exigente por sustentabilidade e segurança (GONÇALVES et al., 2021).

Cada um desses tópicos aborda aspectos cruciais da segurança alimentar e reflete a complexidade de garantir que os alimentos cheguem aos consumidores de forma segura. A integração de conhecimento sobre contaminação, segurança microbiológica, microrganismos específicos e técnicas de sanitização é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes na prevenção de doenças transmitidas por alimentos. Assim, a pesquisa e o desenvolvimento contínuos nesta área são fundamentais para a saúde pública, contribuindo para a redução de surtos de doenças e para a promoção de práticas alimentares mais seguras e sustentáveis (EHUWA et. al., 2021).

Salmonella spp é um patógeno de grande relevância no campo da segurança alimentar, especialmente devido à sua capacidade de causar infecções severas em humanos, como gastroenterite e, em casos mais graves, febre tifoide. A elevada prevalência de *Salmonella* em diversos alimentos, incluindo carnes, ovos, produtos lácteos e vegetais, faz com que esse microrganismo seja um alvo constante de vigilância sanitária e de pesquisas

científicas. Dados recentes indicam que a *Salmonella* é responsável por uma parte significativa das doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, representando uma preocupação contínua para a saúde pública global (FERREIRA et al., 2021).

Nos últimos dez anos, a pesquisa sobre *Salmonella* evoluiu significativamente, com avanços na compreensão dos mecanismos de infecção e sobrevivência desse patógeno. Estudos genômicos têm revelado a complexidade genética das cepas de *Salmonella*, permitindo identificar fatores de virulência específicos que facilitam a colonização e a sobrevivência em diferentes hospedeiros. Além disso, a capacidade da *Salmonella* de formar biofilmes em superfícies inertes, como equipamentos de processamento de alimentos, tem sido um foco importante de estudo, uma vez que esses biofilmes protegem as bactérias contra agentes de sanitização e contribuem para a persistência da contaminação em ambientes industriais (BARROW et al., 2020).

3.5 *ESCHERICHIA COLI*, UM CASO EM PARTICULAR

Entre os microrganismos de maior relevância em segurança do alimento, a *Escherichia coli* aparece particularmente devido à sua forte associação com surtos de doenças transmitidas por alimentos. Embora a maioria das cepas de *E. coli* sejam inofensivas e constituam parte da microbiota normal do intestino humano, algumas variantes patogênicas, como *E. coli* O157:H7, podem resultar em infecções severas, incluindo gastroenterite, infecções urinárias e, em casos mais graves, a síndrome hemolítico-urêmica, que pode levar à insuficiência renal e morte. A patogenidade dessa cepa está relacionada à produção de toxinas Shiga, que podem causar danos significativos à mucosa intestinal e a outros órgãos (ENG et al., 2014).

A presença de *E. coli* em alimentos, especialmente em produtos de origem vegetal, é um indicativo crucial de contaminação fecal, sugerindo falhas graves nas práticas de higiene ao longo da cadeia produtiva. Esta contaminação pode ocorrer em diversas etapas, desde o campo, através do uso de água de irrigação contaminada, até a manipulação inadequada durante a colheita, processamento e distribuição dos alimentos. *E. coli* é, portanto, utilizada como um organismo

indicador nas análises microbiológicas de alimentos para avaliar a eficácia das práticas de sanitização e higiene (TORTORA et al., 2017).

O controle de *E. coli* em alimentos é essencial para garantir a segurança do alimento e proteger a saúde pública. Esse controle envolve uma combinação de medidas preventivas e corretivas, como a implementação rigorosa de boas práticas agrícolas e de fabricação, que incluem a adoção de água potável para irrigação, a sanitização adequada dos equipamentos e superfícies, e a educação continuada dos trabalhadores envolvidos na cadeia produtiva sobre a importância da higiene pessoal e do ambiente. Além disso, a aplicação de tecnologias avançadas, como o uso de métodos de detecção rápidos e sensíveis para *E. coli* em alimentos, tem se mostrado eficaz na prevenção de surtos (BERGAMO et al., 2020).

As autoridades reguladoras, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, têm um papel elementar no estabelecimento de limites rigorosos para a presença de *Escherichia coli* em alimentos, visando minimizar os riscos à saúde pública. Em conformidade com a Resolução RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019, que "*estabelece os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação*", a ANVISA reforça a importância da segurança dos produtos prontos para o consumo, uma medida que sublinha a importância de manter práticas rigorosas de segurança em todas as etapas da cadeia produtiva (BRASIL, 2019). Essa legislação está alinhada com as normas internacionais de segurança alimentar, que visam reduzir a incidência de doenças transmitidas por alimentos, conforme discutido por Jones et al. (2020) em "*Global Standards for Food Safety and the Control of Pathogens*", (BRASIL, 2019; JONES et al.; 2020)

A identificação de *E. coli* em alimentos, além de ser um indicador de contaminação fecal, serve como um alerta para a presença potencial de outros patógenos transmitidos por via fecal-oral, como *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* Portanto, sua detecção desencadeia ações corretivas que vão desde a revisão das práticas de higiene até a implementação de medidas de controle mais rígidas, garantindo que o alimento final esteja seguro para o consumo. Dada a importância de *E. coli* como um patógeno de interesse em segurança do alimento para o consumo, a pesquisa contínua sobre seus mecanismos de sobrevivência e virulência em diferentes matrizes alimentares é fundamental. Isso inclui

estudos sobre a eficácia de novos métodos de sanitização, como o uso de tratamentos térmicos, radiação UV e ozonização, que podem ser aplicados na redução ou eliminação de *E. coli* em alimentos frescos. Em resumo, *Escherichia coli* é um microrganismo de grande relevância no contexto de alimento seguro pra consumo, não apenas como um patógeno potencialmente perigoso, mas também como um indicador-chave de práticas higiênicas na cadeia produtiva. O controle rigoroso de *E. coli* nos alimentos é uma prioridade de saúde pública, demandando uma abordagem integrada que combine prevenção, monitoramento contínuo e aplicação de tecnologias inovadoras para assegurar a qualidade microbiológica dos alimentos consumidos pela população (SILVA et al., 2017).

A principal diferença entre as paredes celulares de *Salmonella* e *E. coli* reside na estrutura que determina sua classificação na coloração de Gram. Ambas são bactérias Gram-negativas, apresentando paredes celulares complexas que se coram de vermelho ou rosa durante o procedimento de coloração de Gram. Essa característica é atribuída à presença de uma fina camada de peptidoglicano situada entre a membrana citoplasmática interna e uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos, conferindo-lhes uma estrutura mais complexa em comparação às bactérias Gram-positivas. As bactérias Gram-positivas, por outro lado, possuem uma parede celular mais espessa, rica em peptidoglicano, e carecem de uma membrana externa. Essa composição permite que retenham o corante cristal violeta durante a coloração de Gram, resultando em uma coloração azul ou violeta. A espessa camada de peptidoglicano, juntamente com ácidos teicoicos presentes na parede celular, contribui para a rigidez e a forma dessas células. A sensibilidade ao ozônio varia entre os diferentes tipos de bactérias. Estudos indicam que bactérias Gram-negativas, como *Salmonella* e *E. coli*, são geralmente mais suscetíveis à ação antimicrobiana do ozônio em comparação às Gram-positivas. Essa maior sensibilidade é atribuída à estrutura de sua parede celular, que possui uma camada de peptidoglicano mais fina, facilitando a penetração e a ação oxidativa do ozônio. Por outro lado, as bactérias Gram-positivas, com sua espessa camada de peptidoglicano, apresentam maior resistência ao ozônio, tornando-as menos suscetíveis à inativação por esse agente oxidante. Em suma, a consideração de métodos de sanitização que utilizam ozônio deve levar em conta as diferenças estruturais

entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, uma vez que essas características influenciam diretamente a eficácia do tratamento antimicrobiano (ANAMMA, 2023).

De acordo com Silva et al. (2011), a redução ou a inativação da população microbiana devido à ozonização depende da concentração de ozônio, do tempo de aplicação e do micro-organismo envolvido. Silva et al. (2011) defendem que as bactérias Gram-negativas possuem maior sensibilidade ao ozônio com relação às Gram-positivas devido à menor quantidade de peptidoglicano da parede celular, sendo o gênero *Staphylococcus* um dos mais 28 resistentes. Por outro lado, Pascual et al. (1997) documentam que as Gram-positivas são mais sensíveis.

3. 6 SALMONELLA E A SALMONELOSE

A ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella spp* pode resultar em salmonelose, uma infecção que frequentemente provoca sintomas gastrointestinais como diarreia, cólicas abdominais e febre. Em casos mais graves, especialmente em populações vulneráveis como crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas, a salmonelose pode progredir para complicações sistêmicas, como septicemia e meningite, que podem ser fatais se não tratadas de forma adequada. De acordo com Eng et. al. (2014) em "*Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance*", a infecção por *Salmonella spp.* pode variar em gravidade, "*desde gastroenterite leve até doenças invasivas mais severas, dependendo tanto da cepa envolvida quanto da susceptibilidade do hospedeiro*" (ENG et. al., 2014).

O controle de *Salmonella spp.* em alimentos exige uma combinação de medidas preventivas rigorosas ao longo de toda a cadeia de produção e consumo. Essas medidas incluem práticas higiênicas estritas, tanto no campo quanto nas unidades de processamento, como a correta lavagem e desinfecção de vegetais e frutas, e a manutenção de condições de armazenamento adequadas para impedir o crescimento bacteriano. A higiene durante o manuseio dos alimentos, incluindo a lavagem frequente das mãos e a limpeza dos utensílios e superfícies de preparação, é fundamental para prevenir a disseminação de *Salmonella*. Ademais, a cocção adequada dos alimentos,

atingindo temperaturas suficientes para eliminar a bactéria, é uma medida crucial na prevenção de infecções. De acordo com a Resolução RDC nº 331 da ANVISA, de 23 de dezembro de 2019, "*a ausência de Salmonella é exigida em todos os alimentos prontos para consumo, e a legislação estabelece limites rigorosos para sua presença em alimentos crus, como carnes e ovos*" (BRASIL, 2019).

A eficácia dessas medidas depende de sua implementação consistente em todas as fases da cadeia produtiva, desde o campo até a mesa do consumidor. A aplicação de programas de APPCC continua sendo uma abordagem amplamente recomendada para identificar e mitigar os riscos de contaminação por *Salmonella*. Segundo Velázquez et al. (2019), "*o sistema APPCC proporciona uma estrutura robusta para monitorar e reduzir os riscos microbiológicos em alimentos, sendo essencial para garantir a segurança dos produtos finais destinados ao consumo.*" No entanto, a eficácia do APPCC depende da aplicação rigorosa e do monitoramento contínuo em cada etapa da produção, processamento e distribuição dos alimentos.

Outrossim, o monitoramento contínuo e a pesquisa sobre novas técnicas de desinfecção e sanitização, como o uso de água ozonizada e radiação UV, são essenciais para melhorar o controle da *Salmonella* em alimentos. Essas tecnologias emergentes oferecem alternativas promissoras para a redução da carga microbiana em produtos frescos, minimizando o risco de contaminação sem comprometer a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos. Portanto, o controle de *Salmonella* deve ser uma prioridade em todos os setores da indústria alimentícia, visando proteger a saúde pública e garantir a segurança dos alimentos consumidos diariamente (GONÇALVES et al., 2021).

Essas descobertas têm impulsionado o desenvolvimento de novas estratégias de controle e prevenção, que vão além dos métodos tradicionais de sanitização. Tecnologias emergentes, como a aplicação de tratamentos térmicos precisos, radiação ultravioleta e o uso de bacteriófagos específicos, têm mostrado promessas na redução da carga microbiana de *Salmonella* em alimentos. Além disso, a integração de programas de gestão de riscos, como o APPCC, com novas ferramentas de monitoramento em tempo real, está sendo explorada para melhorar a eficácia das medidas de controle e reduzir o impacto da *Salmonella* na cadeia de produção de alimentos. Esses avanços sublinham a

importância contínua da pesquisa e da inovação tecnológica na luta contra esse patógeno.

3.6.1 Prevalência e Impacto da *Salmonella* e *E. coli*

Estudos recentes reforçam que a *Salmonella* não apenas é prevalente em alimentos de origem animal, como carne bovina, aves, ovos e laticínios, mas também está presente em produtos vegetais frescos, ampliando o escopo de preocupação na segurança do alimento. A presença desse patógeno em alimentos de origem vegetal, como alfaces, tomates e outras hortaliças, muitas vezes resulta da contaminação cruzada com fontes animais, como a água de irrigação contaminada por dejetos de animais ou o uso inadequado de esterco como fertilizante. Essa disseminação ampla e variada da *Salmonella* sublinha a necessidade de intervenções preventivas em todos os níveis da cadeia de produção de alimentos (EHUWA et al., 2021).

A contaminação por *Salmonella* pode ocorrer em várias fases da cadeia produtiva, incluindo o cultivo, a colheita, o processamento, o armazenamento e o transporte dos alimentos. Durante o cultivo, práticas agrícolas inadequadas, como o uso de água contaminada ou a aplicação de fertilizantes orgânicos não tratados, podem introduzir a *Salmonella* nos alimentos. No processamento, a contaminação pode ser exacerbada pelo manuseio inadequado dos alimentos, pela falta de higiene nas instalações e pela insuficiência dos procedimentos de sanitização. Além disso, a falta de controle de temperatura durante o armazenamento e transporte pode permitir o crescimento e a multiplicação de *Salmonella*, aumentando o risco de infecção no consumidor final (GONÇALVES et al., 2021).

A associação entre a incidência de salmonelose em humanos e o consumo de alimentos contaminados é bem documentada, com evidências que apontam para uma correlação direta entre práticas inadequadas de manuseio de alimentos e surtos de doenças. Li et al. (2019) destacam que produtos crus ou mal cozidos representam um risco significativo, uma vez que a *Salmonella* pode sobreviver e causar infecção se os alimentos não forem submetidos a processos de cocção adequados. Além disso, a capacidade da *Salmonella* de sobreviver

no solo por longos períodos amplia o risco de contaminação dos alimentos, especialmente os de origem vegetal. Estudos recentes mostram que a *Salmonella* pode persistir em solos agrícolas por meses, dependendo de fatores como a umidade, a temperatura e a presença de matéria orgânica (EHUWA et al., 2021).

Além da *Salmonella*, a *E. coli* também apresenta uma notável capacidade de sobrevivência no solo e na água contaminada, contribuindo para a contaminação de alimentos de origem vegetal. Estudos indicam que *E. coli*, especialmente cepas patogênicas como *E. coli* O157:H7, pode persistir no solo por até 90 dias, dependendo de condições ambientais como umidade, temperatura e níveis de matéria orgânica. Na água, sua sobrevivência é influenciada pela presença de nutrientes e a ausência de agentes inativadores, podendo manter sua viabilidade em sistemas de irrigação contaminados por fezes humanas ou animais. Assim como a *Salmonella*, a *E. coli* pode ser transferida para frutas, legumes e hortaliças durante o cultivo, a colheita e o transporte, tornando-se uma importante fonte de doenças transmitidas por alimentos quando os produtos são consumidos crus ou mal lavados. Essa dinâmica ressalta a importância de práticas agrícolas seguras, incluindo o tratamento adequado da água de irrigação e a prevenção da contaminação fecal nas áreas de cultivo (WIEDEMANN et al., 2015).

Essa sobrevivência prolongada no solo pode resultar na contaminação de hortaliças e frutas cultivadas em campos onde o solo está exposto a água de irrigação contaminada ou a fertilizantes de origem animal mal tratados. Além disso, práticas inadequadas de compostagem de resíduos animais podem introduzir o patógeno no ambiente agrícola, aumentando ainda mais o risco de contaminação cruzada. Uma vez contaminados, esses alimentos podem carregar a bactéria até o consumidor final, especialmente se não forem lavados ou cozidos adequadamente antes do consumo. Este cenário ressalta a importância de controles mais rigorosos, incluindo a educação dos consumidores sobre a importância do cozimento adequado, bem como a implementação de medidas mais eficazes de controle de qualidade e segurança do alimento em toda a cadeia de produção. Além disso, práticas agrícolas como o tratamento correto da água de irrigação, o uso seguro de fertilizantes e a rotatividade de

culturas em solos contaminados são essenciais para mitigar os riscos associados à sobrevivência prolongada da *Salmonella* no solo (LI et al., 2019).

3.6.2 Mecanismos de Infecção

A compreensão dos mecanismos de infecção da *Salmonella* foi significativamente aprofundada com o avanço dos estudos moleculares, que trouxeram à luz as complexas estratégias adaptativas dessa bactéria. Um dos aspectos mais críticos descobertos é a capacidade da *Salmonella* de formar biofilmes. Além da resistência física proporcionada pelo biofilme, estudos recentes revelaram que as bactérias dentro dos biofilmes exibem uma expressão gênica distinta que as torna mais resilientes aos tratamentos antimicrobianos. Barrow e Methner (2020) mostram que, no ambiente do biofilme, a *Salmonella* pode entrar em um estado de baixa atividade metabólica, o que a torna menos suscetível a agentes sanitizantes que normalmente seriam eficazes contra bactérias em estado livre (planctônicas). Esse comportamento adaptativo permite que a *Salmonella* persista por longos períodos em superfícies de processamento, aumentando o risco de contaminação cruzada e subsequente infecção alimentar (SANTOS et al., 2021; SILVA et al., 2020; SOUZA et al., 2020).

Outro fator importante destacado pelos estudos é a capacidade da *Salmonella* de sobreviver em uma ampla gama de hospedeiros, o que contribui para sua disseminação global. Essa versatilidade é facilitada pela expressão de genes específicos que permitem à bactéria se adaptar a diferentes ambientes e hospedeiros, desde o trato gastrointestinal de animais até superfícies inertes em ambientes de processamento de alimentos. Essa adaptabilidade genética e fenotípica da *Salmonella*, revelada por técnicas de sequenciamento de última geração, sublinha a necessidade de novas abordagens na sanitização e no controle de contaminação, que levem em conta não apenas a eliminação das bactérias em estado livre, mas também a desagregação e remoção eficaz dos biofilmes (SOUZA et al., 2020).

3.6.3 Estratégias de controle

Avanços tecnológicos na detecção e controle da *Salmonella* têm sido foco de inúmeras pesquisas. O uso de tecnologias emergentes, como a sanitização com ozônio e a aplicação de bacteriófagos específicos, têm mostrado eficácia significativa na redução da carga microbiana em alimentos. Segundo Zhang et al. (2021), o tratamento com ozônio não só reduz a presença de *Salmonella* em vegetais frescos, mas também preserva a qualidade sensorial dos alimentos, oferecendo uma alternativa promissora aos métodos tradicionais de sanitização.

Além disso, programas de controle como o APPCC permanecem centrais na gestão dos riscos microbiológicos em alimentos, sendo amplamente reconhecidos por sua eficácia. Esses programas têm sido continuamente aprimorados e adaptados às necessidades modernas da indústria alimentícia, incorporando novas descobertas científicas e tecnologias avançadas. Recentemente, estudos de Montville e Matthews (2017) enfatizaram a necessidade de uma aplicação mais rigorosa e abrangente do APPCC em todas as etapas da cadeia produtiva, desde a produção primária até a distribuição e consumo, para combater eficazmente a contaminação por *Salmonella*.

A integração de tecnologias emergentes tem potencializado a eficácia dos programas APPCC. Técnicas de detecção rápida, como a proteína C reativa em tempo real e a espectrometria de massa, têm sido incorporadas como ferramentas complementares, permitindo a identificação precoce de *Salmonella* em diferentes pontos da cadeia produtiva. Essas tecnologias oferecem uma sensibilidade e especificidade superiores, reduzindo o tempo necessário para a detecção de patógenos e, conseqüentemente, permitindo uma resposta mais rápida e eficaz na prevenção da contaminação. A combinação dessas tecnologias com o APPCC tradicional representa uma evolução significativa na capacidade de monitorar e controlar riscos microbiológicos, conforme destacado por Montville e Matthews (2017).

Ademais, a eficácia do APPCC é ainda mais amplificada quando os programas são personalizados para atender às características específicas de cada etapa da cadeia produtiva. Isso inclui desde o ajuste de parâmetros críticos de controle, como temperaturas e tempos de cozimento, até a adoção de práticas de sanitização avançadas, como o uso de ozônio ou radiação UV em áreas de

alto risco. A personalização dos programas APPCC, aliada à integração de novas tecnologias, não apenas melhora a segurança dos alimentos, mas também contribui para a confiança dos consumidores na qualidade dos produtos, reduzindo a incidência de surtos de salmonelose associados a falhas no controle microbiológico.

3.6.4 Desafios e Perspectivas Futuras

Embora os avanços no controle das doenças transmitidas por alimentos sejam promissores, desafios significativos permanecem, especialmente no que diz respeito à resistência antimicrobiana. Estudos como o de Hur et al. (2019) alertam para o aumento da resistência de cepas de *Salmonella* e *E. coli* a antibióticos comumente usados, o que complica o tratamento de infecções humanas e demanda o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

A pesquisa futura deverá concentrar-se em abordagens integradas que combinem medidas preventivas ao longo da cadeia de produção com tecnologias inovadoras de detecção e controle, visando reduzir de forma significativa a incidência de salmonelose. Essa abordagem integrada requer uma sinergia entre diferentes disciplinas, como microbiologia, ciência de alimentos, e engenharia de processos, para desenvolver soluções que não apenas previnam a contaminação, mas também detectem a presença de *Salmonella* com rapidez e precisão. Tecnologias como a nanotecnologia e a inteligência artificial estão emergindo como ferramentas promissoras para identificar e neutralizar patógenos em tempo real, oferecendo uma nova dimensão de controle na produção de alimentos (VELAZQUEZ et al., 2019).

A colaboração entre setores regulatórios, acadêmicos e industriais será essencial para a implementação dessas soluções eficazes e sustentáveis. Regulamentações mais robustas, fundamentadas em evidências científicas atualizadas, podem guiar a adoção de novas tecnologias e práticas dentro da indústria alimentícia. Além disso, a academia desempenha um papel crucial na condução de pesquisas que explorem novas fronteiras na detecção e controle de doenças transmitidas por alimentos, enquanto a indústria pode fornecer *feedback* prático sobre a aplicabilidade dessas inovações no ambiente real de produção. Essa parceria tripartite não apenas acelera a implementação de novas

práticas, mas também garante que elas sejam viáveis e eficazes na prática, resultando em uma redução substancial nos casos de salmonelose e febre tifoide (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; JONES et al., 2020).

Para alcançar um impacto duradouro, é fundamental que as futuras estratégias de controle de doenças transmitidas por alimentos também considerem a sustentabilidade e a viabilidade econômica. Isso inclui o desenvolvimento de métodos que sejam acessíveis para pequenas e médias empresas, que muitas vezes enfrentam desafios maiores na implementação de tecnologias avançadas. A pesquisa e a inovação devem, portanto, focar em soluções que sejam escaláveis e adaptáveis a diferentes contextos produtivos, garantindo que todas as partes da cadeia de alimentos possam adotar práticas que melhorem e tornem os alimentos seguros para consumo sem comprometer a sustentabilidade econômica ou ambiental.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INATIVAÇÃO *IN VITRO* DE *ESCHERICHIA COLI* E *SALMONELLA*

4.1.1 Cepas bacterianas e meios de cultura

Foram utilizadas cepas padrão de *Salmonella* Enterica sorovar *Typhimurium* ATCC 14028 e *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888 (American Type Culture Collection, Bioscan). As bactérias foram mantidas em ágar trípticaseína de soja (TSA) e confirmadas pelos meios seletivos, como ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e ágar eosina azul de metileno (EMB), respectivamente.

A suspensão bacteriana foi preparada em caldo trípticaseína de soja (TSB), e incubada a 37 °C por 24 horas.

As culturas bacterianas foram diluídas para uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹. Em seguida, a suspensão bacteriana individual foi centrifugada (10.000rpm) por 10 minutos seguida de TSB de ambos os tubos, decantando o TSB e ressuspendendo os pellets em 10 mL de solução de NaCl (0,85%) e agitada em vórtex por um minuto. O nível de inóculo de cada cepa foi de aproximadamente 10^6 UFC mL⁻¹, ajustado pela escala de McFarland (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France).

Todos os meios de cultura foram adquiridos da Oxoid *Laboratories* (Cambridge, CB5 8BZ, UK) e preparados seguindo as instruções do fabricante.

4.1.2 Geração de ozônio

O ozônio foi produzido por um gerador de ozônio comercial operando com efeito corona (Ozone & Life 1,5 RM), alimentado por oxigênio puro. A concentração do gás limitada pelo equipamento, calibrado em uma vazão de O₃ de 17mg. L⁻¹. O fluxo de entrada do gás oxigênio (O₂) utilizado foi de 1L por minuto de O₂. O ar ozonizado produzido a vazão constante pelo aparelho foi

passado por um tubo de silicone para um difusor. Suspensões bacterianas (500 mL) foram expostas ao O₃ diretamente através do borbulhamento permanente (tratamento dinâmico) e temperatura do ambiente controlada de 20°C durante o desenvolvimento do experimento.

4.1.3 Viabilidade Bacteriana

As cepas bacterianas foram cultivadas em ágar trípticaseína de soja (TSA, Oxoid ®) incubadas a 37°C por 24 horas. Uma colônia de cada espécie foi inoculada em 1000 mL de caldo trípticaseína de soja (TSB, Oxoid ®) e incubada a 37°C por 24 horas. A densidade celular inicial foi determinada usando a escala de McFarland standard (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, França) que corresponde a uma concentração de $1,0 \times 10^8$ UF /mL⁻¹.

Para o tratamento com ozônio, a densidade celular das culturas foi ajustada para concentrações de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de solução de NaCl (0,85% p/v). Como controle (sem tratamento com ozônio) foi utilizada uma amostra de cada espécie bacteriana na concentração de 1×10^6 UFC mL⁻¹.

Amostras de 0,1 mL, não tratadas e tratadas com ozônio foram coletadas em diferentes períodos de tempo (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 minutos), e inoculadas em ágar trípticaseína de soja e incubados a 37°C por 24-48 horas e então as colônias foram contadas.

Nos mesmos períodos de tempo, para verificar a eficiência inibitória do ozônio, foram retirados 0,1mL da amostra, visando confirmar a presença de microrganismos viáveis, por meio da adição de 0,050 mL do corante Cloreto de 2,3,5 - Trifeniltetrazólio (TTC, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), para evidenciar a atividade da enzima desidrogenase, envolvida no processo respiratório. Pela hidrogenação do TTC em seres vivos as células produzem o trifetil formazan, que é uma substância vermelha, estável e não difusível. Tornou-se possível distinguir as amostras vivas coradas em vermelho, das amostras inativas que permanecem na mesma cor (SILVESTER, 1911).

O experimento foi repetido quatro vezes e em seguida obteve-se a média de UFC/ml e porcentagem de viabilidade celular para cada intervalo de tempo.

4.2 EFEITO DA ÁGUA OZONIZADA NA SANITIZAÇÃO DE TOMATES CONTAMINADOS EXPERIMENTALMENTE COM *ESCHERICHIA COLI* E *SALMONELLA ENTERICA*

4.2.1 Preparação de Suspensão Bacteriana

Os patógenos comuns associados ao tomate, *Salmonella* Enterica sorovar *Typhimurium* (ATCC 14028) e *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888) foram cultivados em ágar tríplicaseína de soja (TSA) e confirmadas pelos meios seletivos, como ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e ágar eosina azul de metileno (EMB), respectivamente.

A suspensão bacteriana para inoculação dos tomates foi preparada em caldo tríplicaseína de soja (TSB), e incubada em *shaker* a 37 °C e 150 rpm por 24 horas.

Todos os meios de cultura foram adquiridos da Oxoid *Laboratories* (Cambridge, CB5 8BZ, UK) e preparados seguindo as instruções do fabricante.

4.2.2 Variedade e preparação de tomates para inoculação

Para avaliação da atividade antibacteriana da água ozonizada foram empregados tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.), variedade Sweet grape, maduros e sem lesões, adquiridos em comércio de hortaliças e frutas.

Cada tomate foi cuidadosamente lavado em água corrente e, em seguida, se procedeu ao tratamento com ácido acético (0,7% v/v) por um minuto, quando foi desprezado e depois água estéril por 1 minuto, este procedimento foi repetido duas vezes (CHANG e FANG, 2007). Após limpeza com papel estéril, os tomates foram secos ao ar em cabine de biosegurança.

Para verificação da ausência de *Escherichia coli* e *Salmonella* foram retirados 6 unidades e transferidos para béquer contendo 10mL de solução salina (NaCl, 0,85%) e depois agitados suavemente durante 2 min. Após diluição em série decimal, 0,1 mL das diluições adequadas foram espalhadas em ágar eosina azul de metileno (EMB) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD), respectivamente, e incubadas a 37 °C por 24 horas.

4.2.3 Preparação de microrganismos para inoculação de tomates

O processo de preparação das bactérias (*Salmonella* Enterica sorovar *Typhimurium* ATCC 14028 e *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888) aplicado neste estudo começou pela transferência de uma colônia representativa para 10 mL de caldo Luria (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 37 °C por 18 a 20 horas e incubação em shaker a 37 °C e 150 rpm por 24 horas. Um total de 3 mL da suspensão bacteriana foi posteriormente transferido para tubos de centrifuga e centrifugado por 10 min a 1.000 rpm e o sobrenadante desprezado, seguido por duas lavagem das células colhidas com solução salina (NaCl 0,85%) livre de demanda de ozônio e o ajuste das suspensões para 10^9 UFC mL⁻¹, determinada utilizando padrão McFarland (HITCHINS, JINNEMAN, CHEN, 2016).

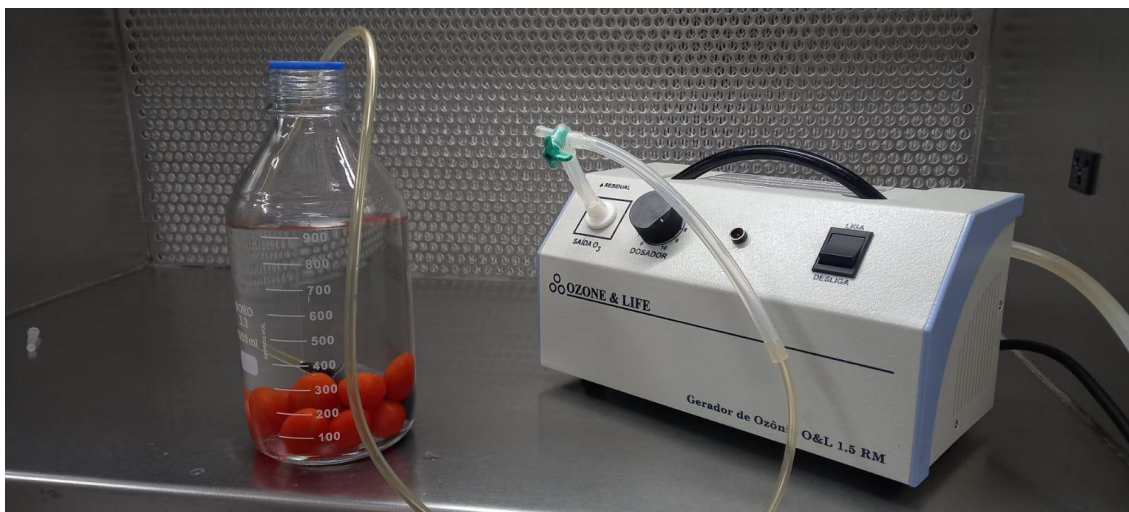
4.2.4 Inoculação dos tomates e ozonização

Os tomates foram inoculados colocando 10 unidades em recipiente de vidro autoclavado contendo 500mL do inóculo de cada bactéria. Os tomates foram agitados suavemente em solução de inóculo por 10 min, e depositados em cabine de biossegurança por 12 horas para facilitar a fixação bacteriana, bem como para prevenir a redução microbiana prematura (STEARNS et al., 2022). Em seguida, retirados da suspensão bacteriana, e secos ao ar por 10 min, em cabine de biosegurança .

A seguir os tomates inoculados foram colocados no frascos contendo 800mL de água deionizada estéril por 30 segundos, e depois agitados suavemente durante 2 min. Após diluição em série decimal, 0,1 mL das diluições adequadas foram espalhadas em ágar eosina azul de metileno (EMB) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD), respectivamente, e incubadas a 37 ° C por 24 horas, quando as colônias foram contadas para confirmação da concentração inicial de bactérias (HITCHINS, JINNEMAN, CHEN, 2016).

A ozonização foi realizada como descrito no item 4.1.2. A Figura 1 evidencia a configuração do sistema utilizado para realizar a ozonização dos tomates inoculados.

Figura 1: Configuração do sistema utilizado para realizar a ozonização dos tomates inoculados.



Fonte: Autoria própria.

Durante o processo de ozonização, amostras de 0,1 mL, não tratadas e tratadas com ozônio foram coletadas em diferentes períodos de tempo (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 minutos), e inoculadas em ágar eosina azul de metileno (EMB) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD), e incubadas a 37°C por 24-48 horas e então as colônias foram contadas (EPELLE et al., 2022).

O delimitamento foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram: 1- tomates inoculados sem ozonização (controle) e 2- Tomates inoculados com ozonização em diferentes tempos. Todos os experimentos foram repetidos em triplicata para um total de 60 frutos analisados por microrganismo.

Para a avaliação da eficácia do efeito antimicrobiano da água ozonizada, a variação da carga microbiana foi analisada com o objetivo de observar qual microrganismo apresentou a maior variação negativa (queda) na contagem microbiana. Nesse contexto, a variação percentual da contagem microbiana foi determinada através da seguinte equação:

$$\text{Contagem microbiana (\%)} = \frac{(\text{Contagem}_{10\text{min}} - \text{Contagem}_{0\text{min}})}{\text{Contagem}_{0\text{min}}} \times 100$$

As variações negativas evidenciam diminuição na contagem microbiana e variações positivas mostram aumento da contagem microbiana nos tempos avaliados. A variação percentual da contagem microbiana foi determinada por meio de estatísticas descritivas a fim de observar qual microrganismo foi menos resistente à ação da água ozonizada como meio de sanitização de tomates.

4.3 EFEITO DA ÁGUA OZONIZADA NAS CARACTERÍSTICAS DE TOMATES CONTAMINADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* Enterica

4.3.1 Determinação do pH de tomates

O pH de tomates tratados e não tratados com água ozonizada foi avaliado por um período de 16 dias, utilizando a metodologia descrita por Ajayi e Olasehinde (2009). A cada três dias, frutos de tomate com aproximadamente o mesmo peso foram colhidos e esmagados suavemente usando o almofariz e pilão de laboratório e o pH foi medido usando o medidor de pH e os dados registrados.

4.3.2 Teste de vida útil de frutos de tomate

A vida útil de frutos de tomate foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Thole et al. (2020). Utilizaram-se 15 frutos de tomate por tratamento (com e sem água ozonizada), dispostos individualmente em bandejas de plástico para propagação de mudas. O peso (massa) de cada fruto foi determinado e registrado e a cor foi avaliada usando anotação visual (vermelho escuro, vermelho, amarelo-vermelho).

A firmeza da fruta foi determinada usando uma escala de 1 a 5 (1 = muito firme, 2 = firme, 3 = médio, 4 = macio, 5 = muito macio). Em seguida foi marcado a firmeza da fruta segurando-a com as duas mãos e movendo os dedos ao redor de todo o equador de cada fruta. Tomates muito firmes (1) possuíam uma superfície totalmente rígida, enquanto frutas muito macias (5) apresentaram uma sensação de "balão de água" ao redor. Os tomates que foram marcados como (3) estavam em fase intermediária. Este método permitiu a avaliação rápida e não destrutiva da firmeza do fruto como um todo.

Os frutos de tomate foram avaliados quanto à presença de lesões usando uma escala de 1 a 5 (1 = sem lesão, 2 = 1 lesão, 3 = 2 lesões, 4 = 3 lesões, 5 =

4 ou mais lesões). Todas as avaliações foram realizadas em triplicata e a cada três dias, por um período de 16 dias.

4.2.5 Análise estatística

1. Análise descritiva das contagens microbianas para cada microrganismo estudado de acordo com o tempo de exposição em água ozonizada.

2. Teste de Análise de Variância (ANOVA) com teste de comparação múltipla de Tukey para verificar possíveis diferenças significativas entre as contagens microbianas ao longo do tempo de exposição dos tomates à água ozonizada.

3. Gráficos de linha para análise da contagem microbiana ao longo de tempo de exposição à água ozonizada.

4. Teste t para amostras independentes para observar diferenças entre as variações da contagem microbiana ao longo do tempo de exposição à água ozonizada.

5. Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

6. Software utilizado: Minitab 17 (Minitab Inc.)

5. RESULTADOS

5.1 INATIVAÇÃO *IN VITRO* DE *ESCHERICHIA COLI* E *SALMONELLA*

A Tabela 1 evidencia a contagem microbiana de *Salmonella* Enterica sorovar *Typhimurium* (ATCC 14028) e *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888) submetidas à água ozonizada em diferentes tempos. Os resultados mostram a presença de diferenças significativas na contagem microbiana ao longo do tempo de exposição dos microrganismos à água ozonizada e água sem ozônio.

No tratamento *E. coli* controle (sem ozônio) as maiores contagens foram observadas nos tempos iniciais, até 90 minutos, diminuindo de forma significativa sua contagem, atingindo o menor valor de contagem microbiana no tempo de

210 minutos, enquanto que para *S. typhimurium* controle (sem ozônio) verificou-se as maiores contagens em até 120 minutos e redução gradativa nos demais tempos experimentais.

Tabela 1. Média±desvio padrão (Mediana) da contagem microbiana do *Salmonella* Enterica sorovar *Typhimurium* (ATCC 14028) e *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888) submetidas à água ozonizada e sem ozonizar em diferentes tempos (minutos) de exposição.

Tempo (min)	Tratamentos			
	<i>E. coli</i> (controle)	<i>E. coli</i>	S.Enterica(controle)	S.Enterica
0	1,2.10 ⁶ ±0,0 (1,2.10 ⁶) a	1,2.10 ⁶ ±0,0 (1,2.10 ⁶) a	1,2.10 ⁶ ±0,0 (1,2.10 ⁶) a	1,2.10 ⁶ ±0,0 (1,2.10 ⁶) a
30	1,2.10 ⁶ ±0,0 (1,2.10 ⁶) a	2,5.10 ⁴ ±1,0.10 ³ (2,5.10 ⁴) b	1,2.10 ⁶ ±0,0 (1,2.10 ⁶) a	2,3.10 ³ ±1,5.10 ² (2,4.10 ³) b
60	1,2.10 ⁶ ±0,0 (1,2.10 ⁶) a	4,4.10 ³ ±1,0.10 ² (4,4.10 ³) c	1,2.10 ⁶ ±0,0 (1,2.10 ⁶) a	1,1.10 ² ±1,0.10 ¹ (1,1.10 ²) c
90	1,1.10 ⁶ ±0,0 (1,1.10 ⁶) b	3,2.10 ² ±1,1.10 ¹ (3,2.10 ²) d	1,2.10 ⁶ ±0,0 (1,2.10 ⁶) a	1,4.10 ¹ ±2,0 (1,4.10 ¹) d
120	1,0.10 ⁶ ±5,7.10 ⁴ (1,0.10 ⁶) c	9,3.10 ¹ ±5,7 (9,0.10 ¹) e	1,1.10 ⁶ ±0,0 (1,1.10 ⁶) b	0,0±0,0 (0,0) e
150	1,0.10 ⁶ ±1,0.10 ⁵ (1,0.10 ⁶) c	2,0.10 ¹ ±0,5 (2,0.10 ¹) f	1,1.10 ⁶ ±0,0 (1,1.10 ⁶) b	0,0±0,0 (0,0) e
180	8,6.10 ⁵ ±1,1.10 ⁵ (8,0.10 ⁵) d	0,0±0,0 (0,0) g	1,1.10 ⁶ ±0,0 (1,1.10 ⁶) b	0,0±0,0 (0,0) e
210	2,3.10 ⁵ ±5,7.10 ⁴ (2,0.10 ⁵) f	0,0±0,0 (0,0) g	1,0.10 ⁶ ±1,0.10 ⁵ (1,0.10 ⁶) c	0,0±0,0 (0,0) e
240	3,8.10 ⁵ ±1,1.10 ⁴ (3,8.10 ⁵) e	0,0±0,0 (0,0) g	1,0.10 ⁶ ±1,0.10 ⁵ (1,0.10 ⁶) c	0,0±0,0 (0,0) e
Valor P ¹	0,001	0,001	0,001	0,001

¹ Valor P referente ao teste de Kruskal-Wallis a P<0,05. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de comparação múltipla de Dunn a P<0,05.

Fonte: A autoria própria.

5.2 EFEITO DA ÁGUA OZONIZADA NA SANITIZAÇÃO DE TOMATES CONTAMINADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Escherichia coli* e *Salmonella* Enterica *Typhimurium*

Na Tabela 2 são apresentadas as estatísticas descritivas da contagem microbiana dos tomates infectados por cada microrganismo em seus tempos de exposição à água ozonizada. Os resultados indicam a presença de diferenças significativas na contagem microbiana de ambos microrganismos quando o tempo de exposição dos tomates à água ozonizada aumenta. É possível observar que a contagem microbiana diminuiu de forma significativa ao longo dos 20 minutos de exposição.

Tabela 2. Média \pm desvio padrão (Mediana) das contagens microbianas dos tomates de acordo com o tempo de exposição em água ozonizada.

Tempo de exposição(min)	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
0	$1,610^6 \pm 2,5.10^5$ ($1,7.10^6$) a	$2,3.10^6 \pm 3,2.10^5$ ($2,5.10^6$) a
5	$1,6.10^4 \pm 5,3.10^3$ ($1,5.10^4$) b	$2,0.10^2 \pm 7,7.10^1$ ($1,7.10^2$) b
10	$0,4.10^1 \pm 0,2.10^1$ ($0,4.10^1$) b	0,0 \pm 0,0 (0,0) b
15	0,0 \pm 0,0 (0,0) b	0,0 \pm 0,0 (0,0) b
20	0,0 \pm 0,0 (0,0) b	0,0 \pm 0,0 (0,0) b
Valor P ¹	<0,001	<0,001

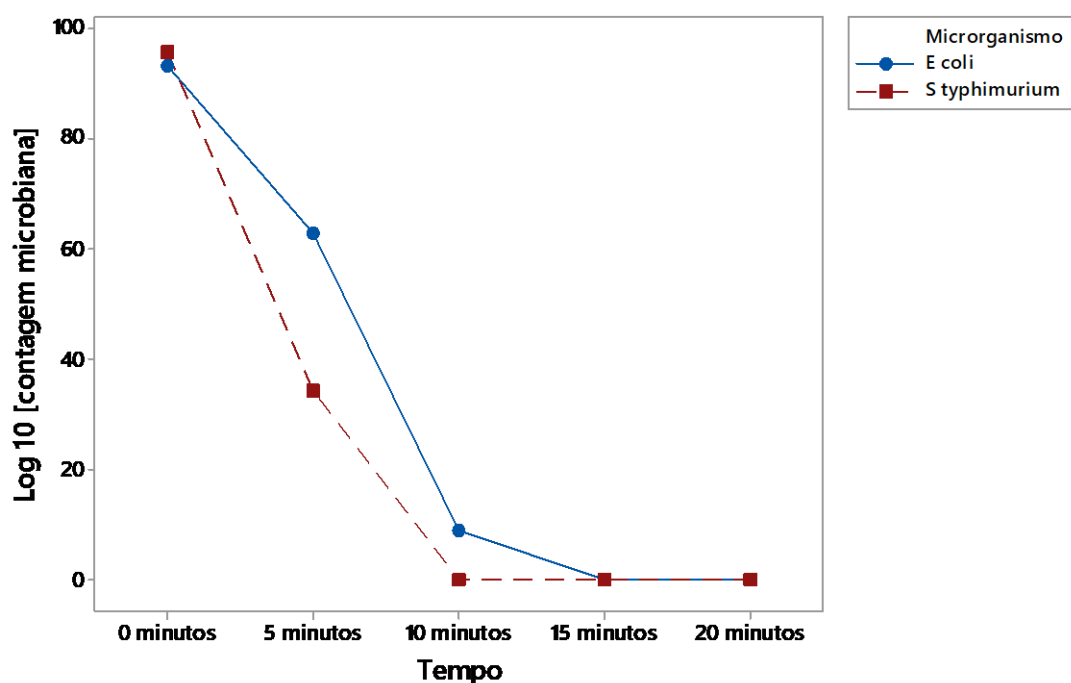
¹ Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a $P < 0,05$. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de comparação múltipla de Tukey a $P < 0,05$.

Fonte: Autoria própria.

Em relação à *E. coli*, os tomates apresentaram carga microbiana nula em 15 minutos de exposição à água ozonizada, entretanto, para *S. typhimurium*, os tomates apresentaram carga microbiana nula no tempo de 10 minutos de exposição.

A Figura 2 evidencia o comportamento da contagem microbiana de ambos os microrganismos ao longo dos 20 minutos de exposição dos tomates à água ozonizada.

Figura 2. Comportamento da carga microbiana em relação ao tempo de exposição à água ozonizada.



De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3 foi possível observar que a *E. coli* foi mais resistente à ação da água ozonizada, pois sua contagem microbiana foi nula a 15 minutos de exposição. Em contrapartida, os tomates contaminados com *S. typhimurium* precisaram somente de 10 minutos em exposição à água ozonizada para serem considerados livres de contaminação.

Os dados ainda evidenciam diferenças estatísticas na variação da contagem microbiana entre os tempos de 0 a 5 minutos, mostrando que a variação foi significativamente superior para os tomates contaminados com *S. typhimurium* em relação aos tomates contaminados com *E. coli*. Neste contexto, a queda microbiana foi mais acentuada nos tomates contaminados com *S. Typhimurium*.

Sendo assim é possível pressupor que a água ozonizada é eficiente contra ambos os microrganismos estudados, entretanto, é mais eficiente contra *S. typhimurium* do que *E. coli*, pois o tempo de exposição dos tomates contaminados com *S. typhimurium* à água ozonizada para anular a carga microbiana foi significativamente inferior em relação ao tempo dos tomates contaminados com *E. coli* (tabela 3).

Tabela 3. Média \pm desvio padrão (Mediana) da variação percentual (%) da contagem microbiana para ambos os microrganismos avaliados

Microrganismo	Variação da carga microbiana			
	0-5min	5-10min	10-15min	15-20min
<i>E. coli</i>	-98,9 \pm 0,00 (-99,0)	-99,9 \pm 0,00 (-99,9)	-1,00 \pm 0,00(-1,00)	-1,00 \pm 0,00(-1,00)
<i>S.typhimurium</i>	-99,9 \pm 0,00 (-99,9)	-1,00 \pm 0,00(-1,00)	-1,00 \pm 0,00(-1,00)	-1,00 \pm 0,00(-1,00)
Valor P ¹	<0,001	- ²	-	-

¹ Valor P referente ao teste t para amostras independentes a P<0,05. ² Teste estatístico não realizado devido aos dados serem todos iguais a zero, não havendo variação.

Fonte: Autoria própria.

5.3 EFEITO DA ÁGUA OZONIZADA NAS CARACTERÍSTICAS DE TOMATES CONTAMINADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* Entérica *Typhimurium*

A tabela 4 evidencia os resultados de pH dos extratos dos frutos de tomate tratados com água ozonizada e dos frutos de tomate não tratados. O pH dos frutos de tomate não tratados tornou-se mais ácido com 7 dias de prateleira, enquanto a acidez dos frutos tratados com água ozonizada reduziu ligeiramente aos 13 dias.

Tabela 4: pH de frutos de tomates tratados e não tratados com água ozonizada.

Dias de avaliação de pH	Frutos de tomate / água ozonizada	Frutos de tomate / água
1	4,78	4,80
4	4,78	4,79
7	4,77	4,60
10	4,77	4,48
13	4,52	4,23
16	4,51	3,98

Fonte: Autoria própria.

Não foram observadas variações quanto à cor e peso dos frutos de tomate no período avaliado.

Os resultados referentes à firmeza dos frutos, apresentados na tabela 5, evidenciam diferenças entre os tratamentos. Foram verificadas mudanças na firmeza dos frutos não tratados com água ozonizada, a partir do décimo dia de avaliação, enquanto que, os frutos tratados com água ozonizada mantiveram as características de firmeza, evidenciando aumento da vida de prateleira.

A partir do décimo terceiro dia de avaliação foi verificada a presença de lesões em frutos não tratados com água ozonizada (Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação da firmeza e da presença de lesões em frutos de tomates tratados e não tratados com água ozonizada.

Dias de avaliação	Frutos de tomate / água ozonizada	Frutos de tomate / água
1	Firme / sem lesão	Firme / sem lesão
4	Firme / sem lesão	Firme / sem lesão
7	Firme / sem lesão	Firme / sem lesão
10	Firme / sem lesão	Médio / sem lesão
13	Firme / sem lesão	Médio / com lesão
16	Firme / sem lesão	Macio / com lesão

Fonte: Autoria própria.

6. DISCUSSÃO

Os patógenos mais comuns encontrados nas frutas e hortaliças são bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que podem ser psicotrópicas ou mesófilas. Esta microflora inicial consiste em *Bacillus cereus*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium botulinum*, *Enterobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Pseudomonas spp.*, e *Yersinia enterocolitica*, capazes de formar biofilmes (VIVEK et al., 2019).

Os biofilmes são estruturas complexas que proporcionam novas vantagens de sobrevivência aos microrganismos, permitindo-lhes crescer em diversas comunidades microbianas. É fundamental mencionar que nem todo microrganismo pode produzir biofilmes (FLEMMING, WINGENDER, 2010). A produção de biofilmes requer condições ambientais adequadas para o desenvolvimento de muitos microrganismos e a formação de biofilmes. A formação do biofilme inicia-se com a adesão microbiana à uma superfície, sendo mais favorável às bactérias que possuem flagelos, permitindo quimiotaxia e motilidade natatória para colonização por meio da adesão superficial (TORTORA et al., 2017).

Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus* e *Escherichia* são capazes de formar biofilme em frutas e hortaliças frescos, o que é crucial devido à virulência das cepas patogênicas (AMRUTHA et al., 2017). Sun et al. (2021) demonstraram que *E. coli* O157:H7 formou um biofilme mais denso nos tecidos do pepino, especialmente nos tecidos vasculares. Da mesma

forma, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* enterica, causadores dos surtos de doenças transmitidas por alimentos, são comuns em brotos de alface e folhas de alface, utilizando as suas fímbrias para se fixarem à superfície da planta (YARON, ROMLING, 2014).

Segundo Giaouris e Simões, (2018), biofilmes formados por patógenos humanos são altamente resistentes a produtos saneantes. A adesão de bactérias aos produtos frescos também é favorecida pelas irregularidades da superfície do produto (rugosidade, fendas, buracos), reduzindo a eficácia da lavagem e da higienização utilizada para remover ou eliminar células aderidas. Os autores afirmam que a formação de biofilme evidenciou resistência aos antimicrobianos em comparação com as bactérias planctônicas, aumentando o potencial de contaminação cruzada por microrganismos presentes em vegetais frescos.

A exposição de vegetais frescos a ambientes insalubres aumenta a probabilidade de contaminação por patógenos nas superfícies externas, o que pode levar à internalização da bactéria patogênica. Em estudo realizado por com Ibarra-Sanchez et al. (2004), os tomates foram submersos em uma suspensão bacteriana contendo *Salmonella* entérica e *Escherichia coli*, e as bactérias sobreviveram por 24 horas à temperatura ambiente após internalização nos frutos do tomate. A entrada das bactérias na fruta parece ocorrer através da cicatriz porosa do caule, através da qual as bactérias podem atravessar o tecido interno e se multiplicar, mesmo em níveis de pH de 4,10 do fruto. Outras pesquisas indicam que *Salmonella* e *E. coli* podem persistir no exterior dos frutos do tomate ao longo do tempo (GU et al., 2002; ITURRIAGA et al., 2007; HINTZ et al., 2010; ZHOU, 2014; HITCHINS, JINNEMAN, CHEN, 2016).

Os vegetais frescos apresentam benefícios nutricionais significativos para os consumidores, mas podem ser um produto de maior risco de contaminação devido à agentes patogênicos, tornando incerta a segurança dos consumidores. Por esta razão, são implementadas técnicas de desinfecção que é a inativação ou destruição de microrganismos que podem causar doenças de origem alimentar ou alterações indesejáveis nos alimentos (MENDOZA et al., 2020).

O método convencional e amplamente utilizado para desinfetar vegetais frescos é a aplicação de desinfetantes químicos, usados para reduzir o risco de contaminação microbiana. Contudo, é necessário compreender que diversos

fatores, como concentração, tempo de contato, temperatura, carga orgânica, pH, tipo e carga de microrganismos, afetam a eficácia antimicrobiana de desinfetantes (KWÁSNIEWSKA et al., 2020).

Atualmente novos métodos de desinfecção foram desenvolvidos e propõem uma abordagem mais sustentável para este problema. Os métodos de tratamento não térmico, como ozônio (SHEZI et al., 2020), água eletrilizada (WU et al., 2018), plasma frio tecnologia (SHAH et al., 2019), alta pressão hidrostática (BALASUBRAMANIAM et al., 2015), ultravioleta (GUO et al., 2017), ultrassom (BHILWADIKAR et al., 2019) e surfactantes microbianos (GUTIÉRREZ-CHÁVEZ et al., 2021).

O ozônio é reconhecido como um agente antimicrobiano para armazenamento, lavagem e processamento de vegetais. O ozônio evita e controla o crescimento microbiano nos vegetais, mantendo a sua aparência atrativa e qualidades sensoriais, garantindo a retenção das características nutricionais, mantendo e aumentando o prazo de validade.

Em solução líquida, o ozônio pode ser usado para desinfetar água de processamento e vegetais, e na forma gasosa ajuda a higienizar e preservar vegetais durante o armazenamento. A multifuncionalidade do ozônio o torna um promissor agente de processamento de alimentos. Porém, se o ozônio for utilizado de forma inadequada, provoca alguns efeitos deletérios aos produtos, como perdas na sua qualidade sensorial. Para uma utilização eficaz e segura do ozônio, são necessárias condições de tratamento específicas deve ser determinado para todos os tipos de vegetais (SARRON et al., 2021).

Fatores que influenciam a solubilidade, estabilidade e reatividade do ozônio também podem afetar a sua eficácia. A temperatura afeta a eficiência biocida do ozônio, entretanto a redução da temperatura de um meio aquoso aumenta a solubilidade e a estabilidade do ozônio, aumentando sua disponibilidade no meio e, conseqüentemente, aumentando sua eficácia. As capacidades inativadoras do ozônio estão correlacionadas com a diminuição da temperatura. À medida que a temperatura aumenta, o ozônio torna-se menos solúvel e menos estável com um aumento da sua taxa de decomposição (Gunduz, et. al; 2009).

Das_ et al. (2006) descobriram que populações de *Salmonella Enteritidis* inoculadas na superfície e nas cicatrizes do caule do tomate cereja foram mortas após 10 mg/L de tratamento com ozônio por 20 min. Antes do tratamento, altos

níveis de *Salmonella* (7,0 log UFC por tomate) foram inoculados e deixados estabilizar e fixar por 4 horas a 7 e 22°C. Após 1 h de tempo de fixação, as populações de *Salmonella* foram mortas em 15 min. Tempos de morte mais rápidos foram alcançados com níveis mais baixos de bactérias inoculadas. O nível mais baixo, 3,0 log UFC por tomate, foi completamente eliminado em 5 minutos com um tratamento com ozônio de 10 mg L⁻¹. A eficácia do tratamento com ozônio também dependia da concentração do gás; por exemplo, 20 mg L⁻¹ reduziram as populações de *Salmonella* em 15 min e 30 mg L⁻¹ reduziram as populações em apenas 5 min. No entanto, 5 mg L⁻¹ não foi tão eficaz na redução de populações num período de tempo mais curto. Todas as concentrações produziram descoloração na superfície das amostras testadas.

Na presente pesquisa foi utilizado tratamento de ozônio de 17 mg L⁻¹, com borbulhamento constante, (modadlidade dinâmica), durante todo o experimento, obtendo-se a nulidade da contagem de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* (ATCC 14028) e *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888) em tomates inoculados foi obtida em 10 e 5 minutos, respectivamente (Tabela 2, Figura 2).

De acordo com Marino et al. (2018) a aplicação de ozônio aquoso nas duas modalidades diferentes apresenta efeitos antimicrobianos diferentes, a taxa de inativação das células ligadas (biofilme) é maior nas condições dinâmicas do que nas estáticas, independentemente da espécie microbiana. Segundo os autores as taxas mais baixas de inativação de biofilmes em condições estáticas podem ser atribuídas ao fato de que a concentração de ozônio na água diminuiu progressivamente ao longo do tempo devido à decomposição e a sua meia-vida, que é de aproximadamente 10 min. Já nas condições dinâmicas, os microrganismos são sensíveis ao tratamento, devido ao fornecimento permanente de ozônio (borbulhamento constante).

No entanto Yousef et al. (1999) e Kozusny-Andreani et al. (2018) afirmaram que a destruição e/ou inibição da microbiota por meio do tratamento com ozônio é afetada por fatores como o tipo e o nível inicial do agente patogénico, do tempo de exposição ao agente, a medida em que o agente patogénico é capaz de se ligar ao produto e a relação que o agente patogénico tem com aquele produto alimentar (DAS_ et al., 2006).

Chang et al. (2022) avaliaram os efeitos de vários níveis de ozônio na sobrevivência de *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* O157:H7 presentes no resíduo líquido de laticínios. Vários níveis de ozônio (43,26, 87,40 e 132,46 mg L⁻¹) foram produzidos no sistema de ozônio e difundido no resíduo líquido, por vários períodos (30, 60 e 120 min). Os resultados evidenciaram que concentrações de ozônio de 132,46 mg L⁻¹ e tempo de exposição de 120 min resultaram na redução dos níveis de *E. coli* e *Salmonella*. Baixos níveis de ozônio e tempo de exposição limitado foram considerados menos eficazes na remoção de patógenos devido ao alto teor de sólidos no material analisado.

Na presente pesquisa verificou-se que o uso de ozônio aquoso em condições dinâmicas foi eficaz na inativação de *E. coli* e *Salmonella enterica* em condições planctônicas e em frutos de tomate (Tabelas 1 e 2, Figura 2). No entanto, a pesquisa realizada por Mustapha et al. (2020) evidenciou que o ozônio aquoso não foi particularmente eficaz na limpeza de tomates cereja, Os autores observaram uma redução mínima em bactérias mesófilas, leveduras e bolores (<1 log UFC g⁻¹). Isto pode estar relacionado à forte exposição de toda a superfície às partículas de ozônio, especialmente quando irregularidades e pontos ocultos estão presentes na superfície.

De acordo com Inatsu et al. (2011), o tamanho e a forma dos tratamentos também desempenham um papel importante na eliminação e redução de cargas de bactérias pelo ozônio. De acordo com o autor, quando a rúcula folhosa foi comparada e a abóbora, a desinfecção foi de 91,8 e 99,3%, respectivamente. No entanto quando compararam a desinfecção da alface e do espinafre com ozônio na água, no total de células coliformes a redução foi de 3,8 e 5,2 log UFC g⁻¹, respectivamente.

Na utilização do ozônio aquoso aplicado em condições dinâmicas, a cinética de inativação de biofilmes geralmente se caracteriza pela inativação microbiana causada por processos oxidativos após a ozonização, enquanto que o ozônio gasoso é um antimicrobiano menos eficaz (MARINO et al., 2018). O efeito moderado exercido pelo ozônio gasoso deve-se estritamente ao mecanismo de ação do ozônio, que requer a presença de água (MARTINELLI et al., 2017). De acordo com Pascual et al. (2007) e Koseki; Isobe (2006), o aumento da umidade relativa poderia aumentar a eficiência do ozônio gasoso, encurtando assim os tempos de exposição. A força física de um fluxo de bolhas

nos produtos crus pode efetivamente separar e inativar bactérias superficiais e tem o potencial de reduzir o uso de produtos químicos antimicrobianos e de água nas operações de embalagem pós-colheita (LEE et al., 2018).

A maioria das utilizações industriais do ozônio está frequentemente ligada às suas propriedades antimicrobianas e à sua capacidade de degenerar compostos orgânicos através da oxidação. Sua rápida reatividade e não seletividade a diferentes classes de microrganismos são particularmente vantajosas para uma ampla gama de aplicações (MARTINELL et al., 2017). Além disso, enquanto o ozônio oxida diretamente os constituintes (como proteínas e aminoácidos) nas paredes celulares e membranas dos esporos, acredita-se que o cloro se difunda inicialmente no protoplasma celular, através da parede celular antes de inativar as enzimas (ROSENBLUM et al., 2012), assim implicando que é necessária uma concentração mais baixa e um tempo de contato mais curto para a sua inativação com o ozônio, em comparação com o cloro. O ozônio atua inicialmente na membrana celular, sendo a superfície da célula microbiana o primeiro alvo a ser atingido. Sua ação antimicrobiana é decorrente da oxidação de glicolípídeos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular, alterando a permeabilidade e causando sua rápida lise. O ozônio ataca também grupos sulfidrila de enzimas, ocasionando o colapso da atividade enzimática celular. Além disso, sua ação sobre o material nuclear dos microrganismos altera as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos, como ocorre com alguns vírus, onde o ozônio destrói seu RNA além de alterar as cadeias polipeptídicas do cápsideo protéico (BOTELHO et al., 2011). Isto é desejável principalmente em aplicações de grande escala, onde o processamento rápido e a segurança do trabalhador são as principais preocupações.

O ozônio é um importante sanitizante pois evita e controla o crescimento biológico de microrganismos, mantendo a sua aparência atrativa e qualidades sensoriais, garantindo a retenção das características nutricionais e mantendo e aumentando o prazo de validade (SARRON et al., 2021). Na presente pesquisa os frutos de tomate tratados com água ozonizada apresentaram maior firmeza e não foram observadas lesões, o que permite presumir maior tempo de prateleira (Tabela 5). A multifuncionalidade do ozônio o torna um promissor agente de processamento de alimentos. Porém, se o ozônio for utilizado de forma inadequada, provoca alguns efeitos deletérios aos produtos, como perdas na sua

qualidade sensorial. Para uma utilização eficaz e segura do ozônio, são necessárias condições de tratamento específicas que devem ser determinado para todos os tipos de vegetais (ASLAM et al., 2022).

A higienização de frutas e vegetais frescos desempenha um papel importante na melhoria da qualidade alimentar e da segurança microbiana, pois o controle da deterioração e microrganismos patogênicos é fundamental em toda a cadeia de produção de cultivo, processamento, distribuição e consumo.

Em suma, a segurança microbiológica dos alimentos é garantida não apenas pela existência de regulamentações rigorosas, mas também pela sua aplicação prática e contextualizada ao longo de toda a cadeia de produção. A vigilância contínua e a adaptação às novas descobertas científicas são fundamentais para manter e melhorar os padrões de segurança alimentar, protegendo assim a saúde dos consumidores e prevenindo surtos de doenças transmitidas por alimentos.

7. CONCLUSÃO

Pela metodologia utilizada e pelos resultados obtidos pode concluir-se que:

- A água ozonizada inativou *Salmonella* Enterica sorovar *Typhimurium* (ATCC 14028) e *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888) em suspensão em 90 minutos e 120 minutos, respectivamente;
- *E. coli* foi mais resistente à ação da água ozonizada, pois sua contagem microbiana foi nula a 15 minutos de exposição. Em contrapartida, os tomates contaminados com *S. typhimurium* precisaram somente de 10 minutos em exposição à água ozonizada para serem considerados livres de contaminação.
- A aplicação de ozônio aquoso na modalidade dinâmica apresentou efeitos antimicrobianos na taxa de inativação das células bacterianas em suspensão e ligadas (biofilme) à superfície de tomates da variedade Sweet grape.
- Os frutos de tomate tratados com água ozonizada não evidenciaram alterações no pH, mantiveram as características de firmeza e não apresentaram lesões, indicando maior tempo de prateleira.

Referências Bibliográficas

AJAYI, A. A.; OLASEHINDE, I.G. Studies on the pH and protein content of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruits deteriorated by *Aspergillus niger*. **Scientific Research and Essay**, v. 4, n. 3, p.185-187, 2009.

ALLENDE, A., SELMA, M. V., LÓPEZ-GÁLVEZ, F., VILLAESCUSA, R., & GIL, M. I. Role of comercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. **Postharvest Biology and Technology**. v.49, 155–163, 2008. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.12.010

ALEGBELEYE, O. O., SINGLETON, I., SANT'ANA, A. S. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food microbiology*, 73, 177–208, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003>

ALVARENGA, C. D. M. Avaliação de formação de biofilme por *Salmonella enterica* Sorovar Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em aço inoxidável AISI 304. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – **Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS**, 2014. Disponível em: Acesso em: 29 nov. 2024.

AMRUTHA, B.; SUNIL, L.; SATHYAN, N. Biofilms: A survival strategy of *Salmonella* during environmental stress. **Microbial Pathogenesis**, v. 119, p. 231-238, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.002>. Acesso em: 4 set. 2024.

ANAMMA. Qual a diferença entre bactérias gram-positivas e gram-negativas? **Associação Nacional de Medicina do Meio Ambiente**, 2023. Disponível em: <https://anamma.com.br/diferenca-entre-bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas> . Acesso em: 29 nov. 2024.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa - IN Nº 161**, de 1º de julho de 2022. 2022. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/IN_161_2022_.pdf > Acessado 04 nov.2024.

ASLAM, R., ALAM, M. S., & PANDISELVAM, R. Aqueous ozone sanitization system for fresh produce: Design, development, and optimization of process parameters for minimally processed onion. **Ozone: Science & Engineering**, 44(1), 3-16,2022.

AWUCHI, Chinaza Godswill. HACCP, HACCP, quality, and food safety management in food and agricultural systems. **Cogent Food & Agriculture**, v. 9, n. 1, 2023. Disponível em: DOI:[10.1080/23311932.2023.2176280](https://doi.org/10.1080/23311932.2023.2176280). Acesso em: 29 nov. 2024.

BALALI GI, YAR DD, AFUA DELA VG, ADJEI-KUSI P. Microbial Contamination, an Increasing Threat to the Consumption of Fresh Fruits and Vegetables in Today's World. **Int J Microbiol.** May 22;2020:3029295, 2020. <doi:10.1155/2020/3029295>.

BALASUBRAMANIAM, V. M. B., MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S. I., & GUPTA, R. Principles and application of high pressure-based technologies in the food industry. In **Annual review of food science and technology**. Vol. 6, pp. 435–462, 2015. Annual Reviews Inc. <<https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015539>>

BARROW, P. A.; METHNER, U. **Salmonella in domestic animals**. 3. ed. Wallingford: CAB, 2020.

BERGAMO, G.; SILVA, I. G.; SERAGLIO, S. K. T.; DEMOLINER, F.; SANTIN, N. C. Métodos rápidos para detecção de Escherichia coli* em carcaças de frango: um estudo comparativo. Sociedade 5.0: **Educação, Ciência, Tecnologia e Amor**, Recife, V COINTER PDVAgro 2020. Disponível em: <https://cointer.institutoidv.org/smart/2020/pdvagro/uploads/1597.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2024.

BHILWADIKAR, T., POUNRAJ, S., MANIVANNAN, S., RASTOGI, N. K., NEGI, P. S. Decontamination of microorganisms and pesticides from fresh fruits and vegetables: A comprehensive review from common household processes to modern techniques. In **Comprehensive reviews in food science and food safety** Blackwell. v.18, Issue4 July, p.1003-1038, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12453>>. Acesso 04 set. 2024

BIALKA, K. L.; DEMIRCI, A. Applications of ozone for sanitization of fruits and vegetables. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 1, p. 75-84, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1082013213491761>. Acesso em: 4 set. 2024.

BINTSIS, T.; LITOPOULOU-TSIAMITA, P.; ALMAKEDIS, P. Ozone applications in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 452-459, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.012>. Acesso em: 4 set. 2024.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre padrões microbiológicos de alimentos. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 23 dez. 2019. Disponível em:

<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-de-diretoria-colegiada-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-236578185>. Acesso em: 4 set. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella* / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, **Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doencas-diarreicas-agudas/manual-tecnico-de-diagnostico-laboratorial-das-salmonella-spp.pdf/view> >. Acesso em 04 nov. 2024.

BOTELHO, S. S. et al. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias** [Internet].32(2):659-682, 2011. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744101026>. Acesso em 29 nov.2024.

CDC-Centers for **Disease Control and Prevention**. (2020). Foodborne germs and illnesses. <<http://www.cdc.gov/foodsafety/foodbornegerms>>.

CHANG, J. M.; FANG, T. J. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium* in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 24, n.7-8, p.745-751, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.005>. Acesso em: 04 set. 2024.

CHANG, R.; PANDEY, P.; JAMES, P.; PANDEY, P.; LI, Y.; ZHANG, R.; WEIMER, B.C. Assessment impacts of ozone on *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in liquid dairy waste. **Appl. Sci.**12,13,6527, 2022 <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/13/6527>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO CONAB. Mercado Hortigranjeiro nas Centrais de Abastecimento, Resumo Executivo Semanal nº 44, 2024. Disponível em: <file:///C:/Users/Cliente/Desktop/o%20tomate/rferencias/Resumo-Executivo-Prohort-44.pdf>. Acessado em 11 ov. 2024.

DAS_, E., G. C. GURAKAN, A. BAYINDIRLI. Effect of controlled atmosphere storage, modified atmosphere packaging and gaseous ozone treatment on the survival of *Salmonella Enteritidis* on cherry tomatoes. **Food Microbiol.** 23:430–438,2006.

EHUWA, O.; JAMAL, M. A.; ROULY, M. *Salmonella*, food safety and food handling practices: A review. **Current Opinion in Food Science**, v. 39, p. 68-75,

2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.05.007>. Acesso em: 4 set. 2024.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produção de tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/tomate#:~:text=O%20Brasil%20n%C3%A3o%20s%C3%B3%20%C3%A9%20adotadas%20para%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o>. Acessado em: 11 nov. 2024.

ENG, S. K.; PADMAN, J.; HE, Z.; ZHANG, Q.; CHUNG, Y. C. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, p. 284-293, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>. Acesso em: 4 set. 2024.

EPELLE, E.I.; MACFARLANE, A.; CUSACK, M.; BURNS, A.; AMAEZE, N.; RICHARDSON, K.; MACKAY, W.; RATEB, M.E.; YASEEN, M. Stabilisation of Ozone in Water for Microbial Disinfection. **Environments** 2022, 9, 45. <https://doi.org/10.3390/environments9040045>

FAOUR-KLINGBEIL, D., TODD, E.C.D., KURI, V., Microbiological quality of ready-to-eat fresh vegetables and their link to food safety environment and handling practices in restaurants. **LWT - Food Science and Technology**. Volume 74, p. 224-233, 2016, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643816304625> .

FARKAS, J.; PINTER, R. Efficacy and challenges in the use of ozone in food processing: A review. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15056>. Acesso em: 4 set. 2024.

FERREIRA, Cássia Thaís Pessoa de Albuquerque. Condições higiênic-sanitárias e sua importância para a prevenção de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocasionados por *Salmonella* spp. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 4, 2021. Disponível em: <https://revistascientificas.ifrj.edu.br/index.php/alimentos/article/view/1910> . Acesso em: 29 nov. 2024.

FLEMMING, H. C., & WINGENDER, J. (2010). The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>, 2010 8:9.

GIAOURIS, E. E., SIMOES, M. V (2018). Chapter 11-pathogenic biofilm formation in the food industry and alternative control strategies. In A. M. Holban, & A. M. Grumezescu (Eds.), *Foodborne diseases* (pp. 309–377). **Academic Press**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00011-7>.

GONÇALVES, S.; MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; RUIZ, M. L. Efficacy of ozone in reducing microbial load and preserving quality of fresh-cut vegetables. **Food Control**, v. 121, p. 107611, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107611>. Acesso em: 4 set. 2024.

GUO, S., HUANG, R., & CHEN, H. Application of water-assisted ultraviolet light in combination of chlorine and hydrogen peroxide to inactivate Salmonella on fresh produce. **International Journal of Food Microbiology**, 257, 101–109, 2017. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.017](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.017)

GUTIÉRREZ-CHAVEZ, C., BENAUD, N., FERRARI, B. C. The ecological roles of microbial lipopeptides: Where are we going? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 19, 1400–1413, 2021. <<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.017>.

GÜNDÜZ, G. T., ŞEN, A. GÖNÜL, M. KARAPINAR. 2009. Efficacy of myrtle oil against Salmonella Typhimurium on fresh produce. **Int. J. Food Microbiol.** 130:147–150.

HANNING, I. B., J. D. NUTT, AND S. C. RICKE. Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. **Foodborne Pathog. Dis.** 6:635–648, 2009. Disponível em: DOI: [10.1089/fpd.2008.0232](https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0232). Acesso em 04 set. 2024.

HINTZ, L. D., R. R. BOYER, M. A. PONDER, R. C. WILLIAMS, S. L. RIDEOUT. Recovery of Salmonella enterica Newport introduced through irrigation water from tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit, roots, stems, and leaves. **HortScience** 45:675–678, 2010. DOI: [10.21273/HORTSCI.45.4.675](https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.4.675)

HITCHINS, A. D.; JINNEMAN, K; CHEN, Y. Food and Drug Administration Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. **Bacteriological Analytical Manual**, Ch. 10. (2016) Disponível online em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScience>

HUR, J.; CHOI, Y.; PARK, J. H.; KO, G. Global trends in antimicrobial resistance of Salmonella enterica serotypes isolated from humans and animals: **A review. Veterinary Quarterly**, v. 39, n. 1, p. 48-54, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1576405>. Acesso em: 4 set. 2024.

IBARRA-SANCHEZ, L. S., S. ALVARADO-CASILLAS, M. O. RODRIGUEZ-GARCIA, N. E. MARTINEZ-GONZALES, A. CASTILLO. 2004. Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemicals. **J. Food Prot.** 67:1353–1358.

INATSU, Y., BARI, M. L., KAWASAKI, S., KITAGAWA, T., NAKAMURA, N.; NEI, D.; KAWAMOTO, S. (2011). Effectiveness of stable ozone microbubble water on reducing bacteria on the surface of selected leafy vegetables. **Food Science and Technology Research**, 17(6), 479-485.

ITURRIAGA, M. H., M. L. TAMPLIN, E. F. ESCARTÍN. Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature. **J. Food Prot.** 70:30–34, 2007. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.1.30>.

JONES, J.; BARCLAY, C.; PETERSON, A. Global standards for food safety and the control of pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 239-261, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-091719-060012>. Acesso em: 4 set. 2024.

KOSEKI, S., ISOBE, S. (2006). Effect of ozonated water treatment on microbial control and on browning of iceberg lettuce (*Lactuca sativa*). **Journal of Food Protection**, 69, 154–160.

KOZUSNY-ANDREANI, Dora Inés et al. In vitro inactivation of pathogenic bacteria by the use of ozone in different exposure times. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 70, n. 1, p. 34-44, 2018.

KUMAR V., MRITUNJAY S. K. Fresh farm produce as a source of pathogens: a review. **Research Journal of Environmental Toxicology**.9(2):59–70, 2015. DOI: [10.3923/rjet.2015.59.70](https://doi.org/10.3923/rjet.2015.59.70)

KWÁSNIIEWSKA, D., CHEN, Y. L., & WIECZOREK, D. (2020). Biological activity of quaternary ammonium salts and their derivatives. In **Pathogens**. Vol. 9, p.1–12, 2020. MDPI AG. Disponível em: doi: [10.3390/pathogens9060459](https://doi.org/10.3390/pathogens9060459). Acesso em 04 nov. 2024.

L. R. BEUCHAT, GUO, X., J. CHEN, AND R. E. BRACKETT. Survival of *Salmonella* on tomatoes stored at high relative humidity, in soil, and on tomatoes in contact with soil. **J. Food Prot.** 65:274–279, 2002.

LAROQUE, D. A et al. Cold plasma in food processing: Design, mechanisms, and application, *Journal of Food Engineering*, Volume 312, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877421002740>. Acesso em 04 nov. 2024.

LEE JJ, EIFERT JD, JUNG S., STRAWN LK (2018) Cavitation Bubbles Remove and Inactivate *Listeria* and *Salmonella* on the Surface of Fresh Roma Tomatoes and Cantaloupes. **Front. Sustain. Food Syst.** 2:61. doi: 10.3389/fsufs.2018.00061

LI, X.; BETHUNE, L. A.; YAO, J.; PHILLIPS, R.; WANG, L.; SHI, L.; WANG, Y.; JIANG, Q.; CHENG, G. *Salmonella* prevalence in meat samples from retail markets and quantitative risk assessment of human salmonellosis in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 292, p. 27-35, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.016>. Acesso em: 4 set. 2024.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; BAGGIO, A.; Innocente, N. Inactivation of Foodborne Bacteria Biofilms by Aqueous and Gaseous Ozone. **Front. Microbiol.** 2018, 9 doi: 10.3389/fmicb.2018.02024.

MARTINELLI, M., GIOVANNANGELI, F., ROTUNNO, S., TROMBETTA, C. M., MONTOMOLI, E. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. **J. Preven. Med. Hyg.** 58, E48–E52, 2017. doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2017.58.1.757.

MARTINS, P. A. et al. Biofilm formation capacity of Salmonella strains isolated from broiler carcasses and abattoir environments. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 42-47, 2018. Disponível em: Acesso em: 29 nov. 2024.

MARVASI et al.: Systematic analysis of the ability of Nitric Oxide donors to dislodge biofilms formed by Salmonella enterica and Escherichia coli O157:H7. **AMB Express** 2014 4:42. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4070026/> .

MENDOZA IC, et al. Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables. **Food science and technology.** 2022 Aug 1; 165:113714. doi:10.1016/j.lwt.2022.113714. .

MONTVILLE, T. J.; MATTHEWS, K. R. Food microbiology: **An introduction**. 3. ed. Washington, DC: ASM Press, 2017.

MSIMANGO T, DUVENAGE S, DU PLESSIS EM, KORSTEN L. Microbiological quality assessment of fresh produce: Potential health risk to children and urgent need for improved food safety in school feeding schemes. **Food Sci Nutr.** Jul 9;11(9):5501-5511, 2023. doi: 10.1002/fsn3.3506.

MUSTAPHA, A. T., ZHOU, C., WAHIA, H., AMANOR-ATIEMOH, R., OTU, P., QUDUS, A., FAKAYODE, O. A., & MA, H. (2020). Sonozonation: Enhancing the antimicrobial efficiency of aqueous ozone washing techniques on cherry tomato. **Ultrasonics Sonochemistry**, 64, 1050-1059.

O'DONNELL, C.; TUMA, D.; BALASUBRAMANIAM, V. M. Ozone as a sanitizing agent for food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 64, p. 42-51, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.015>. Acesso em: 4 set. 2024.

OLAIMAT, A. N., HOLLEY, R. A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. **Food Microbiology**, 32(1), 1–19, 2012. <doi:10.1016/j.fm.2012.04.016>.

OLIVEIRA, A. A.; SOARES, D. V.; MENDES, P. J. Use of chlorine and alternative disinfectants for fresh produce sanitization: Efficacy and limitations. **Food Science and Technology International**, v. 26, n. 7, p. 559-571, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1082013219894725>. Acesso em: 4 set. 2024.

PASCUAL, A., LLORCA, I., CANUT, A. (2007). Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Trends Food Sci. Technol.** 18, 29–35. doi: 10.1016/j.tifs.2006.10.006.

PEREIRA, R. A.; GONÇALVES, M. J.; ALMEIDA, J. D. Efficiency of ozone treatment in reducing microbial contamination in fresh produce. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 4, p. e15123, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15123>. Acesso em: 4 set. 2024.

PONCE, A. G.; CONDE, L. R.; BRU, E.; MOREIRA, M. R. Ozone applications in fresh produce: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 20, n. 2, p. 1450-1467, 2021. Disponível em: doi: [10.3390/foods10030605](https://doi.org/10.3390/foods10030605). Acesso em: 4 set. 2024.

RAJWAR, A., SRIVASTAVA, P., & SAHGAL, M. (2016). Microbiology of Fresh Produce: Route of Contamination, Detection Methods, and Remedy. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 56(14), 2383–2390. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.841119> .

SANTOS, L. R. et al. Dinâmica de formação de biofilmes multiespécies de *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de procedimentos de higienização. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre**, 2021. Disponível em: Acesso em: 29 nov. 2024.

SARRON, E.; GADONNA-WIDEHEM, P.; AUSSÉNAC, T. Ozone treatments for preserving fresh vegetables quality: A critical review. **Foods** 10, 605,2021. <https://doi.org/10.3390/foods10030605>

SCHREINER, L. L. **Padrões Microbiológicos de Alimentos – Conceitos e Alterações**. ANVISA. 2020. <<https://www.gov.br> > pt-br > alimentos > arquivos>.

SHEZI, S., SAMUKELO MAGWAZA, L., MDITSHWA, A., & ZERAY TESFAY, S. Changes in biochemistry of fresh produce in response to ozone postharvest treatment. **Scientia Horticulturae**, v. 269, (27), 109397, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423820302259#pre-view-section-cited-by>. Acesso em: 24 nov. 2024.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SILVA, M. F. S. et al. Biofilmes de patógenos na indústria de alimentos: uma revisão sobre a sua formação e controle. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 40, n. 2, p. 1-10, 2020. Disponível em: Acesso em: 29 nov. 2024.

SINGH, P., HUNG, Y. C., QI, H. Efficacy of peracetic acid in inactivating foodborne pathogens on fresh produce surface. **Journal of Food Science**, 83(2), 432–439, 2018. Disponível em: DOI: [10.1111/1750-3841.14028](https://doi.org/10.1111/1750-3841.14028). Acesso em 04 set. 2024.

SIQUEIRA, A. B. **Regulamentação de segurança alimentar: fundamentos e práticas**. São Paulo: Editora Saúde, 2022.

SOUZA, E. L. et al. Adesão e formação de biofilme de *Escherichia coli* em diferentes superfícies e condições ambientais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 27, n. 3, p. 123-129, 2020. Disponível em: Acesso em: 29 nov. 2024.

STEARNS, R.; COREY COE, C.; HOLÁSKOVÁ, I.; MATAK, K.; FRESHOUR, A.; JACZYNSKI, J.; XUE, J.; LUO, Y.; JONES, L.; WANG, X.; SHEN, C. Efficacy of triple-wash using a peroxyacetic acid and hydrogen peroxide solution at reducing populations and cross-contamination of *Salmonella Typhimurium* and the surrogate on tomatoes, **LWT Food Science and Technology** 175 (2022) 114499. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114499>

SUN, M., YE, S., XU, Z., WAN, L., & ZHAO, Y. (2021). Endophytic *Bacillus altitudinis* Q7 from *Ginkgo biloba* inhibits the growth of *Alternaria alternata* in vitro and its inhibition mode of action. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 35(1), 880–894. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1936639>.

SYLVESTER PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. **Meth Mol Biol**, 2011; 716:157-68. doi: 10.1007/978-1-61779-012-6_9.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: An introduction**. 12. ed. Boston: Pearson, 2017.

THOLE, V., VAIN, P., YANG, R.-Y., ALMEIDA BARROS DA SILVA, J., ENFISSI, E. M. A., NOGUEIRA, M., PRICE, E. J., ALSEEKH, S., FERNIE, A. R., FRASER, P. D., HANSON, P., MARTIN, C. Analysis of tomato post-harvest properties: Fruit color, shelf life, and fungal susceptibility. **Current Protocols in Plant Biology**, 5, e 20108, 2020. doi: <https://doi.org/10.1002/cppb.20108>

VASILIEV, A.; DEMIRCI, A.; BIALKA, K. L. Ozone applications in food safety: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 256-274, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12705>. Acesso em: 4 set. 2024.

VELAZQUEZ, C. A.; TALLON, F. A.; HUGGINS, R. Advances in HACCP implementation in food industries. **Food Control**, v. 98, p. 79-92, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.035>. Acesso em: 4 set. 2024.

VIVEK, K., SURANJOY SINGH, S., RITESH, W., SOBERLY, M., BABY, Z., BAITE, H., MISHRA, S., & PRADHAN, R. C. A review on postharvest

management and advances in the minimal processing of fresh-cut fruits and vegetables. In **Journal of microbiology, Biotechnology and food sciences** Vol. 8, pp. 1178–1187, 2019. Disponível em: <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/8843>. Acessado em 04 set. 2024.

YARON, S.; ROEMLING, U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 496-516, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12186> Acesso em: 4 set. 2024.

YOUSEF, A. E., J.-G. KIM, S. DAVE. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods—a review. **J. Food Prot.** 62:1071–1087.

WHO - World Health Organization. **WHO-global-strategy-food-safety-2022-2030**. p.56,2022 <[https://cdn.who.int > media > docs > default-source](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/)>.

WIEDEMANN, Agnès; VIRLOGEUX-PAYANT, Isabelle; CHAUSSÉ, Anne-Marie; SCHIKORA, Adam; VELGE, Philippe. Interações da Salmonella com animais e plantas. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 791, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25653644/>> Acesso em: 29 nov. 2024.

WU, S., NIE, Y., ZHAO, J., FAN, B., HUANG, X., LI, X., SHENG, J., MENG, D., DING, Y., & TANG, X. The synergistic effects of low-concentration acidic electrolyzed water and ultrasound on the storage quality of fresh-sliced button mushrooms. **Food and Bioprocess Technology**, 11(2), 314–323, 2018. Disponível em: DOI:[10.1007/s11947-017-2012-2](https://doi.org/10.1007/s11947-017-2012-2). Acesso em 04 nov. 2024.

ZAMUNER, C. F. C., DILARRI, G., BONCI, L. C., SALDANHA, L. L., BEHLAU, F., MARIN, T. G. S., SASS, D. C., BACCI, M., FERREIRA, H. A cinnamaldehyde-based formulation as an alternative to sodium hypochlorite for post-harvest decontamination of citrus fruit. **Tropical Plant Pathology**, 45(6), 701–709, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00338-9>. Acessado em 24 nov. 2024.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5th edition. Essex: Prentice Hall, 2009. 960p.

ZHANG, Z.; LIU, F.; TANG, J.; YANG, R.; YE, X.; CHEN, Z. High moisture extrusion technology of meat analogues: A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 55, p. 202-218, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.05.011>. Acesso em: 4 set. 2024.

ZHOU, B., Y. LUO, X. NOU, Y. YANG, Y. WU, Q. WANG. Effects of postharvest handling conditions on internalization and growth of Salmonella enterica in tomatoes. **J. Food Prot.** 77:365– 370, 2014. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-307> .