

VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA DO USO DE GÁS OZÔNIO NA DESINFECÇÃO DE TAMPAS DE GALÃO DE ÁGUA MINERAL NO MUNICÍPIO DE CACOAL - RO (BRASIL)

VERIFICATION OF THE EFFECTIVENESS OF THE USE OF OZONE GAS IN THE DISINFECTION OF GALLON CAPS OF MINERAL WATER IN THE MUNICIPALITY OF CACOAL – RO (BRAZIL)

MARIA EDUARDA BIANCO¹, MICHELY TAVARES NOVAES¹, FABIANA DE OLIVEIRA SOLLA SOBRAL², RENAN FAVA MARSON^{3*}

1. Acadêmica (o) do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná (CEULJI/ULBRA); 2. Biomédica, Mestre em Biologia Celular e Molecular, docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná (CEULJI/ULBRA); 3. Biomédico, Mestre em Bioengenharia, docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná (CEULJI/ULBRA).

* Avenida Engenheiro Manoel Barata da Fonseca, 762, Cx Postal 61, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil. CEP: 76907-438. renanfmarson@gmail.com

Recebido em 22/11/2017. Aceito para publicação em 07/12/2017

RESUMO

A água mineral deve ser totalmente livre de microrganismos, e o consumo da mesma vem crescendo conforme o passar dos anos. Coliformes totais, Enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens* são tolerados até 2,0 UFC/100 mL, já os coliformes termotolerantes devem estar ausentes em 100 mL, conforme a Resolução nº 310/1999. A falta de higienização e cuidados na coleta e envase podem levar a contaminação cruzada e o cloro, método utilizado na desinfecção de materiais, vem apresentando riscos mutagênicos. Sendo assim, o ozônio (O₃) tem sido utilizado como forma de desinfecção. Foram analisadas 48 amostras antes de ozonizar, 48 amostras depois de ozonizar nos tempos 12', 15', 20' e 30 minutos (sem a higienização prévia da cuba que acondiciona as tampas) e 48 amostras após a ozonização nos tempos 12', 15', 20' e 30 minutos (com higienização da cuba). Houve crescimento dez amostras ozonizadas sem a higienização da cuba. Nas amostras que foram coletadas após a higienização e ozonização da cuba, não houve crescimento bacteriano. Os resultados obtidos mostram que o ozônio, de forma isolada, não reduziu a quantidade de microrganismos. Porém, quando combinado com a higienização e ozonização prévia da cuba os resultados obtidos foram satisfatórios.

PALAVRAS-CHAVE: Ozônio, água mineral, tampas, mesófilos, microrganismos.

ABSTRACT

The mineral water must be totally free of microorganisms, and the consumption of the same one has been growing as the years go by. Total coliforms, enterococci, *Pseudomonas aeruginosa* and *Clostridium perfringens* are tolerated up to 2.0 CFU / 100 mL, while thermotolerant coliforms should be absent in 100 mL, according to the Resolution nº 310/1999. The lack of hygiene

and care in the collection and packaging can lead to cross-contamination and chlorine, the method used in the disinfection of materials, is presenting mutagenic risks. Thus, ozone (O₃) has been used as a form of disinfection. 48 samples were analyzed before ozonization, 48 samples after ozonization at 12', 15', 20' and 30 minutes times (without previous hygiene of the tub wrapping the caps) and 48 samples after ozonization at 12', 15', 20' and 30 minutes (with cleaning of the tub). There were ten ozonized samples without tub hygiene. In the samples that were collected after the hygienization and ozonization of the tub, there was no bacterial growth. The results obtained show that ozone alone did not reduce the amount of microorganisms. However, when combined with hygienization and prior ozonization of the tub the results were satisfactory.

KEYWORDS: Ozone, mineral water, lids, mesophiles, microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

Água mineral natural é aquela que é obtida diretamente de fontes naturais ou artificiais, subterrâneas, com constante quantidade de sais minerais, oligoelementos e outros constituintes. Possui cor límpida e é determinado que seja ausente de microrganismos considerados patogênicos¹.

Dados da Associação Brasileira da Indústria de Águas Minerais (ABINAM)² indicam que o Brasil é o 4º maior produtor de água mineral natural do mundo, sendo, também, a mais barata. No ano de 1995, o país produziu 1,5 bilhão de litros de água mineral. Em 2007 esse número saltou para 6,8 bilhões de litros e esse crescimento, fez com que as vendas ultrapassassem as de refrigerantes,

abrindo oportunidades para expandir a variedade de produtos, bem como água com gás, água saborizada, dentre outros. O elevado consumo de água mineral se deve à pureza, propriedades terapêuticas e medicinais representando um estilo de vida saudável^{3,4}.

Se pré-estabelece que a água mineral possa apresentar algumas bactérias, porém, contaminações elevadas podem levar à falta de segurança para aqueles que a consomem⁵. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 275/2005 preconiza que a presença de determinados microrganismos na água está dentro dos padrões, desde que não ultrapasse os valores estabelecidos permitidos⁶.

Os coliformes totais, Enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens* são tolerados até 2,0 UFC/100 mL (Unidades Formadoras de Colônia). Já os coliformes termotolerantes, chamados de *Escherichia coli*, devem estar ausentes em 100mL (amostra indicativa) de amostra. A falta de uma rigorosa higienização nas embalagens ou durante a captação da água pode levar à contaminação posterior, resultando na condenação daquele determinado lote. A água mineral vinda direto da fonte possui sua flora bacteriana normal, levando em consideração que as temperaturas são baixas, o que favorece a proliferação de bactérias caso não seja seguido um protocolo de higiene, conforme a Resolução nº 310/1999⁷.

Desinfecção da água e embalagens

O hipoclorito de sódio é um dos produtos mais utilizados na desinfecção de alimentos, mas que diversos microrganismos vêm apresentando resistência com o passar dos anos e ainda há riscos de formação de produtos carcinogênico-mutagênicos como compostos organoclorados, trihalometanos (THMs) e ácidos haloacéticos. Levando em consideração os riscos mutagênicos do Cloro e a não comprovação de sua total eficácia se torna necessário a busca de novas alternativas eficazes para a desinfecção de alimentos e embalagens no setor alimentício, como o uso do Ozônio (O₃)⁸.

O nome Ozônio deriva de ozeína, do grego “cheiro”, que se deve ao fato do odor desagradável do Ozônio⁹. É um gás altamente solúvel em água e oxidativo (oxida o citoplasma e a membrana plasmática de bactérias), o que o torna um potente esterilizante¹⁰. O Ozônio é um gás fruto da reação da quebra da molécula de Oxigênio (O₂), podendo combinar-se com outras moléculas de Oxigênio, como na reação a seguir: $O_2 \sqrt{2(O)} + 2 O_2 \sqrt{2 O_3}$ ¹¹. É conhecido como trioxigênio, por ser a forma triatômica e altamente instável do Oxigênio, que será recombinado com outro oxigênio quando excitado¹². É normalmente encontrado na camada de Ozônio, que tem como função a absorção de raios Ultravioleta que são prejudiciais à saúde⁸.

Quanto ao uso do Ozônio na indústria alimentícia, um dos maiores benefícios é o custo benefício, pelo fato de

não necessitar de matéria prima além do próprio Oxigênio, que será convertido em O₃¹³ e por ser formado de Oxigênio, o O₃ não é tóxico ao organismo e nem à natureza, o que o torna ainda mais viável para uso. Tem sido usado há décadas e, recentemente, foi reconhecido como seguro (GRAS - Generally Recognized as Safe) nos Estados Unidos, sendo capaz de inativar bactérias, bolores, leveduras, parasitas e vírus tanto no estado líquido quanto no gasoso e por um curto período de exposição¹⁴.

O aumento da temperatura pode reduzir a eficácia do Ozônio, por ser decomposto facilmente com o calor e deve ser analisado o tipo de material a ser desinfetado para aperfeiçoar a eficácia na utilização do gás, visto que cada material possui determinadas propriedades, contaminação e termo sensibilidade¹⁵.

Este estudo visou verificar a eficácia de um processo de sanitização com o uso de gás ozônio por uma empresa de água mineral na cidade de Cacoal – RO, bem como analisar o melhor tempo de ozonização, melhorando os custos e benefícios para uma melhor utilização deste meio de desinfecção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 144 tampas de galões de 20 litros de água, de uma indústria de água mineral localizada na zona rural do município de Cacoal – RO foram escolhidas aleatoriamente. O estudo consistiu na análise microbiológica comparativa de 48 tampas por coleta, antes e após os tratamentos com gás ozônio em diferentes concentrações/tempo e combinado com outros métodos de higienização.

Foram realizados testes microbiológicos das tampas comparando três situações: 48 tampas antes de serem ozonizadas; 48 tampas após serem ozonizadas sem higienização prévia da cuba e cânula do ozonizador com álcool 70%, sendo esse o Tratamento 1 e no dia seguinte outro saco de tampas foi dividido em três partes, reduzindo assim o número de tampas ozonizadas por vez. Foram escolhidas mais 48 tampas que sofreram análises após a higienização da cuba com água, sabão neutro e álcool 70%, caracterizando o Tratamento 2.

Inicialmente foi passado *swab* estéril em 48 amostras retiradas aleatoriamente diretamente do saco adquirido pela empresa contendo mil tampas, sendo passado por uma extensão de 20 cm² das tampas, e colocado em tubo contendo 10mL de meio de transporte e as mesmas foram identificadas para coleta após o uso do ozônio. Após essa etapa, o mesmo saco foi levado à sala de ozonização tendo as tampas distribuídas em diversas partes do saco, sendo submetidas a diferentes tempos de exposição ao gás: 12', 15', 20' e 30 minutos, compreendendo então, 20, 25, 33 e 50 mg/ozônio de exposição, visto que o aparelho utilizado fornece 100 mg/h de ozônio.

Em cada tempo foram retiradas 12 tampas previamente identificadas de pontos aleatórios, friccionando o swab e colocando-o no tubo contendo meio de transporte, finalizando as 48 tampas do Tratamento 1.

No Tratamento 2, a cuba, onde fica o saco de tampas, e a cânula do ozonizador foram submetidas a limpeza com álcool 70% e o ozonizador foi ligado dentro da cuba vazia por 15 minutos. O saco de tampas foi dividido em três partes, sendo assim, nessa etapa foram ozonizadas, em média, 330 tampas. Foram escolhidas mais 48 tampas que sofreram análises antes e após o processo de ozonização conforme descrito anteriormente.

As amostras foram transportadas em caixa térmicas e levadas ao laboratório do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná. Inoculou-se 1 mL de cada amostra em meio para contagem de total de bactérias mesófilas Plate Count Ágar (PCA), sendo distribuída com alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 37°C por 24 e 48h e então as UFC foram quantificadas, conforme descrito por Silva (2010)¹⁶.

3. RESULTADOS

Em Das 48 amostras coletadas antes do processo de ozonização, todas obtiveram crescimento $<1,0 \times 10^1$ UFC/cm². Já das 48 amostras do “Tratamento 1”, dez placas obtiveram crescimento significativo, com 12’, 15’ e 20’ minutos de exposição e nas amostras do “Tratamento 2”, todas as tampas apresentaram uma eficácia no processo de desinfecção, conforme demonstrado na Figura 1.

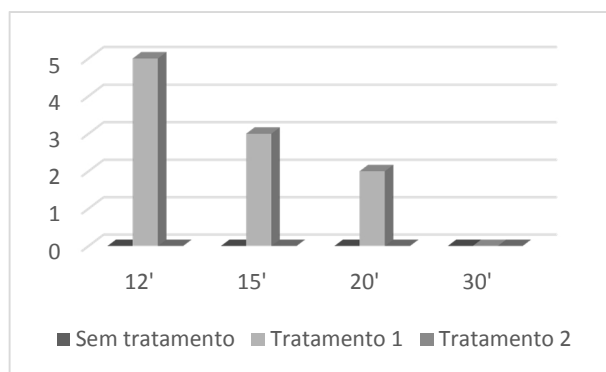


Figura 1. Número de placas que apresentaram crescimento bacteriano após a utilização do ozônio como desinfetante, nos diferentes tipos de tratamentos utilizados.

No Tratamento 1, onde não se fez uma pré-higienização da cuba e ozonizou-se 1000 tampas por vez, houve um aumento da carga microbiana. Já no Tratamento 2 onde se realizou um processo prévio de higienização da cuba e diminuí o número de tampas ozonizadas a cada vez, o processo se mostrou eficiente mesmo no tempo mais curto de 12 minutos, demonstrando assim que

quanto menor o número de tampas, a limpeza e desinfecção das cubas de ozonização e o tempo ideal aumentam a eficácia da ozonização.

Nesse estudo, levou-se em consideração a ISO 7218:2007, relatando como aceitáveis placas com contagem entre 10 e 300 colônias¹⁷. Mesmo que as bactérias heterotróficas, em sua maioria, não apresentem patogenia, devem ser mantidas sob controle para que não se tornem prejudiciais à saúde e alterem a qualidade, cor, odor e sabor da água¹⁸.

4. DISCUSSÃO

De acordo com a metodologia empregada, as amostras do Tratamento 1 foram analisadas usando apenas a ozonização como forma de intervenção e o crescimento microbológico das mesmas se manteve em dez amostras, revelando que houve multiplicação bacteriana, onde, antes da manipulação, não havia crescimento, mostrando assim que o processo de manipulação das tampas influencia no aumento de microrganismos, fato explicado pela RDC 216/2004¹⁹ sugerindo que o processo de manipulação de alimentos é o principal ponto em que se ocorre as contaminações, sendo o manipulador o principal responsável, devido à falta de conhecimento ou treinamento técnico para o mesmo.

Nas amostras do Tratamento 2 a ozonização foi combinada com limpeza da cuba com água, sabão neutro e álcool 70%, ozonização livre no meio e redução do número de tampas dentro do saco, acarretando assim na eliminação de microrganismos quando comparado ao “Tratamento 1”. Conforme a RDC 173/2006²⁰ o processo designado “Tratamento 1” é considerado desinfecção, sendo apenas a etapa de redução de microrganismos por método físico e/ou químico. Já o “Tratamento 2” é classificado como higienização, compreendendo a limpeza e desinfecção da cuba.

Diferentes estudos relataram o uso do ozônio na sanitização de alimentos e desinfecção de itens médicos. Junior (2011)²¹ analisou o uso do ozônio como método para a esterilização de tampas de garrafão de 20L, utilizando 5 amostras não ozonizadas e 5 amostras ozonizadas, coletando-as do saco com 3.000 tampas. Coletou as tampas em um Becker de 1000 mL e realizou as análises microbiológicas utilizando meio PCA, para contagem de mesófilas e verificou, também, a presença de Coliformes termotolerantes e *Pseudomonas aeruginosa*. Não foi observada a detecção de Coliformes termotolerantes e *Pseudomonas aeruginosa* após a ozonização, já os microrganismos heterotróficos apresentaram redução significativa, atendendo à Portaria 518²². Fato também relatado por Cardoso (2003)²³ que observou redução de aeróbios mesófilos em todas as amostras de garrafão de água mineral

quando usado água ozonizada na higienização dos mesmos, visto que antes da água ozonizada era feita a lavagem convencional dos garrafões.

O aumento do crescimento microbiológico quando usado apenas o ozônio não é um fato restrito neste estudo. Em um estudo conduzido por Lanita e Silva (2008)²⁴ a presença de microrganismos em queijos do tipo parmesão era reduzida com o uso do ozônio, porém, a ozonização de forma isolada não foi capaz de reduzir significativamente a contaminação por bolores e leveduras. No mesmo estudo quando se combinou com outros métodos de lavagem da superfície dos queijos tipo parmesão, associado ao uso do ozônio mostrou-se eficaz, sendo semelhante aos resultados encontrados nesse estudo que após a associação da ozonização e limpeza da cuba e carrinho de transporte, aumentou significativamente a qualidade do processo de desinfecção.

O gerador de ozônio usado na pesquisa em questão tem capacidade de liberar 100mg/h de O₃ e se mostrou efetivo, visto que a contaminação de bactérias em tampas de garrafão é baixa, quando comparado, por exemplo, com um estudo conduzido por Marson *et al.* (2016)²⁵ que avaliou o efeito desinfetante do ozônio aquoso em endoscópios imediatamente após a remoção do trato gastrointestinal, nos tempos de 8' e 10 minutos, liberando 330mg/L/h de ozônio. Observou-se que em doses mais baixas de ozônio, não foi obtido crescimento bacteriano nas superfícies lisas dos endoscópios, porém ainda restaram microrganismos nos canais de água e ar. Em doses maiores, obteve-se a inativação de 100% dos microrganismos tanto da superfície lisa, quanto dos canais do endoscópio. Outro estudo com relação a higienização de materiais biológicos foi o realizado por Garcia (2008)¹⁵ em salas cirúrgicas de hospitais e mostraram que a desinfecção usando O₃ se mostrou muito mais eficaz do que o método convencional (lavagem, limpeza manual e uso de agentes químicos), levando em consideração que cada material possui superfícies diferentes, acarretando em tempo de exposição e quantidade de ozônio liberada diferentes.

Ainda sobre o tempo de exposição e a quantidade de gás gerada, um estudo²⁶ avaliou a eficácia do Ozônio na inativação de *Staphylococcus aureus* e observou que, na água previamente ozonizada juntamente do fluxo constante de Ozônio, a suspensão de *S. aureus* era inativada em um tempo menor do que na água não ozonizada previamente e apenas com fluxo constante de ozônio. Na água ozonizada combinada com a liberação do gás, o maior tempo para a inativação do microrganismo foi de 5'25". Já nas amostras suspensas em água não ozonizada antes do experimento, mas com a liberação do gás, o tempo máximo foi de 23'45", evidenciando que apenas o fluxo de O₃ durante a exposição não é o suficiente, resultados semelhantes a este estudo quando se trata da higienização prévia do carrinho, cuba e mangueira se diminui

significativamente o número de microrganismos.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que o ozônio foi capaz de reduzir a quantidade de microrganismos presente em tampas de galão de água mineral. Porém a ozonização de forma isolada além de não ser suficiente para reduzir em níveis aceitáveis os microrganismos presentes nas amostras em questão, ainda aumentou o número de microrganismos, ressaltando a importância das boas práticas nas indústrias de alimentos e água. Quando a ozonização das tampas foi combinada com a higienização da cuba com água, sabão e álcool 70%, redução do número de tampas no saco e a liberação do gás no meio previamente, os resultados foram satisfatórios desde o menor tempo de exposição, eliminando 100% dos microrganismos.

REFERÊNCIAS

- [01] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 54, de 15 de junho de 2000.
- [02] Frasso L. O mercado de 7 bi de litros. ABINAM – associação Brasileira da Indústria de Águas Minerais. São Paulo – SP. (2009).
- [03] Sant'ana AS, Silva SCFL, Farani IOJ, Amaral CHR. Qualidade microbiológica de águas minerais. Cienc. Tecnol. Aliment. 2003; (23): 190-194.
- [04] Reis JÁ, Hoffman FL, Hoffman P. Ocorrência de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*, em amostras de águas minerais envasadas, comercializadas no município de São José do Rio Preto, SP. Hig. Alim. 2006; 20 (145): 109-115.
- [05] Ritter AC, Tondo EC. Avaliação microbiológica de água mineral e de tampas plásticas utilizadas em uma indústria da grade Porto Alegre/RS. Alim. Nutri., 2009; 20 (2): 203-208. ISSN 0103-4235.
- [06] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.
- [07] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 310, de 16 de junho de 1999.
- [08] Oliver JC, Germano JL, Veiga SMOM. Eficiência de sanificantes alternativos sobre frutos contaminados artificialmente com *Escherichia coli*. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações. 2012; 10 (2): 351-359.
- [09] Balakrishnan P, Arunagiri A, Rao P. Ozone Generation by Silent Electric Discharge and Its Application in Tertiary Treatment of Tannery Effluent. Journal of Electrostatics. 2002; (56): 77- 86.
- [10] Murphy L. Ozone-the latest advance in sterilization of medical devices. Can Oper Room Nurs J. 2006; 24(2): 28-38.
- [11] De Renzo DJ. Pollution control technology for industrial wastewater. Parke Ridge, N.J., 1981.
- [12] Cardoso CC, Fiorini JE, Gurjão JWB, Nascimento LC, Amaral LA. Avaliação microbiológica da eficiência de um

- processo de sanitização de latões de leite com Ozônio. Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes". 1999; 310 (54): 13-21.
- [13] Sousa CS, Torres LM, Azevedo MPF, Camargo TC, Graziano KU, Lacerda RA, et al. Ozônio na esterilização de produtos para assistência à saúde: revisão integrativa da literatura. Rev. Esc. Enferm. USP. 2011; 45(5): 1243-9.
- [14] Kim JG, Yousef AE, Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. J Food Prot. 1999; 62(9):1071-87.
- [15] Garcia CA, Stanziola L, Vieira IS, Naves JHFF, Neves SMN. O gás Ozônio na descontaminação de ambientes cirúrgicos. Vet. Not. 2008; 14 (2): 37 – 40.
- [16] Silva, N. et al. Manual de Métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 2010; 4: 1 – 624. ISBN: 978-85-7759-013-1.
- [17] ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – *General requirements and guidance for microbiological examination*, 3^o ed. The International Organization for Standardization, 2007.
- [18] Filho FA, Dias MFF. Qualidade Microbiológica de Águas Minerais em Galões de 20 Litros. Alimento e Nutrição, Araraquara. 2008 jul./set.; 19 (3): 243-248.
- [19] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004.
- [20] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 173 de 13 de setembro de 2006.
- [21] Junior, ECS. Avaliação da eficiência da ozonização na esterilização de tampa de garrafão de 20 litros de água mineral. [monografia] Imperatriz (MA): Universidade Federal do Maranhão; 2011. 44f.
- [22] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução PORTARIA nº 518/GM. Diário Oficial da União, Brasília, 25 de mar. 2004.
- [23] Cardoso, CC et al. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 23, n. 1, p. 59-61, jan./abr. 2003.
- [24] Lanita CS, Silva SB. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. Braz. J. Food Technol. 2008 jul./set.; 11 (3): 182-189.
- [25] Marson RF, Melo LHMS, Zângaro RA, Lima CJ, Fernandes AB. Use of ozonated water for disinfecting gastrointestinal endoscopes. São José dos Campos (SP). rev. Ozone: Science & Engineering. 2016 jun; ISSN: 0191-9512. DOI: [10.1080/01919512.2016.1192455](https://doi.org/10.1080/01919512.2016.1192455).
- [26] Velano HG, Nascimento LC, Barros LM, Panzeri H. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. Pesqui. Odontol. Bras. 2001 jan./mar.; 15 (1).