



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS TECNOLÓGICOS PARA
PRESERVAÇÃO E DESCONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS”**

Shirly Marleny Lara Pérez

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Coorientadora: Dra. Kate Cristina Blanco

Bolsista: 23964310808

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001

São Carlos - SP
2020

SHIRLY MARLENY LARA PÉREZ

**“DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS TECNOLÓGICOS PARA
PRESERVAÇÃO E DESCONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS”**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Coorientadora: Dra. Kate Cristina Blanco

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristina Paiva de Sousa
Departamento de Microbiologia- UFSCar

Dr. Fernanda Alves Dias de Sousa
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

São Carlos
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Shirly Marleny Lara Perez, realizada em 04/03/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato (USP)

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa (UFSCar)

Profa. Dra. Fernanda Alves Dias de Sousa (IFSC/USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Lara Pérez, Shirly Marleny

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS TECNOLÓGICOS PARA
PRESERVAÇÃO E DESCONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS / Shirly
Marleny Lara Pérez. -- 2020.

78 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São
Carlos, São Carlos

Orientador: Vanderlei Salvador Bagnato

Banca examinadora: Cristina Paiva de Souza, Fernanda Alves Dias de
Sousa, Vanderlei Salvador Bagnato

Bibliografia

1. Descontaminação de alimentos. 2. Luz UV-C. 3. Ozônio. I.
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325

*A mi Abuelo Adonías, que dejó este espacio terrenal, pero sigue en mi mente y por
siempre en mi corazón
A mis padres, Jairo y Eddy, que me motivan siempre a creer que todo es posible, me
apoyan y creen en mi potencial.*

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem caminhar, os momentos bons ou não que temos que passar, são para nosso próprio aprendizado porque é exatamente que é isso a vida: de momentos... poder dizer as pessoas que nada foi em vão, que o amor existe, que vale a pena se doar as amizades e as pessoas, que a vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim ... e que valeu a pena. E nunca esquecendo do mais importante, nada na vida é por acaso!

Chico Xavier e Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu criador pela oportunidade de vida, por me dar forças e seu amor incondicional e permitir estar aqui vivenciando tudo isto, lembrando-me que tudo nesta terra é temporário, mas que devemos sempre nos esforçar para fazer tudo com amor, se não fosse por sua graça, vontade em minha vida eu não poderia chegar até aqui. Deus sempre tem sido fiel.

Aos meus pais por suas orações, todo o amor e apoio de sempre. Por me motivar e me lembrar que tudo ficará bem, e especialmente minha mãe, porque ela sempre teve palavras de encorajamento e amor em todas as etapas deste processo. À minha família, por todo seu amor, que possamos sempre continuar unidos, desde qualquer lugar do mundo!

Ao meu amor Emmanuel, meu melhor amigo, meu porto seguro, a pessoa que me ensinou a querer nossas pesquisas e laboratórios, sua dedicação me surpreende e sua resiliência para afrontar os problemas de laboratório. Dia a dia me ensina que as dificuldades só nos acrescentam e nos ensinam muito mais que o caminho fácil, sinto muita admiração por seu trabalho pois tem que ter muita garra e convicção, poucos fazem o que você faz. Você me enche de orgulho. Obrigada por me dar apoio quando mais precisei. Eu fui muito abençoada por ter alguém que me ama do jeito doído que eu sou. Te amo!

A Meus orientadores; Professor Vanderlei quem me recebeu e aceitou no seu grupo, acreditou no meu trabalho. Sempre ensinando com sua trajetória a ter disciplina, dedicação, responsabilidade e amor pela ciência. Mostrando-nos que sempre podemos dar mais. Sinto muita admiração pelo que faz. Desde ciência básica até a ciência virar para a sociedade! Eu fui muito afortunada de conhecê-lo. Obrigada. A Kate que além de ser minha orientadora se tornou uma grande amiga, obrigada por todos os seus ensinamentos, pela motivação quando tudo parecia caos. Eu fui muito abençoada de chegar até você e ser você quem me leva pela mão no caminho da ciência, com seu amor e dedicação por seu trabalho você conseguiu me mostrar esse lado bonito que a academia tem. Também quero agradecer a Thaila, por todos os conselhos, apoio, conversas, desabafos e pela motivação para culminar este projeto, além de tudo ser um exemplo de profissional no laboratório, muito obrigada.

A Jennifer, eu tenho um carinho muito especial por você, fui muito feliz em hoje poder te chamar amiga pois você é muito difícil de conquistar. Agradeço sua visão que sempre foi

objetiva e motivadora quando até eu mesma desconfiava de meu potencial, o amor que você tem pelo seu trabalho ainda me faz acreditar que devemos fazer o que nos traga felicidade. Obrigada por tudo Jenninha! E também quero agradecer ao Lucas pela parceria, sempre ser bem-vinda na sua casa, muitos roles de comer até passar mal, açaí, e muitas risadas; vocês fazem meus dias felizes.

A Larissa por seus conselhos, muitíssimas conversas, marmitas, e sempre disposta a me ajudar. Eu adoro você! A Amandinha sempre com muita energia me contagiando para os treinos, experimentos e roles, eu sou muito feliz de poder contar com você. A Paulinha e Hilde, que são pessoas muito dedicadas a seu trabalho e ter vocês de perto são um exemplo para todos nós, tenho muita admiração. Ao Renan uma pessoa muito humilde que sempre soube tudo o que eu já perguntei. A Camilinha por ser tão delicada, fofa e muito carinhosa comigo. Ao Matheuzera sempre alegrando meus dias. Ao Didi que sempre disposto ajudar, nos escuta e tem um coração de ouro! O Lucas pela parceria e amizade. E Ao Johan que se tornou um grande amigo. Obrigada a todos!

A minha amiga Katherine, por sempre me dar apoio, ânimos, muitos bolos e cuidar de mim como se eu fosse uma irmã pequena.

A meus amigos do Lab, Giulia, que sempre me escutou e sempre nos demos ânimos e força para continuar. Marlon sempre disposto a ajudar, Geisinha sempre muito doce com palavras de ânimo. Michelle e Helô vocês são muito fortes! A doidinha Thays por ser sempre amigável e receptiva conmigo, Keiko pela ajuda e motivação. E também a Leti que começamos juntas neste caminho. Obrigada a todos!

Fernanda Alves por todas as conversações de motivação, agradeço muito todos seus conselhos e contribuição valiosa no trabalho. Muito obrigada!

A Lili, sempre realista, muito objetiva que nos ajuda pensar melhor sobre a vida. Também admiro muito seu trabalho como pesquisadora e sobre todo o papel mais importante como mãe. A professora Cristina Kurachi, pelos conselhos e por sempre estar disposta ajudar e ao professor Sebastião pela contribuição no trabalho, A Naty também pelas conversas e conselhos durante meu mestrado.

Ao Daniel (Chavinho) que sempre esteve disposto a ajudar, obrigada por me aguentar quase todos os dias e não desistir deste projeto.

Ao Programa de Pós graduação em Biotecnologia (*PPG-Biotec*) da UFSCar, pela oportunidade.

A professora Ignez, sua frase num começo de aula me marcou para sempre neste mundo da pesquisa “A todos os cientistas, a pesquisa tem que ser imperfeita, pois quando ela chega a ser perfeita, o nosso trabalho acabou” e também por todo o que faz pelo nosso programa.

A Claudia Pastega, secretaria do *PPG-Biotec*, que sempre amigável, receptiva e sempre nos ajuda a resolver todos os problemas.

Aos membros da Banca examinadora por aceitarem participar o processo de avaliação deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar do processo de avaliação e contribuições deste trabalho.

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), CEPOF e ao laboratório de Biofotônica, pela infraestrutura e apoio para a realização deste projeto.

Aos membros da secretaria do Grupo de Óptica do IFSC, que sempre estiveram dispostos ajudar. Obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Obrigada a todos!

RESUMO

As contaminações de alimentos causadas por microrganismos ocorrem por manipulação e/ou processamento, os quais podem mudar suas características físico-químicas e diminuir o tempo de prateleira, além de causar doenças. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ozônio gasoso além da combinação da luz UV-C e ozônio aquoso analisando assim, a melhor forma de disponibilizá-lo para inativar bactérias contidas superficialmente em carnes bovinas com contaminações *in natura* e *Escherichia coli*. Foi construído um protótipo para o ozônio gasoso, a avaliação em amostras inertes submetidas ao ozônio gasoso teve diminuição de 3,88 Log (UFC/cm²) de *E. coli* em 30 minutos e para amostras de carne bovina com contaminações *in natura* a redução microbiana foi de 50% em 10 minutos. Foi conduzido experimentos para avaliar os comportamentos microbiológicos da carne simulando situações da exposição no açougue de 12 horas, os resultados mostraram que no tempo de exposição de 30 minutos de ozônio gasoso teve redução de 2,18 Log (UFC/cm²), e após da segunda refrigeração de 12 horas se manteve a carga inativada, no entanto a amostra controle final em condições iguais de temperatura e sem tratamento teve proliferação de 1,7 Log (UFC/cm²). Para a avaliação dos tratamentos combinados de ozônio aquoso e luz UV-C, foi construído o equipamento e testado em carnes bovinas contaminadas com *E. coli*, as amostras foram sometidas a 10 ciclos repetitivos para os tratamentos combinados e isolados. O tratamento de luz UV-C obteve uma redução de 1,3 Log (UFC/cm²) no último ciclo da amostra e para o tratamento de ozônio aquoso não teve diferença significativa na inativação microbiana até o último ciclo ($p < 0,05$), mas apresentou diferença significativa para amostra controle final do experimento, a qual teve crescimento de 0,6 Log (UFC/cm²), os ciclos combinados de luz UV-C e ozônio aquoso mostraram inativações semelhantes de 0,7 Log (UFC/cm²) aproximadamente e todos os tratamentos combinados e isolados apresentaram preservação do alimento evitando a proliferação exponencial dos microrganismos. Foi realizada a avaliação das propriedades organolépticas das carnes após os tratamentos, a verificação do pH, quantificação de proteínas pelo método *Bradford*, e ensaios de TBARS foram realizadas para os dois protótipos e para ozônio gasoso, também foram analisadas lâminas histológicas para verificação de danos estruturais, e capacidade de retenção da água. As avaliações organolépticas não mostraram diferenças significativas em relação as amostras controle, para as duas tecnologias; ozônio gasoso e combinação de luz UV-C e ozônio aquoso, mostrando potencial na descontaminação de alimentos sem deteriorar sua qualidade organoléptica.

Palavras chaves: Carne; ozônio; luz ultravioleta; descontaminação; bactérias; *E. coli*; UV; O₃

ABSTRAT

Contamination of foods caused by microorganisms occurs through their handling and or processing, which can change their physical-chemical characteristics and decrease shelf life, and cause infection. The objective of this work was to evaluate the effect of gaseous ozone (O₃) and to the combination of ultraviolet light and aqueous ozone, to analyze the best protocol that makes it available to inactivate bacteria contained superficially on beef with in *natura* contaminations and by *Escherichia coli*. A prototype for gaseous ozone was designed, and the evaluation in inert samples submitted to gaseous ozone decreased around 3,88 Log (CFU / cm²) of *E. Coli* in 30 minutes, and for beef samples with *in natura* contamination, the microbial reduction was 50% after 10 minutes. Experiments were conducted to evaluate the microbiological behavior of the meat simulating exposure situations in the 12-hour butcher shop, the results showed that in the 30 minutes exposure time there was a reduction of 2,18 Log (CFU / cm²), and in the second refrigeration the load was inactivated, however, the control sample under equal temperature conditions and without treatment had a proliferation of 1,7 Log (CFU / cm²). To evaluate the combined treatments of ozone in aqueous phase and ultraviolet light, the equipment was built and tested against *E. coli* on contaminated beef. Samples were added to 10 repetitive cycles for the combined and isolated treatments. For the isolated treatment of ultraviolet light, a reduction of 1.3 Log (CFU / cm²) was obtained at the end of cycles and for the ozone treatment, there was no significant difference in microbial inactivation ($p < 0,05$), but there was a difference for the final control sample of the experiment, which grew by 0,6 Log (CFU / cm²), the combined cycles showed similar inactivation of 0,7 Log (CFU / cm²) approximately and all combined and isolated treatments showed food preservation avoiding the exponential proliferation of microorganisms. The organoleptic properties of the meat were evaluated after the treatments, the pH was checked, the protein quantified by the *Bradford* method, and TBARS tests were performed for both prototypes and gaseous ozone, histological slides were also analyzed for structural damage and water holding capacity. Organoleptic evaluations did not show significant differences about the control samples, for both technologies; gaseous ozone and combination of ultraviolet light and aqueous ozone and showing potential for decontamination of food without deteriorating its quality.

Keywords: Meat; ozone; UV light; decontamination; bacteria; *E. coli*; UV; O₃

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Contaminações microbianas contidas em carne vermelha, frango, peixe e porco, em açougues aleatórios da cidade de São Carlos, SP. Fonte: Elaborada pela autora.....	19
Figura 2 Ilustração da formação do ozônio por luz UV-C fornecida pelo sol. Fonte: Elaborada pela autora.....	20
Figura 3 Ilustração da produção do ozônio por descarga corona. Fonte: Elaborada pela autora.	20
Figura 4 Ilustração Da dimerização da timina por efeito da luz UV-C. Fonte: Barbosa et.al ^[39] (2004). Adaptada pela autora.....	24
Figura 5 Montagem do protótipo. (a) Equipamento com cilindro (câmara isolada), (b) Gerador de ozônio Blue Ocean®, (c) Visão interna do cilindro. Fonte: Elaborada pela autora.	28
Figura 6 Avaliação do protótipo de ozônio gasoso para superfície inerte (arruela de aço inox) contaminada com E. coli, em tempos de exposição ao ozônio de 1, 10 e 30 minutos, e tempos de espera para a coleta microbiológica imediatamente após o tratamento (0h) e após 2 horas (2h). *Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). Os valores expressam a média e desvio padrão. Fonte: Elaborado pela autora.....	34
Figura 7 Avaliação do protótipo de ozônio gasoso para carnes bovinas contaminadas com E. coli, em tempos de exposição ao ozônio de 1, 10 e 30 minutos, e tempos de espera para a coleta microbiológica imediatamente após o tratamento (0h) e após 2 horas (2h). *Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). Os valores expressam a média e desvio padrão. Fonte: Elaborado pela autora.	35
Figura 8 Avaliação do protótipo de ozônio gasoso para carnes bovinas com contaminação própria (in natura), utilizando a técnica de coleta homogeneização (A) e swab (B). *Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). Os valores expressam a mediana. Elaborado pela autora.	37
Figura 9 Ciclos de refrigeração de 12 horas e tratamento de ozônio gasoso de 1, 10 e 30 minutos, em carne bovina contaminada com diferentes espécies microbianas. * Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$) ● significativamente diferente do 12 ($p < 0,05$) Δ Significativamente diferente do 12+ ($p < 0,05$). Os valores expressam a média e desvio padrão. Elaborado pela autora.	38
Figura 10 a) Exposição ao ozônio gasoso por 1 min, variando tempo de espera entre ciclo de 1 hora, 30 min, 10 min em amostras de carne. b) Exposição ao ozônio gasoso por 10 min, variando tempo de espera entre ciclo de 30 min, 10 min em amostras de carne. *Significativamente	

diferente do controle e 0* ($p < 0,05$). Os valores expressam a mediana. Elaborado pela autora.	40
Figura 11 Desenho ilustrativo do equipamento com os componentes e suas respectivas localizações no balcão multifuncional. Elaborado pelo LAT.....	42
Figura 12 Fotos do sistema de geração de ozônio e do balcão multifuncional. (A) Sistema de visualização do software eletrônico que controla o sistema. (B) Tanque em aço inox com serpentinas de refrigeração. (C) Aspersores instalados na parte superior do balcão. (D) Lâmpadas UV-C instaladas na parte superior do balcão. Elaborada pela autora	43
Figura 13 Irradiação de luz UV-C em amostras de carne bovina contaminadas com E. coli durante ciclos de 1 hora. A dose de luz para cada ciclo foi de 69 mJ/cm^2 . No gráfico, A representa as amostras de carne que foram penduradas na parte superior do balcão, B representa as amostras de carne que foram colocadas na base do balcão, e 0 representa as amostras de carne que não receberam irradiação, sendo amostras controles avaliadas no início e no final dos experimentos. Os valores expressam a média e desvio padrão. *Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). Elaborada pela autora	45
Figura 14 Ciclos de aspersão de ozônio aquoso (0,9 ppm) em amostras de carne bovina contaminadas com E. coli. No gráfico, A representa as amostras de carne que foram penduradas na parte superior do balcão, B representa as amostras de carne que foram colocadas na base do balcão, e 0 representa as amostras de carne que não receberam irradiação, sendo amostras controles avaliadas no início e no final dos experimentos. Os valores expressam a média e desvio padrão. *Significativamente diferente ($p < 0,05$). Elaborada pela autora.....	46
Figura 15 Combinação do ozônio aquoso com luz UV-C (a) Ciclos combinados de luz UV e ozônio aquoso simultâneos, (b) Ciclos alternados de luz UV-C e ozônio aquoso em amostras de carne bovina contaminadas com E.coli. * Significativamente diferente ($p < 0,05$), **Significativamente diferente de todos ($p < 0,05$). Os valores expressam a média e desvio padrão. Elaborado pela autora	48
Figura 16 Curva padrão de Albumina de soro bovino (BSA), absorbância medida em 595 nm. Elaborada pela autora.	58
Figura 17 Cortes transversais de amostras de músculos de carne bovina expostas ao ozônio gasoso. (A) Controle, (B) tempo de 1 minuto, (C) 10 minutos, (D) 30 minutos. Coloração HE (hematoxilina e eosina). Aumento 4x. Elaborado pela autora.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Água, proteína e gordura em gramas para cada 100 g de carne crua vermelha bovina. Fonte: FSA,2002 ^[13] Adaptada pela autora	14
Tabela 2 Conteúdo de Vitaminas por 100 g de carne crua vermelha bovina. Fonte: FSA, 2002[13]. Adaptada pela autora.....	15
Tabela 3 Conteúdo de minerais por 100 g de carne crua vermelha bovina. Fonte: FSA, 2002 ^[13] . Adaptada pela autora	16
Tabela 4 Principais efeitos de contaminação bacteriana em carnes cruas bovina. Adaptada pela autora.	17
Tabela 5 Resumo de uso de as aplicações do ozônio para redução microbiana. Elaborada pela autora	23
Tabela 6 Resumo de uso de as aplicações da luz ultravioleta UV-C para redução microbiana. Elaborada pela autora	26
Tabela 7 Medida de pH em amostras de carnes expostas ao ozônio gasoso 1, 10, 30 minutos e amostra controle. Elaborada pela autora.....	56
Tabela 8 Medida de pH em amostras de carnes expostas combinados de luz UV-C e ozônio aquoso. Elaborada pela autora.	56
Tabela 9 Efeito do tempo de tratamento com ozônio gasoso na oxidação lipídica de amostras de carne bovina. Os valores são apresentados com a média e desvio padrão. Elaborada pela autora.	57
Tabela 10 Efeito do tempo de tratamento com ozônio aquoso e luz UV-C na oxidação lipídica de amostras de carne bovina. Os valores são apresentados com a média e desvio padrão. Elaborada pela autora	57
Tabela 11 Quantidade total de proteínas em carne bovina tratadas com ozônio gasoso. Elaborada pela autora.	58
Tabela 12 Quantidade total de proteínas em carne bovina tratadas com ozônio aquoso e luz UV-C * Significativamente diferente (p<0,05). Elaborada pela autora.	59
Tabela 13 Medidas de CRA para amostras de carne expostas ao ozônio gasoso por 1, 10 e 30 min e amostra controle. Elaborada pela autora.....	60

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRAT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
SUMÁRIO	14
PREFÁCIO	17
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Carnes	14
2.2 Microbiologia das carnes	16
2.3 Tecnologias para descontaminação de carnes frescas	18
2.4 Ozônio	19
2.5 Aplicações do ozônio nos alimentos	20
2.6 Luz ultravioleta	24
2.7 Uso de luz UV-C nos alimentos	24
3 OTIMIZAÇÃO DO USO DO OZÔNIO GASOSO PARA PRESERVAÇÃO DE CARNES BOVINAS	27
3.1 Contextualização	27
3.2 Objetivo geral	27
3.2.1 <i>Objetivos específicos</i>	27
3.3 Metodologia	27
3.3.1 <i>Protótipo de descontaminação de alimentos</i>	28
3.3.2 <i>Microrganismos</i>	28
3.3.3 <i>Preparo das amostras</i>	29
3.3.3.1 <i>Superfícies inertes</i>	29
3.3.3.2 <i>Carnes Bovinas</i>	29
3.3.3.2.1 <i>Contaminação com Escherichia Coli</i>	29
3.3.3.2.2 <i>Amostras in natura</i>	29
3.3.4 <i>Tratamento com ozônio gasoso em superfícies inertes e carnes bovinas</i>	30
3.3.5 <i>Análise do tratamento</i>	30
3.3.5.1 <i>Swab</i>	30
3.3.5.2 <i>Homogeneização</i>	30

3.3.6	<i>Ciclos de refrigeração com disponibilização do ozônio gasoso</i>	31
3.3.7	<i>Exposições ao ozônio gasoso com variações no tempo de espera entre cada ciclo</i>	32
3.3.7.1	Preparo do isolado de carnes	32
3.3.7.2	Análise	32
3.3.8	<i>Análise estatística</i>	33
3.4	Resultados e discussão	33
3.4.1	<i>Avaliação do protótipo de ozônio gasoso</i>	33
3.4.1.1	Avaliação de contaminações por <i>E.coli</i> em superfícies inertes	33
3.4.1.2	Avaliação de contaminações por <i>E. coli</i> em carnes bovinas	34
3.4.1.3	Avaliação de contaminações in natura em carnes bovinas	36
3.4.2	<i>Ciclos de refrigeração com disponibilização do ozônio</i>	37
3.4.3	<i>Exposições ao Ozônio com variações no tempo de espera entre cada ciclo</i>	39
3.5	Conclusões	40
4	OTIMIZAÇÃO DO USO DE OZÔNIO AQUOSO E LUZ UV-C PARA PRESERVAÇÃO DE CARNES BOVINAS	41
4.1	Contextualização	41
4.2	Objetivo geral	41
4.2.1	<i>Objetivo específicos</i>	41
4.3	Metodologia	42
4.3.1	<i>Construção do equipamento</i>	42
4.3.2	<i>Desenho experimental</i>	44
4.3.3	<i>Análise estatística</i>	44
4.4	Resultados e discussões	44
4.4.1	<i>Ciclos de Luz UV-C</i>	44
4.4.2	<i>Ciclos de ozônio aquoso</i>	46
4.4.3	<i>Ciclos combinados de luz UV-C e ozônio aquoso</i>	48
4.5	Conclusões	50
5	AVALIAÇÃO DAS QUALIDADES ORGANOLEPTICAS DAS CARNES BOVINAS	51
5.1	Contextualização	51
5.2	Objetivo	51
5.2.1	<i>Objetivos específicos</i>	51
5.3	Metodologia	52
5.3.1	<i>Análise de pH</i>	52

5.3.2	<i>Ensaio de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)</i>	52
5.3.3	<i>Ensaio de quantificação de proteínas pelo método do Bradford</i>	53
5.3.4	<i>Capacidade de retenção de água (CRA)</i>	53
5.3.5	<i>Lâminas histológicas</i>	54
5.3.6	<i>Análise estatística</i>	54
5.4	Resultados e discussões	54
5.4.1	<i>pH</i>	54
5.4.2	<i>Ensaio de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)</i>	56
5.4.3	<i>Quantificação das proteínas pelo método do Bradford</i>	58
5.4.4	<i>CRA</i>	59
5.4.5	<i>Lâminas Histológicas</i>	60
5.5	Conclusões	61
6	CONCLUSÕES GERAIS	63
7	REFERÊNCIAS	65

PREFÁCIO

Neste estudo foi avaliado dois protótipos para a descontaminação e preservação de alimentos (carne bovinas), visando o melhor entendimento desta dissertação o conteúdo foi dividido em 4 capítulos, sendo o primeiro o estudo da literatura, em seguida o capítulo do primeiro protótipo em que se apresenta a avaliação do ozônio gasoso em amostras de carnes bovinas, o terceiro capítulo mostra os resultados do segundo protótipo que avaliam luz ultravioleta (UV-C) e ozônio na forma aquosa e o último capítulo em que foram apresentados as análises das propriedades organolépticas realizadas em amostras de carne bovina após os tratamentos utilizando-se os protótipos.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – (IBGE) foram abatidas 31,86 e 24,42 milhões de cabeças de gado bovino, o que gerou uma produção de 7,95 e 6,14 toneladas de carcaças, isto para o ano 2018^[1] e o decorrer até terceiro trimestre do ano 2019^[2], respectivamente. Segundo o USDA (Departamento de Agricultura de os Estados Unidos) foram exportadas em 2019 quase 2,4 milhões de toneladas. A previsão de produção para 2020 permanece em um nível recorde de 10,6 milhões de toneladas ^[3]. Isso mostra que a indústria pecuária é de grande importância para a economia e desenvolvimento do país. Este cenário é de grande relevância para manter e preservar a qualidade e o tempo de prateleira das carnes e produtos cárneos.

O tempo de prateleira das carcaças de carne fresca está relacionada a fatores físico-químicos como temperatura, danos físicos, adição de ingredientes além de fatores microbiológicos ^[4]. Todo alimento têm uma tendência a degradar-se por vias metabólicas e enzimáticas, sendo que as contaminações microbianas podem acelerar esses processos. Há uma preocupação cada vez maior pelas indústrias em manter as propriedades organolépticas dos alimentos. No processo de produção e abate da carne existem pontos críticos de controle em que deve-se se garantir boas práticas de fabricação, tais como evisceração, cortes da carcaça e refrigeração. Procedimentos inadequados nestas etapas podem dar condições para a proliferação microbiana, e da mesma forma ao manuseio, utensílios e ambiente. Por outro lado, os parâmetros de higiene também são de extrema importância para garantir produtos seguros e livres de microrganismos patogênicos para alcançar a segurança alimentar. As doenças transmitidas por alimentos contaminados relatadas são crescentes ^[5], o que se torna um assunto de interesse e de conscientização dos consumidores e empresas alimentícias.

Existem métodos para a descontaminação da carne, como a lavagem com vapor de água, ácidos orgânicos, tratamentos químicos e choques térmicos, entretanto essas intervenções não são capazes de eliminar completamente a carga bacteriana e além disso gastam muita energia, o que gera altos custos econômicos; produzir substâncias residuais capazes de modificar a aparência do produto e causar possíveis riscos à saúde ^[6]. Desse modo, novas tecnologias têm sido estudadas para descontaminação de carne fresca que sejam amigáveis ao meio ambiente e, ao mesmo tempo, garantir a segurança dos alimentos. Tecnologias como o uso do ozônio e luz ultravioleta (UV-C) tem sido promissora para a solução deste problema.

O ozônio é uma molécula composta por três átomos de oxigênio com um alto poder oxidativo, é também uma molécula instável como resultado de uma rápida degradação ao

oxigênio e, portanto, uma diminuição de substâncias residuais é esperada. Em 2001, o ozônio foi aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA) como aditivo para tratamento, armazenamento e processamento de alimentos tanto na sua forma gasosa como na fase aquosa [7], e sabe-se que é atuante contra bactérias, fungos, vírus e esporulados^[8]. O mecanismo de ação, ocorre por meio da oxidação dos lipídios insaturados da membrana citoplasmática, além de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos^[8]. A luz UV-C é conhecida por sua ação germicida no comprimento de onda de 100-400 nm, sendo o pico germicida em 254 nm, o mecanismo de ação ocorre na penetração da membrana celular danificando o DNA das bactérias impedindo a sua reprodução levando a morte celular^[9], o qual também é aprovado pela FDA desde 2007. [10]

Neste estudo foram construídos protótipos de ozônio gasoso e ozônio na fase aquosa combinado com luz UV-C para a descontaminação superficial de carnes que serão descritos conforme seus efeitos antimicrobianos e organolépticos em carnes bovinas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Carnes

A definição de carne de acordo com o Departamento de Agricultura dos EUA, 2016^[11]: “Carne: A parte do músculo de qualquer gado, ovelha, suíno ou cabra que seja esquelético ou encontrado na língua, diafragma, coração ou esôfago, com ou sem a gordura acompanhante e sobrejacente, e as porções de osso (em osso produto como osso T ou bife de porterhouse), pele, tendão, nervo e sangue vasos que normalmente acompanham o tecido muscular e que não estão separados dele no processo de vestir. Quando aplicado a produtos de equídeos, esse termo tem um significado comparável:

1. A carne não inclui os músculos encontrados nos lábios, focinho ou orelhas;
2. A carne não pode incluir porções significativas de osso, incluindo osso duro e componentes relacionados, como medula óssea ou qualquer quantidade de cérebro, gânglios trigêmeos, medula espinhal ou gânglios da raiz dorsal”.

De acordo com a FAO, a carne é um dos alimentos mais consumidos na maioria das sociedades, já que contribui com nutrientes essenciais para a saúde, contendo níveis consideráveis de proteínas, gordura, vitaminas, minerais e micronutrientes, essenciais para o crescimento e desenvolvimento^[12].

A Composição dos macronutrientes da carne são mostrados na Tabela 1, os quais incluem água, proteína, gordura, energia e colesterol para cada 100 g de carne magra bovina.

Tabela 1 Água, proteína e gordura em gramas para cada 100 g de carne crua vermelha bovina. Fonte: FSA,2002
^[13] Adaptada pela autora

Macronutrientes	g/100 g
Água	71,9
Proteína	22,5
Gordura	4,3

A proteína da carne tem um alto valor biológico pois contém os aminoácidos essenciais que o ser humano não é capaz de sintetizar, além disso a ingesta de carne tem um conteúdo de lipídeos que auxiliam na composição estrutural da membrana celular, facilita o transporte e absorção de vitaminas lipossolúveis A, D, E, K. Também é fonte de micronutrientes, vitaminas e minerais apresentadas nas Tabelas 2 e 3 respectivamente.

A carne é uma fonte importante de tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), biotina, vitamina B6, vitamina B12 e ácido pantotênico, além de fornecer

muitos minerais, como zinco, ferro, cobre e manganês, fósforo, potássio e selênio. A carne vermelha pode fornecer 63% da vitamina B12 por cada 100g ^[14]; sendo de importância para a síntese de neurotransmissores e DNA. A deficiência de vitamina B12 pode levar a anemia, fadiga, tontura e falta de memória ou confusão. A vitamina B12 é encontrada apenas em alimentos de origem animal; portanto, indivíduos com alimentos limitados ou sem alimentos de origem animal são incentivados a tomar suplementos de vitamina B12 para evitar uma deficiência.

Tabela 2 Conteúdo de Vitaminas por 100 g de carne crua vermelha bovina. Fonte: FSA, 2002[13]. *Adaptada pela autora*

Vitaminas	100g de carne
Tiamina B1 (mg)	0,10
Riboflavina B2 (mg)	0,21
Niacina B3 (mg)	5,0
Ácido pantotênico B5 (mg)	0,75
Piridoxina B6 (mg)	0,53
Biotina B7(μg)	1
Ácido fólico B9 (μg)	19
Cobalamina B12 (μg)	2
Colecalciferol (μg)	0,5
α – Tocoferol (mg)	0,13

O ferro é um mineral encontrado como “ferro heme” em carnes sendo que a sua disponibilidade é melhor do que o ferro não heme que provem das plantas. A deficiência dele pode causar anemia, fraqueza ou cansaço. Desse modo a carne é fonte rica de macro e micronutrientes essenciais e de fácil absorção para o ser humano ^[15].

Tabela 3 Conteúdo de minerais por 100 g de carne crua vermelha bovina. Fonte: FSA, 2002 ^[13]. Adaptada pela autora

Minerais	100 g de carne
Sódio (mg)	63
Potássio (mg)	350
Cálcio (mg)	5
Magnésio (mg)	22
Fósforo (mg)	200
Ferro (mg)	2,7
Cobre (mg)	0,03
Zinco (mg)	4,1
Selênio (µg)	7

2.2 Microbiologia das carnes

A carga microbiana das carnes depende do controle de várias etapas do processamento tais como abate, aditivos adicionados, contaminantes, condições sanitárias em: armazenamento, distribuição e manipulação. Normalmente, os microrganismos encontrados nas carnes bovinas frescas são incorporados por meio da via sanguínea, mas também pode ocorrer a partir do ar, água, solo, comida (ração), equipamentos de processo e manipulação humana ^[8].

A natureza das comunidades microbianas presentes na carne é muito diversa os microrganismos mais comuns que predominam na carne refrigerada são as psicotróficas *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., *Flavobacterium* spp., *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Lactobacillus*. Também as bactérias produtoras de ácido lático como *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella putrefaciens* e Gram-negativos e micrococos, *Alcaligenes* spp., *Aeromonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Enterobacteriaceae* outros microrganismos encontrados são os estreptococos fecais. As contaminações patogênicas provenientes da microflora intestinal ou do ambiente podem abranger *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Listeria monocytogenes*, a enteropatogênica *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* ^[8]. Na tabela 4 é mostrado os efeitos que produzem as bactérias na carne crua bovina.

Tabela 4 Principais efeitos de contaminação bacteriana em carnes cruas bovina. Adaptada pela autora.

Efeitos	Bactérias
Permanência em temperaturas de refrigeração, Formação de biofilme ^[15] *	* <i>Pseudomonas lundensis</i> ^[16] * <i>Pseudomonas fragi</i> ^[16] <i>Brochothrix thermosphacta</i> ^[17] <i>Brochothrix campestris</i> . ^[17]
Produção de uma variedade de pigmentos não desejados, Azul/verde ^[18]	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^[19]
Produção de ácido lático; a) Fermentação não desejada b) Odor amanteigados	<i>Lactobacillus</i> ^[20] a) <i>Lactococcus piscium</i> ^[21] b) <i>Lactobacillus leuconostoc</i> ^[22]
Produção de CO ₂ : Resistencia a baixa temperatura e sem oxigênio	<i>Enterobacteriaceae</i> ^[23]
Causadoras de doenças ^[8]	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica / pseudotuberculose</i> , <i>Campylobacter jejuni / coli</i> , <i>Listeria monocytogenes, enteropatogênica</i> <i>E.coli, Bacillus cereus, Clostridium perfringens e Clostridium botulínico.</i>

As contaminações bacterianas além de causarem doenças, podem deteriorar a carne através de suas atividades metabólicas, alterando a qualidade do alimento. As consequências podem ser observadas por alteração da cor, odores desagradáveis, textura de lodo amarelado, levando assim à perda e à rejeição do consumidor ^[24]

De acordo com a Resolução nº12 da ANVISA de 02 de janeiro de 2001, é exigido em carnes resfriadas ou congeladas “in natura” de bovinas ausência de *Salmonella* spp, e no máximo de 10⁴ de coliformes totais ^[25]. Apesar da legislação brasileira não estabelecer limites para bactérias do tipo mesófilos aeróbicos e psicrotróficas estas são de igual importância para

avaliar o estado de deterioração de alimentos musculares frescos já que são especialmente perecíveis em condições aeróbicas.

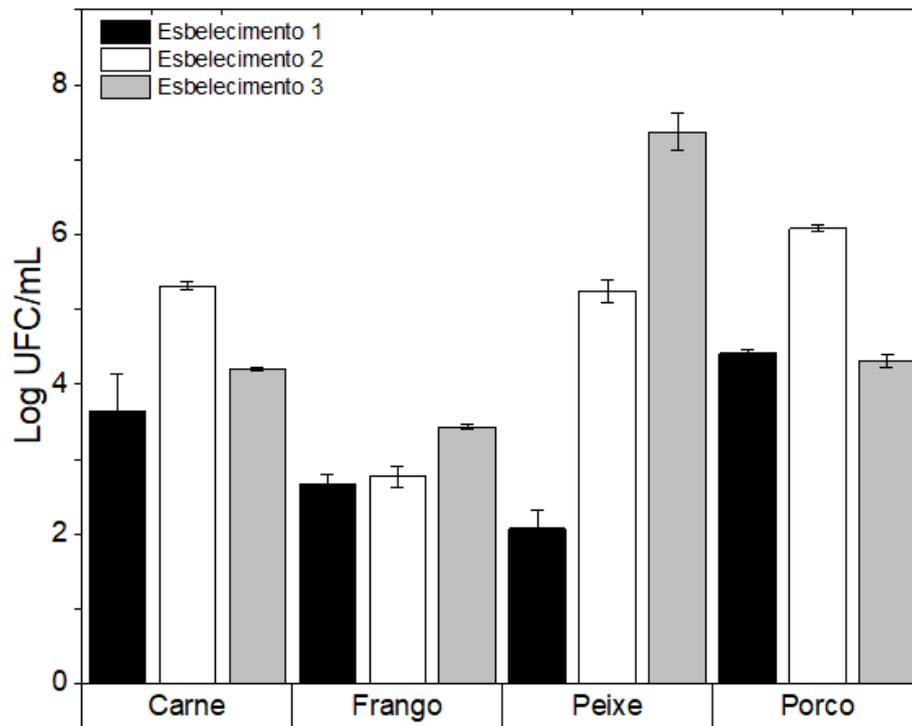
2.3 Tecnologias para descontaminação de carnes frescas

A carga microbiana da carcaça antes do resfriamento e distribuição ao consumidor depende não apenas da extensão da contaminação durante o processo de abate e distribuição final, mas também de tecnologias para a diminuição do número de microrganismos nas superfícies. É realizada técnicas para diminuir essa carga microbiana tais como a lavagem com água que remove impurezas, cabelos, fezes.

Métodos físicos como refrigeração e congelamento, é essencial após a morte para a preservação da carne e controle microbiológico, métodos químicos com o uso de agentes oxidantes que incluem cloro, dióxido de cloro, hipoclorito, cloraminas, peróxido de hidrogênio, ozônio, ácido peracético e ácido láctico também são utilizados. A sinergia dessas técnicas com a pulverização de soluções oxidantes em altas temperaturas durante pequenos intervalos de segundos também tem sido considerada ^[8]. Tecnologias não térmicas tais como irradiação gama, irradiação com luz ultravioleta, também são usadas para melhorar a segurança e descontaminação dos microrganismos. ^[24]

Foi realizado um estudo prévio pela autora na cidade de São Carlos, SP, para verificar a qualidade da carga microbiana de carnes tais como carne vermelha, frango, peixe e porco que é exibida nos açougues. A seleção de três açougues de forma aleatória foi realizada e coletaram-se as amostras e em seguida estas foram analisadas. Os dados obtidos são representados na Figura 1 mostrando altas cargas de contaminações sendo valores todos acima de 2 unidades logarítmicas para bactérias aeróbicas. Portanto, é de suma importância utilizar tecnologias antimicrobianas nesta etapa para controlar a proliferação microbiana.

Figura 1 Contaminações microbianas contidas em carne vermelha, frango, peixe e porco, em açougues aleatórios da cidade de São Carlos, SP. Fonte: Elaborada pela autora.



2.4 Ozônio

O ozônio (O_3) é um alótropo formado por três átomos de oxigênio. É um gás instável, por tanto sua estrutura é dissociada rapidamente ao oxigênio molecular. Possui baixo peso molecular ($PM=48$ g/mol), solubilidade em água ($0^\circ C$) de 0,64; densidade de 2.141 g/L. Apresenta um elevado potencial de oxidação de 2,07 V, comparado com o cloro (1,36 V) e o oxigênio (1,23 V). É encontrado na natureza, na estratosfera, formado por reações fotoquímicas, os raios solares em comprimentos de onda UV (100-240 nm) dissociam as moléculas de oxigênio as quais colidem com oxigênio molecular gerando o ozônio (Figura 1). Dado isso, existem formas para a geração de ozônio com luz UV e descarga elétrica de alta voltagem conhecido como “descarga de corona” (Figura 2) [26]. O mecanismo de ação, nas células bacterianas ocorre por meio da oxidação dos lipídios insaturados da membrana citoplasmática. A barreira da membrana é destruída provocando vazamento do conteúdo da célula, como resultado ocorre a destruição gradual ou imediata da célula [27], além de oxidar proteínas, enzimas e ácidos nucleicos [7].

Figura 2 Ilustração da formação do ozônio por luz UV-C fornecida pelo sol. Fonte: Elaborada pela autora.

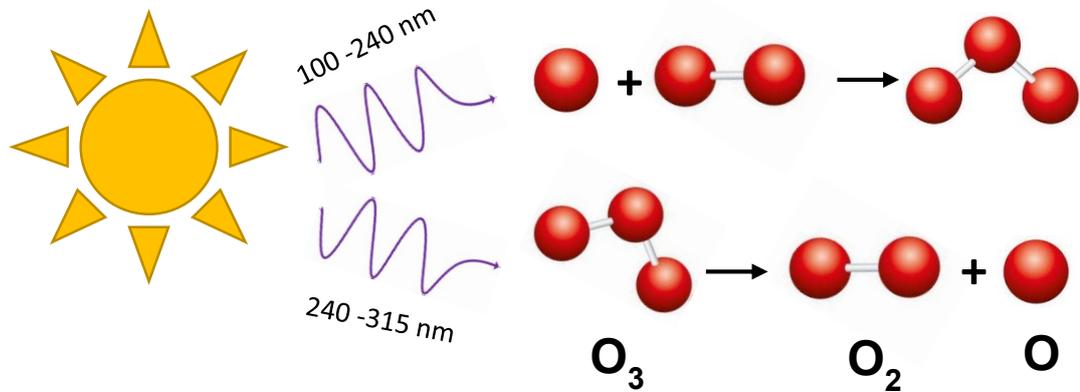
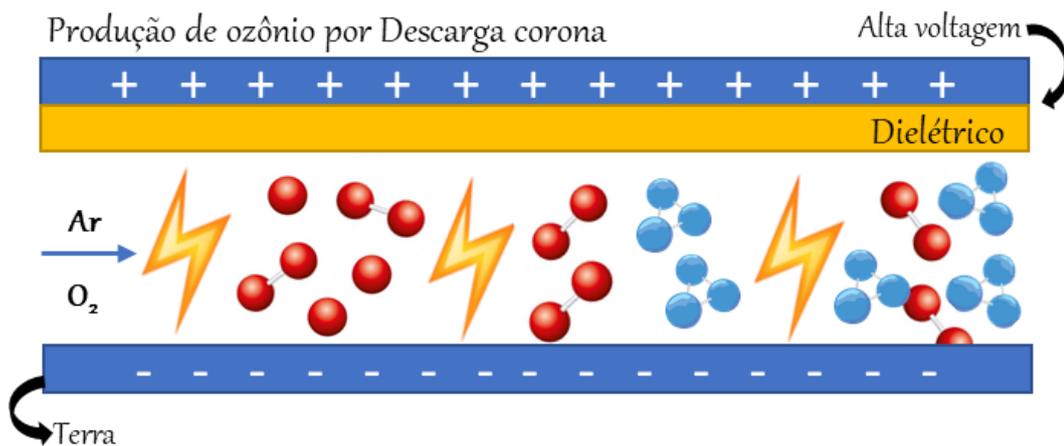


Figura 3 Ilustração da produção do ozônio por descarga corona. Fonte: Elaborada pela autora.



2.5 Aplicações do ozônio nos alimentos

É uma preocupação da indústria alimentar obter e oferecer produtos naturais, livres de produtos residuais, e é por isso que o ozônio devido ao alto poder oxidante que caracteriza seu potencial germicida o qual tem sido estudado em diferentes tipos de alimentos e processos. As primeiras indústrias que utilizaram o ozônio em tratamentos foi a de água em plantas.

Na indústria de frutas foi encontrado um estudo em maçãs inativando 1 Log de *E.coli* O157:H7 com ozônio borbulhado durante a lavagem^[27]. Outro estudo utilizando alface, tomate e cenouras contaminadas com *E.coli* ATCC 11775 expostas à 15 min de ozônio gasoso em concentração de 5 ppm e inativou-se 1,6, 2,2 e 2,5 log de microrganismo, respectivamente^[28]. Bialka e Demirci, relataram a diminuição de 1,4 Log e 3,0. Log em amostras de mirtilo

contaminadas com *E.coli* O157:H7 e *Salmonella* utilizando ozônio pressurizado após 64 min, respectivamente [29]

Outro estudo em espinafre contaminados com *E.coli* e *Listeria spp*, foram tratados com ozônio gasoso 1 ppm por 10 minutos mostrando 1 Log (UFC/mL) de redução, também foi variada a concentração para 10 ppm por curto tempo de 2 minutos obtendo 1 Log (UFC/mL) de redução bacteriana, concluindo que os impactos de concentrações de ozônio de 1 e 10 ppm não foram significativamente diferentes [30].

A tecnologia ozônio gasosa foi estudada em plantas aromáticas secas com contaminações próprias de 10^5 - 10^7 Log (UFC/g). Foram utilizados orégano, tomilho, chá da montanha, verbena e camomila de limão, o efeito do ozônio foi avaliado em 30 e 60 minutos a 4 ppm (2,6 L /min), Os resultados mostraram para as bactérias aeróbicas após 30 minutos de tratamento com ozônio reduções de 4,0;1,2; 2,2 e 1,4 Log (UFC/g) em orégano, limão verbena, camomila e tomilho, respectivamente, e para o chá da montanha não foi observado redução significativa. O estudo também comparou a eficácia dos tempos e concluiu que em 30 minutos de ozonização, nenhuma redução adicional foi observada após o tratamento de 60 minutos em todas as plantas secas testadas [31].

Para a indústria alimentar das carnes incluindo frango, peixe, carne vermelha, camarões foram encontrados estudos diversos com o uso do ozônio na forma gasosa e aquosa ou combinações com outras técnicas.

Estudos com carnes inoculados com *E.coli* e *Salmonella Typhimurium*, foram tratados com água ozonizada a 1% por 7 e 15 minutos. Com reduções de 0,44; 0,78 e 0,57 Log (UFC / g), para coliformes, *Salmonella* e mesófilas aeróbicas respectivamente na carne moída no tempo de 15 minutos. As reduções para 7 minutos de ozônio só foram efetivas para *Salmonella* e mesófilas aeróbicas equivalentes a 0,45 e 0,32 Log (UFC / g), respectivamente. Neste estudo também foi analisado o efeito do ozônio na cor e relataram que todos os tratamentos causaram mudanças no (L^*) tonando a cor mais clara [32].

Cardenas *et al* [33] relataram os efeitos do tratamento do ozônio gasoso em temperaturas de refrigeração, sobre as contagens microbianas de heterotróficos mesofílicos e também *E.coli*, que foram inoculados em meios de cultura e em carne bovina. O tratamento consistiu em exposições de 3 e 24 horas de ozônio gasoso (154×10^6 kg/m³) variando as temperaturas de 0 e 4°C, os tratamentos aplicados em meios de cultura inoculados com *E. coli* causaram uma inativação total desse microrganismo após 3 ou 24 horas de tratamento a 0 e 4°C. A ação antimicrobiana do ozônio foi menos eficaz no caso de tecido bovino do que nos meios de cultura, uma vez que parte do ozônio reage com os componentes do tecido. Nos dois

tratamentos (3 e 24 h), a redução microbiana foi maior ao trabalhar a 0 ° C devido à maior solubilidade do ozônio gasoso. Em amostras de carne bovina tratadas com ozônio gasoso, a maior inativação microbiana foi observada a 0 ° C e após 24 horas de exposição, produzindo uma diminuição de 0,7 Log de *E. coli* e 2,0 Log na contagem total de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbicos. No entanto, tanto a cor da superfície quanto a oxidação lipídica destas amostras de carne foram inaceitáveis após o tratamento para consumo. Tempos de exposição mais curtos (3 h) à concentração de ozônio testada em ambas temperaturas (0 e 4 °C), reduziu 0,5 Log (UFC/mL) para heterotróficos mesófilos aeróbicos totais e variações de 0.6 - 1.0 Log nas contagens de *E. coli*, sem alterar a cor ou produzir ranço na carne bovina.

Para tratamentos com aves, um estudo em peitos de frango com 40, 60 e 70 ppm de ozônio gasoso durante 20 minutos apresentou redução de menos de 10 (UFC/g) em todas as populações bacterianas aeróbicas como coliformes totais após os tratamentos^[34]

Foram investigados os efeitos do ozônio na extensão da vida útil de filés de carne de frango liofilizados armazenados a 21 ± 1 ° C. As amostras foram expostas ao ozônio gasoso com três concentrações de 0,4; 0,6 e 0,72 ppm durante 10, 30, 60 e 120 min. O prazo de validade das amostras de carne de frango liofilizadas ozonizadas foi determinado usando análises microbiológicas e sensoriais durante 8 meses de armazenamento. Os resultados mostraram que para amostras controles congeladas e liofilizadas no segundo mês houve aumento de até 7 Log (UFC/g) sendo a carga inicial 4 Log (UFC/g) aproximadamente. Para amostras tratadas com ozônio, as contagens sempre foram menores de 4 Log (UFC/g) sendo a melhor combinação de 0,6 ppm por 10 min de ozônio e liofilização, reduzindo no 6º mês 2,74 Log (UFC/g) sem alterar as características sensoriais do produto e aumentando a vida útil da carne de peito de frango cru por até 8 meses^[35].

Outro estudo relatado para carne de peru, tratada com ozônio (1×10^2 kg/m³, por até 8 h) mostrou reduções de aproximadamente 2,9; 2,3 e 1,9 Log nas contagens de bactérias mesófilas aeróbicas totais para 6 h de exposição, *Enterobacteriaceae* e levedura, respectivamente, mas as características sensoriais foram alteradas tais nos teores de carbonila, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, valores de cor e pH das amostras^[36]

Em 2001 o uso do ozônio foi pelo FDA (Food Drug Administration) tanto na forma gasosa como aquosa para aplicações no alimento como aditivo antimicrobiano^[8]. Na tabela 5 se encontra o resumo dos estudos relatados do uso do ozônio em alimentos para inativação microbiana.

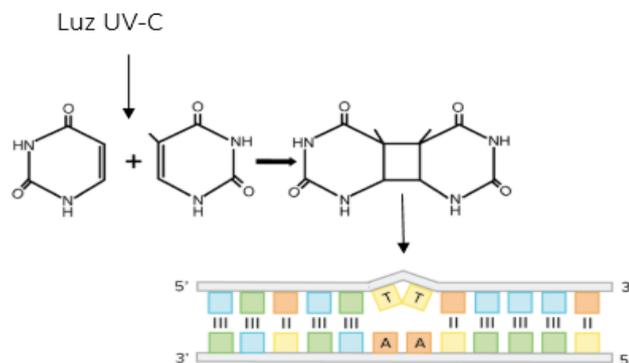
Tabela 5 Resumo de uso de as aplicações do ozônio para redução microbiana. Elaborada pela autora

Alimento	Técnica	Redução de Bactéria
Frutas ^[27] .	Ozônio borbulhado	1 Log de <i>E.coli</i> O157:H7
Alface ^[28] .	Ozônio gasoso por 15 minutos, 5ppm	1.6 Log <i>E.coli</i> ATCC 11775
Tomate ^[28] .		2.2 Log <i>E.coli</i> ATCC 11775
Cenoura ^[28] .		2.5 Log <i>E.coli</i> ATCC 11775
Mirtilio ^[29]	Ozônio gasoso pressurizado após 64 min	1.4 Log <i>E.coli</i> O157:H7 3.0 Log <i>Salmonella spp</i>
Espinafre ^[30]	Ozônio gasoso por 10 minutos, 1ppm	1 Log <i>E.coli e Listeria</i>
Orégano ^[31]	Ozônio gasoso por 30 minutos, 4ppm	4.0 Log Bactérias aeróbicas
Limão verbena ^[31]		1.2 Log Bactérias aeróbicas
Camomilha ^[31]		2.2 Log Bactérias aeróbicas
Tomilho ^[31]		1.4 Log Bactérias aeróbicas
Carne	Água ozonizada 1% por 15 minutos ^[32]	0.4 Log Coliformes totais 0.78 Log <i>Salmonella</i> 0.57 Log Bactérias mesófilas
	Ozônio gasoso 24 horas (156× 10 ⁶ Kg/ m ³) 0° C ^[33]	0.7 Log <i>E.coli</i> 2.0 Log Bactérias mesófilas
	Ozônio gasoso 3 horas (156× 10 ⁶ Kg/ m ³) 0° C ^[33]	0.5 Log Heterotróficos mesofilos 0.6-1 Log <i>E.coli</i>
Frango	Ozônio gasoso 40, 60, 70 ppm por 20 minutos ^[34]	< 10 UFC/g
	Liofilizado com ozônio gasoso por 10 minutos. 0.6 ppm ^[35]	2.75 Log sexto mês de armazenamento.
Carne de peru	Ozônio 1×10 ⁶ Kg /m ³ por 6 horas ^[36]	2.9 Log Bacterias mesófilas 2.3 Log <i>Enterobacteriaceae</i> 1.9 Log Levedura

2.6 Luz ultravioleta

A luz ultravioleta (UV) se estende na faixa de comprimento de onda do espectro eletromagnético na região não ionizante, entre os raios X (100 nm) e a luz visível (400 nm). As subdivisões da luz ultravioleta está definida por comprimentos de onda longo de 320-400 nm (UV-A), comprimento de onda médio que abrange de 280-320 nm (UV-B), comprimentos de onda curtos de 200-280 nm (UV-C) e a região de UV de vácuo de 100-200 nm (UV-V) [38]. O pico germicida é no comprimento de onda de 254 nm pois a maioria dos microrganismos absorvem a luz nesse comprimento de onda, o qual é suficiente para causar mudanças físicas de elétrons e rompimento nas ligações do DNA evitando a reprodução celular. O mecanismo de ação é causado pela absorção da luz nas bases de pirimidina que são sensíveis à UV-C, induzindo a formação de ligações covalentes de dímeros de pirimidina, as pirimidinas são as bases de timina, citosina e adenina, esses dímeros de pirimidina são formados quando as bases de timina adjacentes dentro de uma mesma fita de DNA ao absorver um fóton de UV forma a dimerização da timina (Figura 4), isto inibe a correta replicação do DNA e conseqüentemente a morte celular[39].

Figura 4 Ilustração Da dimerização da timina por efeito da luz UV-C. Fonte: Barbosa et.al [39] (2004). Adaptada pela autora



2.7 Uso de luz UV-C nos alimentos

A radiação ultravioleta em seu pico germicida, começou a ser utilizada amplamente na década de 1930 para descontaminação de ar, no ambiente hospitalar, na esterilização de embalagens e no processamento de alimentos, sendo a primeira aplicação no tratamento de água, após isso na indústria de sucos [40]. Sendo assim aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) [10].

Um estudo realizado em suco de maçã e laranja para a inativação de coquetéis de *E.coli* e *Saccharomyces cerevisiae* com diferentes técnicas como luz UV-C de baixo comprimento e tratamento ultrassônico em tempos de 10 minutos, observou a inativação de 2,2 Log (UFC/mL) para tratamento ultrassônico e para irradiação de luz UV-C 4,5 Log (UFC/mL) em suco de maçã. E para suco de laranja 2 Log (UFC/mL) no dois tratamentos para a cepa *E.coli* ATCC 35218, Para *S. cerevisiae* em suco de maçã foi inativado 3 Log (UFC/MI) para 15 minutos de luz UV-C^[41]

Foi relatado um trabalho de cubos de melão com aplicação de luz UV-C durante as operações de corte e antes da embalagem, para a análise de contagem microbiana, cor, firmeza, escoamento de suco, propriedades sensoriais A exposição da luz UV-C inativou 2 Log para a contagem total viável e *Enterobacteriaceae*, respectivamente. Para os estudos de cor e firmeza não teve efeito negativo e para os vazamentos de suco a irradiação melhorou devido à formação de uma fina película seca nas amostras, também foi associado uma melhoria no sabor em relação com amostras não tratadas^[42]. Para maçã cortada, também foi relatado o efeito do tratamento com luz UV-C em 1,2; 6,0, 12,0 e 24,0 kJ / m², mostrando para todos os tratamentos reduções de 1-2 Log nas contagem viáveis totais, mas tratamentos com dose maior a 1,2 kJ / m² apresentaram desidratação e fenômenos oxidativos^[43] Concluindo que o tratamento com luz UV-C demonstrou ser uma tecnologia de alto potencial para descontaminação superficial de frutas prontas para consumo.

Para a indústria de carnes foi encontrado um estudo em peito de frango inoculados com *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* em concentrações de 6–7 Log (UFC / g). Irradiados com luz UV-C nas doses 0; 0,5; 1, 3 e 5 kJ / m². A irradiação com UV-C a 5 kJ / m² reduziu as populações iniciais de *C. jejuni*, *L. monocytogenes*, e *S. typhimurium* em 1,26; 1,29 e 1,19 Log (UFC / g), respectivamente, Sem causar alterações na cor^[44]. Em outro estudo carnes moída inoculadas com cepas de *Salmonella* após irradiações com luz UV-C reduziram 1 Log (UFC/g)^[45]. Stermer *et. al* em 1987 relataram a inativação de bactérias em superfícies de carne fresca, utilizando a luz UV-C em doses de 150 mW s / cm² (275 μW / cm² por 550 s) com reduções em torno de 2 Log de na superfície lisa da carne (carne bovina) sem alterações significativos na cor (Hunter "a", vermelhidão) ou na aparência geral. Concluindo que a luz UV-C pode ser uma alternativa para inativação de bactérias^[46]. Na tabela 6 se encontra o resumo dos estudos citados com aplicação de luz UV-C para inativação microbiana em alimentos.

Tabela 6 Resumo de uso de as aplicações da luz ultravioleta UV-C para redução microbiana. Elaborada pela autora

Alimento	Técnica	Reduções bacterianas (Log)
Suco de maçã ^[41]	Luz UV-C por 10 minutos	4.5 <i>E.coli</i>
Suco de Laranja ^[41]	Luz UV-C por 10 minutos	2.0 <i>E.coli</i>
Melão em cubos ^[42]	Luz UV-C 12 KJ/m ²	2.0 <i>Enterobacteriaceae</i>
Maça ^[43]	Luz UV-C KJ/m ²	1–2 mesófilas aeróbicas
Frango ^[44]	Luz UV-C 1.2 KJ/m ²	1.26 <i>Campylobacter jejuni</i> 1.26 <i>Listeria monocytogenes</i> 1.19 <i>Salmonella Typhimurium</i>
Carne moída ^[46]	Luz UV-C 150 mWs/ cm ²	2 Aeróbicas

3 OTIMIZAÇÃO DO USO DO OZÔNIO GASOSO PARA PRESERVAÇÃO DE CARNES BOVINAS

3.1 Contextualização

As dificuldades na indústria alimentar relacionadas ao uso de sanitizantes para o controle microbiológico, sem aumentar os custos e sem modificar o alimento, são ainda desafios enfrentados atualmente. Além disso, os consumidores têm evitado alimentos que tenham passado por processamento químico, e as indústrias têm buscado tecnologias sustentáveis para alimentos livres de resíduos e minimamente processados [47]

Outro desafio é a disponibilização de sanitizantes que possam ser facilmente aplicados em larga escala, considerando que os alimentos passam por diversas etapas de processamento até o armazenamento final, sendo, portanto, expostos a diversos pontos de possível contaminação. Com base nas propriedades antimicrobianas do ozônio gasoso e sua utilização na indústria alimentícia, existe a perspectiva de utilizá-lo em alimentos, como por exemplo, no setor de carnes.

3.2 Objetivo geral

O objetivo deste estudo consistiu em desenvolver um protótipo com a tecnologia de ozônio gasoso para a descontaminação superficial de microrganismos em carnes bovinas.

3.2.1 *Objetivos específicos*

- Avaliar o potencial do protótipo para a inativação microbiana superficial em amostras inertes e carnes bovinas contaminadas com *E.coli* e contaminações *in natura*
- Avaliar o efeito do ozônio gasoso aplicados a ciclos de refrigeração de 12 horas em carnes bovinas com contaminações *in natura*
- Avaliar em carnes bovinas, ciclos repetitivos de exposições de ozônio gasoso em diferentes tempos de aplicação.

3.3 Metodologia

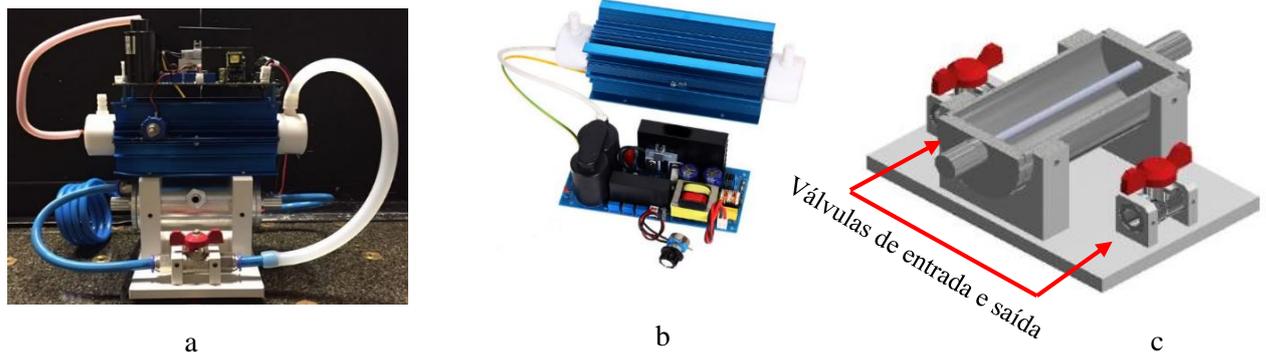
A metodologia proposta foi baseada em provas de conceito e em ensaios microbiológicos, nos quais a efetividade do protótipo foi avaliada realizando variações nos protocolos de aplicação em diversas situações, a fim de validar o desenvolvimento da tecnologia

3.3.1 Protótipo de descontaminação de alimentos

Para a montagem do protótipo (Figura 5 a) foi utilizado um gerador de ozônio marca Blue Ocean®, modelo BO-10 QNAON (Figura 5 b), com um fluxo de saída (Oxigênio) de 10,8 g/h. Um cilindro de aço inox foi adaptado ao gerador de ozônio para criar uma câmara isolada com entrada e saída de ozônio mediante borrachas de plástico. Em seu interior possui um suporte para pendurar as amostras (Figura 5 c), permitindo maior contato com o gás.

A fonte de ar utilizada foi oxigênio industrializado de 95% de pureza com uma razão de 2,6 L/min. As adaptações foram desenvolvidas pelo Laboratório de Apoio Tecnológico, no Instituto de Física de São Carlos (LAT/IFSC/USP)

Figura 5 Montagem do protótipo. (a) Equipamento com cilindro (câmara isolada), (b) Gerador de ozônio Blue Ocean®, (c) Visão interna do cilindro. Fonte: Elaborada pela autora.



3.3.2 Microrganismos

O microrganismo *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi utilizado nos experimentos para contaminação das amostras de carne. Para ativação das bactérias, 1 mL do microrganismo foi suspenso em 9 mL de meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) a 37 °C, 150 rpm por 16 horas. Após esse período, 5 mL dessa cultura foram inoculados em 45 mL de BHI líquido sob as mesmas condições anteriores, em incubadora do tipo rotacional (Quimis®). Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos (Centrifuga 5702 Eppendorf®) e resuspenso em tampão fosfato salino (*Phosphate buffered solution*, PBS) esterilizado. Esse procedimento foi repetido três vezes. Com as bactérias resuspenso em PBS, foram realizadas diluições para ajustar o inóculo a uma concentração de 10^6 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

3.3.3 *Preparo das amostras*

3.3.3.1 *Superfícies inertes*

Amostras de superfícies inertes, no formato de anel (arruela-M8), em aço inoxidável, com superfície lisa, e esterilizadas foram utilizadas para garantir que fatores externos, tais como porosidade e aderência de substâncias como nutrientes, não interferissem na prova de conceito. As amostras foram contaminadas por imersão durante 15 minutos com *E.coli* numa concentração de 10^6 (UFC/mL)

3.3.3.2 *Carnes Bovinas*

Amostras de carne bovina foram compradas em açougues de seleção aleatória da cidade de São Carlos, SP. O tipo de corte utilizado no estudo foi sempre o mesmo, proveniente da parte traseira do animal, carne classificada como patinho. As amostras foram padronizadas para um tamanho com área de 10 cm^2 e 2 mm de espessura.

3.3.3.2.1 *Contaminação com Escherichia coli*

Para garantir uma descontaminação das carnes antes da contaminação intencional com *E. coli*, evitando contaminações cruzadas, foi realizado um procedimento pré experimento. A descontaminação pré experimento das carnes foi realizada com água destilada em uma garrafa de vidro com agitação manual por 1 minuto. Em seguida, as amostras foram filtradas e a água destilada descartada. Este procedimento foi repetido duas vezes. Com as bactérias resuspendidas em PBS foram inoculadas as carnes bovinas durante 15 minutos

3.3.3.2.2 *Amostras in natura*

Para testar a descontaminação com ozônio gasoso em carnes as amostras foram homogeneizadas para a mistura das bactérias já contidas na carne bovina. A homogeneização foi feita em uma garrafa de vidro estéril com água destilada, agitando manualmente por 1 minuto todos os pedaços de carne, após 15 minutos, as amostras foram retiradas da garrafa dentro do fluxo laminar para iniciar o experimento.

3.3.4 Tratamento com ozônio gasoso em superfícies inertes e carnes bovinas

Para avaliar o protótipo de ozônio gasoso foram realizados experimentos de inativação microbiana em amostras de superfícies inertes e em amostras de carnes bovinas (seção 2.3.3).

Os ensaios consistiram em colocar amostras dentro do protótipo e submetê-las a diferentes tempos de exposição ao ozônio (1, 10 e 30 minutos) A concentração do ozônio gasoso foi de 15 ppm. Após cada tempo de exposição, as amostras foram retiradas do protótipo com o auxílio de uma pinça esterilizada, e em seguida, cada amostra foi colocada em um tubo Falcon com 10 mL de PBS, homogeneizada por 1 minuto em agitador automático. Para a análise do tratamento, duas coletas foram realizadas: (1) imediatamente após o tratamento e (2) 2 horas após o tratamento. Além disso, foram feitos dois procedimentos diferentes de coleta microbiológica nas amostras: (1) *Swab* e (2) homogeneização.

Foram feitas diluições seriadas e posteriormente semeadas em placas de Petri-contendo meio de cultura ágar BHI. Em seguida, as placas foram colocadas na estufa (Eletrolab®) a 37 °C. A contagem das unidades formadoras de colônia por cm² (UFC/cm²) foram feitas após 24 h. Os experimentos foram realizados em triplicata com um n=9

3.3.5 Análise do tratamento

3.3.5.1 Swab

Foram utilizados *swabs* estéreis de hastes plásticas de 15 cm com algodão especial de alta absorção. Para todas as amostras do controle e do tratamento, o *swab* foi umedecido com PBS antes da coleta das bactérias. Os movimentos realizados foram em dois sentidos, vertical e horizontal com respeito a posição da amostra. Além disso, a haste plástica foi girada até o final, sendo o ângulo utilizado de 30°. Logo após, o *Swab* foi introduzido em um tubo Falcon com 10 ml de diluente (água destilada esterilizada) e agitado no vortex por 1 minuto^[48]. Diluições seriadas foram realizadas e semeadas em placas de Petri e imediatamente incubadas em estufa à 37 °C por 24 horas para consecutiva contagem das UFC/cm². Os experimentos foram realizados em triplicata com n=9

3.3.5.2 Homogeneização

A técnica da homogeneização consistiu na coleta da amostra com pinças estéril, e inserida dentro de um tubo Falcon com 10 mL de diluente (água destilada auto estéril), a qual foi homogeneizada no agitador de tubos do tipo Vortex por 1 min. Diluições seriadas foram

feitas e semeadas em placas de Petri, incubadas em estufa a 37 °C por 48 h, para o contagem das UFC/cm² [49]. Os experimentos foram realizados em triplicata.

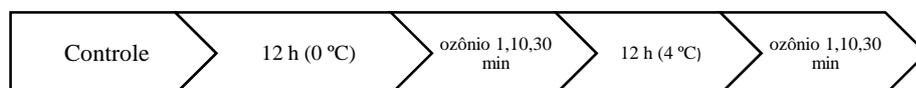
3.3.6 Ciclos de refrigeração com disponibilização do ozônio gasoso

Para a realização deste ensaio foi necessária uma pesquisa nos açougues locais, para saber sobre os ciclos de refrigeração que são submetidas as carnes e os produtos de carne nos açougues, para assim poder investigar os comportamentos microbiológicos nesses ciclos de refrigeração até ser vendido. Além disso, foram incluídas exposições ao ozônio para estudar os comportamentos microbiológicas na ausência e na presença do ozônio. A metodologia usada para a coleta das amostras foi a técnica de homogeneização descrita no item 2.3.5.2 Os microrganismos a estudar foram provenientes da carne *in natura*. Os experimentos foram realizados em duplicata.

De acordo com os açougueiros, ao redor da região os processos de refrigeração que armazenam as carnes até ser vendida são os seguintes:

1. Chegada do corte bovino ao açougue, que é imediatamente refrigerado na câmara frigorífica na temperatura de -1 a 0 °C;
2. Retirada do corte bovino da câmara frigorífica cerca de 20 minutos de antecedência para aclimatizar, e realização de cortes em temperatura ambiente;
3. Permanência do corte bovino por 12 horas nos balcões refrigerados com temperatura de 4 °C, o que corresponde ao horário comercial de venda;
4. Ao fim do dia comercial, as carnes que não foram vendidas voltam para a câmara frigorífica por 12 horas, sob temperatura de -1 a 0 °C.

Com base nesse processo, um ciclo de refrigeração como acontece nos açougues foi simulado no laboratório durante um dia, e os experimentos foram realizados a cada 12 horas, quando há mudança de temperatura. As exposições das carnes ao gás ozônio foram realizadas em diferentes tempos, isto é, 1, 10 e 30 minutos, sempre com uma amostra controle, que não recebeu gás ozônio, mas teve os mesmos parâmetros de temperatura e tempo. A continuação o diagrama de fluxo das coletas microbiológicas realizadas para a simulação:



3.3.7 Exposições ao ozônio gasoso com variações no tempo de espera entre cada ciclo

3.3.7.1 Preparo do isolado de carnes

Os microrganismos isolados de carne bovina foram coletados de várias amostras advindas de diferentes açougues. Para isso, foi utilizada a técnica da homogeneização. As amostras foram homogeneizadas em um tubo Falcon, com 10 mL de água destilada autoclavada. Em seguida, uma alíquota de 1 mL da solução homogeneizada foi inoculada em 9 mL de meio líquido BHI. A suspensão de bactérias foi incubada a 37 °C por 16 horas em rotação de 150 rpm. As bactérias suspensas em meio líquido foram guardadas em tubos criogênicos com glicerol 20% e congeladas a 4 °C, criando-se um estoque de bactérias.

Para cada experimento, a ativação das bactérias ocorreu transferindo-se 1 mL do volume presente no tubo criogênico em 9 mL de meio líquido BHI em tubo Falcon, que foi incubado a 37 °C por 16 horas em rotação de 150 rpm. Após esse período, o inóculo foi semeado em placas de Petri contendo meio ágar BHI, em triplicata, e a identificação das colônias foi realizada de forma qualitativa pelo fenótipo. As colônias repetidas em cada placa de Petri foram coletadas, e cada colônia foi guardada isoladamente em meio líquido BHI com glicerol a 40%.

Para formar o *pool* de bactérias, 1 mL de cada colônia repetida, guardada isoladamente, foi inoculado em 9 mL de meio líquido BHI em tubo Falcon, que foi incubado a 37 °C por 16 horas em rotação de 150 rpm. Após o crescimento, alíquotas de 600 µL de cada inóculo foram guardadas junto com 600 µL de glicerol a 40% em tubos criogênicos, para ensaios posteriores.

Para a realização dos experimentos, os microrganismos foram inoculados em tubo Falcon com 9 mL de meio de cultura líquido BHI e incubados a 37 °C por 16 horas em rotação de 150 rpm. Este procedimento foi feito em duplicata para um total de 20 mL de inóculo. Diluições na proporção 1:4 foram feitas para a concentração final do inóculo. As amostras de carne foram deixadas em contato com o inóculo por 15 minutos e, logo após, foram retiradas e secadas dentro do fluxo laminar à temperatura ambiente, por 15 minutos

3.3.7.2 Análise

O preparo das amostras de carne bovina foi descrito na seção 3.3.3.2.1 utilizando os isolados de carne descrito no item anterior. Neste experimento, o tempo de exposição da carne ao gás ozônio e o tempo de espera entre cada ciclo foram variados de acordo com a seguinte combinação:

- 1 minuto de exposição e 1 hora de espera por ciclo, durante 10 ciclos;

- 1 minuto de exposição e 30 minutos de espera por ciclo, durante 10 ciclos;
- 10 minutos de exposição e 30 minutos de espera por ciclo, durante 10 ciclos;
- 10 minutos de exposição e 10 minutos de espera por ciclo, durante 10 ciclos.

Chama-se de ciclo: tempo de exposição ao gás ozônio + tempo de espera da reação do gás + realização de prova microbiológica.

Estes ensaios foram feitos em duplicata (n=6). A concentração do gás ozônio foi a máxima produzida pelo equipamento.

3.3.8 *Análise estatística*

Os resultados foram verificados conforme a sua distribuição paramétrica. Para os dados com distribuição normal paramétrica foi aplicado o teste ANOVA One Way, e para dados com distribuição não paramétrica foi aplicado o teste Kruskal-Wallis. Os resultados são apresentados pela média e desvio padrão, para a distribuição normal, e pelas medianas, para a distribuição não paramétrica. O nível de significância foi de ($p < 0,05$).

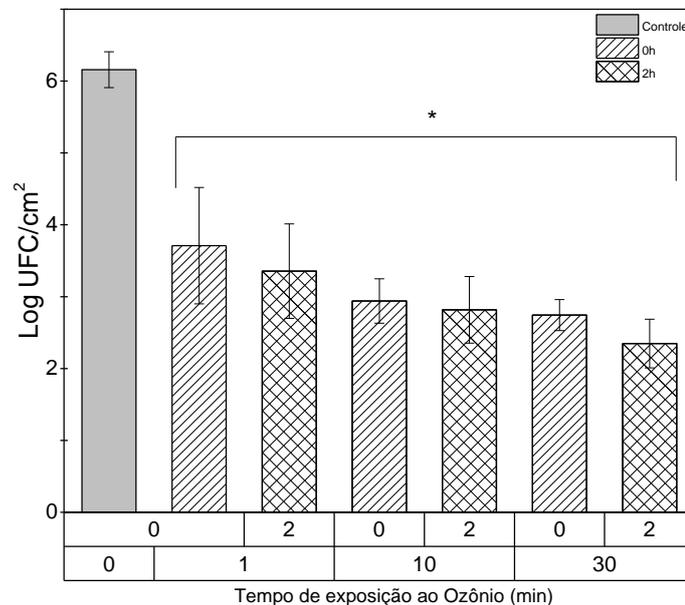
3.4 Resultados e discussão

3.4.1 *Avaliação do protótipo de ozônio gasoso*

3.4.1.1 *Avaliação de contaminações por *E.coli* em superfícies inertes*

Para avaliar a eficácia do protótipo foram realizados testes microbiológicos, no qual os dados foram transformados de UFC/cm² para LogUFC/cm² para melhor visualização dos resultados. Uma arruela de aço inox utilizadas para a prova de conceitos de efetividade do equipamento de ozônio gasoso ofereceu condições que não prejudicaram o experimento como aderência, porosidade, aprovisionamento de nutrientes ou água, entre outros. Na Figura 6, observa-se uma tendência de redução microbiana com o aumento do tempo de exposição. Os resultados mostram que em 30 minutos de tratamento com intervalo de 2 horas para coleta da amostra a ser analisada foi apresentada uma redução de 3,88 Log (UFC/cm²) de *E.coli* em relação ao grupo controle. Desse modo, o protótipo demonstrou um potencial de descontaminação para futuros protocolos.

Figura 6 Avaliação do protótipo de ozônio gasoso para superfície inerte (arruela de aço inox) contaminada com *E. coli*, em tempos de exposição ao ozônio de 1, 10 e 30 minutos, e tempos de espera para a coleta microbiológica imediatamente após o tratamento (0h) e após 2 horas (2h). *Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). Os valores expressam a média e desvio padrão. Fonte: Elaborado pela autora



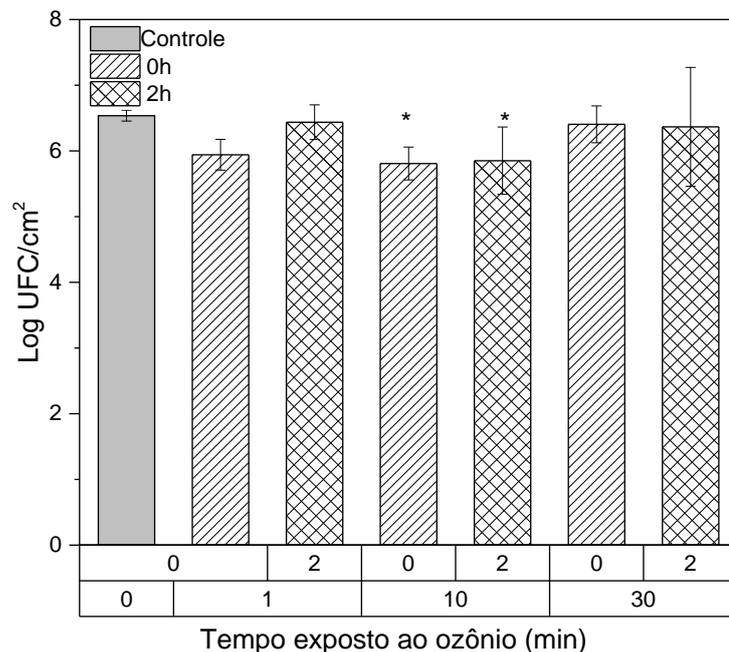
Os resultados encontrados na literatura como os apresentados por Ginny Moore *et al* (2000) ^[50] utilizaram diferentes microrganismos de interesse na indústria alimentar, aplicando gás ozônio a corpos de prova de aço inox, os autores observaram uma redução de aproximadamente 4,85 Log após 4 horas de exposição com 2 ppm para *E. coli*. Outras superfícies inertes foram avaliadas por Ameer Megahed *et al* (2018) ^[51] as quais apresentaram redução de 3,2; 1,6 e 0,6 Log para plástico, metal e borracha, respectivamente, com 8 minutos de exposição ao ozônio gasoso com a 9 ppm. Desse modo os resultados obtidos no presente trabalho corroboram como o esperado pela literatura.

3.4.1.2 Avaliação de contaminações por *E. coli* em carnes bovinas

A Figura 7 mostra a ação antimicrobiana do ozônio gasoso em carnes bovinas contaminadas com *E. coli*. Observou-se que no tempo de 10 minutos de exposição de ozônio gasoso, o tratamento com intervalos de coleta da amostra de 0 horas apresentou a maior redução bacteriana de 0,72 Log e após 2 horas 0,68 Logs, essa menor inativação microbiana é provavelmente decorrente da carne ser um alimento composto majoritariamente de água, proteínas, lipídeos e nutrientes que proporcionam a multiplicação microbiana, além de possuir

uma superfície rugosa, o que possibilita maior aderência das bactérias. [33] O tempo de exposição de 1 minuto não foi suficiente para oxidar as células bacterianas presentes e com 30 minutos de exposição há conversão do ozônio em oxigênio, diminuindo os efeitos oxidativos.

Figura 7 Avaliação do protótipo de ozônio gasoso para carnes bovinas contaminadas com *E. coli*, em tempos de exposição ao ozônio de 1, 10 e 30 minutos, e tempos de espera para a coleta microbiológica imediatamente após o tratamento (0h) e após 2 horas (2h). *Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). Os valores expressam a média e desvio padrão. Fonte: Elaborado pela autora.



Além disso, a concentração da bactéria patogênica é superior as encontradas em açougues, além de serem compostas por diversos microrganismos, os quais podem apresentar menos virulência. A *E. coli* foi escolhida por ser muito estudada, além de ser uma bactéria patogênica em alimentos e de fácil reprodução. A *E. coli* é um microrganismo no comensal do trato intestinal do homem e de outros animais e compreende um grande número de grupos e tipos sorológicos. De acordo com a normativa brasileira (ANVISA,2001) existem limites de aceitação para coliformes totais de 10^4 sendo *E. coli* parte desses grupo. A contaminação microbiana de alimentos por organismos patogênicos é avaliada através da presença de microrganismos indicadores de contaminação fecal. Os organismos indicadores mais comuns são coliformes totais e os coliformes fecais e, dentre eles, especialmente a *E. coli*.

Esses resultados demonstram as diferenças da aplicação do protótipo em diferentes materiais, visto que comparativamente em amostras inorgânicas o resultado de inativação foi superior em relação as amostras biológicas.

3.4.1.3 Avaliação de contaminações *in natura* em carnes bovinas

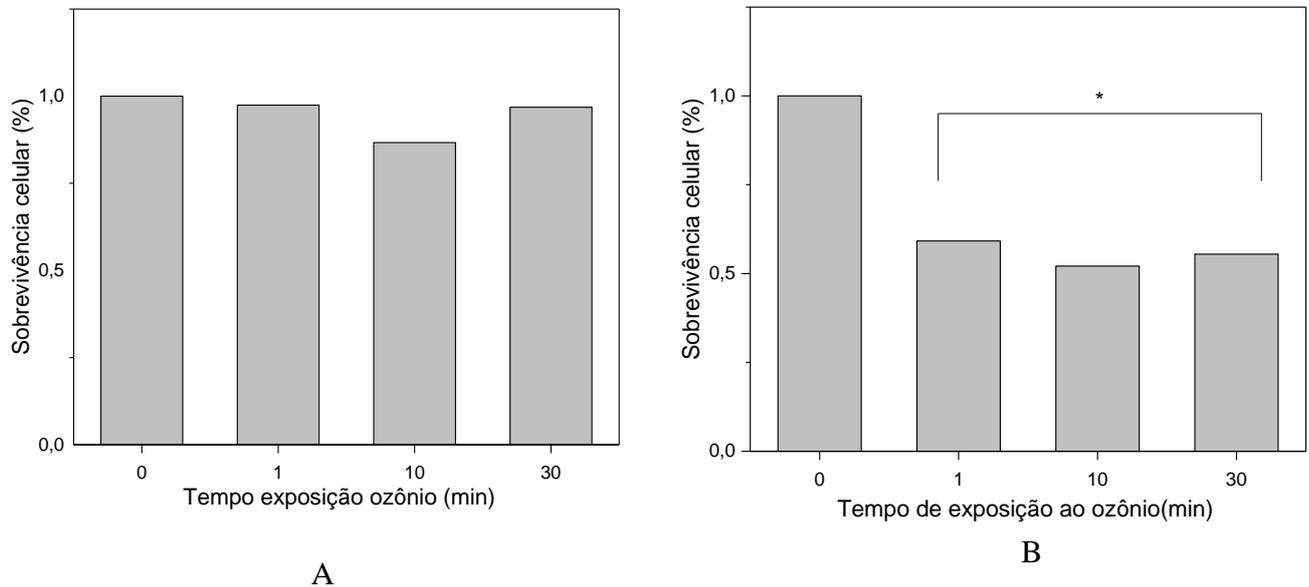
Com o intuito de avaliar a efetividade do protótipo frente ao mal-uso dos instrumentos, distribuição, transporte das carcaças e contato com o operário foram realizados experimentos em condições de contaminação durante a venda de carne para os consumidores. Então foram delineados experimentos considerando a contaminação *in natura*, ou seja, sem a adição de inóculo bacteriano conhecido.

Na Figura 7, observa-se que o ozônio não foi capaz de inativar os microrganismos presentes na superfície da carne, visto que no tempo máximo de tratamento com exposição da carne ao ozônio gasoso, as bactérias apresentaram 0,2 Log maior que o controle, uma hipótese é que o uso da metodologia de homogeneização empregada para a coleta das amostras. Neste caso, a homogeneização pode ter liberado bactérias que estavam em regiões mais profundas para a área superficial da carne, uma vez que a água pode percorrer a porosidade da carne auxiliando na remoção mecânica do interior do tecido

Na Figura 8A, foi observado 10% de redução microbiana em 10 min. que é similar ao resultado de 1 minuto de tratamento com ozônio gasoso. Em 30 minutos não foi possível observar redução comparado com o número inicial de bactérias. Esses resultados podem ser explicados por dois fatores. O primeiro é que o gás ozônio possui baixa difusão para superfícies complexas^[51] e o segundo, é que os microrganismos estão localizados tanto na superfície da carne quanto em seu interior e, sendo assim, a técnica de homogeneização pode ter auxiliado a saída dos microrganismos do interior da amostra. O tratamento das carnes com um *Swab* para coleta das bactérias é apresentado na Figura 8B, representam a quantidade de bactérias que receberam o gás ozônio, por estarem localizadas superficialmente na amostra, e a quantidade de bactérias que não receberam o gás ozônio, por estarem localizadas internamente na amostra de carne.

Já o tratamento das amostras de carne em que a coleta das bactérias foi realizada por *swab* é apresentado na Figura 8B, e inclui apenas os dados das bactérias que receberam o tratamento do ozônio gasoso, ou seja, as localizadas superficialmente nas amostras de carne.

Figura 8 Avaliação do protótipo de ozônio gasoso para carnes bovinas com contaminação própria (*in natura*), utilizando a técnica de coleta homogeneização (A) e swab (B). *Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). Os valores expressam a mediana. Elaborado pela autora.



É válido ressaltar que ao comparar os dois métodos de coleta verificou-se que os resultados podem ser distintos em decorrência de cada técnica, sendo uma coleta superficial para o *Swab* e uma coleta interna e externa para a homogeneização. Por esta razão, é importante adequar a técnica com a característica do equipamento e tratamento aplicado.

Por conseguinte, a metodologia empregada foi alterada para este tipo de avaliação *in natura*. Para coletar as amostras se utilizou o método de coleta de microrganismos superficialmente com *Swab*, com o objetivo de verificar a inativação na área superficial. Os resultados foram mostrados em porcentagem devido a variações de contaminação *in natura* em cada amostra controle. Assim, na Figura 8B foi possível observar a redução do número de bactérias logo após 1 minuto de exposição ao gás ozônio, redução essa que se manteve também no tratamento 30 minutos de exposição, sendo o melhor resultado de inativação obtido com 10 minutos de exposição ao gás ozônio, no qual foi conseguido 52% de redução na carga bacteriana.

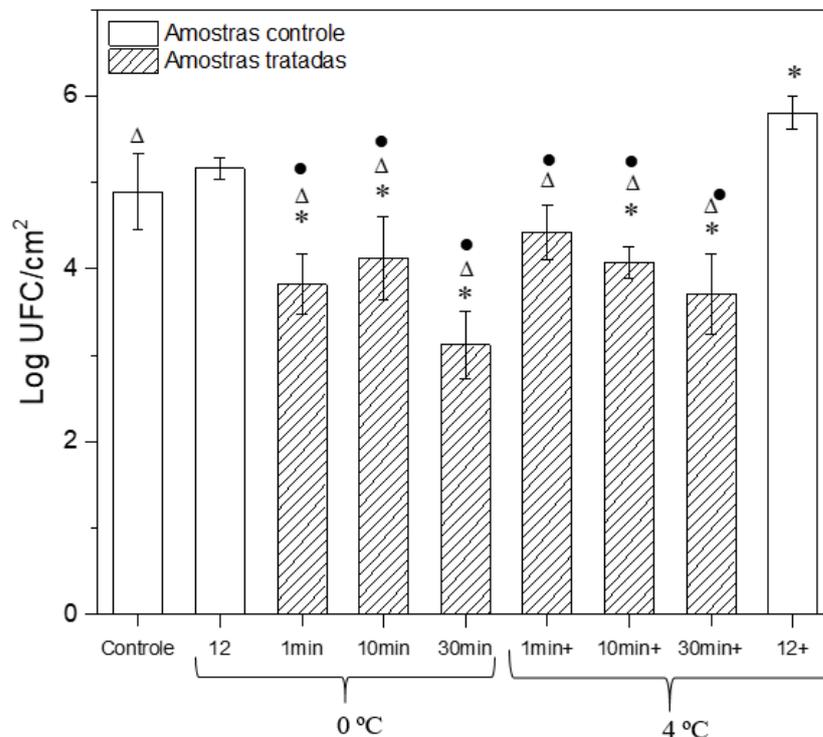
3.4.2 Ciclos de refrigeração com disponibilização do ozônio

A Figura 9 mostra os resultados referentes aos experimentos de ciclos de refrigeração da carne para exposição e venda em açougues, que intercalam tempos de armazenamento nos balcões, freezers ou câmaras frigoríficas.

Para investigar a ação do ozônio gasoso no comportamento microbiológico nesses ciclos de refrigeração até o momento da venda das carnes, foram simulados ciclos de exposição ao ozônio gasoso durante 24 horas. Assim, as amostras foram expostas ao ozônio gasoso por 1, 10 e 30 minutos a cada 12 horas, considerando mudanças de temperatura nas primeiras 12 horas de 4 °C e 0 °C nas outras 12 horas. Além disso, uma amostra controle sem exposição ao gás ozônio foi analisada para conferir a tendência de proliferação microbiana sem uso de sanitizantes.

As amostras tratadas tiveram na primeira mudança de temperatura (4 °C) em 1 minuto de exposição ao gás ozônio uma redução de 1,98 Log (UFC/cm²) da carga microbiana, e em 30 minutos 2,04 Log (UFC/cm²). Após a segunda mudança de temperatura, as amostras controle tiveram um crescimento maior em relação às amostras tratadas com gás ozônio, mantendo-se assim a preservação da carga microbiana.

Figura 9 Ciclos de refrigeração de 12 horas e tratamento de ozônio gasoso de 1, 10 e 30 minutos, em carne bovina contaminada com diferentes espécies microbianas. * Significativamente diferente do controle (p<0,05) ● significativamente diferente do 12 (p<0,05) Δ Significativamente diferente do 12+ (p<0,05). Os valores expressam a média e desvio padrão. Elaborado pela autora.



Os resultados, portanto, evidenciam que a aplicação do ozônio gasoso, embora não esterilize a carne, exerce uma preservação microbiana e evitando a proliferação ao longo dos tempos analisados. Além disso, o grupo não tratado apresentou um aumento significativo de

bactérias, o que demonstra a necessidade de inclusão de técnicas para o controle microbiológico em alimentos, sendo o ozônio um sanitizante promissor, assim como demonstrados por Cárdenas *et.al* (2011) ^[33].

3.4.3 Exposições ao Ozônio com variações no tempo de espera entre cada ciclo

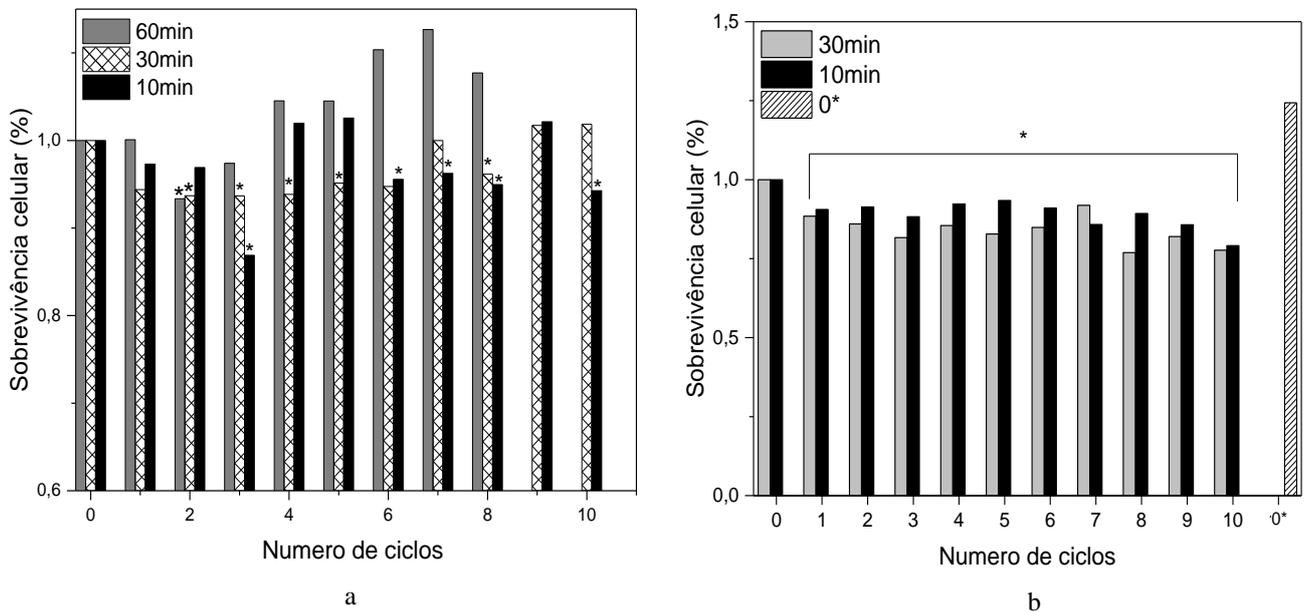
Os experimentos foram realizados para contribuir no entendimento do comportamento das bactérias contidas na superfície das carnes variando os tempos de exposição e espera entre cada ciclo de ozônio.

De acordo com a Figura 10 a, observa-se que o melhor resultado é obtido no último ciclo (10), com tempos de espera de 30 e 10 min. Embora não tenha uma redução significativa, as inativações das bactérias se mantem abaixo das cargas iniciais. Para as variações de intervalo de exposição de ozônio de 1h foi observado um crescimento microbiano de 6% comparado com a amostra controle no último ciclo, isso ocorre possivelmente devido ao metabolismo dessas bactérias, quando o tempo de espera entre exposição ao ozônio é maior, permite que as bactérias se recuperem e se reproduzam. Em média a maioria das bactérias tem tempo de geração de 20 min ^[52]. Não obstante, ao fazer as análises comparando as três variáveis, verificou-se, sutilmente, que a medida em que o tempo de espera é menor, há uma maior inativação microbiana. Também foi observado uma redução de 12,3% no tempo de espera de 10 min no ciclo 3.

Devido a esse resultado, os próximos experimentos foram feitos com tempos de espera de 30 e 10 min, como mostra a Figura 10b. Variou-se o tempo de exposição ao ozônio, deixando atingir 10 min para comparar as amostras controles com o tempo. Foi adicionado mais uma amostra sem exposição ao ozônio, a qual foi coletada após finalizar o último ciclo. Desse modo, obteve-se um aumento de 24% a mais que uma amostra controle coletada no início (Figura 7 b, 0*). Em contrapartida, amostras tratadas com ozônio apresentaram uma redução no último ciclo de 20%, e no ciclo 8 com tempo de espera de 30 min uma redução de 24%.

Como os resultados demonstrados, o ozônio gasoso foi capaz de exercer atividade antimicrobiana, porém a carne por ser um tecido biológico além de ser uma matriz de suporte confere aderência para as células, é fonte nutritiva que favorece sua proliferação. Por esta razão, os melhores resultados obtidos são os que atuam entre o tempo de geração bacteriana e os que fornecem tempo de exposição suficiente para oxidar a bactérias presentes na amostra.

Figura 10 a) Exposição ao ozônio gasoso por 1 min, variando tempo de espera entre ciclo de 1 hora, 30 min, 10 min em amostras de carne. b) Exposição ao ozônio gasoso por 10 min, variando tempo de espera entre ciclo de 30 min, 10 min em amostras de carne. *Significativamente diferente do controle e 0* ($p < 0,05$). Os valores expressam a mediana. Elaborado pela autora.



3.5 Conclusões

A construção do protótipo foi realizada em pequena escala e comprovou sua eficácia utilizando o ozônio gasoso para a inativação bacteriana para amostras inertes, além de mostrar um grande potencial para a descontaminação de materiais que não possam ser submetidas ao calor ou outras situações extremas.

Foi observado a inativação da carga microbiana com a não recontaminação do mesmo para amostras de carne em condições de contaminação *in natura*, obteve-se uma inativação de até 50% da carga inicial. As simulações de ciclos de refrigeração e ozônio gasoso considerando temperaturas de açougues mostrou inativação e preservação das contaminações *in natura* em carne bovina, em comparação as amostras não tratadas.

O ozônio na forma gasosa mostrou-se ser uma alternativa para a inativação microbiana com tempos de exposição de no mínimo de 10 minutos, mesmo 30 min sendo também um tempo com bons resultados não apresentam diferenças ao tempo de 10 minutos, visando assim um melhor custo benefício desse tempo de exposição considerando-o para uma aplicação em escala real.

OTIMIZAÇÃO DO USO DE OZÔNIO AQUOSO E LUZ UV-C PARA A PRESERVAÇÃO DE CARNES BOVINAS

3.6 Contextualização

As alternativas para a descontaminação e preservação de carne durante sua exposição e disponibilização ao consumidor são escassas, considerando diversas situações que contribuem para a inviabilização comercial do alimento. Uma delas é referente à proliferação microbiana que pode ocorrer durante o manuseio pelo operário, por contaminações cruzadas, ou por cargas microbianas do próprio alimento. A técnica mais utilizada atualmente para preservar carnes destinadas ao comércio é a refrigeração, porém sua ação apenas retarda o crescimento dos microrganismos com a diminuição do seu metabolismo ^[45]. A inocuidade dos alimentos com mínimo processamento (limitando o uso de agentes antimicrobianos nocivos para a saúde humana e para o meio ambiente) ^[53] é exigida para a valorização comercial do produto. Portanto, há a necessidade de desenvolver uma nova solução capaz de reduzir a carga microbiana das carnes e garantir que esse alimento chegue aos consumidores com qualidade e baixa carga microbiana. A tecnologia utilizando ozônio aquoso em combinação com luz UV-C é um novo desafio que pode ser utilizado na indústria para promover a descontaminação de alimentos durante sua exposição ou período de armazenagem.

3.7 Objetivo geral

Construir e avaliar a eficácia de um equipamento multifuncional para a descontaminação e preservação de carnes bovinas durante sua exposição e disponibilização comercial.

3.7.1 *Objetivo específicos*

- Desenvolver e avaliar um protótipo de ozonização em fase aquosa pelo método de aspersão de ozônio em água;
- Avaliar o efeito antimicrobiano do ozônio aquoso com a luz UV-C em amostras de carne bovina contaminadas,
- Simular ciclos de exposição a temperatura, ozônio e luz UV-C compatíveis com os horários de exposição das carnes para a venda.

3.8 Metodologia

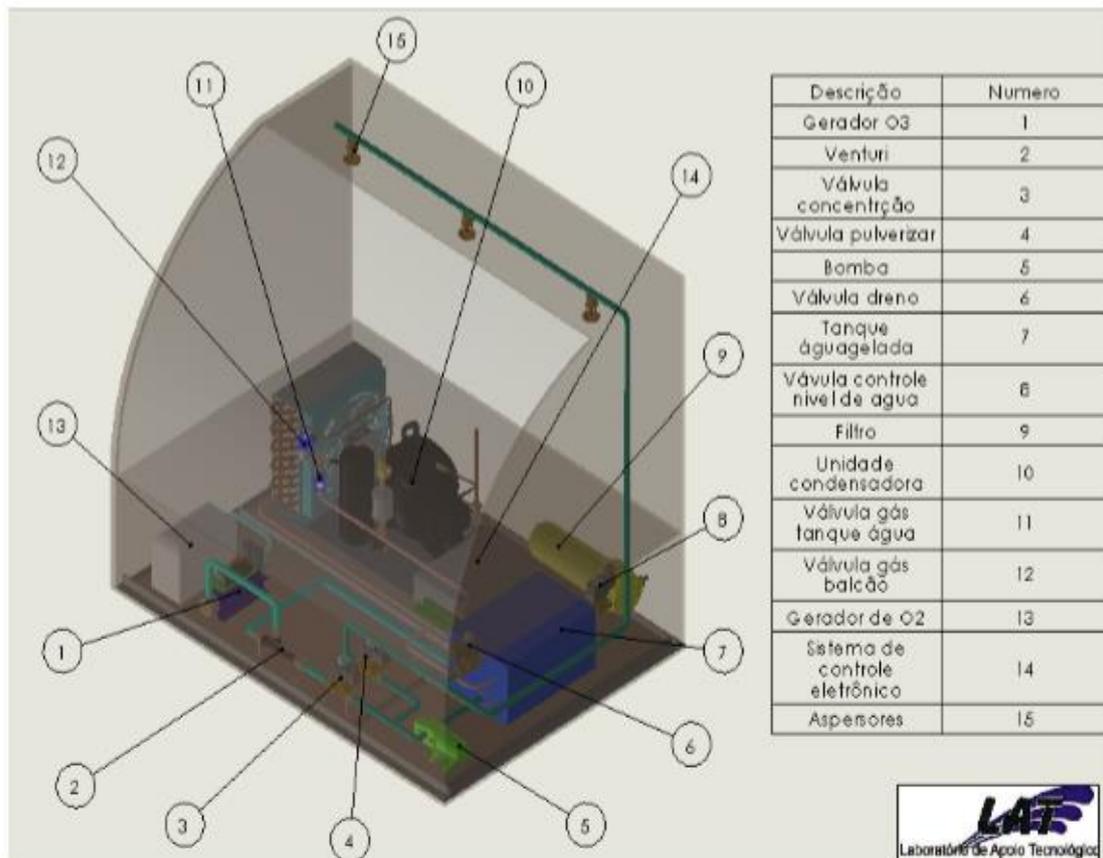
A metodologia proposta abrangeu o desenvolvimento do protótipo de ensaios microbiológicos para cada modo operacional do equipamento para carne bovina.

O microrganismo usado para o estudo, o preparo das amostras de carne bovina (seção 3.3.3.2) e a coleta microbiológica foram descritos no capítulo anterior no item (3.3.2)

3.8.1 Construção do equipamento

O equipamento multifuncional desenvolvido neste estudo trata-se de um balcão refrigerado, onde foram realizadas adaptações das tecnologias ozônio aquoso e luz UV-C pelo Laboratório de Apoio Tecnológico, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (LAT/IFSC/USP). Na Figura 11 está o desenho ilustrativo do equipamento, evidenciando a distribuição dos componentes para o funcionamento do equipamento.

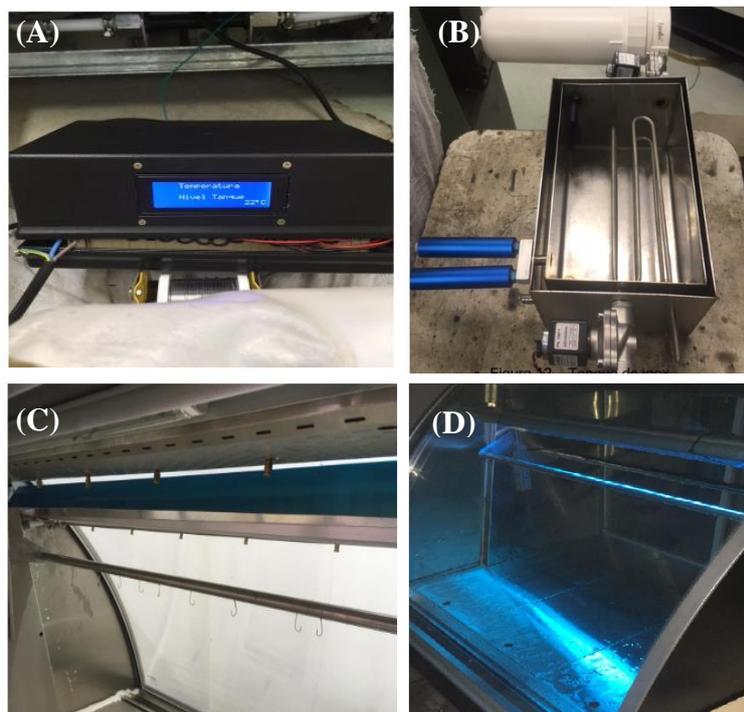
Figura 11 Desenho ilustrativo do equipamento com os componentes e suas respectivas localizações no balcão multifuncional. Elaborado pelo LAT.



Um software eletrônico foi desenvolvido para o controle do sistema para facilitar os modos operacionais do balcão (Figura 12A). Para o processo de ozonização da água é apresentado um sistema de geração de ozônio enriquecido por uma fonte de ar, o gás é transportado por borrachas até o tubo Venturi, onde se faz a mistura que circula por tubos até o tanque, o qual é o estágio de concentração da mistura e armazenamento da água com capacidade de 8 litros. O tanque é composto por serpentinas internas de refrigeração (Figura 12B) para facilitar as baixas temperaturas da mistura, a qual é necessária para estabilizá-lo. Uma vez transcorrido o tempo de concentração, a água ozonizada é transportada por uma bomba mediante tubos até os aspersores (Figura 12C). Por fim, para borrifar a solução ozônio + água foram implementadas válvulas na saída do tanque, assim quando o processo de concentração esteja completo as válvulas sejam fechadas, para evitar líquidos circulantes e vazamentos. Também foi implementada outra válvula antes do gerador de ozônio com o intuito de evitar o vazamento da água até o gerador de ozônio e possíveis curto circuitos.

Para a ação da luz UV-C foram utilizadas lâmpadas UV-C com potência de 30W, instaladas na parte superior tanto do balcão quanto das portas, e no centro da base superior (Figura 12D). Foi implementado sensores nas portas para quando estas estiverem abertas, o acionamento da luz seja suspenso.

Figura 12 Fotos do sistema de geração de ozônio e do balcão multifuncional. (A) Sistema de visualização do software eletrônico que controla o sistema. (B) Tanque em aço inox com serpentinas de refrigeração. (C) Aspersores instalados na parte superior do balcão. (D) Lâmpadas UV-C instaladas na parte superior do balcão. Elaborada pela autora



3.8.2 *Desenho experimental*

Foram testadas 20 amostras de carne bovina contaminadas com *E. coli*, descrito anteriormente. Cada teste apresentou 10 amostras penduradas, localizadas na parte central superior do balcão (A), e 10 amostras localizadas na base do equipamento (B). Cada experimento apresentou $n = 9$.

O efeito da água ozonificada e a luz UV nos microrganismos da carne foram avaliadas independentemente e de forma combinada, resultando em quatro tipos de operação do balcão:

1. Experimentos com luz UV-C realizados em ciclos, com um total de 10 irradiações, sendo as amostras irradiadas por 15 segundos (69 mJ/cm^2) com intervalo de 1 hora entre eles, totalizando 10 horas de experimento
2. Experimentos com ozônio em fase aquosa (0,9 ppm) realizados em ciclos, com um total de 10 aspersões por 30 segundos com intervalo de 1 hora entre eles, totalizando 10 horas de experimento
3. Experimentos com ozônio em fase aquosa e luz UV-C combinados no mesmo ciclo, sendo aplicado primeiro 15 segundos de luz UV-C e, em seguida, 30 segundos de aspersão do ozônio em fase aquosa, totalizando 10 ciclos e 10 horas de experimento
4. Experimentos com ozônio em fase aquosa e luz UV-C aplicados de maneira alternada nos ciclos, totalizando 10 ciclos e 10 horas de experimento

3.8.3 *Análise estatística*

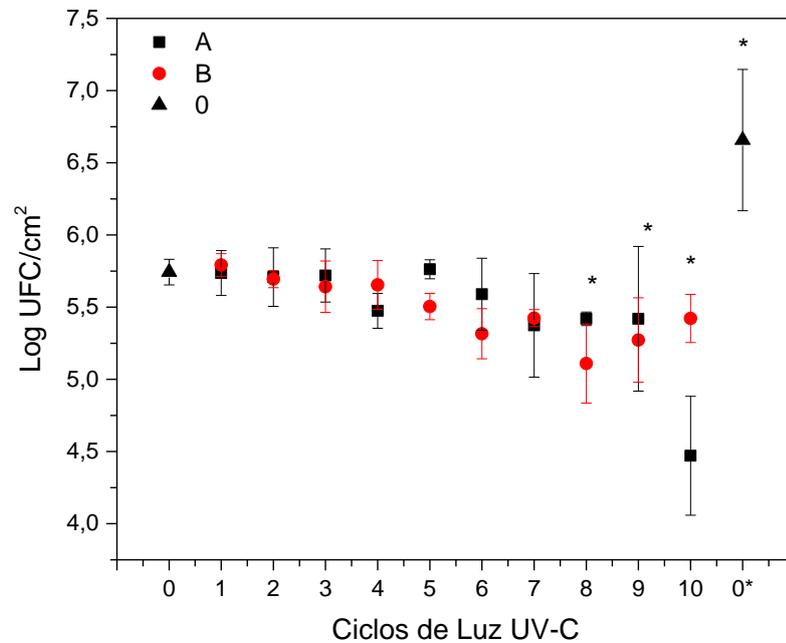
Os resultados foram verificados conforme a sua distribuição paramétrica, para os dados com distribuição normal paramétrica foi aplicado o teste ANOVA One Way. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). Os resultados são apresentados pela média e desvio padrão (distribuição normal)

3.9 **Resultados e discussões**

3.9.1 *Ciclos de Luz UV-C*

Uma vez colocadas as amostras no equipamento, o modo operacional de luz UV-C foi avaliado. Para cada ciclo com tempo de espera entre eles de 1 hora foram dados uma dose de luz entregue de 69 mJ/cm^2 . Os resultados da aplicação de múltiplas doses ao longo do tempo são representados na Figura 13.

Figura 13 Irradiação de luz UV-C em amostras de carne bovina contaminadas com *E. coli* durante ciclos de 1 hora. A dose de luz para cada ciclo foi de 69 mJ/cm². No gráfico, A representa as amostras de carne que foram penduradas na parte superior do balcão, B representa as amostras de carne que foram colocadas na base do balcão, e 0 representa as amostras de carne que não receberam irradiação, sendo amostras controles avaliadas no início e no final dos experimentos. Os valores expressam a média e desvio padrão. *Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). Elaborada pela autora



Na Figura 13 dois tipos de amostras de carne foram avaliadas de acordo sua localização, sendo assim as amostras (A) representam as carnes localizadas na parte central superior do equipamento (penduradas) e (B) representam as carnes que foram colocadas na base do balcão, Além disso, o crescimento bacteriano de amostras sem nenhum tipo de tratamento também foi avaliado no início (0) e no final (0*) dos experimentos.

Os resultados mostraram redução de 1,3 Log (UFC/cm²) para *E. coli* no último ciclo da amostra A, quando comparada com a amostra controle inicial (0), e um aumento significativo de *E. coli* de 0,91 Log UFC/cm² na amostra controle final (0*), quando comparada com a amostra controle inicial (0). Embora os resultados não tenham apresentado reduções significativas nos ciclos, foi observada quando os grupos tratados A e B são comparados com o grupo controle inicial (0). Isso ocorreu devido à baixa dose de luz aplicada, que foi suficiente para evitar a proliferação exponencial do microrganismo nas amostras de carne.

Resultados similares foram encontrados para carne moída contaminada com quatro cepas de *Salmonella* e apresentam reduções de 1,15 Log (UFC/g), utilizando luz UV-C durante 30 segundos^[45]. Outro estudo realizado em carnes bovinas de hanwoo (Raça de gado Hanu

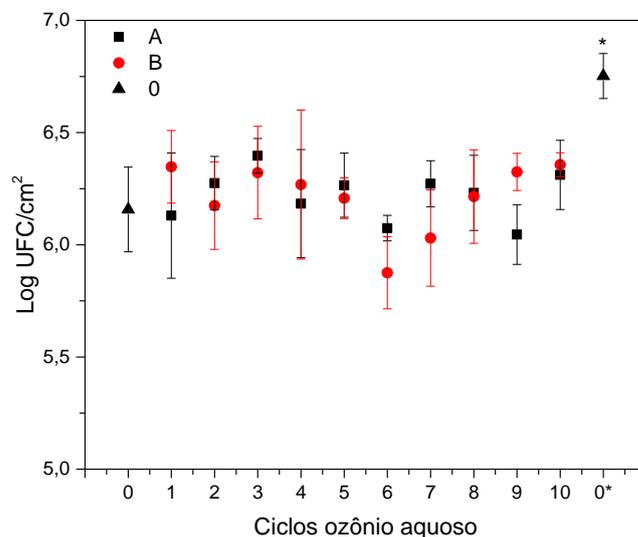
nativo da Coréia) contaminadas com bactérias mesófilas, não apresentou diferença estatística na inativação bacteriana entre amostras tratadas e controle, mas mostrou que as amostras irradiadas preservaram a mesma quantidade de carga microbiana ao longo dos dias de armazenamento [53].

Estudos recentes avaliando a luz UV-C em carnes bovinas, frango e carne de porco contaminadas com *E.coli* ATCC 25922 foram irradiadas com lâmpadas UV-C (254 nm) por tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 minutos. As amostras apresentaram reduções de o número de *E. coli* em carne bovina em torno de $(1,0 \pm 0,2)$ Log (UFC / mL) após 5 min de exposição, em frango e porco, reduções de $(1,6 \pm 0,7)$ Log UFC / mL e $(1,6 \pm 0,4)$ Log (UFC / mL) após 4 e 10 minutos de irradiação, respectivamente [71]. Estes trabalhos corroboram com os resultados obtidos no presente estudo.

3.9.2 Ciclos de ozônio aquoso

Os ciclos de ozônio em fase aquosa foram realizados na concentração de 0.9 ppm borrifados nas amostras de carne por 30 segundos. Na Figura 14 estão os resultados microbiológicos obtidos após cada ciclo, porém não se observou redução significativa de microrganismos presentes na carne ($p < 0,05$), mas apresentou diferença significativa para amostras não tratadas no final do experimento, sendo esta comparada com todos os ciclos, obtendo um crescimento de 0,6 Log (UFC/cm²) em relação as amostras ozonizadas.

Figura 14 Ciclos de aspersão de ozônio aquoso (0,9 ppm) em amostras de carne bovina contaminadas com *E. coli*. No gráfico, A representa as amostras de carne que foram penduradas na parte superior do balcão, B representa as amostras de carne que foram colocadas na base do balcão, e 0 representa as amostras de carne que não receberam irradiação, sendo amostras controles avaliadas no início e no final dos experimentos. Os valores expressam a média e desvio padrão. *Significativamente diferente ($p < 0,05$). Elaborada pela autora



As reduções microbiológicas neste experimento foram semelhantes as apresentadas por trabalhos relatados na literatura. O estudo realizado por Castillo *et. al* (2003) ^[54] consistiu na avaliação do sinergismo da lavagem por água morna (28 °C) e ozônio aquoso (95 ppm) em carcaças bovinas contaminadas com *E.coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium*. As reduções obtidas com o tratamento por ozônio não foram significativas quando comparadas com os resultados dos testes das amostras controles e com as obtidas apenas com a lavagem com água. O sinergismo do ozônio foi avaliado com temperaturas de 45 °C até 75 °C, usando carne contaminada com *Clostridium perfringens*. Os resultados mostraram que a combinação obteve uma diminuição de 1,5 Log (UFC/g) nas células vegetativas usando 5 ppm de ozônio aquoso por 5 minutos, seguido pelo tratamento a 45 °C por 30 minutos e uma redução de 2,09 Log(UFC/g) usando 5 ppm, seguido de tratamento a 55 °C. No entanto, nestes estudo as amostras analisadas individualmente com ozônio e em temperaturas de 45 °C e 55 °C não apresentaram diferença significativa de inativação microbiana em relação a amostra controle. Nesta investigação também foi relatada a morte celular para temperaturas maiores de 65 °C, entretanto a aparência da carne sofreu alteração, que se mostrou deteriorada e com aparência cozida (escurecimento da superfície da carne) ^[55].

Em outro estudo, filés de salmão do Atlântico foram inoculados com *Listeria innocua*, que avaliaram a influência de tratamentos de aspersões de ozônio aquoso nas concentrações de 1 mg/L e 1,5 mg/L de ozônio, obtendo para 1 mg/L com 3 aplicações de ozônio 1,17 Log (UFC/g) de inativação microbiana. As populações bacterianas aeróbicas foram significativamente reduzidas por aspersões de 1,5 mg/L de ozônio no dia 0 em comparação com os controles. No entanto, em contraste com a eficácia dos tratamentos, não houve reduções significativas de múltiplas aspersões para concentração 1,5 mg/L. Embora os resultados mostrem diferenças significativas, não especificaram os tempos de contato da pulverização com as amostras, o que é um parâmetro muito importante para a reduções e qualidade final do alimento ^[56].

Outro trabalho relatou o estudo de ozônio aquoso na concentração de 12 ppm com intervenções por spray em carne bovina fresca com tempos de 90 segundos de pulverização a cada 30 minutos por 12 horas. O resfriamento por spray de ozônio aquoso reduziu as bactérias aeróbicas em 0,99 Log e para *E. coli* O157: H7 a redução foi de 1,46 Log ^[57] mostrando a eficácia da tecnologia.

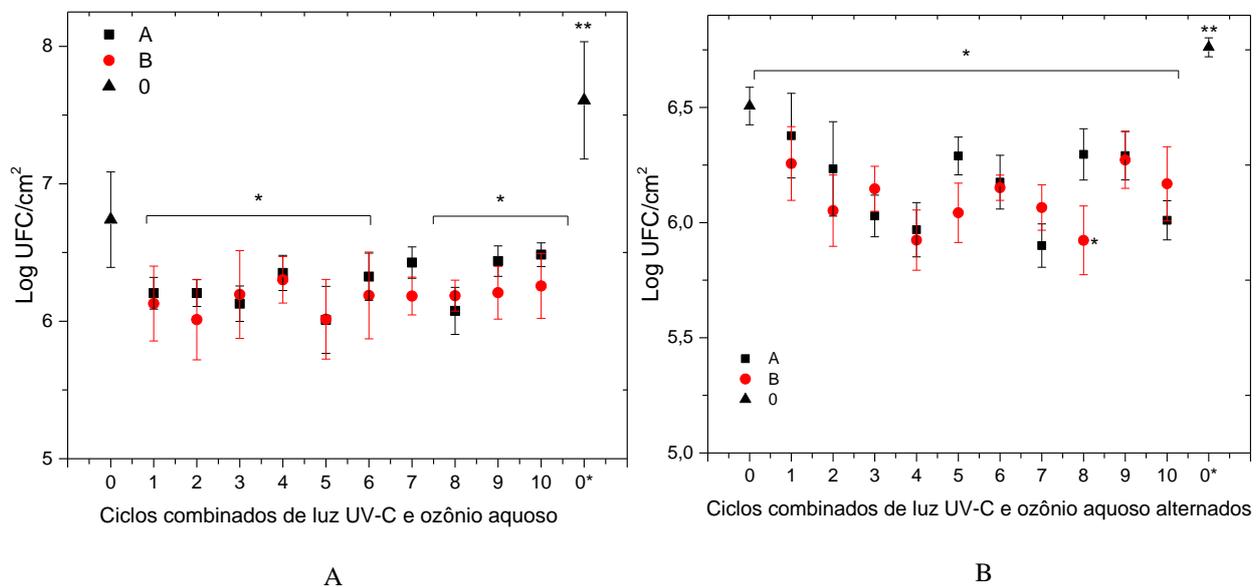
Embora no presente estudo as reduções microbianas tenham sido menores, elas podem estar relacionadas ao tempo de exposição das amostras ao ozônio, à concentração do ozônio aquoso, e ao maior tempo de espera entre cada ciclo. Por conseguinte, foi demonstrado que o

ozônio em água, disponibilizado no modo de aspersões sequencial, auxilia na preservação da carga microbiana inicial, aumentando possivelmente o tempo de prateleira e a qualidade do alimento

3.9.3 Ciclos combinados de luz UV-C e ozônio aquoso

Conforme apresentado na Figura 13, 14, a luz UV-C e ozônio aquoso mostraram-se potenciais agentes para redução microbiana e principalmente na preservação da carga bacteriana inicial, uma vez que as doses de luz UV-C e concentrações de ozônio aquoso entregues afetaram as bactérias, mesmo que não tenham levado a população microbiana à redução completa. De acordo com os resultados os tratamentos realizados individualmente foram semelhantes, com destaque para luz UV-C, para o qual é observado redução de 1,3 Log (UFC/cm²) na Figura13, o que motivou a combinação das técnicas afim de potencializar os resultados.

Figura 15 Combinação do ozônio aquoso com luz UV-C (a) Ciclos combinados de luz UV e ozônio aquoso simultâneos, (b) Ciclos alternados de luz UV-C e ozônio aquoso em amostras de carne bovina contaminadas com *E.coli*. * Significativamente diferente ($p < 0,05$), **Significativamente diferente de todos ($p < 0,05$). Os valores expressam a média e desvio padrão. Elaborado pela autora



A avaliação da combinação da luz UV-C e ozônio aquoso nas carnes bovinas, são representadas na Figura 15. Pode-se observar que, em quase os ciclos do gráfico A e B amostras tratadas com a combinação foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) das amostras não tratadas. Além disso, para uma comparação da técnica nas mesmas condições sem tratamento, amostras coletadas no final do experimento apresentaram maior crescimento microbiano

quando comparado com os resultados de todos os ciclos e controles iniciais, constatando que, as carnes que não foram tratadas com as tecnologias aqui aplicadas para a preservação da carga microbiana têm tendência ao aumento da proliferação bacteriana, mesmo mantendo temperaturas não ideais para o crescimento. De acordo com a Figura 15A observam-se reduções de *E.coli* de 0,7 Log (UFC/cm²) nos ciclos 2, 5, e 8. Nos demais ciclos foram mantidas a carga e proliferação microbiana inicial (6,6 Log UFC/cm²). A amostra controle (0*) apresentou crescimento microbiano de 1 Log (UFC/cm²) aproximadamente em relação as amostras tratadas.

A fim de avaliar as tecnologias de forma alternada visando obter menores efeitos invasivos nos alimentos, os experimentos de ciclos luz UV-C + ozônio aquoso e luz UV-C+ ozônio aquoso (Figura 15B), foram aplicados, respectivamente. Os resultados apresentaram uma leve redução da carga microbiana, sendo em torno de 0,7 Log (UFC/cm²), evitando desse modo a proliferação de microrganismos. Esses resultados no experimento alternados ficaram muito próximos dos experimentos da combinação do ozônio aquoso e luz UV-C simultaneamente. As tecnologias conjuntas se auxiliam ao ter diferentes alvos de morte celular. O ozônio por ter um alto poder oxidante atua principalmente na oxidação das paredes lipídicas das bactérias^[58] e a luz UV-C especificamente no comprimento de onda 254 nm, apresenta elevada absorção pelo material genético dos microrganismos, o que promove dano no DNA, evitando sua replicação, e levando os microrganismos à morte ^[39]. Assim esses efeitos potencializados na eficácia dos tratamentos combinados para a inativação microbiana.

Até o presente momento há na literatura trabalhos com combinação de luz UV-C e ozônio apenas em frutas e verduras. Um estudo realizado em espargos brancos avaliou os efeitos de lavagem com ozônio (aprox. 3 ppm ou 4,5 ppm a 10 ° C) e irradiações com luz UV-C na carga microbiana *in natura*, as quais foram analisados três vezes durante um armazenamento de quatro dias. Os resultados mostraram que não afetou significativamente suas cargas microbianas durante o armazenamento ^[59]. Gutierrez *et.al* (2019) ^[60] relatou num estudo em rúcula a aplicação separada dos tratamentos com luz UV-C (25 kJ/m², 6,3 min) e ozônio gasoso (2,5 mg/L por 10 minutos) e de sua combinação (25 kJ/m² luz UV-C com 2,5 mg/L ozônio gasoso) em contagens de mesófilos aeróbicos. A aplicação separada de luz UV-C e ozônio gasoso e da sua combinação reduziram a carga para 1,3 e 1,4 Log UFC/g, respectivamente. Em relação ao controle, a carga para psicofílico para os tratamentos de ozônio gasoso, luz UV-C e combinações levaram a redução na contagem de 1,20, 1,37 e 1,22 Log (UFC/g), respectivamente. Para enterobactérias foi obtido reduções de 1,07 a 0,67 Log (UFC/g) em comparação com o controle. Portanto, as combinações da luz UV-C e ozônio encontradas

na literatura (para outros tipos de amostras) mostraram similaridade com os resultados obtidos neste estudo com carnes bovinas, quanto à preservação da carga microbiana e aos valores de inativação.

Esse resultado evidencia que as amostras que tenham contaminações, mesmo sendo armazenadas em temperaturas ideais, possuem à tendência de proliferação microbiana caso não ocorram intervenções para a desaceleração do crescimento dos microrganismos, conforme verificado nas amostras controles coletadas no final dos experimentos, mostrando assim a ação da luz UV-C e ozônio aquoso combinados. Apesar dos resultados de inativação terem sido baixos, a preservação do alimento foi conseguida evitando as aparências de “cozido” ou deterioramento do alimento.

3.10 Conclusões

Com a realização deste estudo foi possível construir um novo protótipo realizando as adaptações pertinentes para avaliar as tecnologias de pulverização de ozônio aquoso e luz UV-C em amostras de carne bovina.

Com o intuito de testar todos os modos operacionais do balcão, foram realizados os testes para as tecnologias luz UV-C, ozônio aquoso e as tecnologias combinadas obtendo assim 4 formas de operá-lo, sendo a mais eficiente as combinações das tecnologias para a preservação e inativação microbiana. Apesar dos resultados não serem os melhores para as inativações microbianas, são considerados bons levando em conta o tempo mínimo de exposição a que as amostras de carnes foram submetidas, sendo baixa tanto a dose de luz quanto a concentração de ozônio. Além disso, os tempos entre cada ciclo foram de 1 hora, tempo hábil para que as bactérias consigam se recuperar.

A combinação de luz UV-C+ ozônio aquoso e alternados em carnes bovinas é inovação do presente trabalho, não havendo relatos anteriores na literatura, principalmente em amostras de carne na etapa final de venda, auxiliando a preservação do alimento.

4 AVALIAÇÃO DAS QUALIDADES ORGANOLEPTICAS DAS CARNES BOVINAS

4.1 Contextualização

Na indústria alimentícia, o controle microbiológico é de suma importância para garantir a inocuidade dos alimentos. Dependendo da técnica escolhida para a contenção desses microrganismos, pode ocorrer a degradação do alimento. Como exemplo, pode-se citar o uso do vapor de água e altas temperaturas como alternativa, no entanto isto favorece a desnaturalização de proteínas, causando uma impressão de alimento “cozido”, o que muitas vezes não é aceito pelo consumidor. Outro exemplo, para a supressão desses microrganismos, é o uso de ácidos e outras substâncias como nitritos e nitratos, que além de modificar as propriedades do alimento, são prejudiciais ao ser humano.

Em vista disso, esta pesquisa visa avaliar o efeito do ozônio gasoso e combinados de luz UV-C e ozônio aquoso como alternativa às estratégias supracitadas, cujo objetivo final é inativar os microrganismos presentes nos alimentos e, conseqüentemente, preservar suas características e garantir ao consumidor a segurança alimentar. Para isto foram realizados diferentes ensaios em amostras de carnes bovinas, de grande importância na indústria tecnológica de carne. Os estudos foram: verificação do pH das amostras após tratamentos, quantificação de proteínas pelo método *Bradford*, e ensaios de TBARS para medir oxidação lipídica. Para ozônio gasoso, além de todos os ensaios já mencionados, foram realizados estudos histológicos para verificar danos estruturais, e a capacidade de retenção da água.

4.2 Objetivo

Avaliar o efeito do tratamento ozônio gasoso e as tecnologias combinadas de luz UV-C e água ozonizada do balcão sobre as qualidades organolépticas em amostras de carne bovinas.

4.2.1 Objetivos específicos

Avaliar nas amostras de carnes bovinas o pH e a capacidade de retenção de água (CRA), quantificar as proteínas totais pelo método de *Bradford*, identificar e caracterizar as possíveis alterações morfológicas das amostras de carne através de estudos histológicos; avaliar peroxidação lipídica pelo método de TBARS

4.3 Metodologia

O Análise das características organolépticas após o tratamento de ozônio gasoso em carnes bovinas foram realizados para tempos diferentes de exposição ao ozônio de 1, 10, 30 minutos e uma amostra controle que não recebeu exposição ao ozônio gasoso

As análises realizadas para o balcão foram feitas para os ciclos 1,3,6 e 10 de o tratamento combinado de luz UV-C (15 segundos) e água ozonizada (30 segundos de borrifação) respectivamente, e também para uma amostra controle. A escolha desde modo operacional do balcão foi porque possuía os dois tratamentos, e em termos de mudança as amostras tratadas seriam as mais afetadas.

As metodologias apresentadas foram as mesmas para os dois equipamentos

4.3.1 *Análise de pH*

O medidor de pH de bancada utilizado foi da marca Qualxtron® modelo QX1500. Para a realização das medidas, foi triturada a amostra com 90 mL de solução tampão em um liquidificador por 1 minuto. O sobrenadante foi coletado, filtrado e medido. Para cada tempo ou ciclo se fez uma medida de pH e a cada medida foi replicada duas vezes ^[61].

4.3.2 *Ensaio de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)*

Foi medida a oxidação lipídica pelo método do ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), o teste representa a quantificação do malonaldeído (MDA), em alimentos geralmente que tem sido associado com ranço oxidativo, ou seja, oxidação de ácidos graxos poli-insaturados contidos na carne.

A análise foi realizada conforme Siu e Draper (1978) ^[62] utilizando o método de filtração. Amostras de carne bovina (5 g) foram homogeneizadas durante 5 minutos com 25 mL de água destilada estéril, a seguir foram adicionados 25 mL de ácido tricloroacético a 10% e se deixou reagir por 5 minutos, após essa reação as amostras foram filtradas com papel filtro qualitativo de diâmetro de 15 cm. Após, retirou-se 5 mL do filtrado e adicionado 1 mL de ácido 2-tiobarbiturico 0,06M e foram colocados em tubos de ensaio com tampa de rosca estéril, por 90 min a 80 °C, após foi coletado 2 mL e analisado no espectrofotômetro Cary UV-VIS (Varian, Austrália) no comprimento de onda 532 nm. Foi comparado com a um “branco” com preparo de 2 mL de água destilada, 2 mL de ácido tricloroacético e 1 mL de TBA. Os resultados são

mostrados como espécies reativas ao ácido 2-tiobarbiturico (TBARS) em mg de malonaldeído MDA/kg de carne para os cálculos utilizou-se o coeficiente de extinção molar do MDA $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.3.3 Ensaio de quantificação de proteínas pelo método do Bradford

Para a execução deste teste, se seguiu o protocolo padrão de microplacas na faixa de 100-1500 ug/mL da ThermoFisher para o Kit *Bradford*. As amostras foram pesadas 5 g de carne bovina em balança de precisão, após o tratamento, para a homogeneização foi utilizado um Ultraturrax Stirrer (Modelo ultra380) para facilitar a extração. Para a homogeneização foi usado um tampão de extração de proteínas na proporção 1:1, cujo processo foi sempre sobre resfriamento (aplicação de gelo). Depois disto, a mistura foi centrifugada em 10,000 rpm por 15 min a 4 °C e o líquido sobrenadante foi utilizado para a análise.

Resumidamente, o protocolo padrão de microplacas é apresentado a seguir:

1. Pipetados 10 µL de cada amostra na microplaca
2. Adicionou-se 300 µL do reagente Coomassie Plus a cada poço e misturou-se com o agitador de placas por 30 segundos.
3. Removeu-se a placa do agitador. Para resultados mais consistentes, incubou-se a placa por 10 minutos em temperatura ambiente (TA).
4. Mediu-se a absorbância a 595 nm ou próximo a ele com um leitor de placas.
5. Subtraia-se o valor média de 595 nm para as réplicas em branco das medidas de 595nm de todos os outros indivíduos réplicas de amostras padrão e desconhecidas.

Foi preparada uma curva padrão plotando a média de 595 nm corrigida em branco para cada padrão da BSA vs. concentração em mg / mL. As concentrações medidas foram, 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,125, 0,025, 0 de padrão BSA.

4.3.4 Capacidade de retenção de água (CRA)

Foi medida a retenção de água antes e depois do tratamento com ozônio gasoso. O ensaio consistiu em cortar as amostras com peso de 5 g junto com 8 ml uma solução 0,6M de NaCl, com 30 minutos de banho de gelo agitando por 1 min. Logo após, foi centrifugada numa rotação de 10,000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado por decantação, e medido volume final ^[61]. Os resultados foram calculados conforme a Equação 1

$$CRA = [(8 - s) \times 100]/5 \quad (\text{Equação 1})$$

onde CRA é dado em mL de água retidos para cada 100 g de carne, e *s* representa o volume de sobrenadante extraído.

4.3.5 *Lâminas histológicas*

Para avaliar o efeito do ozônio gasoso na estrutura das amostras de carnes foram confeccionadas lâminas histológicas. As peças foram levadas para o processamento após serem embebidas em paraformaldeído à 4%. A seguir o tecido foi tratado seguindo os passos de (i) desidratação (sequência de imersões crescentes em etanol), (ii) diafanização (dois banhos em xilol), (iii) inclusão em parafina (três banhos em estufa com parafina) e (iv) emblocamento. Em seguida, as amostras foram cortadas em micrótomo (cortes de 5 a 10 micrômetro), coradas com hematoxilina e eosina e analisadas. As lâminas foram observadas em microscópio Nikon eclipse Ti-S, para análise de dano nas fibras musculares. Para cada tempo de exposição ao ozônio, foi confeccionada uma lâmina correspondente e uma amostra controle sem exposição ao ozônio.

4.3.6 *Análise estatística*

Os experimentos foram realizados com um total de 9 réplicas. Os resultados foram verificados conforme a sua distribuição paramétrica, onde os dados que apresentaram distribuição normal foram aplicados o teste Anova One Way, com um valor $p < 0,05$. Os resultados foram apresentados pela média e desvio padrão.

4.4 **Resultados e discussões**

4.4.1 *pH*

O abate e a sangria do animal geram um conjunto de reações bioquímicas que transforma os músculos em carnes, mas tais reações dependem também de processos biofísicos como a temperatura, estresse do animal, entre outros. Quando o animal está vivo, o meio do músculo obter energia é pelo glicogênio muscular na presença de oxigênio, que é transportado via sanguínea, gerando ATP. Quando a etapa da sangria é realizada, ou seja, não há mais corrente sanguínea, por conseguinte não tem mais oxigênio no tecido muscular, e fatores externos como sexo, raça, idade, alimentação, fatores genéticos, estresse do animal antes do

abate não alterem as quantidades de glicogênio muscular. Fatores de estresse podem levar ao esgotamento do glicogênio muscular antes do abate. O músculo continua obtendo energia por meio da via anaeróbica, utilizando assim as reservas de glicogênio muscular e transformando-as em glicose, a qual gera lactato (ácido lático) e ATP. Como não há vias de transporte (sangue) para levar o ácido lático até ser metabolizado, este é acumulado no músculo e por consequência há uma queda do pH. Também existe um processo biofísico que pode afetar a rapidez da queda do pH, como a temperatura, porque se for elevada a glicólise e a queda de pH ocorre mais rapidamente, por isso seu controle é importante.

A formação de ácido lático muscular é o que determina o valor pH. Assim, levam ao *rigor mortis*, que é quando os músculos se endurecem. Se há uma produção de *rigor mortis* rápida ou lenta, influencia diretamente o pH final da carne. Isso depende de como as reservas de glicogênio são degradadas e, portanto, os estágios pré-abate são de grande importância. Normalmente o valor inicial do pH após o abate é de 7-6,9 e estabiliza após 24h, com valores de 5,8 a 5,5 sob condições normais e controladas. Se os valores finais do pH na carne são maiores que 6, essa anomalia é conhecida como DFD (*dark, firm, dry*), uma carne de coloração escura, seca e firme. Esse cenário ocorre quando as reservas de glicogênio são esgotadas antes do abate. O pH abaixo de 5,8 significa uma degradação muito rápida do glicogênio e é chamado PSE (*pale, soft, exudative*) pálida, flácida e com baixa retenção de água. Carnes com essas características e pH finais não são de qualidade e pouco valorizadas na indústria da carne ^[63].

Parâmetros como o pH, são de importância na qualidade das carnes bovinas, uma alteração no pH pode mudar maciez, textura, cor, capacidade de reter água e alterar o crescimento bacteriano ^[64]. Baseando-se na literatura, existem valores de pH os quais determina a qualidade das carnes após o abate, quando o animal morre, há um decaimento de pH até 24 horas onde se estabiliza em valores de 5.5-5.8. Com base nestes valores, os resultados obtidos para ozônio gasoso mostrado na Tabela 7 e para os tratamentos combinados Tabela 8, na amostra controle apresentam uma carne com pH normal, e as amostras tratadas não teve uma diferença significativa de mudança do pH. Desse modo, este resultado evidencia que a ação do ozônio gasoso e os tratamentos combinados na carne não interfere no pH, logo não altera a qualidade da carne.

Tabela 7 Medida de pH em amostras de carnes expostas ao ozônio gasoso 1, 10, 30 minutos e amostra controle. Elaborada pela autora.

Amostras	pH
Controle	5,71±0,09
1 min	5,73±0,01
10 min	5,88±0,16
30 min	5,89±0,06

Tabela 8 Medida de pH em amostras de carnes expostas combinados de luz UV-C e ozônio aquoso. Elaborada pela autora.

Amostras	pH
Controle	5,76±0.07
1 ciclo	5,88±0.15
3 ciclo	5,90±0.14
6 ciclo	5,88±0.14
10 ciclo	5,88±0.15

4.4.2 Ensaio de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

A oxidação lipídica é considerada um processo complexo onde as espécies reativas de oxigênio reagem com os ácidos graxos poli-insaturados da carne, gerando a deterioração destes, definindo a qualidade sensorial e tempo de prateleira do alimento^[65]. O TBARS é um produto de oxidação secundária comum utilizado para medir a oxidação lipídica. O malonaldeído (MDA) é um produto gerado pelo deterioramento dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados. A formação do composto TBA-MDA produz uma cor vermelho quantificado pela absorvância variando de 500 a 532 nm^[66].

Na literatura foi encontrado o limiar de aceitação para carnes e produtos cárneos de 1 mg de MDA/ kg de Carne^[67]. Nas Tabelas 9 e 10 são apresentados os resultados de mg de MDA/kg de carne obtidos após os tratamentos. De acordo com os valores da Tabela 9, as amostras que foram expostas ao ozônio gasoso não se observam diferenças significativas com relação ao controle, sendo que em 30 minutos de ozônio foi o valor com maior oxidação, no entanto estes resultados adequam-se ao limiar de aceitação. Num estudo realizado em carne

bovina exposto ao gás ozônio por 3 horas e concentração de 4 ppm obteve resultados para o ensaio de TBARS de $0,33 \pm 0,001$ mg de MDA/ kg de carne, sendo este valor maior aos obtidos, considerando que este efeito foi pelo tempo de exposição, corroborando-se que exposições ao gás ozônio até 3 horas não afetam significativamente os ácidos graxos ^[33].

Tabela 9 Efeito do tempo de tratamento com ozônio gasoso na oxidação lipídica de amostras de carne bovina. Os valores são apresentados com a média e desvio padrão. Elaborada pela autora.

Amostras	mg de MDA/ kg de carne
Controle	0,21±0,04
1 min	0,19±0,03
10 min	0,23±0,04
30 min	0,29±0,06

Na Tabela 10 é mostrado os valores obtidos para a avaliação do teste TBARS após tratamentos combinados com luz UV-C e ozônio aquoso em carnes bovinas, observando-se que não teve diferença significativa para as amostras tratadas relacionadas ao controle e entre cada ciclo. Considerando que o valor máximo de TBARS aceitável é 1mg de MDA/ kg de carne, e os obtidos foram menores inferindo que o uso dos tratamentos combinados não incrementou no teor de malonaldeído.

Tabela 10 Efeito do tempo de tratamento com ozônio aquoso e luz UV-C na oxidação lipídica de amostras de carne bovina. Os valores são apresentados com a média e desvio padrão. Elaborada pela autora

Amostras	mg de MDA / kg de carne
Controle	0,12±0,11
1 ciclo	0,12±0,04
3 ciclo	0,08±0,04
6 ciclo	0,07±0,00
10 ciclo	0,12±0,06

4.4.3 Quantificação das proteínas pelo método do Bradford

A quantidade de proteínas totais foi medida pelo reagente Bradford. Foi construído uma curva padrão com diluições seriadas de albumina de soro bovino (BSA) para obter as concentrações das amostras (Figura 16). Os cálculos foram feitos com a equação da reta, $Y=0,4247 + 0,66816*x$, onde Y é absorbância medida e x a concentração não conhecida. Os resultados obtidos são representados nas Tabelas 11 e 12.

Figura 16 Curva padrão de Albumina de soro bovino (BSA), absorbância medida em 595 nm. Elaborada pela autora.

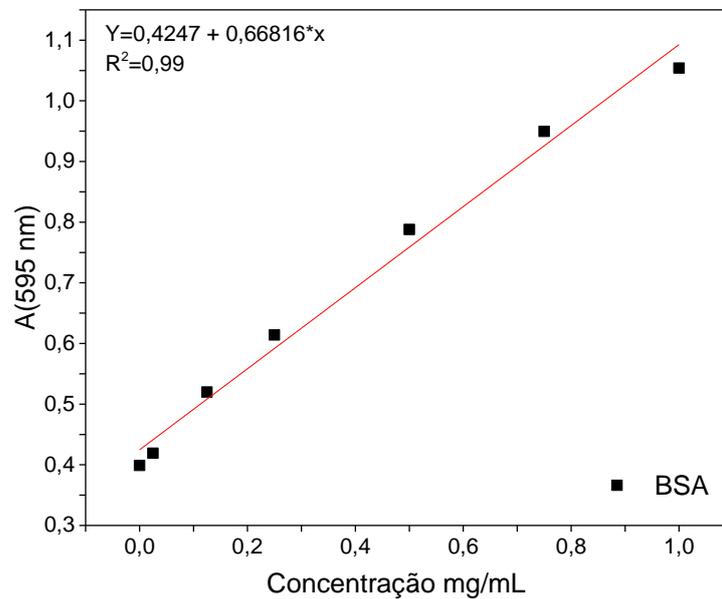


Tabela 11 Quantidade total de proteínas em carne bovina tratadas com ozônio gasoso. Elaborada pela autora.

Amostras	mg de proteína/ g carne
Controle	9,17±0,68
1 min	9,16±0,50
10 min	8,76±0,73
30 min	8,48±0,33

De acordo com os resultados (Tabela 11) para o tratamento ozônio gasoso em carnes bovinas não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) em relação a amostra controle, entretanto o maior tempo de exposição teve uma pequena diminuição da quantidade total de proteínas. Na Tabela 12 é mostrado os dados obtidos após tratamento dos ciclos combinados

de luz UV-C e ozônio aquoso, os ciclos não apresentaram diferença significativa em relação ao controle na quantidade de proteínas totais das amostras. Por outro lado, entre os ciclos, ocorreu diferença significativa entre o ciclo 6 e o ciclo 9, sendo a maior quantidade de proteínas totais no último ciclo. Uma forte hipótese para isto, é que as amostras são únicas e heterogêneas, podendo variar sua quantidade de proteínas totais. As aplicações com os tratamentos não mostram diminuição da quantidade total da proteína, portanto as tecnologias não danificam este parâmetro.

Tabela 12 Quantidade total de proteínas em carne bovina tratadas com ozônio aquoso e luz UV-C * Significativamente diferente ($p < 0,05$). Elaborada pela autora.

Amostras	mg de proteína/ g carne
Controle	9,17±0,68
1 ciclo	8,80±0.51
3 ciclo	8,75±0,65
6 ciclo	8,41±0,99*
9 ciclo	9,60±0,59*

4.4.4 CRA

A capacidade de retenção de água é definida como a facilidade em reter sua própria umidade ou água sob a aplicação de forças externas tais como, aquecimento, cortes, trituração, pressão e/ou centrifugação. Este parâmetro é importante em relação à qualidade da carne, pois compromete a textura e cor da carne, a suculência e a firmeza da carne cozida. Por isso, uma perda razoável de água não é desejável pois afeta características organolépticas e perda de peso, que são rejeitados tanto pelo consumidor como pela indústria ^[68].

De acordo com a Tabela 13, pode-se afirmar que os valores medidos de CRA nas amostras de carne tratada após exposição ao ozônio gasoso mantiveram-se iguais até 10 min de tratamento em relação à amostra controle. No tempo de 30 min de exposição ao ozônio obteve-se uma diferença mínima de 3 unidades. Portanto, a exposições de gás ozônio nos tempos de 1, 10 e 30 min não apresentaram efeito negativo nas amostras

Tabela 13 Medidas de CRA para amostras de carne expostas ao ozônio gasoso por 1, 10 e 30 min e amostra controle. Elaborada pela autora.

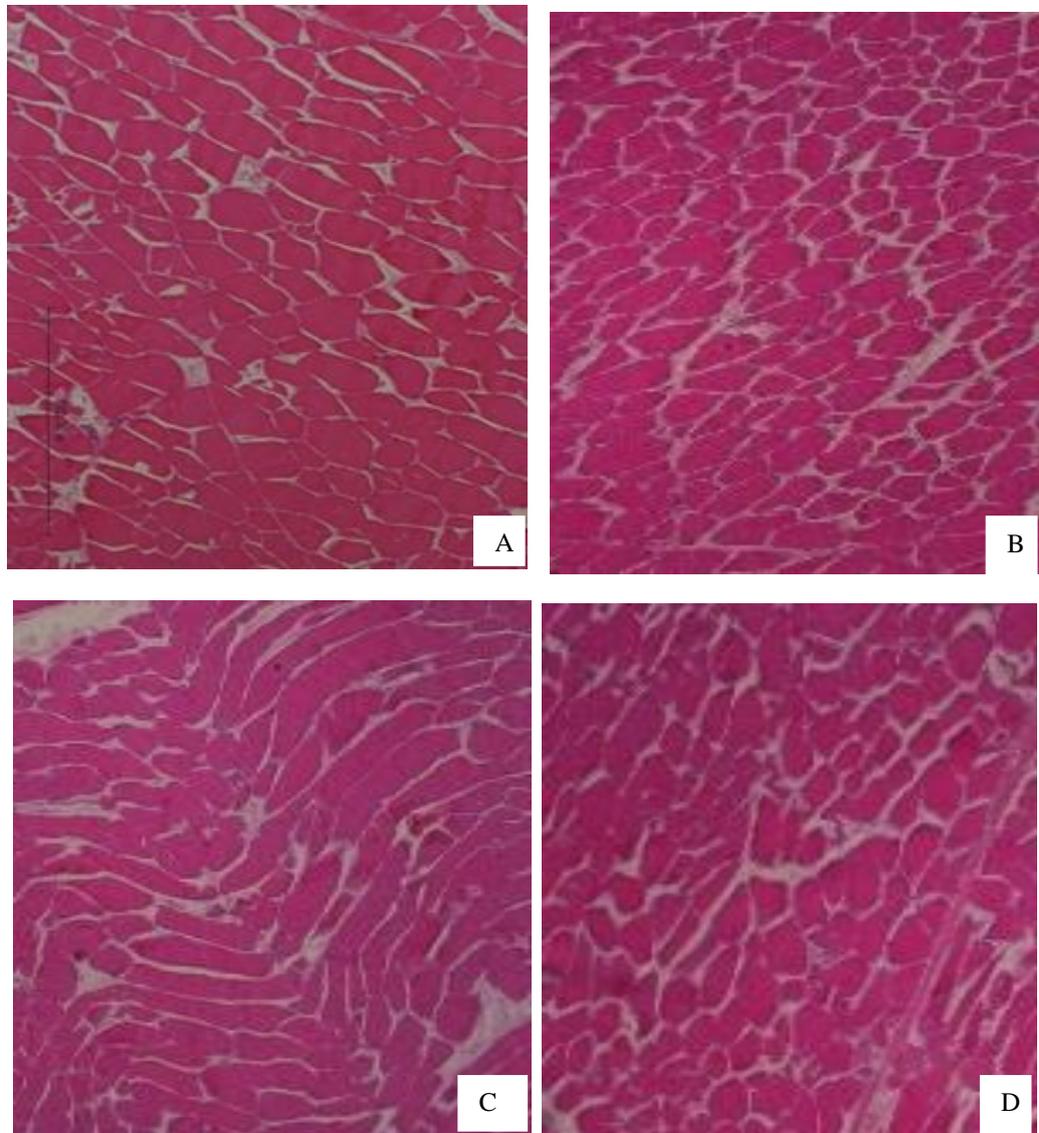
Amostras	CRA
Controle	36
1min	36
10min	36
30min	33

4.4.5 Lâminas Histológicas

A análise de possíveis alterações morfohistológicas com as amostras de carnes expostas ao ozônio gasoso não apresentou mudanças na estrutura das fibras musculares com relação ao controle (Figura 17) e, corroboram como Atlas de Histologia^[69]

Os resultados obtidos com o protocolo mostraram que nas três amostras analisadas (1, 10 e 30 minutos) não se observou autólise celular e o espaço intercelular manteve-se íntegro. Destaca-se que o processo de autólise das células não foi observado, o que pode ser evidenciada pela similaridade do comportamento histológico entre as amostras sadias^[70]

Figura 17 Cortes transversais de amostras de músculos de carne bovina expostas ao ozônio gasoso. (A) Controle, (B) tempo de 1 minuto, (C) 10 minutos, (D) 30 minutos. Coloração HE (hematoxilina e eosina). Aumento 4x. Elaborado pela autora.



4.5 Conclusões

A partir do estudo do efeito do ozônio gasoso sobre as características da carne bovina pode-se inferir que os tratamentos não provocaram a oxidação lipídica sendo uma das qualidades da carne de grande importância. Conjuntamente, resultados similares foram concluídos para os tratamentos combinados de luz UV-C e ozônio aquoso com valores obtidos dentro da faixa aceitável. A quantificação de proteínas totais pelo método Bradford não mostrou diferenças significativas na alteração da quantidade proteica total para os dois tratamentos. Em

relação aos testes de pH, as amostras se encontraram na faixa de carnes normais e não apresentaram valores significativamente diferentes aos das amostras controle, mas foi observado um leve aumento do pH conforme ao incremento do tempo de ozônio gasoso e os ciclos.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Durante a realização deste projeto foi possível alcançar os principais objetivos de cada Capítulo. A tecnologia de ozônio gasoso mostrou ser potencial como agente antimicrobiano para a descontaminação de amostras inertes atingindo reduções significativas de 3,88 Log (UFC/cm²) de contaminações por *E. coli*, sendo de grande interesse e importância para o campo industrial.

Para os tratamentos com carnes bovinas o ozônio gasoso também mostrou ser eficiente na diminuição da carga microbiana em amostras contaminadas *in natura*, reduzindo até o 50% da população em tempos curtos de 10 minutos de exposição. Além disto, em situações simuladas para a exposição comercial destas amostras normalmente armazenadas a baixas temperaturas (0, 4 °C) as aplicações do ozônio gasoso nesses intervalos de refrigeração auxiliou na inativação microbiana, preservando o tempo de vida de prateleira do alimento, e isto foi verificado quando amostras sem tratamento ao ozônio gasoso evidenciaram crescimento exponencial da carga microbiana.

Para a melhor disponibilização do tratamento ozônio gasoso foram realizado teste com ciclos repetitivos de ozônio gasoso, obtendo diferentes situações de aplicabilidade da técnica, inativando as cargas microbianas e mantendo ao longo do tempo (10 horas). Na avaliação das propriedades das carnes com o efeito do ozônio gasoso nas carnes foram realizados os ensaios para o pH com a capacidade de retenção da água, estudo de laminas histológicas para visualizar danos estruturais, oxidação lipídica e quantificação da massa proteica, sendo que todos os ensaios não apresentaram diferenças significativas no tempo de 30 minutos em relação as amostras controles. Mostrando que o ozônio gasoso pode ser uma alternativa para a preservação do alimento sem alterar significativamente suas qualidades.

Para a pesquisa realizada para as tecnologias de ozônio aquoso e luz UV-C, foi possível a construção do equipamento que visa uma nova tecnologia com o uso de agentes antimicrobianos tais como luz ultravioleta (UV-C) e ozônio na forma aquosa com disponibilização deste na forma de aspersão. Na avaliação da eficácia destas tecnologias para a descontaminação da carga microbiana, foi proposto a utilização de cada tecnologia de forma isolada e combinada em baixa dose e contratação para a aplicação de situações reais em relação aos tempos nas quais são disponibilizadas as amostras de carne bovina que é em torno de 12 horas, como resultado os ciclos realizados com a tecnologia UV-C apresentou diferenças significativas em relação a amostras sem tratamento. No entanto para os ciclos realizados de forma isolada com ozônio aquoso não teve diferenças significativas nas reduções, mas

possibilitou evitar a proliferação exponencial das bactérias. Isto porque foi analisado o comportamento microbiológico de amostras sem tratamentos e sempre houve crescimento da carga microbiana significativamente. Foi possível realizar os ensaios com as tecnologias combinadas, relatando a inativação microbiana com diferenças significativas e ao longo do tempo preservando a carga microbiana, porém auxiliando na preservação do tempo de vida do alimento. Para as avaliações da qualidade das carnes após o tratamento as tecnologias combinadas de luz UV-C e ozônio aquoso não alteraram de forma significativa o pH, a oxidação lipídica e a quantificação da massa proteína.

Portanto este estudo mostrou o potencial das tecnologias ozônio gasoso, luz UV-C e ozônio aquoso e suas formas combinadas para a inativação microbiana das carnes bovinas sem alterar as propriedades organolépticas do alimento.

6 REFERÊNCIAS

- [1] IBGE. Indicadores IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística de Produção Pecuária*, 2018. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>, acesso em 4 de fev.2019 IBGE. Indicadores
- [2] IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística de Produção Pecuária, 2019*. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>, acesso em 3 de fev.2020
- [3] USDA. United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Disponível em: < <https://www.fas.usda.gov/>>, acesso em 3 de fev.2020
- [4] FISCHMANN, M. **Avaliação da vida-de-prateleira e qualidade da carne bovina submetidas a embalagens sob diferentes atmosferas**. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre.2016
- [5] PAIVA DE SOUSA, C. The Impact of Food Manufacturing Practices on Food borne Diseases. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, São Carlos, SP. v. 51, Jun/Ago 2008. P. 815-823
- [6] SOFOS J.N. Microbial growth and its control in meat, poultry and fish. em: Pearson A.M., Dutson T.R. (eds) **Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products**. Advances in Meat Research, vol 9. Springer, Boston, MA. 1994
- [7] KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E.; KIM, J.G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **J Food Sci.**, Washington, D.C.v.66, n.9, 2001.p.1242-1252.
- [8] PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. **Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products-advances in meat research series**. London: Chapman & Hall, v.9. 1994. p359
- [9] GUEDES, A. M. M., NOVELLO, D. A., MENDES, G. M. P., & CRISTIANINI, M. Ultraviolet Technology For Food Preservation [tecnologia De Ultravioleta Para Preservação De Alimentos]. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*.2009.
- [10] FDA. US Food and Drug Administration. **Irradiation in the production, processing and handling of food**: Part 179.39. Code of Federal Regulations. (2007). pp. 439–440.
- [11] U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Chapter III, Subchapter A, Sec. 301.2. Terminology: **Adulteration and Misbranding**. Disponível:<<https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2006-title9-vol2/pdf/CFR-2006-title9-vol2-part301.pdf>> acesso em: 25 Janeiro 2020.

- [12] FAO, Food and Agriculture organization of the United Nations, **Meat consumption**. Disponivel em: <<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html/>> acesso em 5 de dez 2019
- [13] FSA (Food Standards Agency), McCance and Widdowson's **the Composition of Foods**. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. 2002.
- [14] PURCHAS, R. W., WILKINSON, B. H., CARRUTHERS, F., & JACKSON, F. comparison of the nutrient content of uncooked and cooked lean from New Zealand beef and lamb. *Journal of Food Composition and Analysis*, Nova Zelanda. v.35(2), Agosto 2014.p75-82.
- [15] LIU, Y.J., XIE, J., ZHAO, L.J., QIAN, Y.F., ZHAO, Y., LIU, X., 2015. Biofilm formation characteristics of *Pseudomonas lundensis* isolated from meat. *Journal of Food Science*. China v.80. Outubro 2002.p M2904-M2910
- [16] NYCHAS, G. J. E., SKANDAMIS, P. N., TASSOU, C. C., & KOUTSOUMANIS, K. P. Meat spoilage during distribution. *Meat science*, Greece. v. 78(1-2), Janeiro 2008 .p77-89.
- [17] GRIBBLE, A., & BRIGHTWELL, G. Spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and *campestris* in chilled vacuum packaged lamb, and their detection and identification by real time PCR. *Meat science*, Nova zelanda.v.94(3), Julio 2013.p361-368.
- [18] CORNELIS, P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied microbiology and biotechnology*, Bruxelas, Bélgica. v 86(6), Março 2010. p1637-1645.
- [19] ANDREANI, N.A., MARTINO, M.E., FASOLATO, L., CARRARO, L., MONTEMURRO, F., MIONI, R., BORDIN, P.,CARDAZZO, B.. Tracking the blue: a MLST approach to characterise the *Pseudomonas fluorescens* group. *Food Microbiology*. Italia. v39, Dezembro 2013. p116 e 126.
- [20] POTHAKOS, V., DEVLIEGHERE, F., VILLANI, F., BJÖRKROTH, J., & ERCOLINI, D. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat science*, Ghent, Bélgica. v109, Abril 2015. p66-74.
- [21] SAKALA, R.M., HAYASHIDANI, H., KATO, Y., KANEUCHI, C., OGAWA, M. Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. *Journal of Applied Microbiology* Kanagawa, Japan. v92, Janeiro 2002. p173 e 179.
- [22] POTHAKOS, V., STELLATO, G., ERCOLINI, D., DEVLIEGHERE, F. Processing environment and ingredients are both sources of *Leuconostoc gelidum*, which emerges as a major spoiler in ready-to- eat meals. *Applied and Environmental Microbiology*. Ghent, Belgium. v81, Maio 2015. p3529 e 3541.

- [23] BRIGHTWELL, G., CLEMENS, R., URLICH, S., BOEREMA, J., 2007. Possible involvement of psychrotolerant *Enterobacteriaceae* in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats. **International Journal of Food Microbiology**. Nova Zelanda.v119, Novembro 2007. p334 -339.
- [24] LAWRIE, R. A., & LEDWARD, D. *Lawrie's meat science*. **Woodhead Publishing**. (2014).
- [25] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA (ANVISA). **Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001**.Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 02 maio.2019
- [26] GONÇALVES, A. Ozone- an Emerging Technology for the Seafood Industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Canada. Vol.52, n. 6. November-December 2009 pp. 1527-1539.
- [27] KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E.; KIM, J.G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **J Food Sci.**, Ohio US. v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.
- [28] BERMÚDEZ, A; BARBOSA, G. Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. **Food Control**, Washington, USA. v. 29, no 1, Jan 2013. p. 82-90.
- [29] BIALKA, K.; DEMIRCI, A. Decontamination of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* on blueberries using ozone and pulsed UV-light. **Journal of Food Science**, vol. 72, no 9, Outubro 2013.p. M391-M396. 2013.
- [30] WANI, S., MAKER, J. K., THOMPSON, J. R., BARNES, J., & SINGLETON, I. Effect of Ozone Treatment on Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria sp.* on Spinach. **Agriculture**, UK. v5(2), Março 201. p155-169.
- [31] KAZI, M., PARLAPANI, F. F., BOZIARIS, I. S., VELLIOS, E. K., & LYKAS, C. Effect of ozone on the microbiological status of five dried aromatic plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Greece. v98(4), Setembro 2017. p1369-1373.
- [32] STIVARIUS, M. R., POHLMAN, F. W., MCELYEA, K. S., & APPLE, J. K. Microbial, instrumental color and sensory color and odor characteristics of ground beef produced from beef trimmings treated with ozone or chlorine dioxide. **Meat Science**, USA. v60(3), Dezembro 2002. p299-305.
- [33] CÁRDENAS, F. C., ANDRES, S., GIANNUZZI, L., & ZARITZKY, N. (2011). Antimicrobial action and effects on beef quality attributes of a gaseous ozone treatment at refrigeration temperatures. **Food Control**, Buenos Aires, Argentina. v22(8), Agosto 2011. p1442-1447.

- [34] EL-DAHSHAN, HANAN A.; HAFEZ, TAGHREED A.; EL-GHAYATY, HANAN A. Effect of ozone on preservation of chilled chicken. **Assiut Vet. Med. J**, vol. 59, no 136, janeiro 2013. p. 22-26.
- [35] CANTALEJO, M. J., ZOUAGHI, F., & PÉREZ-ARNEDO, I. Combined effects of ozone and freeze-drying on the shelf-life of Broiler chicken meat. **LWT-Food Science and Technology**, Pamplona, Espanha.v68, Maio 2016.p400-407.
- [36] AYRANCI, U. G., OZUNLU, O., ERGEZER, H., & KARACA, H. Effects of Ozone Treatment on Microbiological Quality and Physicochemical Properties of Turkey Breast Meat. **Ozone: Science & Engineering**, Turquia. v 42(1), Agosto 2019. P 95-103.
- [37] RICE, Rip G.; GRAHAM, Dee M.; LOWE, Matt T. Recent ozone applications in food processing and sanitation. **Food Safety Magazine**, vol. 8, no 5, Outubro/Novembro 2002 p. 10-17.2002.
- [38] BINTSIS, T., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., & ROBINSON, R. K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry—a critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, UK.v 80(6), 2000. p637-645.
- [39] BARBOSA-CÁNOVAS, G. V., TAPIA, M. S., & CANO, M. P. (EDS.). **Novel food processing technologies**. CRC press. 2004 p.408
- [40] GUEDES, A. M. M., NOVELLO, D., MENDES, G. & CRISTIANINI, M. Ultraviolet Technology For Food Preservation [tecnologia De Ultravioleta Para Preservação De Alimentos]. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**.
- [41] CHAR, C. D., MITILINAKI, E., GUERRERO, S. N., & ALZAMORA, S. M. Use of high-intensity ultrasound and UV-C light to inactivate some microorganisms in fruit juices.**Food and Bioprocess Technology**, Buenos Aires, Argentina. v 3(6), Dezembro 2009.p797-803.
- [42] MANZOCCO, L., DA PIEVE, S., & MAIFRENI, M. (2011). Impact of UV-C light on safety and quality of fresh-cut melon. **Innovative food science & emerging technologies**, Italia. v 12(1), Dezembro 2010.p13-17.
- [43] MANZOCCO, L., DA PIEVE, S., BERTOLINI, A., BARTOLOMEOLI, I., MAIFRENI, M., VIANELLO, A., & NICOLI, M. C. Surface decontamination of fresh-cut apple by UV-C light exposure: Effects on structure, colour and sensory properties. **Postharvest Biology and Technology**, Italia. v61(2-3), 2011. p165-171.
- [44] CHUN, H. H., KIM, J. Y., LEE, B. D., YU, D. J., & SONG, K. B. Effect of UV-C irradiation on the inactivation of inoculated pathogens and quality of chicken breasts during storage. **Food Control**, República da Coréia. v 21(3), Março 2010. p276–280.

- [45] YEH, Y., DE MOURA, F. H., VAN DEN BROEK, K., & DE MELLO, A. S. Effect of ultraviolet light, organic acids, and bacteriophage on Salmonella populations in ground beef. **Meat Science**, USA. V 139, Maio 2018. p44–48.
- [46] STERMER, R. A., LASATER-SMITH, M. A. R. G. A. R. E. T., & BRASINGTON, C. F. (1987). Ultraviolet radiation—an effective bactericide for fresh meat. **Journal of food protection**, Texas.v50(2), Juno 1987.p108-111
- [47] DE BARCELLOS, MARCIA D., et al. "European consumers' acceptance of beef processing technologies: A focus group study." **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. Aarhus, Dinamarca. v11.4. Outubro 2010.p721-732.
- [48] LAZARUS, C. R., A. ABU-BAKAR, R. L. WEST, AND J. L. Comparison of microbial counts of beef carcasses by using the moist swab contact method and secondary tissue removal technique. **Appl. Environ. Microbiol.** Florida. v 33. Janeiro 1977. p217-218.
- [49] GORMAN, B. M., KOCHEVAR, S. L., SOFOS, J. N., MORGAN, J. B., SCHMIDT, G. R., & SMITH, G. C. Changes on beef adipose tissue following decontamination with chemical solutions or water of 35C or 74C. **Journal of Muscle Foods**, Colorado. v8(2), Janeiro 1997. p185–197.
- [50] MOORE, G., GRIFFITH, C., & PETERS, A. Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. **Journal of food protection**, UK. v63(8), Agosto 2000. p1100-1106.
- [51] MEGAHED, A., ALDRIDGE, B., & LOWE, J. The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. **PloS one**, Egito. V 13(5). 2018
- [52] MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, 10.ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2004, 608p.
- [53] KIM, H. J., LEE, Y. J., & EUN, J. B. Changes in the microbiological characteristics of Korean native cattle (Hanwoo) beef exposed to ultraviolet (UV) irradiation prior to refrigeration. **Korean journal for food science of animal resources**, UK, v 34(6), Março 2015. p815.
- [54] CASTILLO, K. S. MCKENZIE, L. M. LUCIA, and G. R. ACUFF (2003) Ozone Treatment for Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Serotype Typhimurium* on Beef Carcass Surfaces. **Journal of Food Protection**: Vol. 66, No. 5, Maio 2003, pp. 775-779.

- [55] JOHN S. NOVAK and JAMES T. C. YUAN Increased Inactivation of Ozone-Treated *Clostridium perfringens* Vegetative Cells and Spores on Fabricated Beef Surfaces Using Mild Heat. **Journal of Food Protection**. USA. v 67, No. 2, February 2004, pp. 342-346
- [56] CROWE, K. M., SKONBERG, D., BUSHWAY, A., & BAXTER, S. Application of ozone sprays as a strategy to improve the microbial safety and quality of salmon fillets. **Food Control**, USA. v25(2), Novembro 2012. p464-468.
- [57] KALCHAYANAND, N., WORLIE, D., & WHEELER, T. A Novel Aqueous Ozone Treatment as a Spray Chill Intervention against *Escherichia coli* O157: H7 on Surfaces of Fresh Beef. **Journal of Food Protection**, USA. v82(11), October 2019.p1874-1878.
- [58] MAHAPATRA, A. K., MUTHUKUMARAPPAN, K., & JULSON, J. L. (2005). Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 45(6), 447-461.
- [59] HUYSKENS-KEIL, S., HASSENBERG, K., & HERPPICH, W. B. Impact of postharvest UV-C and ozone treatment on textural properties of white asparagus (*Asparagus officinalis* L.). **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Berlin, Germany. v84(2), September 2012. p229.
- [60] GUTIÉRREZ, D. R., & RODRÍGUEZ, S. D. C. (2019). Combined Effect of UV-C and Ozone on Bioactive Compounds and Microbiological Quality of Fresh-Cut Rocket Leaves. **American Journal of Food Science and Technology**, Argentina. v7(3), Abril 2019.p71-78.
- [61] BRAÑA VARELA, D., et al. *Manual de Análisis de Calidad en Muestras de Carne*. Sagarpa. 2011
- [62] SIU, G. M., & DRAPER, H. H. (1978). A survey of the malonaldehyde content of retail meats and fish. **Journal of Food Science**, v43(4), 1978. p1147-1149.
- [63] MARTINS, Cátia arruda. **Efeito do pH final sobre a qualidade da carne de bovinos da raça Nelore**. 2017. 73f. Mestre em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Instituto superior de Agronomia- Universidade de Lisboa.
- [64] MELO, AURÉLIO FERREIRA, et al. Fatores que influenciam na qualidade da carne bovina: Revisão. **PUBVET**, Goiás, Brasil. vol. 10, Outubro 2016. p. 721-794.
- [65] AMARAL, A., SILVA, M. & LANNES, S. Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors—a review. **Food Science and Technology**, São Paulo, Brasil. Vol 38, Dezembro 2018. p1-15.

- [66] OSAWA, C. C., FELÍCIO, P. E. D., & GONÇALVES, L. A. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, Campinas, SP. v28(4), jul/ ago 2005. p655-663.
- [67] GRAY, J. I., GOMAA, E. A., & BUCKLEY, D. J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat science**, Irlanda. v43, Dezembro 1999. p111-123
- [68] FEIJÓ, G. L. D. **Qualidade da carne bovina. CURSO CONHECENDO A**, 2000.
- [69] YOUNG, B., STEVENS, A., & LOWE, J. S. **Wheater histologia funcional: texto e atlas em cores**. Elsevier Brasil. (2007). p 100-101
- [70] ZEOLA, N. M. B. L., et al. Evaluation of the production model and fat inclusion in qualitative and sensorial parameters of the sheep hamburgers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Jaboticabal, SP. Juno 2012. vol. 64, no 3, p. 727-734.
- [71] CORRÊA, T. Q., BLANCO, K. C., GARCIA, É. B., PEREZ, S. M. L., CHIANFRONE, D. J., MORAIS, V. S., & BAGNATO, V. S. Effects of ultraviolet light and curcumin-mediated photodynamic inactivation on microbiological food safety: a study in meat and fruit. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, São Carlos, SP. v 30. Juno 2020. p101678.