



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA

EFEITO DA OZONIZAÇÃO NA CONTAGEM DE
***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM LEITE**

EMANUEL PEREIRA COUTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

Brasília
Distrito Federal - Brasil
Fevereiro – 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA

EFEITO DA OZONIZAÇÃO NA CONTAGEM DE
***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM LEITE**

ALUNO: EMANUEL PEREIRA COUTO

ORIENTADORA: MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

Publicação: 97/2014

Brasília
Distrito Federal - Brasil
Fevereiro – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

C871a Couto, Emanuel Pereira Couto.
Efeito da ozonização na contagem de *Staphylococcus aureus* em
leite [manuscrito] / Emanuel
Pereira Couto. – 2014.
58 f. : il.

Orientadora: Márcia de Aguiar Ferreira
Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília,
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Leite/microbiologia 2. Leite 3. Ozônio 4.
Staphylococcus aureus I. Ferreira, Márcia de Aguiar. II.
Título.

CDU:614.3

Elaborado pela bibliotecária Laura Maria Pereira Couto
CRB-1/2712

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

EFEITO DA OZONIZAÇÃO NA CONTAGEM DA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM
LEITE

Emanuel Pereira Couto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Animais.

APROVADO POR:

MÁRCIA DE ÁGUIAR FERREIRA, Dra.
Orientadora

ERNANDES RODRIGUES ALENCAR, Dr.
Universidade de Brasília

VÍTOR SALVADOR PICÃO GONÇALVES, Dr.
Universidade de Brasília

BRASÍLIA, 21 DE FEVEREIRO DE 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Seu Filho e à Mãe Divina, por terem me dado uma vida ótima, com saúde, uma família maravilhosa e me ajudado a concluir mais esse projeto.

À minha família: meus excepcionais pais Carlos e Margarida, pelo esforço em nos dar a melhor educação possível; meus amados irmãos Laura e Daniel, nosso querido Duque (o melhor labrador preto do mundo!). Também aos meus avós – vó e madrinha Alda, tia Rose, tios, primos (em especial José Henrique, pela constante ajuda no mestrado!).

Especialmente à minha orientadora Márcia, que me ajuda a crescer profissionalmente *since* 2008 (seis anos!). Da mesma forma, ao professor Ernandes, que participou de maneira ativa e entusiasmada deste projeto. E ao professor Vítor, pelo imprescindível auxílio! Assim como todo o pessoal do LAMAL.

Por todos os amigos que tenho (a rusticidade continua!), assim como todas as pessoas que passaram pelo LabLeite, me ajudando muito no meu desenvolvimento acadêmico. Entram aí, de forma especial, a Jaqueline, sempre disposta, meus colegas e amigos Anna Carolina, Anderson Japa e Marcello, que sempre me motivaram absurdamente no mestrado!

“I am the nothing man, and I feel like I’m a rider on a downbound train, and I believe in a promised land.” Bruce Springsteen

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
CAPÍTULO 1	9
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVO.....	11
2.1. Objetivo geral	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1. Leite	12
3.1.1. Produção brasileira	12
3.1.2. Composição	13
3.1.3. Tratamento térmico.....	14
3.1.4. Qualidade do leite pasteurizado no Brasil	15
3.2. Staphylococcus aureus	16
3.2.2. Características	17
3.2.3. Fatores de virulência	18
3.2.4. Doenças em animais	19
3.2.5. Doenças em humanos e importância na saúde pública.....	21
3.2.6. Ocorrência no leite	22
3.3. Ozônio.....	23
3.3.1. Histórico.....	23
3.3.2. Propriedades.....	24
3.3.3. Produção	25
3.3.4. Segurança.....	26
3.3.5. Ação antimicrobiana	27
3.3.6. Fatores que afetam a ação antimicrobiana	29
3.3.7. Aplicações do ozônio em alimentos	30
3.3.8. Uso em leite e derivados	31
CAPÍTULO 2	33
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1. Local da pesquisa.....	37
2.2. Preparo dos inóculos e das amostras.....	37
2.3. Processo de ozonização e binômios tempo/concentração de ozônio.....	38
2.4. Análises microbiológicas.....	39
2.5. Análise estatística.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4. CONCLUSÃO.....	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Nove países com maior produção de leite em 2010.....	14
Tabela 1.2 Principais características físico-químicas do gás ozônio puro.....	27
Tabela 1.3 Agentes oxidantes e seus respectivos potenciais de oxidação.....	27
Tabela 1.4 Níveis aprovados de aplicação de ozônio.....	29
Tabela 2.1 Apresentação dos ensaios, com suas respectivas concentrações de ozônio e tempo (T) de aplicação.....	39
Tabela 2.2 Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R^2) para concentração residual do ozônio em função do tempo após passagem por coluna contendo 300 mL de leite desnatado e integral, na temperatura de 10°C, e concentração do gás de 34,7 e 44,8 mg L ⁻¹	46
Tabela 2.3 Contagens do número de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> antes e depois da ozonização de leite desnatado.....	56
Tabela 2.4 Contagens do número de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> antes e depois da ozonização de leite integral.....	57

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 Estrutura molecular do ozônio.....	26
Figura 1.2 Geração do ozônio através do processo corona.....	28
Figura 1.3 Micrografia eletrônica de transmissão de células de <i>Escherichia coli</i> ante e após exposição ao ozônio.....	30
Figura 2.1 Gerador de ozônio.....	38
Figura 2.2 Variação média das contagens de <i>Staphylococcus aureus</i> após ozonização, em cada tempo, para cada ensaio.....	41
Figura 2.3 Variação média, nos ensaios, das contagens de <i>Staphylococcus aureus</i> após ozonização em todos os tempos.....	43
Figura 2.4 – Concentração de ozônio residual medido antes (inicial) e após o contato do gás com as amostras nos ensaios 1 e 3.....	44
Figura 2.5 – Concentração de ozônio residual medido antes (inicial) e após o contato do gás com as amostras nos ensaios 2 e 4.....	44

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

As definições e normas de qualidade dos alimentos em geral são estabelecidas pelo *Codex Alimentarius*, órgão da FAO/OMS (*Food and Agriculture Organization/ Organização Mundial da Saúde*), e dizem que devem apresentar baixa contagem bacteriana, ausência de micro-organismos patogênicos ao homem, ausência de resíduos de medicamentos veterinários e mínima contaminação com produtos químicos ou toxinas microbianas.

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (Brasil, 2011). Considerando-se as boas condições de crescimento bacteriano que o leite oferece, devido às suas características intrínsecas, Santos & Fonseca (2007) destacam que a qualidade microbiológica é um dos fatores críticos na produção leiteira e está relacionada com a manutenção da saúde da glândula mamária do rebanho e as condições de manejo e higiene adotados na fazenda.

Dentre as espécies encontradas no leite, o *Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos com importância na saúde animal e humana. É um micro-organismo que pode ser carregado naturalmente intra e interespecies, sendo que a frequência encontrada naturalmente na superfície epitelial de humanos é, em média, de 20% (Acton et al., 2009) e em vacas, entre 14% e 23% (Nagase et al., 2002; Roberson et al., 1994). Nas enfermidades em animais, destaca-se a mastite em fêmeas dos rebanhos leiteiros, principalmente por causa das perdas econômicas decorrentes da alta prevalência da doença na maioria dos países. Em termos de saúde pública, *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos que podem ser encontrados em alimentos de origem animal, especialmente no leite e seus derivados (Oliveira et al., 2013,

Santana, 2006, Maciel et al., 2008, Alves et al., 2009, Neder et al., 2011), expondo a população consumidora ao risco de intoxicação alimentar pela ingestão de toxinas específicas produzidas pelo micro-organismo.

O tratamento do leite, visando ao controle da carga microbiana, deve ser iniciado na unidade produtora, com o resfriamento do leite, onde se deve atingir uma temperatura máxima de 7°C para a sua conservação. Na indústria, os processos utilizados para o beneficiamento são a pasteurização lenta, rápida ou UAT (Ultra Alta Temperatura). Tais processos não destroem toda a população bacteriana, mas devem eliminar todos os patógenos que podem estar no alimento.

O ozônio começou a ser descoberto como forte germicida pelo químico Marius Paul Otto, na França, que fez estudos em estações de tratamento de água e esgoto. A partir desta descoberta, o ozônio passou a ser amplamente utilizado nas estações de tratamento de vários países. A utilização do ozônio na indústria de alimentos tem sido alvo de pesquisas desde quando o composto foi considerado seguro por associações internacionais (Graham, 1997; O'Donnell et al., 2012). Segundo Restaino et al. (1995), o ozônio tem se revelado um eficiente agente contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus. Porém, o nível de inativação microbiana pelo ozônio varia de acordo com o pH, temperatura e quantidade de matéria orgânica que circundam as células.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a eficiência do ozônio sobre a população de *Staphylococcus aureus* artificialmente inoculados em amostras de leite.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Padronizar procedimento de ozonização *in vitro* de leite.
- 2.2.2. Avaliar a eficiência de diferentes binômios concentração x tempo na redução das contagens de *S.aureus* inoculados em leite.
- 2.2.3. Avaliar a interferência dos teores de gordura do leite na eficiência da ozonização na redução de *S. aureus*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Leite

3.1.1. Produção brasileira

A produção de leite de vaca no Brasil cresceu a uma taxa relativamente constante desde 1974 até os dias atuais. Segundo dados da Pesquisa Pecuária Municipal (IBGE), o país saiu do patamar de 7,1 bilhões de litros de leite produzidos naquele ano, alcançando o de 32,1 bilhões de litros de leite em 2011, crescimento superior a 350% no período (Maia et al., 2013).

O Brasil foi, em 2010, o quinto maior produtor de leite do mundo, segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). Conforme demonstrado na Tabela 1, o país respondeu por 5,1% da produção mundial de leite. Entretanto, esse volume de produção foi obtido por meio de um grande contingente de vacas com baixa produtividade (Maia et al., 2013).

Tabela 1.1 – Nove países com maior produção de leite em 2010.

	Participação na produção mundial (%)	Produtividade (toneladas/vaca)
Estados Unidos	14,6	9,59
Índia	9,1	1,28
China	6,0	2,88
Rússia	5,3	3,78
Brasil	5,1	1,34
Alemanha	4,9	7,08
França	3,9	6,24
Nova Zelândia	2,8	3,63

Fonte: FAOSTAT *apud* Maia et al., 2013.

3.1.2. Composição

Segundo Prata (2001), a composição média do leite de vaca é: 87% de água; 3,5 – 3,7% de gordura; 4,9% de lactose; 3,5% de proteínas; 0,7% de cinzas. Vários fatores podem influenciar a proporção destes constituintes, como a raça, intervalo entre ordenhas, fases da ordenha, período de lactação, estações do ano, alimentação, doenças e idade.

A gordura do leite é composta por 98 a 99% de triglicerídeos e 1 a 2% de fosfolípídeos, esteróis, carotenoides, vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos livres. As vitaminas lipossolúveis estão associadas a uma membrana de natureza proteica, que protege os glóbulos de gordura (tamanho médio de cinco micras). Quando é feito o processo de homogeneização do leite, há destruição parcial desta membrana e conseqüente aumento da sensibilidade da gordura aos processos de hidrólise e oxidação (Prata, 2001; Tronco, 2003).

As proteínas do leite são formadas por dois grupos: as caseínas (80%) e proteínas do soro (20%) e representam 95% de todo o nitrogênio presente no leite. A caseína é uma substância coloidal complexa, que apresenta conformação quaternária, está associada ao cálcio e ao fósforo na forma de citratos e fosfatos, precipita em pH baixo ou quando submetida a ação de coalho e à presença de álcool. Essa proteína é uma grande micela, formada por duas submicelas denominadas de: alfa caseína (α S1 e α S2), beta caseína (β), gama caseína (γ) e kappa caseína (κ), sendo a proporção molecular de, respectivamente, 11:3:10:4 (Ordóñez, 2005). As proteínas do soro são constituídas pela albumina, alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina, imunoglobulinas e peptonas. Em geral, essas proteínas desnaturam-se em temperaturas acima de 80°C (Tronco, 2003).

A lactose, principal carboidrato, é um dissacarídeo formado por uma molécula de galactose, produzido na glândula mamária, e uma de glicose, que tem origem da corrente sanguínea (Prata, 2011). Juntamente com os íons sódio, potássio e cloreto, é responsável pela manutenção da pressão osmótica na glândula mamária (Silva, P., 2010).

Em termos de elementos inorgânicos, o leite contém sais como cloretos, fosfatos e citratos, importantes para a estabilidade térmica e há, ainda, a presença em quantidades significativas (0,6 a 0,8% do peso do leite), de potássio, cálcio, sódio, magnésio, cloro e enxofre (Prata, 2001).

Dessa forma, o leite se apresenta como um alimento completo e oferece a possibilidade de processamento industrial e obtenção de diversos produtos (Silva, P., 2010).

3.1.3. Tratamento térmico

Considerando que o leite e seus produtos derivados apresentam uma série de benefícios nutricionais, é de importância o uso de processos de beneficiamento da matéria prima (leite cru) que eliminem os perigos químicos e microbiológicos, com o objetivo de garantir a saúde da população consumidora. Segundo o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), entre 1993 e 2006, mais de 1500 pessoas contraíram alguma doença devido ao consumo do leite cru e queijo nos Estados Unidos (FDA, 2012).

O principal método de tratamento do leite é a pasteurização, que consiste na aplicação de altas temperaturas por tempos específicos (binômio temperatura/tempo), com objetivo de reduzir ou eliminar a microbiota indesejável composta por micro-organismos patogênicos e deteriorantes.

A legislação brasileira mais recente padroniza a metodologia que deve ser empregada na pasteurização do leite cru. Desta forma, a Instrução Normativa nº 62, de 2011, do Ministério da Agricultura, permite a utilização de dois tipos de pasteurização: a rápida e a lenta, enquanto a Portaria nº 146, de 1996, do mesmo ministério, descreve o processo de tratamento UAT – Ultra Alta Temperatura.

A pasteurização lenta consiste no aquecimento do leite a um intervalo de temperatura de 62 a 65 °C por trinta minutos, mantendo-o em grande volume sob agitação mecânica e lenta, em aparelhagem própria (Brasil, 1952). O uso do processo de pasteurização lenta é permitido em condições que o envase seja realizado em circuito fechado e o leite cru satisfaça às especificações de qualidade (Brasil, 2006).

A pasteurização rápida é o processo de tratamento térmico do leite fluido cru na faixa de temperatura de 72 a 75 °C durante 15 a 20 segundos, em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle com termo-registrador e termo-regulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de prova, seguindo-se resfriamento imediato em aparelhagem a placas até temperatura igual ou inferior a 4°C e envase em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações. Ainda, imediatamente após a pasteurização, o produto assim processado deve apresentar teste negativo para fosfatase alcalina, teste positivo para peroxidase e contagem de coliformes totais menor que 0,3 NMP/mL (Brasil, 2006).

O tratamento denominado por UAT (Ultra Alta Temperatura) ou UHT (*Ultra High Temperature*) deve ser feito com leite homogeneizado, durante 2 a 4 segundos, a uma

temperatura entre 103 °C e 150 °C, mediante processo técnico de fluxo contínuo, resfriado a menos de 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas. Ainda, podem ser utilizados estabilizantes como sódio monofosfato, sódio difosfato, sódio trifosfato, separados ou em um quantidade não superior a 0,1g/100 mL (Brasil, 1996)

3.1.4. **Qualidade do leite pasteurizado no Brasil**

Segundo a Embrapa (2012), a ingestão média nacional de leite pasteurizado é de 25,6 kg *per capita*, enquanto o consumo de leite cru é de 9,8 kg *per capita*. Apesar de a legislação brasileira ser clara quanto ao uso das técnicas de beneficiamento do leite cru, algumas pesquisas relatam que a qualidade microbiológica do leite pasteurizado não atingiu os padrões estabelecidos pelas normativas.

O tipo de pasteurização empregado na indústria é determinado, em geral, pela escala de produção, sendo que em atividades menores, utiliza-se a pasteurização lenta, enquanto que, em indústrias com maior volume de produção, a pasteurização rápida é a principal metodologia para o beneficiamento do leite.

Diversas pesquisas têm buscado monitorar, ao longo do tempo, a qualidade microbiológica e físico-química do leite beneficiado com a pasteurização rápida no Brasil. Paiva (2007) concluiu que o leite pasteurizado distribuído em programa governamental de Minas Gerais possuía qualidade insatisfatória, representando riscos à saúde de seus consumidores. No norte do Paraná, Tamanini et al. (2007) analisaram amostras de leite tipo C para contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e termotolerantes: 3,7%, 30% e 14%, respectivamente, estavam fora dos limites estabelecidos pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Em estudo semelhante, Ataíde et al. (2008) avaliaram características microbiológicas e físico-químicas de leite pasteurizado produzido em indústria na Paraíba, destacando que 35,7% das amostras recém beneficiadas e 64,3% das embaladas apresentaram resultados acima dos limites. Silva, V. et al. (2010) constataram que a qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo A produzido em granja leiteira do Rio Grande do Sul também não estava de acordo com os padrões de qualidade, sendo que 50% e 33,3% das amostras tinham altas contagens de coliformes totais e termotolerantes, respectivamente. No Distrito Federal, Silva, P. (2010) concluiu que o leite beneficiado não atendia aos critérios de qualidade da época, estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51, de

2002, do Ministério da Agricultura, devido aos altos níveis de contaminação tanto na matéria prima como no produto final, indicando condições inadequadas de produção e beneficiamento.

As combinações das tecnologias de ultrapasteurização de envase asséptico em embalagens longa vida e da retirada do ar no momento do fechamento da embalagem garantem ao leite UHT a preservação de suas propriedades organolépticas e nutritivas, sem necessidade de conservantes e de refrigeração (ABLV, 2009 *apud* Nascentes & Araújo, 2012). De acordo com ABLV (2012), o leite UHT é o laticínio fluido mais consumido no Brasil, seguido por leite em pó e leite pasteurizado. Nascentes & Araújo (2009) avaliaram a qualidade microbiológica de amostras de leite UHT comercializados em cidade de Minas Gerais e confirmaram a ausência de micro-organismos patogênicos. Rossi Júnior et al. (2006), ao acompanhar todo o processo de produção do leite UHT, concluíram que o processo foi capaz de reduzir, mas não eliminou totalmente a carga microbiana presente no leite cru. Vittori et al. (2008) avaliaram a presença de três gêneros de bactérias (*Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. e *Clostridium* sp.) em leite caprino UHT, comercializado em cidades dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul, e da mesma forma, concluíram que o processo térmico pode não ser suficiente para eliminação total de tais micro-organismos, já que observaram a presença de *Staphylococcus* sp. e *Bacillus* sp em 36% e 32% das amostras, respectivamente.

3.2. *Staphylococcus aureus*

3.2.1. Histórico

O primeiro registro de uma descrição de bactérias do gênero *Staphylococcus* é de 1880, autoria do cirurgião escocês Sir Alexander Ogston (Ogston, 1984), em que ele analisa a secreção de um abscesso cirúrgico do joelho de um paciente. Seguindo os postulados e métodos de coloração de seu contemporâneo Robert Koch, Ogston isolou e cultivou os micro-organismos utilizando ovo de galinha como nutriente, descrevendo, após análise microscópica, dois tipos de bactérias em forma de cocos, nomeando-os como *Streptococcus* e *Staphylococcus* (Newsom, 2008).

Em 1884, Friedrich Rosenbach diferenciou e nomeou duas espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus*: *S. aureus* e *S. albus* (renomeada como *S. epidermidis*), devido à pigmentação apresentada pelas colônias: amarelas douradas - aureus - e brancas - albus (Rosenbach, 1884).

Estudos realizados por Baird Parker (1974) reconheceram somente três espécies de importância clínica, considerando a produção da enzima coagulase como o principal diferencial bioquímico: *S. aureus* - coagulase-positiva; *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*-coagulase-negativa.

3.2.2. Características

Atualmente, o gênero *Staphylococcus* é constituído de 40 espécies e 24 subespécies (Murray, 2010). De acordo com Garrity et al. (2004), a classificação filogenética (definida pela análise da sequência do 16S rDNA) da espécie *Staphylococcus aureus* é:

- Domínio *Bacteria*;
- Filo *Firmicutes*;
- Classe III – *Bacilli*;
- Ordem I – *Bacillales*;
- Família VIII – *Staphylococcaceae*;
- Gênero I – *Staphylococcus*.
- Espécie - *Staphylococcus aureus subespécie aureus*

A morfologia típica das células bacterianas do gênero é classificada em cocos apresentando diâmetro médio de 1 μm e que tendem a se agrupar em arranjos semelhantes a cachos de uva (Quinn et al., 2005). Esse padrão de agrupamento ocorre porque as células se dividem alternando planos perpendiculares em todas as três dimensões (Tzagoloff & Novick, 1977) o que, presumivelmente, melhora a habilidade de explorar seu nicho evolutivo (Turner et al., 2010).

As espécies do gênero estão amplamente distribuídas no mundo todo como comensais na pele de animais e de humanos, assim como nas mucosas do trato respiratório superior, urogenital inferior e transitoriamente no trato digestório (Quinn et al., 2005). Segundo Jay (2005), em ambientes úmidos, podem ser encontradas entre 10^3 a 10^6 UFC/cm². A maioria tem uma necessidade nutricional relativamente complexa, mas em geral, requerem uma fonte orgânica de nitrogênio, que pode ser fornecido por cinco a 12 aminoácidos essenciais como arginina, valina e vitaminas do complexo B. São bactérias não móveis, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas que crescem tanto por respiração aeróbica como por fermentação (Harris, 2002). Ainda, podem crescer num intervalo de pH entre 4,8 e 9,4, resistir a ambientes secos e altas temperaturas como 60°C por até 30 minutos (Sommerville, 2009). Os

membros do gênero são catalase-positivos, oxidase-negativos e podem produzir a enzima coagulase, sendo que as espécies coagulase positivas são comumente patogênicas, dentre elas *S.aureus*, *S.intermedius* e *S.hyicus* (Harris, 2002).

As colônias da espécie *S.aureus* são β -hemolíticas devido à produção de várias hemolisinas como a α -toxina e a β -toxina. Também são resistentes, devido a produção de osmoprotetores, a meios com concentrações de NaCl entre 7,5% e 10% (Sommerville, 2009). Morfológicamente, os *S.aureus* são cocos Gram-positivos e, bioquimicamente, são diferenciados das demais espécies pela metabolização da glicose, xilose, lactose, maltose, glicerol, mas principalmente, pela habilidade de fermentar o manitol. Quando crescem em Agar sal Manitol, há produção de uma zona amarela em volta da colônia (Sommerville, 2009). Segundo Shockman & Barren (1983), a parede celular de *S. aureus* é um revestimento resistente, de aparência amorfa e espessa (20-40 nm), cujo principal componente é o peptidoglicano, responsável por 50 % de sua massa (Waldvogel, 1990 apud Harris, 2002). Outro importante componente da parede celular é o polímero formado de glicerol-fosfato, o ácido teicoico, responsável por 40% da massa da parede e por conferir carga negativa à superfície celular (Knox & Wicken, 1973).

3.2.3. Fatores de virulência

Segundo Trabulsi (2008), os principais fatores de virulência do *S.aureus* são os componentes da superfície celular e toxinas.

Várias cepas de *S.aureus* produzem uma cápsula polissacarídica, que tem como principal função, proteger a bactéria da fagocitose, além de auxiliar na ligação do micro-organismo a tecidos vivos e superfícies sólidas – formação de biofilmes (Trabulsi, 2008; Madigan et al., 2010). Gilbert (1931) descreve dois tipos de colônias de *Staphylococcus* distintas, uma com presença de cápsula e outra sem. Os polissacarídeos capsulares são classificados, de acordo com sua variabilidade antigênica, em oito sorotipos, sendo que os mais encontrados em amostras clínicas são os CP5 e CP8 (Karakawa, 1985).

Outro importante fator de virulência da espécie é a proteína A (*SpA*: *Staphylococcal protein*), uma das diversas proteínas de superfície e se encontra ligada covalentemente ao peptidoglicano. Sua principal característica de virulência é a capacidade de se ligar à porção FC das IgG (imunoglobulinas G), atrapalhando a ligação das células fagocitárias (Trabulsi, 2008). Além da proteína A, um complexo denominado de *MSCRAMM*

(*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), igualmente ligado ao peptídeo glicano, também atua impedindo o processo de opsonização. Fazem parte deste complexo: *Cna* (*collagen binding*), *FnBP* (*fibronectin binding protein*) e *ClfA* (*clumping factor A*). A primeira é a proteína de aderência em substratos de colágeno; a segunda confere propriedade de ligação à fibronectina e se encaixa ao fator de complemento C3, bloqueando sua deposição na superfície celular; a terceira é o fator *clumping A*, responsável pela ligação ao fibrinogênio, e conseqüente aglutinação (Foster, 1998; Foster, 2005).

De acordo com Trabulsi (2008), *S.aureus* é capaz de produzir citotoxinas, superantígenos e, ainda, toxinas esfoliativas. Dentre as citotoxinas, destaca-se a α -toxina, capaz de formar poros na membrana celular de leucócitos, promovendo a morte celular. As toxinas superantígenos são a *TSST-1* (síndrome do choque tóxico) e o grupo das enterotoxinas (*SE*), formado por nove principais tipos (são conhecidos mais de vinte) – *SEA*, *SEB*, *SEC*, *SED*, *SEE*, *SEF*, *SEG*, *SEH* e *SEI* – que está diretamente relacionado à intoxicação alimentar. As toxinas esfoliativas são capazes de degradar as moléculas de adesão do epitélio cutâneo.

Ainda, a espécie produz enzimas extracelulares que funcionam como fatores de virulência, destacando-se a coagulase, enzima característica da espécie. Essa enzima ativa a coagulação sanguínea a partir da transformação de protrombina em trombina, a qual forma fibrina a partir do fibrinogênio. Outras enzimas produzidas pelo *S.aureus* são a catalase, desoxirribonucleases, hialuronidase, lipase, proteases e estafiloquinase (Trabulsi, 2008).

3.2.4. Doenças em animais

De acordo com Quinn (2005), as principais doenças de importância em animais domésticos causadas por *S.aureus* são a mastite estafilocócica bovina, a piemia pelo carrapato em cordeiros, a botriomicose em equinos e infecções supurativas em cães e gatos. A piemia pelo carrapato é limitada a regiões montanhosas da Irlanda e Grã-Bretanha; a botriomicose ocorre devido à infecção do cordão espermático após castração.

A mastite contagiosa exerce importância, principalmente, em dois aspectos: economia da atividade leiteira e saúde pública. A mastite é a maior causa de perdas econômicas em propriedade leiteiras devido ao menor rendimento dos tetos infectados, custos com tratamento veterinário, descarte de leite e de animais (Peton & Le Loir, 2013). Halasa et al. (2009) estimaram o custo anual da mastite em €4896, em um rebanho de cem vacas em lactação, enquanto Guimarães et al. (2013) calcularam o custo anual real, de \$61623,12 e, para manter o

nível de mastite baixo, um investimento de \$18203,43, num estudo de caso de rebanho no estado de Minas Gerais.

Segundo Peton & Le Loir (2013), poucas linhagens clonais de *S.aureus* estão envolvidas na mastite de ruminantes: CC97, ST151, CC130, CC126 em bovinos e CC133 em pequenos ruminantes. Esta última linhagem, evolutivamente, deu origem às demais como resultado de transferência de hospedeiro natural: do homem para os ruminantes (Guinane et al., 2010). Nagase et al. (2001) verificaram a presença de *S.aureus* em 23,3% das amostras coletadas da superfície da pele de vacas, mostrando que a espécie é habitante natural de epitélio de bovinos, além de outros animais de sangue quente em quantidades variáveis.

O principal reservatório de *S.aureus* nos rebanhos é mesmo o epitélio dos tetos e úberes, em que os animais infectados disseminam a bactéria no leite em concentrações que variam, geralmente, entre 10^2 e 10^5 unidades formadoras de colônia por mililitro (Peton & Le Loir, 2013). Dessa forma, o micro-organismo pode ser transmitidos entre úberes durante a ordenha através do equipamento a vácuo ou pelas mãos do ordenhador, segundo trabalho realizado por Sakwinska et al. (2011). A mastite causada por *S.aureus* é, em geral, uma infecção de longa duração, com tendência a cronicização e baixa taxa de cura, tanto espontânea como por uso de antibióticos (Santos & Fonseca, 2007). Tal característica infecciosa ocorre porque o *S.aureus* possui grande capacidade de invasão, o que permite sua instalação em partes profundas da glândula mamária, além disso, há formação de tecido fibroso no foco da infecção, formando “bolsões” de bactérias que impedem o acesso dos antibióticos ao local da infecção (Santos & Fonseca, 2007).

Com relação à manifestação dos sintomas, a mastite é classificada em clínica e subclínica, de forma que na primeira, os sintomas são facilmente observados, enquanto na segunda, é necessário o uso de testes indicadores como o California Mastitis Test (CMT) ou a Contagem de Células Somáticas (CCS), que indicam a quantidade das células inflamatórias no leite (Andrade, 2012). Na Europa, uma diretiva estabelece um limite máximo de 400.000 células somáticas por mililitro de leite em tanques de expansão, enquanto no Brasil, a Instrução Normativa 62, de 2011, do Ministério da Agricultura coloca o prazo até julho de 2016 (Sul, Sudeste e Centro- Oeste) e julho de 2017 (Norte e Nordeste) para atingir o mesmo patamar (Brasil, 2011). Segundo Santos & Fonseca (2007), as infecções causadas por *S.aureus* apresentam-se, geralmente, na forma subclínica e pode haver um aumento variável da CCS.

3.2.5. Doenças em humanos e importância na saúde pública

De acordo com Trabulsi (2008), as manifestações clínicas causadas pelo *S.aureus* em humanos podem ser divididas em três tipos: infecções superficiais, como abscessos cutâneos; infecções sistêmicas, como bacteremia e endocardite; intoxicações como a síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar.

Segundo Jay (2005), a intoxicação alimentar estafilocócica foi estudada pela primeira vez em 1894 por J. Denis e depois, em 1914, por M. A. Barber, que reproduziu em si mesmo os sintomas da doença depois de consumir leite contaminado com *S.aureus*. A intoxicação se desenvolve em pessoas que ingerem alimentos preparados ou armazenados de maneira imprópria. A severidade da doença depende da quantidade de alimento ingerido, da quantidade da toxina e do estado geral da saúde da vítima. A quantidade de toxina necessária para provocar intoxicação varia entre 20 e 100 ng e a doença só ocorre caso haja ingestão da toxina pré-formada no alimento, pois a bactéria, quando ingerida, não produz a toxina. Os sintomas incluem vômitos, diarreia, dor abdominal e náuseas (Schelin et al., 2011; Murray, 2010). A doença tem um período de incubação que varia entre 30 minutos até 8 horas, é autolimitante, raramente letal e os idosos são mais susceptíveis (Santana, 2006; Pinchuk et al., 2010). Outra característica importante das enterotoxinas estafilocócicas é a sua termoestabilidade, o que confere resistência à temperatura de cocção dos alimentos (Trabulsi, 2008).

Nos Estados Unidos, segundo Scallan et al. (2011), trinta e um patógenos foram responsáveis por 9.4 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos, sendo mais de 55 mil hospitalizações e superando mil óbitos. Na Europa, segundo o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC, 2012), foram reportados 5.500 surtos de doenças transmitidas por alimentos em 2009, com 49.000 vítimas e 46 mortes. Dentre estes surtos, 293 foram causados por *Staphylococcus* spp e toxinas bacterianas.

No Brasil, de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS, 2011), houve 8.663 surtos alimentares, sendo 3.927 relacionados a perigos biológicos ou químicos, enquanto o restante não teve causa identificada. No período de 2000 a 2011, o *S. aureus* foi o segundo patógeno mais identificado nos surtos alimentares no Brasil, antecedido por *Salmonella* spp. No Japão, Asao (2003), após investigação epidemiológica, constatou um extenso surto de intoxicação (mais de 13 mil pessoas) estafilocócica devido à ingestão de leite semi-desnatado com altas doses de enterotoxina A. Do mesmo modo, na Áustria, Schimd

(2009) relata um surto ocorrido com aproximadamente 40 crianças em escolas de dois bairros que recebiam produtos lácteos de um mesmo fornecedor e, após investigação, foi constatada a ingestão de tais produtos como principal causa, com a presença de enterotoxinas A e D.

A mastite provocada pelo *S.aureus* também é um risco potencial à saúde pública, já que mais da metade das cepas isoladas de leite infectado possuem genes enterotoxigênicos. Apesar de o número médio de micro-organismos que passam do teto de vacas com mastite para o leite ser considerado moderado (10^4 UFC/mL), a contaminação do leite de conjunto e subsequente consumo, pode provocar intoxicação estafilocócica (Le Loir, 2003).

3.2.6. Ocorrência no leite

De maneira geral, *Staphylococcus* spp. pode ser encontrado, em quantidades variáveis, na maioria (ou todos) dos alimentos de origem animal ou qualquer outro alimento que passe por manipulação humana (Jay, 2005).

A presença de *S. aureus* em leite cru é relatada em diversos trabalhos. Oliveira et al. (2013) evidenciaram um elevado percentual de isolados em amostras de leite cru, coletadas de tanque de expansão em duas regiões do estado de São Paulo. No Paraná e Rio Grande do Sul, Santana (2006), em pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivos em leite cru refrigerado de 101 propriedades, verificou a presença destes micro-organismos em todas as amostras, com um isolamento de *S.aureus* em 53,9%. A comercialização de leite cru no Brasil, apesar de proibida pela legislação, é uma prática regular e que expõe os consumidores a riscos microbiológicos. Diversos trabalhos têm constatado a presença de micro-organismos patogênicos nesse leite, dentre os quais destaca-se o *S. aureus*, como por exemplo: Maciel et al.(2008) observaram contagens médias de *S. aureus* acima de $1,5 \times 10^4$ em leite cru comercializado no estado da Bahia e, Alves et al. (2009), relataram a presença de *Staphylococcus* coagulase positivos em 23,3% das amostras comercializadas no estado do Maranhão.

Na Argentina, Neder et al. (2011) avaliaram a ocorrência de *S. aureus* enterotoxigênicos em leite de tanques de produtores de quatro regiões e mencionaram que, dos 94 isolados, 11 eram produtores de algum tipo de enterotoxina. Tsegmed et al. (2007) também investigaram a ocorrência de *S.aureus* em leite cru originado de vacas e, distintamente, de iagues na Mongólia, constatando presença em 22 amostras das 97 amostras coletadas, sendo que 23% produziam enterotoxina C. Na Turquia, Gucukoglu et al. (2012) realizaram pesquisa

com o objetivo de detectar a presença de *S.aureus* enterotoxigênicos em leite cru e derivados do leite pela técnica de PCR. *S. aureus* foi encontrado, com diferentes proporções, em todos os seguintes produtos: leite cru (75%), queijo branco (37,5%), queijo kashar (30%), manteiga (30%) e sorvete (10%), sendo que apenas os isolados de sorvete não apresentaram nenhum gene codificador de enterotoxinas. Da mesma forma, Jorgensen et al.(2005), em pesquisa na Noruega, avaliaram a contaminação de leite cru de bovinos e caprinos por *S.aureus*, assim como derivados de leite cru e conclui que 75% do leite bovino, 85,5% do leite caprino e 50% dos derivados tinham a presença do patógeno.

3.3. Ozônio

3.3.1. Histórico

A primeira identificação do ozônio como um composto químico distinto foi realizada por Christian Friedrich, professor de Química da Universidade de Basel. Durante um período considerável, ele dominou os estudos da química do ozônio até a sua morte em 1868. Seus estudos começaram quando observou, em março de 1839, que a eletrólise da água produzia um odor no eletrodo positivo, o mesmo produzido na atmosfera terrestre quando há ocorrência de raios (Rubin, 2001). Em 1857, Werner Von Siemens descobriu a possibilidade de gerar ozônio através de descargas elétricas em meio gasoso. Na Universidade de Sorbonne, Paris, o químico Marius Paul Otto evidenciou a ação germicida do ozônio e deu início à utilização do composto em estações de tratamento de água e esgoto. Em 1936, o ozônio já era utilizado em mais de 100 estações de tratamento na França e em 40 outros lugares do mundo.

No Brasil, começou a ser usado apenas em 1983 no processo de tratamento de águas superficiais (Lapoli et al., 2003). Em 1997, o ozônio passou a ser considerado como um químico GRAS (*Generally Recognised as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) e, desde então, passou a ser estudado e usado também na indústria alimentícia (Graham, 1997; O'Donnell et al., 2012), enquanto no Brasil, até a atualidade, não há legislação específica que trate do assunto.

3.3.2. Propriedades

Na natureza, o ozônio é produzido continuamente na estratosfera (25 a 30 km da superfície terrestre) pela radiação ultra-violeta (<83 nm), que quebra as moléculas de oxigênio em dois átomos altamente reativos. Através de uma reação endotérmica, cada um destes átomos se liga ao oxigênio intacto (O₂) para formar molécula de ozônio (O₃). Pode, ainda, ser produzido durante a descarga elétrica dos raios, que catalizam a formação do ozônio a partir do oxigênio atmosférico (Pirani, 2011). Como apresentado na Figura 1.1, os três átomos de oxigênio da molécula de ozônio são dispostos em ângulo obtuso, em que um átomo de oxigênio central está ligado a dois átomos de oxigênio equidistantes, o ângulo incluído é de aproximadamente 116° 49' e a ligação tem um comprimento de 1.278 Å (Guzel-Seydim et al., 2004).

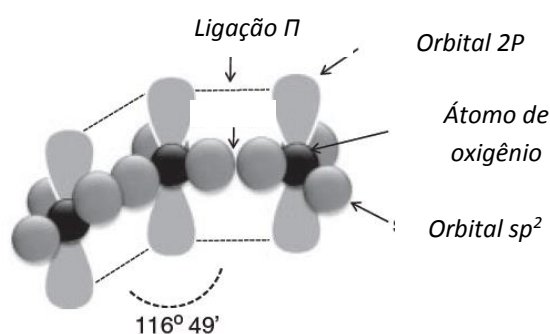


Figura 1.1. Estrutura molecular do ozônio (Greene et al., 2012).

O ozônio é um gás incolor, parcialmente solúvel em água, instável e que evapora em temperatura de -112°C, à pressão atmosférica. Outras propriedades do ozônio estão na Tabela 2. Possui cheiro penetrante e é facilmente detectável em concentrações muito baixas (Lapolli et al. 2011). A solubilidade em água é afetada pela temperatura, diminuindo com temperaturas mais altas. A 0°C, a solubilidade do ozônio é 0.640 L de ozônio/L de água, enquanto a 60°C, é insolúvel (Hill e Rice 1982). Pehkonen (2001) destaca que alguns cenários sugerem que o mecanismo de decomposição do ozônio na água resulta em radicais hidroxil, oxigênio e íons de hidróxido, sendo que em pH acima de 7.5, há um aumento na produção de radicais hidroxil (Pehkonen, 2001). De acordo com Silva et al. (2011), a taxa de desinfecção pelo ozônio é relativamente independente da temperatura.

Tabela 1.2 – Principais características físico-químicas do gás ozônio puro.

Propriedades físico-químicas	
Ponto de ebulição	-111,9±0,3°C
Ponto de fusão	-192,5±0,4°C
Temperatura crítica	-12,1°C
Pressão crítica	54,6 atm
Calor de formação	144,7 kJ/mol
Peso molecular	47,9982 g/mol

Fonte: adaptado de Silva et al., 2011; Pirani, 2011; Guzel-Seydim et al., 2004.

Quando comparado a outros agentes oxidantes, o ozônio se destaca pelo elevado potencial de oxidação, que é de 2,07 mV, menor, apenas, que o do flúor que é de 3,06 mV (Silva, 2011; Lapolli et al. 2011), conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 1.3 – Agentes oxidantes e seus respectivos potenciais de oxidação

Agente oxidante	Potencial de oxidação (mV)
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Hipoclorito	1,49
Cloro	1,36

Fonte: adaptado de Silva et al., 2011; Pirani, 2011; Guzel-Seydim et al., 2004.

3.3.3. Produção

Para gerar ozônio, é necessário que uma molécula diatômica de oxigênio seja separada. A molécula de oxigênio resultante está, portanto, livre para reagir com outra molécula diatômica de oxigênio e formar a molécula triatômica de oxigênio. Porém, para que tal reação ocorra e haja quebra da ligação O-O, uma grande quantidade de energia é essencial (O'Donnell, 2012). Logo, a reação é altamente endotérmica ($\Delta G = + 161,3$ kJ/mol) e é descrita da seguinte forma: $3O_2 \leftrightarrow 2O_3$ $\Delta H = + 284,5$ kJ/mol (Silva et al., 2011).

Assim, os principais métodos para realizar este processo são o uso de radiação ultravioleta (188 nm) - método fotoquímico - e a descarga elétrica (processo corona), que, por ser mais eficiente, é utilizada para a geração de ozônio em níveis comerciais. No processo corona (Figura 1.2), dois eletrodos submetidos à elevada diferença de potencial de aproximadamente 100 V são separados por uma estreita lacuna, por onde passa ar ou oxigênio puro (O'Donnell, 2012; Silva et al. 2011). Quando os elétrons possuem energia suficiente para dissociar a molécula de oxigênio, começam a ocorrer colisões, que causam a dissociação do oxigênio e a consequente formação do ozônio (USEPA, 1999).

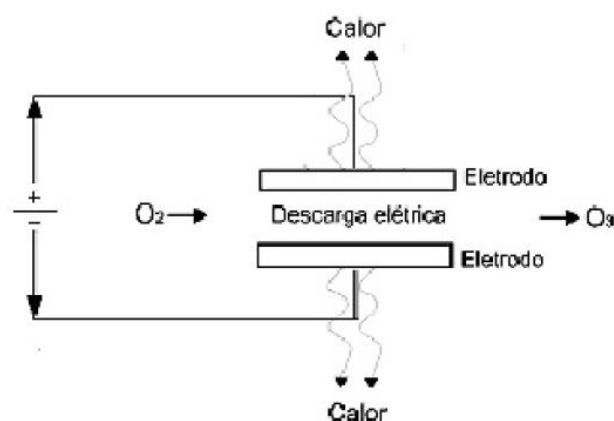


Figura 1.2. Geração do ozônio através do processo corona (Guzel-Seydim et al., 2004).

Segundo Lapolli (2003), há basicamente dois sistemas de geração de ozônio: um a partir do ar e outro a partir do oxigênio puro. Para utilização do ar, é necessário seu pré-tratamento (filtração, compressão, resfriamento e desumidificação). A produção a partir de oxigênio puro, que tem um rendimento maior, exige a alimentação do gerador com um tanque de oxigênio líquido precedido de um evaporador, o que é uma desvantagem em relação ao custo.

3.3.4. Segurança

A toxicidade do ozônio varia com a sua concentração e a duração da exposição. O ozônio é um gás tóxico e pode causar doenças graves e até a morte se inalado em quantidade elevada. É um gás com alta ação oxidante e elevada toxicidade aos animais, plantas e organismos vivos (Pirani, 2011). Os sinais de toxicidade, como acentuada irritação no nariz e garganta podem surgir imediatamente após contato com o gás à concentração de 0,1 ppm. Perda de visão pode surgir após três a seis horas de exposição em concentrações de 0,1 a 0,5 ppm

(Pirani, 2011). A toxicidade do ozônio a 1-2 ppm pode causar irritação na parte superior da garganta, dor de cabeça, dor no peito, tosse e garganta seca. Maiores níveis de ozônio (5-10 ppm) podem causar aumento do pulso e edema pulmonar. Ozônio em níveis de 50 ppm ou mais é potencialmente fatal. Os níveis de exposição ao ozônio como recomendado pelo Departamento de Segurança e Saúde Ocupacional (OSHA) dos EUA são mostrados na Tabela 4.

Tabela 1.4: Níveis aprovados de aplicação de ozônio.

Exposição	Nível de ozônio (ppm)
Odor detectável	0,01 – 0,05
Limite de 8 horas (OHSA)	0,1
Limite de 15 minutos (OHSA)	0,3
Letal em poucos minutos	>1700

Fonte: adaptado de Pirani, 2011.

3.3.5. Ação antimicrobiana

O efeito antimicrobiano do ozônio sobre diversos micro-organismos (bactérias, fungos, protozoários, vírus, esporos bacterianos e fúngicos) tem sido comprovado por diversos estudos realizados. Akey e Walton (1985) demonstraram ação do ozônio sobre o vírus da encefalomielite equina venezuelana. Bolton et al.(1982) constataram o efeito do ozônio em cinco grupos de vírus: da estomatite vesicular, da influenza A, da rinotraqueíte infecciosa bovina, poliovírus tipo I e da hepatite infecciosa canina. Peeters et al. (1989) concluíram que o ozônio tem efeito destrutivo também em oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Restaino et al. (1995) determinaram os efeitos bactericidas do ozônio em quatro bactérias Gram-positivas e quatro Gram-negativas em meio aquoso e, da mesma forma, observaram resultados promissores.

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

resistentes. Por outro lado, Pascual et al. (1997) documentam que as Gram-positivas são mais sensíveis.

A inativação pelo ozônio é um processo complexo com ação sobre vários constituintes da membrana, da parede celular e conteúdo celular (Figura 3). Tanto ozônio molecular quanto os radicais livres produzidos pela sua decomposição têm papel no mecanismo de inativação (Pascual et al., 2007). Segundo Manousaridis (2005), o poder desinfetante do ozônio ocorre principalmente devido a esses radicais livres (hidroxila, hidroperóxido e superóxido) enquanto Hunt & Mariñas (1997) sugerem que o mecanismo predominante é o contato direto do ozônio molecular. Os principais sítios de ação do ozônio nas bactérias são os ácidos graxos insaturados da parede celular; enzimas e ácidos nucleicos intra celulares; glicoproteínas, glicolipídios e enzimas ligadas à membrana. Foram identificados dois mecanismos de ação bioquímica do ozônio sobre estes sítios: oxidação dos grupos sulfidrílica; oxidação de ácidos graxos poliinsaturados em peróxidos ácidos; desnaturação de enzimas e proteólise das demais proteínas em peptídeos menores (O'Donnell, 2012). Desta forma, com o desarranjo das atividades normais da célula, ocorre rápida morte celular.

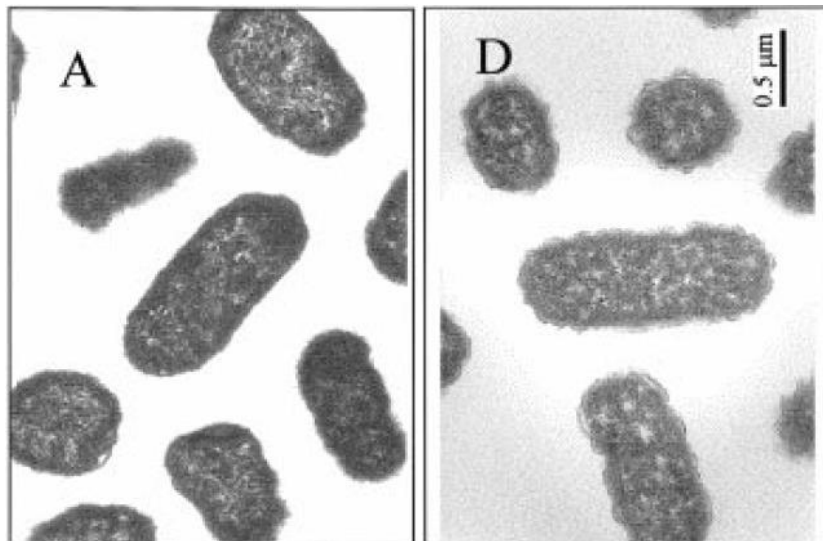


Figura 1.3. Micrografia eletrônica de transmissão de células de *E.coli* antes (A) e após (D) exposição ao ozônio. Fonte: Hunt & Mariñas (1999).

3.3.6. Fatores que afetam a ação antimicrobiana

Segundo diversos autores (Restaino et al., 1995; Pascual et al., 2007; Khadre et al., 2001; Alencar, 2009; Pirani, 2011), o nível de ação antimicrobiana do ozônio pode variar de acordo com alguns parâmetros e variáveis como o pH, temperatura, umidade, aditivos, quantidade de matéria orgânica em volta das célula bacteriana e seu estado fisiológico.

De acordo com Gogate & Pandit (2004), a temperatura influencia a capacidade do ozônio devido à mudança na velocidade da reação e variação da solubilidade. De maneira geral, o aumento na temperatura diminui a solubilidade do ozônio na água e também sua estabilidade (Pascual, 2007). Por outro lado, segundo Khadre et al. (2001), a velocidade da reação do ozônio com os substratos é maior em temperaturas mais elevadas. Silva et al. (2011) destacam, porém, que apesar da influência da temperatura na solubilidade do ozônio, não há efeito na sua taxa de desinfecção.

O pH tem influência apenas na forma de ação do ozônio sobre o substrato: em pH ácido há predominância de reação direta (via ozônio molecular), enquanto em pH mais básico, reação indireta (via radicais OH) (Gottschalk et al., 2000).

A presença de substâncias orgânicas pode competir com os micro-organismos pela interação com o ozônio. Os vírus e as bactérias associadas a matéria orgânica, resíduos celulares, ou fezes são resistentes ao ozônio, mas os vírus purificados são prontamente inativados. Além disso, subprodutos indesejados de ação do ozônio sobre os compostos orgânicos podem encurtar a vida de prateleira, alterar a qualidade organoléptica, ou reduzir a segurança do produto final (Pirani, 2011). Na presença de compostos orgânicos, o ozônio reage de diversas formas devido à formação de diferentes espécies reativas (radicais livres e outras formas moleculares) (O'Donnell et al., 2012). As ligações C-H e S-H de alcanos e alcenos, aminas e compostos sulfidríla são atacados pelo ozônio. Assim como aminoácidos, que reagem com o ozônio no primeiro átomo de nitrogênio da amina ou no grupo R. Já as purinas e pirimidinas são mais resistentes ao ozônio do que outros compostos orgânicos, enquanto os lipídios formam peróxidos (Adachi, 2001). Cataldo (2003) estudou a reatividade do ozônio em meio com cinco proteínas (invertase, pectinase, papaína, tripsina e gelatina) e concluiu que os únicos aminoácidos que foram oxidados foram cisteína, triptofano, tirosina e fenilalanina, enquanto que a ligação poliamídica principal da proteína não foi afetada.

3.3.7. Aplicações do ozônio em alimentos

Considerando o ozônio como um potente agente de ação antimicrobiana, o seu uso no processamento e no armazenamento de alimentos, bem como na indústria, tem sido objeto de estudo há alguns anos. Dentre os alimentos examinados destacam-se as frutas e vegetais; os grãos em geral; a carne e seus derivados, assim como o pescado e seus derivados.

Tiwari & Muthukumarappan (2012) citam diversos trabalhos relacionando o uso do ozônio como ferramenta de desinfecção em frutas e legumes (alface, maçã, coentro, cenoura, melão, batata, mirtilo, aipo, pepino). O principal propósito da ozonização de frutas e legumes, além da inativação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, é a destruição de resíduos de pesticida e de outros produtos químicos. Em geral, o processo é feito com ozônio gasoso, lavagem com água ozonizada ou ainda em sucos de frutas (Tiwari & Muthukumarappan, 2012).

O ozônio tem sido também utilizado - inclusive a nível industrial - para controlar o desenvolvimento de pestes (insetos e micro-organismos em geral) em grãos armazenados, desinfetar farinhas e degradar moléculas potencialmente tóxicas (Lullien-Pellerin, 2012). Kells et al. (2001) avaliaram a ação do ozônio sobre insetos em milho e observaram uma taxa de mortalidade de quase 100%.

O uso da ozonização na cadeia da carne também pode ser na fase gasosa ou aquosa (Pohlman, 2012). Castillo et al. (2003), avaliou o impacto da lavagem de carcaças com spray de água ozonizada comparando com água não ozonizada. As carcaças foram contaminadas com *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Os resultados foram parecidos, porém a pressão usada na lavagem com água não ozonizada foi bem superior. O uso do ozônio na carne pode provocar perdas da característica normal como a coloração vermelha, conferida pela oximioglobina, a qual é oxidada a metimioglobina, ocasionando coloração mais escura à carne. Da mesma forma, a oxidação dos lipídios de cadeia dupla também pode ocorrer (Pohlman, 2012).

O ozônio é utilizado na indústria de processamento de alimentos para a esterilização de equipamentos e da área de produção, a desinfecção de embalagens, a redução da carga microbiana da água usada para resfriamento de frangos, o tratamento de frutas e hortaliças visando aumento da vida de prateleira, o combate a biofilmes microbianos localizados em superfícies de metais, entre outros (Pirani, 2011).

3.3.8. Uso em leite e derivados

Cavalcante et al. (2013) avaliaram os efeitos da ozonização em leite fluido cru sobre o número de aeróbios mesófilos, micro-organismos da família *Enterobacteriaceae*, psicrotróficos, *Staphylococcus* spp, bolores e leveduras. Com 10 minutos de ozonização, houve redução significativa das enterobactérias, estafilococos, bolores e leveduras; enquanto que com 15 minutos, os autores observaram reduções significativas de 0.60 ciclos log, 0.96 ciclos log, 0.13 ciclos log, 1.02 ciclos log e 0.48 ciclos log para aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, psicrotróficos, *Staphylococcus sp.*, bolores e leveduras, respectivamente.

Em trabalho semelhante, Santos (2013) analisou a ação do ozônio sobre a contagem de aeróbios mesófilos e seus efeitos sobre a composição físico-química do leite cru. Realizando vários ensaios com tempos de ozonização e concentrações de ozônio diferentes, o autor concluiu que os melhores resultados, em termos de redução de carga microbiana, foram com tempos acima de 15 minutos e concentração acima de 5 mg/L. Com relação à análise centesimal do leite, o ozônio não exerceu nenhum tipo de influência negativa.

Sheelamary & Muthukumar (2011) estudaram os efeitos da ozonização sobre a população de *Listeria monocytogenes* em amostras de leite. Com os tempos de ozonização que foram de 5, 10 e 15 minutos, concluíram que o processo de descontaminação foi eficiente a partir de 10 minutos, ocorrendo eliminação total do micro-organismo.

Lanita & Silva (2008) compararam três tratamentos com ozônio no controle de bolores e leveduras em queijo tipo parmesão, em condições industriais. Os tratamentos consistiram de: 1) apenas ozônio, 2) ozônio e lavagem dos queijos e 3) ozônio, lavagem e aplicação de fungistático. Como resultado, constataram que as médias das contagens aos 60 dias do tratamento 2 foram significativamente superiores às dos outros tratamentos. Serra et al. (2003) verificaram a ação fungicida do ozônio em sala de maturação de queijo, avaliando o ar e as superfícies. Os resultados obtidos indicaram que os tratamentos reduziram os bolores do ar, mas não afetaram a viabilidade dos bolores nas superfícies.

Segundo Cullen & Norton (2012) uma das primeiras pesquisas com ozônio na indústria de leite foi realizada por Greene et al. (1993), o qual comparou a efetividade da água ozonizada com um sanitizante clorado para desinfecção de superfícies de metal contaminadas com leite UHT (*Ultra High Temperature*) inoculado com colônias de *Pseudomonas fluorescens* e *Alcaligenes faecalis*, concluindo que ambos os tratamentos tiveram alta eficiência, com 99% de redução da microbiota. Güzel-Seydim et al. (2000) estudaram o uso de água ozonizada, a

10°C, como técnica de limpeza prévia de superfície metálica comum em equipamentos da indústria de laticínios, comparando com a limpeza convencional, que é feita com água aquecida a 40°C. Os autores chegaram aos resultados de remoção de 84% dos resíduos de leite pela água ozonizada, enquanto a água morna removeu 51%.

O ozônio pode, ainda, ser utilizado na etapa de produção do leite, especificamente no tratamento de mastite bovina, como afirma Pereira et al. (2003). Em sua revisão, os autores citaram Scrollavezza et al. (1997), que trataram, com ozonioterapia, mais de 5000 vacas leiteiras com mastite clínica e subclínica, realizando insuflação local em diferentes concentrações aplicadas nos quartos afetados, obtendo resultados satisfatórios.

CAPÍTULO 2

RESUMO

EFEITO DA OZONIZAÇÃO NA CONTAGEM DA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM LEITE.

Mestrando: Emanuel Pereira Couto, Universidade de Brasília.

Orientadora: Márcia de Aguiar Ferreira, Universidade de Brasília.

Com o objetivo de avaliar a eficiência da ação da ozonização do leite sobre a redução na contagem de colônias de micro-organismos da espécie *Staphylococcus aureus*, foi realizado experimento em que amostras de leite inoculadas com o micro-organismo foram submetidas à ozonização com diferentes binômios tempo/concentração. Assim, dividiram-se as amostras em quatro ensaios: 1 e 2, com leite desnatado e concentrações de 34.7 mg L⁻¹ e 44.8 mg L⁻¹ de ozônio, respectivamente; e ensaio 3 e 4, com leite integral (34.7 mg L⁻¹ e 44.8 mg L⁻¹ de ozônio, respectivamente). Os tempos de ozonização em todos os ensaios foram de 5 (T1), 10 (T2), 15 (T3), 20 (T4) e 25 (T5) minutos, com três repetições. Cada tratamento foi repetido três vezes. As contagens bacterianas foram feitas imediatamente antes e após o processo de ozonização das amostras, em agar Baird Parker. Nos tratamentos 1 e 2, as maiores reduções foram de 0.42 log₁₀ UFC/mL, enquanto nos tratamentos 3 e 4, foram de 0.19 e 0.21 log₁₀ UFC/mL, respectivamente. Os resultados de todos os ensaios mostram que, em T1, não houve redução da carga microbiana, enquanto que a partir de T2, há uma crescente queda da microbiota, que é acentuada nos tempos T4 e T5. Tanto para leite desnatado quanto para o integral, nas concentrações de 34,7 e 44,8 mg L⁻¹, a partir dos 20 minutos de ozonização, as reduções foram significativamente maiores. Os resultados do trabalho confirmam a eficácia do ozônio sobre o patógeno bacteriano *Staphylococcus aureus* inseridos em leite fluido e que os lipídios do leite exercem influência sobre tal eficiência bactericida.

Palavras chave: Ozônio; *Staphylococcus aureus*; Leite; Beneficiamento do leite.

ABSTRACT

EFFECT OF OZONATION ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* COUNT IN MILK.

Mastership Student: Emanuel Pereira Couto, University of Brasília

Tutor: Márcia de Aguiar Ferreira, University of Brasília

In order to evaluate the efficiency of the action of ozonation of milk on the reduction in bacterial counts of *Staphylococcus aureus*, an experiment was undertaken in which milk samples inoculated with the microorganism were subjected to ozonation with different binomials time / concentration of ozone. Thus, the samples were divided in four assays: 1 and 2, with skim milk, and concentrations of 34.7 mg L⁻¹ and 44.8 mg L⁻¹ of ozone, respectively, and assay 3 and 4, with whole milk (34.7 mg L⁻¹ and 44.8 mg L⁻¹ of ozone, respectively). The time of ozonation in all assays were 5 (T1), 10 (T2), 15 (T3), 20 (T4) and 25 (T5) minutes. Each treatment was replicated three times. The bacterial counts were made immediately before and after the ozonation process, plating the samples on Baird Parker agar. In treatments 1 and 2, the greatest reductions were 0.42 log₁₀ CFU / mL, while in treatments 3 and 4 were 0.19 and 0.21 log₁₀ CFU / mL, respectively. The results of all the tests show that, on T1, there was no reduction in microbial load, whereas, on T2, there is a sharp decrease of the microbiota, which is remarkable in the times T4 and T5. In both skim and whole milk, at ozone concentrations of 34.7 and 44.8 mg L⁻¹, after 20 minutes ozonation, the reductions were significantly greater. The findings confirm the effectiveness of ozone on the bacterial pathogen *Staphylococcus aureus* inoculated into fluid milk. In addition, the milk lipids have an influence on the ozonation's effects.

Keywords: Ozone, *Staphylococcus aureus*, Milk, Milk Processing

1. INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais consumidos no mundo, com grande crescimento nas últimas décadas, especialmente, em alguns países em desenvolvimento, devido ao aumento do acesso da população às proteínas de origem animal (Gerosa e Skoet, 2012). Um dos motivos que estimulam o grande consumo do leite é a sua característica nutricional ímpar, apresentando mais de mil tipos diferentes de moléculas com funções específicas, além da possibilidade de processamento industrial, que resulta em uma ampla oferta de produtos ao comércio.

Além de ser um alimento de extrema riqueza nutricional, o leite apresenta características físico-químicas, como pH e atividade de água, que o tornam um ótimo meio de cultura para uma grande diversidade de micro-organismos, dentre eles os patogênicos e os deteriorantes, que representam, respectivamente, problemas de saúde pública e de conservação do alimento.

Dentre os patógenos de origem alimentar, destaca-se o micro-organismo *Staphylococcus aureus*, responsável por diversos surtos de intoxicações causados pelas enterotoxinas estafilocócicas, que são consideradas superantígenos capazes de resistir ao tratamento térmico dos alimentos (Scallan et al., 2011; European Centre for Disease Prevention and Control, 2012; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011; Asao, 2003; Schimd, 2009). Dessa forma, essa espécie adquire importância na pecuária leiteira, elo inicial da cadeia produtiva, já que é uma das mais predominantes na ocorrência de mastite nos animais produtores, estando intimamente relacionada ao manejo do rebanho. Diversas pesquisas têm relatado a presença de estirpes enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* em leite, desde a sua obtenção na propriedade rural até a produção e comercialização de seus derivados, no Brasil e no mundo (Santana, 2006; Oliveira et al., 2013; Neder et al., 2011; Tsegmed et al., 2007).

O gás ozônio, forma molecular triatômica do oxigênio, tem sido amplamente pesquisado e utilizado na indústria de alimentos, tanto como forma de limpeza de superfícies como no tratamento da matéria-prima, desde que foi considerado um químico GRAS

(*Generally Recognised as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*). O ozônio tem um exímio efeito bactericida devido ao seu elevado potencial de oxidação (2,07mV), menor apenas que o do flúor (3,06 mV). Dentre os vários estudos, destacam-se os resultados obtidos com frutas, vegetais, grãos em geral, carne e seus derivados, assim como o pescado e seus derivados (Tiwari e Muthukumarappan, 2012; Lullien-Pellerin, 2012; Kells et al., 2001; Pohlman, 2012; Castillo et al., 2003).

Ao passo que as pesquisas sobre a utilização do gás ozônio como forma alternativa de tratamento de alimentos avançam, não são muitos os trabalhos que avaliam a eficiência de tal método em leite fluido e seus derivados. Dessa forma e considerando a importância alimentar do leite, o presente trabalho teve por objetivo, avaliar os efeitos da ozonização na redução de *Staphylococcus aureus* inoculados em leite fluido, com diferentes teores de gordura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local da pesquisa

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Análises de Leite e Derivados e de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas, localizados na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília.

2.2. Preparo dos inóculos e das amostras

Para o preparo das amostras, utilizaram-se leites Ultra Alta Temperatura (UAT), integral e desnatado. Para os inóculos utilizou-se a cepa ATCC 25923 cedida pelo Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade de Brasília, que foi repicada e mantida estocada em ágar TSA (*Tryptone Soya Agar - Himedia®*). Os inóculos foram preparados em solução salina 0,85% de forma a obter-se grau de turvação correspondente ao tubo 1 da escala nefelométrica de McFarland (Nefelobac®, Probac do Brasil), contendo aproximadamente $3,0 \times 10^8$ UFC/mL de *S. aureus*. Foram, então, transferidas alíquotas do inóculo em 300mL de leite previamente esterilizado por fervura como forma de garantir a eliminação de qualquer outro micro-organismo, afim de obter-se concentração aproximada de $3,0 \times 10^4$ UFC/mL de *S. aureus*. As amostras foram mantidas resfriadas em temperatura média de 10 °C (8°C-12°C) para a execução da ozonização.

2.3. Processo de ozonização e binômios tempo/concentração de ozônio

O gás ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio (Modelo *O&L 3.0-O2 RM*, da *Ozone & Life*®, Figura 2.1) baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica. Este tipo de descarga é produzido ao aplicar uma alta tensão entre dois eletrodos paralelos, tendo entre eles um dielétrico (vidro) e um espaço livre por onde flui o ar seco. No espaço livre, é produzida uma descarga em forma de filamentos, em que são gerados elétrons com energia suficiente para produzir a quebra das moléculas de oxigênio, formando o ozônio (O_3). No processo de geração do ozônio, foi utilizado como insumo oxigênio (O_2), obtido de concentrador de oxigênio acoplado ao gerador de ozônio.



Figura 2.1. Gerador de ozônio.

Fonte: Ozone & Life (2011)

A concentração de ozônio foi determinada pelo método iodométrico, descrito por Clesceri et al. (2000). Esse método consiste no borbulhamento de massa gasosa contendo ozônio em 50 mL de solução de iodeto de potássio (KI) 1 N, com produção de iodo (I_2). Para garantir o deslocamento da reação para a produção de I_2 , foi necessário acidificar o meio com

2,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 N, depois do borbulhamento. A solução foi titulada com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 0,01 N, com uso de solução de amido 1% como indicador.

Cada amostra de leite foi transferida para uma coluna de vidro, com capacidade de 500 mL, tendo 19 cm de altura e 6 cm de diâmetro. Antes da ozonização de cada amostra de leite, a coluna de vidro era sanitizada, com borbulhamento do próprio gás ozônio em água, por 5 minutos. As colunas de vidro foram conectadas ao aparelho gerador de ozônio por meio de mangueiras de silicone. Instalou-se destruidor térmico catalítico depois da coluna de ozonização, necessária para decomposição do ozônio residual.

Foram estabelecidos 10 ensaios de ozonização conforme quadro abaixo, sendo que cada ensaio foi realizado em triplicata representando um total de 30 amostragens com leite integral (teor \geq 3,0% de gordura) e 30 com leite desnatado (teor \leq 0,6% de gordura).

Tabela 2.1 – Apresentação dos ensaios, com suas respectivas concentrações de ozônio e tempo (T) de aplicação.

Leite desnatado (\leq 0,6% de gordura)		Leite integral (\geq 3,0% de gordura)	
Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
concentração	concentração	concentração	concentração
34.7mg/L	44.8mg/L	34.7mg/L	44.8mg/L
T1= 5 minutos	T1= 5 minutos	T1= 5 minutos	T1= 5 minutos
T2= 10 minutos	T2= 10 minutos	T2= 10 minutos	T2= 10 minutos
T3= 15 minutos	T3= 15 minutos	T3= 15 minutos	T3= 15 minutos
T4= 20 minutos	T4= 20 minutos	T4= 20 minutos	T4= 20 minutos
T5= 25 minutos	T5= 25 minutos	T5= 25 minutos	T5= 25 minutos

2.4. Análises microbiológicas

As avaliações das concentrações dos inóculos e das contagens de *S. aureus* antes e após o processo de ozonização, foram realizadas por meio de sementeiras por superfície, em placas contendo ágar Baird Parker (Acumedia®) e incubadas a 35°C por 24 horas.

2.5. Determinação da concentração residual do ozônio após a passagem por coluna contendo leite

Determinou-se a concentração residual do gás após a passagem pelo produto, em intervalos de 5 minutos, até 25 minutos. Para relacionar concentração residual do gás ozônio com o tempo, realizou-se ajuste da equação sigmoidal aos dados obtidos (Equação 1):

$$C = \left[\frac{a}{1 + e^{-(t-b)/c}} \right]$$

Equação 1, em que C = concentração do gás ozônio (mg L^{-1}); t = tempo (min); a, b e c são constantes da equação.

A partir dos valores das constantes b e c, de acordo com Venegas et al. (1998), foi possível obter o tempo de saturação (Equação 2) e, posteriormente a concentração de saturação (C_{Sat}):

$$t_{\text{Sat}} = b + 2c$$

Equação 2, em que t_{Sat} = tempo de saturação (min).

Conhecendo-se o valor de C_{Sat} , foi possível obter a relação C_{Sat}/C_0 , sendo C_0 a concentração inicial do ozônio.

2.6. Análise estatística

Os resultados foram analisados com o software STATA[®] 13, após a transformação logarítmica dos dados (\log_{10} UFC/mL). Para comparar as médias de cada tempo, dentro de cada ensaio, foi feita análise de variância (Pagano & Gavreau, 2004) e para comparação das médias dos tempos entre os diferentes ensaios, foi realizado teste T de Student (Pagano & Gavreau, 2004).

Para a obtenção das equações de regressão e plotagem dos gráficos referentes à concentração residual do ozônio em função do tempo, utilizou-se o software SigmaPlot 2001.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2.2 apresenta a variação média, referente às três repetições, das contagens (\log_{10} UFC/mL) de *S. aureus* para cada tempo em cada ensaio.

Nos ensaios com leite desnatado (1 e 2), as maiores reduções foram de 0.42 \log_{10} UFC/mL, em T5 (25 minutos), enquanto que nos ensaios com leite integral (3 e 4), foram de 0.19 e 0.21 \log_{10} UFC/mL, respectivamente, também em T5.

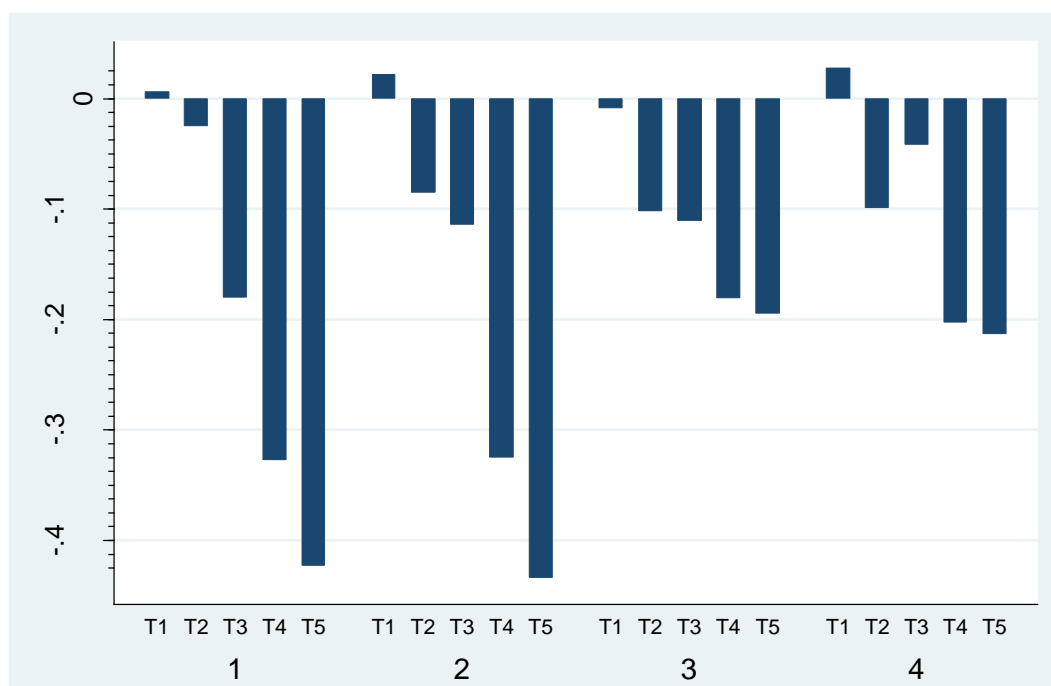


Figura 2.2 – Variação média das contagens de *Staphylococcus aureus* após ozonização, em cada tempo, para cada ensaio.

Analisando a Figura 2.2, observa-se que o efeito segue um padrão consistente em todos os ensaios. Os resultados mostram que, em T1 (5 minutos), não houve redução da carga microbiana, mas a partir de T2 (10 minutos), observou-se diminuição crescente na contagem de *S. aureus* com o aumento do tempo de tratamento. Dessa forma, percebe-se que a

eficácia do processo de ozonização na redução da população de *S. aureus* é dependente do tempo em que o gás ozônio permanece em contato com o micro-organismo.

Alguns trabalhos corroboram o efeito do tempo de ozonização sobre bactérias de diferentes espécies. Cavalcante et al. (2013) avaliaram os efeitos da ozonização do leite cru sobre a sua microbiota, usando tempos de 5, 10 e 15 minutos (concentração de 1,5 mg/L) e observaram uma redução de 0.52 log₁₀ UFC/mL na população de *Staphylococcus* spp em 10 minutos e 1.02 log₁₀ UFC/mL em 15 minutos. O trabalho de Cavalcante et al (2013), entretanto, teve algumas diferenças metodológicas em relação ao presente, principalmente o uso do agente tensoativo polissorbato 80, que foi usado para melhorar o contato com o ozônio, o que pode ter influenciado na obtenção de maiores reduções na população bacteriana. Sheelamary e Muthukumar (2011) verificaram a eficácia da ozonização do leite sobre *Listeria monocytogenes* e observaram que, após 5 minutos, houve redução de metade da população inicial e depois de 15 minutos de tratamento, toda a microbiota foi eliminada. *Listeria monocytogenes*, de acordo com o estudo de Restaino et al. (1995), é naturalmente mais sensível ao ozônio do que o *S. aureus*. Ainda, Pirani (2011) avaliou os efeitos do ozônio sobre colônias de *S. aureus* inseridas em ambiente controlado e observou que após uma hora de tratamento, ocorreu redução de 3.1 log₁₀ UFC/mL. Tal trabalho também mostra a necessidade de muito tempo de contato entre o ozônio molecular e as colônias de *S. aureus*, já que, durante o mesmo período de ozonização, houve uma redução de 5.8 log₁₀ UFC/mL nas contagens de *Escherichia coli*.

Segundo Silva et al. (2011), as bactérias Gram negativas possuem, em geral, maior sensibilidade ao ozônio do que as Gram positivas, devido à menor quantidade de peptideoglicano em sua parede celular, o que foi observado também por Kim (1998), que detectou, por microscopia eletrônica, maiores danos na estrutura celular de Gram negativas. O peptideoglicano é o principal polímero componente da parede celular das bactérias Gram positivas e possui na sua formação moléculas de N-acetilglicosamina. De acordo com Rey et al. (1995), a molécula de N-acetilglicosamina é bem mais resistente à ação do ozônio em meio aquoso, quando comparada à molécula de glicosamina, o que pode explicar parte da resistência das bactérias Gram-positivas ao ozônio, em especial *S. aureus*, que tem em sua parede celular uma quantidade relativamente alta (50 % da massa) de peptideoglicano.

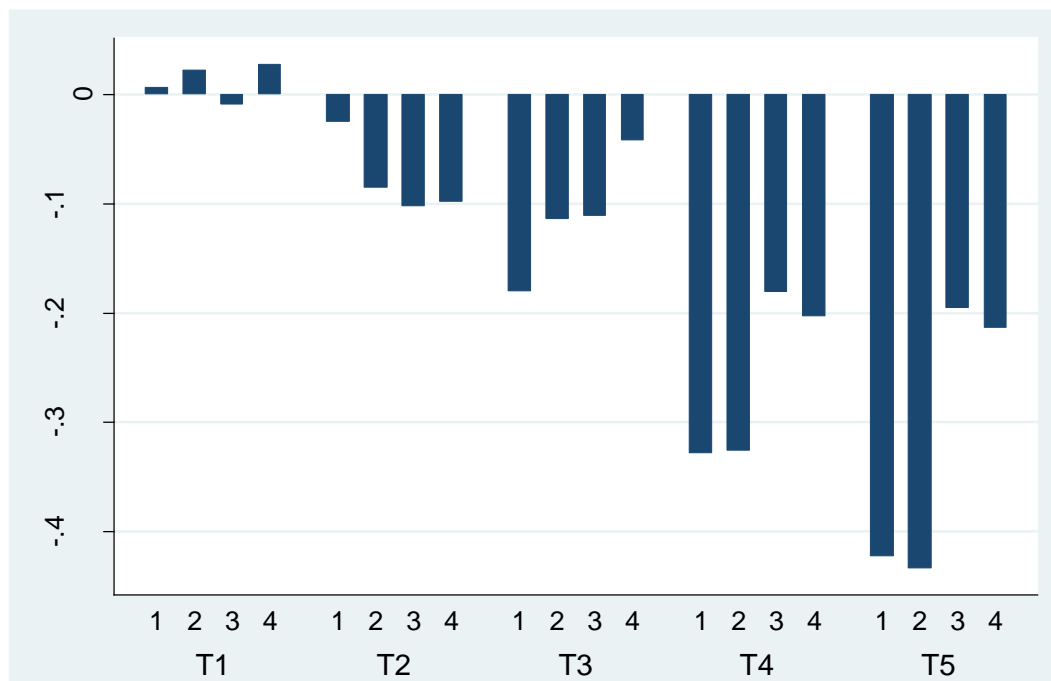


Figura 2.3 – Variação média, nos ensaios, das contagens de *Staphylococcus aureus* após ozonização em todos os tempos.

Com relação aos níveis de concentração de ozônio utilizados na pesquisa (34.7 e 44.8mg/L) observou-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre eles. Portanto, nas condições do trabalho, o aumento da concentração de ozônio não aumentou a eficácia do processo. Hunt e Mariñas (1997) estudaram a cinética da inativação de *Escherichia coli* pelo ozônio e concluíram que tanto a concentração quanto a densidade de micro-organismos ativos foram os principais fatores determinantes para a eficiência do processo.

Silva et al. (2011) enfatizam que o controle correto da concentração do ozônio para o tratamento dos alimentos é importante não apenas para a sua eficácia, mas para que não haja danos oxidativos, odor desagradável e alteração na cor. As concentrações utilizadas (34.7 mg/L e 44.8 mg/L) são consideradas altas em comparação com a maioria dos trabalhos sobre o uso do ozônio como método de beneficiamento de alimentos. Essas concentrações foram selecionadas levando em consideração os resultados obtidos por Santos (2013), que realizou a ozonização de amostras de leite cru utilizando diversos tempos e concentrações diferentes, atingindo a melhor eficiência com concentrações a partir de 15mg/L.

A comparação dos resultados obtidos com leites de diferentes teores de gordura (integral e desnatado) demonstrou que não foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) na redução do micro-organismo até T3, entretanto, T4 e T5 apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$), constatando-se que a gordura do leite, mesmo homogeneizada (leite UAT), interfere

na ação bactericida do ozônio sobre *S. aureus*. Guzel-Seydim et al. (2004) avaliaram os efeitos da ozonização sobre *Bacillus stearothermophilus*, *E. coli* e *S. aureus* que foram inoculados em cinco substratos diferentes: solução tampão estéril, creme de leite, solução de goma de alfarroba, solução de amido solúvel e solução de caseinato de sódio. Os autores concluíram que o creme de leite e o caseinato promoveram o maior efeito de proteção às bactérias. A redução de *S. aureus*, após 10 minutos, em amido foi completa e em creme de leite, de $1.02 \log_{10}$.

Patil et al. (2009) também constataram os efeitos da matéria orgânica sobre os efeitos oxidativos do ozônio sobre *E. coli* em diferentes tipos de suco de laranja (variando a quantidade de matéria orgânica). Os autores concluíram que a quantidade de matéria orgânica interferiu na ação do ozônio foi mais eficiente quando em suco filtrado. Em água, as reações de oxidação dos componentes bacterianos pelo ozônio podem ocorrer de duas maneiras: oxidação direta pelo ozônio molecular ou oxidação indireta, causada pelos radicais livres formados pela autodecomposição ou pela reação com compostos orgânicos ou inorgânicos (Hunt e Mariñas, 1997). A matéria orgânica tende a interagir antes com o ozônio, interferindo na oxidação das bactérias pelo contato direto com ozônio molecular, que é segundo alguns autores (Finch et al., 1992; Labatiuk et al., 1994), o mecanismo predominante. Segundo Kim (1998), a quantidade de matéria também pode interferir na solubilidade do ozônio em meio líquido.

Além da presença da matéria orgânica, a sua composição é de extrema importância e determinante na ação do ozônio. Este fato é corroborado pelas Figuras 2.4, 2.5 e Tabela 2.2, nas quais são apresentadas as curvas e equações de regressão de concentração de ozônio residual em função do tempo, após passagem por coluna contendo leite, nas concentrações de 34.7 mg/L e 44.8 mg/L, respectivamente. Dois aspectos devem ser destacados: o tempo de saturação do gás ozônio e as concentrações de saturação e respectivos valores de C_{Sat}/C_0 . O tempo de saturação permaneceu entre 5,44 e 7,68 minutos. Com relação à concentração de saturação, quando se adotou concentração inicial de 34.7 mg/L, obteve-se para os leites desnatado e integral, concentrações de saturação equivalentes a 19,69 ($C_{Sat}/C_0 = 0,57$) e 13,39 mg/L ($C_{Sat}/C_0 = 0,39$), respectivamente. No que tange a concentração inicial de 44,8 mg/L, obteve-se concentrações de saturação equivalentes a 34,35 ($C_{Sat}/C_0 = 0,77$) e 30,86 mg/L ($C_{Sat}/C_0 = 0,69$), para os leites desnatado e integral, respectivamente. Então, verifica-se que quando se utilizou leite integral, obtiveram-se menores valores de concentração de saturação e relação C_{Sat}/C_0 . Essa tendência pode ser associada à degradação do ozônio mais acelerada no leite, à medida que se eleva o teor de gordura, o que provavelmente interferiu na eficiência do processo de ozonização na inativação de *S. aureus*.

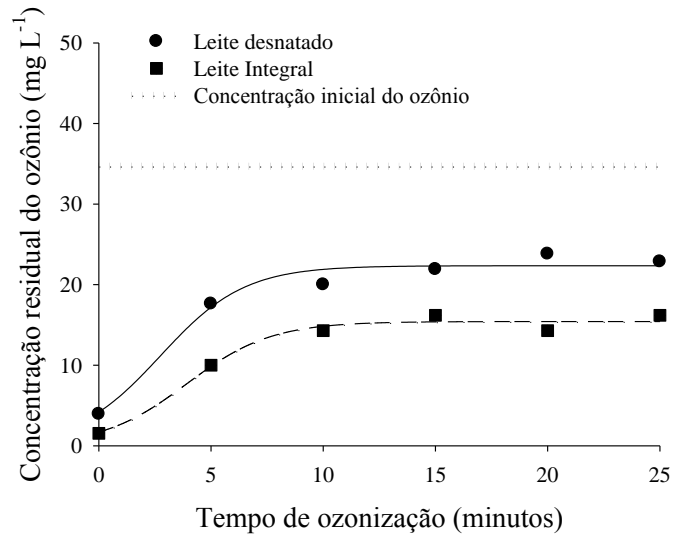


Figura 2.4 – Concentração de ozônio residual medido antes (inicial) e após o contato do gás com as amostras nos ensaios 1 e 3.

B

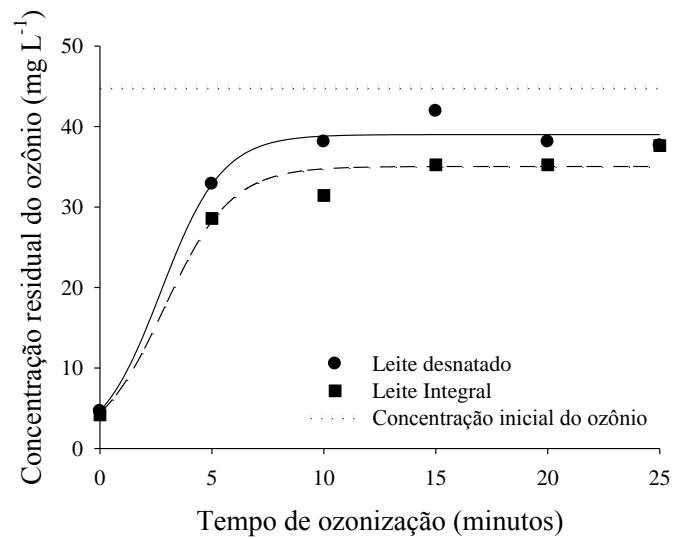


Figura 2.5 – Concentração de ozônio residual medido antes (inicial) e após o contato do gás com as amostras nos ensaios 2 e 4.

Tabela 2.2 - Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R^2) para concentração residual do ozônio em função do tempo após passagem por coluna contendo 300 mL de leite desnatado e integral, na temperatura de 10°C, e concentração do gás de 34,7 e 44,8 mg L⁻¹.

Concentração do ozônio (mg L ⁻¹)	Tipo de leite	Equações Ajustadas	R^2	t_{Sat} (min)	C_{Sat} (mg L ⁻¹)	Relação C_{Sat}/C_0
34,7	Desnatado	$\hat{y} = \frac{22,35}{1 + e^{-\left(\frac{x - 2,75}{1,87}\right)}}$	0,98	6,49	19,69	0,57
	Integral	$\hat{y} = \frac{15,42}{1 + e^{-\left(\frac{x - 3,93}{1,88}\right)}}$	0,98	7,69	13,39	0,39
44,8	Desnatado	$\hat{y} = \frac{39,00}{1 + e^{-\left(\frac{x - 2,72}{1,36}\right)}}$	0,99	5,44	34,35	0,77
	Integral	$\hat{y} = \frac{35,04}{1 + e^{-\left(\frac{x - 2,88}{1,48}\right)}}$	0,98	5,84	30,86	0,69

t_{Sat} – Tempo de saturação

C_{Sat} – Concentração de saturação

C_0 – Concentração inicial

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nessa pesquisa permitem concluir que o ozônio é um método eficaz na redução das contagens de *S. aureus* em leite integral e desnatado, sendo que começa a haver redução da microbiota a partir de 10 minutos de ozonização, nas duas concentrações de ozônio testadas. Os efeitos são mais acentuados a partir dos 20 minutos de ozonização, em todos os ensaios.

A gordura do leite quando em teores integrais, mesmo sendo homogeneizada, diminui a eficiência do ozônio sobre a redução de *S. aureus*. A diferença entre os ensaios com leite integral e desnatado é significativa a partir de 20 minutos, quando então se acentua o efeito do tratamento.

Assim como a pasteurização, a ozonização age na redução de *S. aureus* no leite. Entretanto, há necessidade de mais estudos para a sua utilização deste processo como método alternativo no beneficiamento do leite.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABLV. Associação Brasileira do Leite Longa Vida. Informações Gerais. **Mercado do leite Longa Vida**. 2012. Disponível em: < <http://www.ablv.org.br/fixedcontent.aspx?area=set-inf>>. Acesso em 9 de janeiro de 2014.
- ACTON, D. S., et al. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** n. 28, p. 115–127, 2009.
- ADACHI, D. **Virus inactivation by ozone**, Dissertação de mestrado, Universidade de Toronto, 2001.
- AKEY, D.H., WALTON, T.E. Liquid-phase study of ozone inactivation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 50, n. 4, 882-886, 1985.
- ALENCAR, E. R. **Processo de ozonização de amendoim (*Arachis hypogaea* L.): cinética de decomposição, efeito fungicida e detoxificante de aflatoxinas e aspectos qualitativos**, Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- ALVES, L. M. C., et al. Qualidade microbiológica do leite cru e queijo coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís – MA. **Pesquisa em Foco**, v. 17, n.2, 01-13, 2009.
- ANDRADE, H.H. **Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovina no Distrito Federal e Entorno**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília. Brasília, 2012.
- ASAO, T., et al. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiol. Infect.**, n. 130, 33-40, 2003.
- ATAÍDE, W. S. et al. Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 67, n. 1, p. 73–77, 2008.

- BAIRD-PARKER A. C. The basis for the present classification of staphylococci and micrococci. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 236, 7-14, 1974.
- BOLTON, D.C., ZEE, Y.C., OSEBOLD, J.W. The biological effects of ozone on representative members of five groups of animal viruses. **Environ. Res**, n. 27, 476-484, 1982.
- BRASIL, 1952. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo decreto nº 30.691, de 29/03/52, alterado pelos decretos nº 1.255, de 25/06/62, nº 1.236, de 02/09/94, nº 1.812, de 08/02/96 e nº 2.244, de 04/06/97. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 jun. 1997.
- BRASIL, 2003. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Brasília, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel**.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria nº 146, de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos**.
- CASTILLO, A. Ozone treatment for reduction of *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella* serotype *typhimurium* on beef carcass surfaces, **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 5, 775-779, 2003.
- CATALDO, F. On the action of ozone on proteins. **Polymer Degradation and Stability**, n. 82, 105-14, 2003.
- CAVALCANTE, M. A. Improvement of the raw milk microbiological quality by ozone treatment. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 4, 2017-2021, 2013.
- CHERNICARO, C. A. L. et al. **Pós-tratamento de efluentes anaeróbios por sistemas de desinfecção**. Belo Horizonte. 544f. Projeto PROSAB, 2001.
- CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E. EATON, A.D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Denver: American Water Works Association, 1220p, 2000.

- COSTA, E. N. **Influência do tratamento térmico sobre os ácidos graxos do leite bovino.** Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB - Campus de Itapetinga. 46 p., 2011.
- CULLEN, P. J.; NORTON, T. Ozone sanitisation in the food industry. In: O'DONNELL, C. P., et al. **Ozone in Food Processing**, 1^a ed., Blackwell Publishing, 2012.
- ECDC. Eurosurveillance editorial team. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. **Euro Surveill.**, v. 17, n. 10, 2012. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20113>>. Acesso em: 15 set. 2013.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Panorama do leite.** Ano 6, nº 74, 2013. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_01_PanoramaLeite.pdf>. Acesso em: 09 de janeiro de 2014.
- FDA - United States Food and Drug Administration. **The dangers of raw milk: Unpasteurized milk can pose a serious health risk**, 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM239493.pdf>>
- FINCH G. R. et al. Inactivation of *Escherichia coil* using ozone and ozone-hydrogen peroxide. **Environ. Technol**, n. 13, 571-578, 1992.
- FOSTER, T. J. & HOOK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.**, n. 6, 484-488, 1998.
- FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nat. Rev. Micro.**, v. 3, n.12, 948-958, 2005.
- GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Segunda edição, 2004.
- GEROSA, S.; SKOET, J. Milk Availability: Trends in production and demand and medium-term outlook. **ESA Work Paper**, n. 12-01. Agricultural Development Economics Division. Food and Agricultural Organization of United Nations. 2012.
- GILBERT I. Dissociation in an Encapsulated *Staphylococcus*. **J. Bacteriol.**, n. 21, n. 3, 157-160, 1931.
- GOTTSCHALK, C.; LIBRA, A. J.; SAUPE, A. **Ozonation of Water and WasteWater: A Practical Guide to Understanding Ozone and its Applications**, 2^a ed., 2000.
- GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997.

- GREENE, A., K; GUZEL-SEYDIM., Z., B.; SEYDIM, A., C. **Chemical and physical properties of ozone**. In: O'DONNELL, C. P., et al. **Ozone in Food Processing**, 1^a ed., Blackwell Publishing, 2012.
- GREENE, A.K. et al. A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. **Journal of Dairy Science**, n. 76, 3617–3620, 1993.
- GUCUKOGLU, A., et al. Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk and Dairy Products by Multiplex PCR. **Journal of Food Science**, vol. 77, n. 11, 2012.
- GUIMARÃES, J.L.B et al. Estimativa do custo da mastite em nível de rebanho: estudo de caso. **Vet. e Zootec.**, v. 20, n. 2, Supl. 1, 267-268, 2013.
- GUINANE, C. M et al. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation genome. **Biol. Evol.**, n. 2: 454-466, 2010.
- GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Swiss Society of Food Science and Technology**, n. 37, 453–460, 2004.
- GUZEL-SEYDIM, Z. et al. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. **Food Microbiology**, n. 21, 475–479, 2004.
- HALASA, T. et al. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. **J. Dairy Sci.**, n.92, 599-606, 2009.
- HARRIS, L. G.; FOSTER, S. J; RICHARDS, R. G. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. **European Cells and Material**, v. 4, 39-60, 2002.
- HILL, A.G. and RICE, R.G. Historical background, properties and applications, in Rice, R.G. and Netzer, A. (editores) **Handbook of Ozone Technology and Applications**, v. 1, Ann Arbor Science Publishers, 1-37, 1982.
- HUNT, N.K. and MARIÑAS, B.J. Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics, **Wat. Res.**, vol. 33, n. 11, 2633-2641, 1999.
- HUNT, N.K. and MARIÑAS, B.J. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone. **Water Res.**, v. 31, n. 6, 1355-1362, 1997.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6^a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- JORGENSEN, H. J. et al. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, n. 99, 158-166, 2005.
- KARAKAWA, W. W. and VANN, W. F. Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. **Semin. Infect. Dis.**, n. 4, 285-293, 1982.

- KELLS, S.A. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize, **Journal of Stored Products Research**, n. 37, 371-82, 2001.
- KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E.; KIM, J.G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **J Food Sci.**, v.66, n.9, 1242-1252, 2001.
- KIM J-G. Ozone as an antimicrobial agent in minimally processed foods. Defesa de tese de Doutorado. Ohio State University. 225 p., 1998.
- KNOX, K. W; WICKEN, A. J. Immunological properties of teichoic acids. **Bacteriol. Rev.**, n. 37, 215-257, 1973.
- LABATIUK C. W. et al. Inactivation of *Giardia muris* using ozone and ozonehydrogen peroxide. **Ozone Sci. Eng**, n. 16, 67-78, 1994.
- LANITA, C. S.; SILVA, S. B. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. **Braz. J. Food Technol.**, v. 11, n. 3, 182-189, 2008.
- LAPOLLI, F. R. et al. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In. GONÇALVES, R. F. (Coord.). **Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica**, p. 169-208, Vitória, 2003.
- LE LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.**, n. 2, 63-76, 2003.
- LULLIEN-PELLERIN, V. Ozone in grain processing. In: O'DONNELL, C. P., et al. **Ozone in Food Processing**, 1ª ed., Blackwell Publishing, 2012.
- MADIGAN, T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.
- MAIA, G. B. S. et al. Produção Leiteira no Brasil. In: Inovação na indústria de alimentos: importância e dinâmica no complexo agroindustrial brasileiro. **Agropecuária, BNDES Setorial**, n. 37, p. 371-398, 2013.
- MANOUSARIDIS, G., et al. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. **Food Microbiology**, n. 22 , 1-9, 2005.
- MANSON, M. M. Epoxides – Is there a human health problem? **British Journal of Industrial Medicine**, n. 37, 317-336, 1980.
- MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica**, 6ª edição. Elsevier, 2010.
- MUSTAFA, M.G. Biochemical basis of ozone toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, n. 9, 245-265, 1990.

- NAGASE, N. et al. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. **J. Vet. Med. Sci.**, n. 64, 245-250, 2002.
- NASCENTES, R. M.; ARAÚJO, B. C. Comparação da qualidade microbiológica de leite cru, pasteurizado e UHT comercializados na cidade de Patos de Minas, MG. **Perquirere**. v. 9, n. 1, p. 212–223, 2012.
- NEDER, V., et al. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from Argentine dairy farms. **Revista Argentina de Microbiología**, n. 43, 104-106, 2011.
- NEWSOM, S. W. B. Ogston's coccus. **Journal of Hospital Infection**, v. 70, n. 4, 369-372, 2008.
- O'DONNELL, C. P., et al. Status and trends of ozone in food processing. In: O'DONNELL, C. P., et al. **Ozone in Food Processing**, 1ª ed., Blackwell Publishing, 2012.
- OGSTON, A. On Abscesses. Classics in Infectious Diseases. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, n. 1, 122-128, 1984.
- OLIVEIRA, C.A.F. et al. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* no leite e ambiente de ordenha em propriedades leiteiras do estado de São Paulo. **Vet. e Zootec.**, v. 20, n. 2, Supl. 1, 34-35, 2013.
- OZONE & LIFE. **Manual do usuário** – Gerador de Ozônio Modelo O&L 3.0 –O2-RM. São José dos Campos: Ozone & Life, 10p, 2011.
- PAGANO M, GAUVREAU K. **Princípios de bioestatística**. Tradução da 2ª ed. norte-americana. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004.
- PAIVA, R. M. B. **Avaliação físico-química e microbiológica do leite pasteurizado tipo C distribuído em programa social governamental**. Dissertação de mestrado, Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 76 p. 2007.
- PASCUAL, A., LLORCA, I. and CANUT, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Trends in Food Science & Technology**, n. 18, S29-S35, 2007.
- PEETERS, J.E., et al. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 55, n. 6, 1519-1522, 1989.
- PEHKONEN, A. **The effect of dissolved ozone on the corrosion behavior of some stainless steels**, Dissertação, Helsinki University of Technology, Department of Materials Science and Rock Engineering, 2001.

- PELLEGRINI, L. G. et al. Análise do perfil de ácidos graxos do leite bovino, caprino e ovino. **Sinergismus scyentifica**, v. 1, n. 07, 2012.
- PEREIRA, M. T. C; RIBEIRO, S. C. A.; CARVALHO, S. F. M. Revisão sobre o uso do ozônio no tratamento da mastite bovina e melhoria da qualidade do leite. **Biosci. J.**, v.19, n.2, 109-114, 2003.
- PETON, V., LE LOIR, Y. Staphylococcus aureus in veterinary medicine. **Infect. Genet. Evol.**, 2013.
- PINCHUK, I.V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. **Virulence**, n.2, 2177-2197, 2010.
- PIRANI, S. **Application of ozone in food industries**. Tese de doutorado, Programa de Nutrição Animal e Segurança Alimentar. Università degli Studi di Milano, 2011.
- POHLMAN, F., W. Ozone in meat processing. In: O'DONNELL, C. P., et al. **Ozone in Food Processing**, 1ª ed., Blackwell Publishing, 2012.
- PRATA, L. F. Tratamentos térmicos aplicados ao leite. In: **Fundamentos de ciência do leite**. Jaboticabal, Unesp, p. 21-53, 2001,.
- RESTAINO, L., et al. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol**, v.61, n. 9, 3471-3475, 1995.
- REY, R. P. et al. Ozonation kinetics of glucosamine and N-acetyl glucosamine in aqueous medium. **Ozone: Science and Engineering**, v. 17, n. 4,463-467,1995.
- ROBERSON, J. R., et al. Ecology of Staphylococcus aureus isolated from various sites on dairy farms. **J. Dairy Sci.** n. 77, p. 3354–3364, 1994.
- ROSENBACH, F. J. Mikro-Organismen bei den. Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. **JF Bergmann's Verlag**, 1-122, Wiesbaden, Alemanha, 1884.
- ROSSI JÚNIOR, O. D. et al. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. **Arq. Inst. Biol.** v. 73, n. 1, p. 27–32, 2006.
- RUBIN M.B. (2001) The history of ozone. The Schönbein period, 1839–1868. **Bull Hist Chem** 26:40–56.
- SAKWINSKA, O., et al. Staphylococcus aureus host range and human-bovine host shift. **Appl. Environ. Microbiol.**, n.77, 5908-5915, 2011.
- SANTANA, E. H. W. **Determinação do perigo de consumo de leite cru relacionado a intoxicação estafilocócica**. Defesa de tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

- SANTOS, A. J. P. **Avaliação da utilização de ozônio como método de beneficiamento de leite**. Universidade de Brasília, 2013.
- SANTOS, M., V.; FONSECA, L., F., L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri, SP: Manole, 2007.
- SCHELIN, J. et al. The formation of Staphylococcus aureus enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 2, n. 6, 580-592, 2011.
- SCHIMID, 2009. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. **Wien Klin Wochenschr** (2009) 121: 125–131.
- SCROLLAVEZZA, P. et al. Ozone treatment in mastitis, metritis and retention of fetal membranes in the dairy cow. In: **Anais do Congresso Internacional do Ozônio**, n. 2, 17-21, 1997.
- SERRA, R. et al. Use of ozone to reduce molds in a cheese ripening room. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 12, 2355-2358, 2003.
- SHEELAMARY, M., MUTHUKUMAR, M. Effectiveness of Ozone in Inactivating *Listeria monocytogenes* from Milk Samples. **World Journal Young Researchers**, v. 1, n. 3, 40, 2011.
- SHOCKMAN, G. D; BARRETT J. F. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, n. 37, 501-527, 1983.
- SILVA, P. H. C. **Leite produzido e beneficiado no Distrito Federal e região entorno: adequação às normas estabelecidas pela Instrução Normativa nº 51**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 80 p. 2010.
- SILVA, S. B. et al. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 659-682, Londrina, 2011.
- SILVA, V. A. M. et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma granja leiteira. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 38, v.1, p. 51-57, 2010.
- SOMMERVILLE, G. A; PROCTOR R. A. The Biology of Staphylococci. In: CROSSLEY K. B et al. (editores). **The staphylococci in human disease**, 3-18. New York, N.Y: Churchill Livingstone, 2009.
- SVS, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças de origem hídrica e alimentar**, 2011. Disponível em

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_passos_para_investigacao_surtos.pdf>.

Acesso em: 14 set. 2013.

- TAMANINI, R. et al. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo C produzido na região norte do Paraná. **Semina Ciências Agrárias**. v. 28, n. 3, p. 449–454, 2007.
- TIWARI, B. K.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Ozone in fruit and vegetable processing. In: O'DONNELL, C. P., et al. **Ozone in Food Processing**, 1^a ed., Blackwell Publishing, 2012.
- TSEGMED, U. et al. Occurrence of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk from Yaks and Cattle in Mongolia. **J. Food. Prot.**, v. 70, n.7, 1726-1729, 2007.
- TURNER, R. D. et al. Peptidoglycan architecture can specify division planes in *Staphylococcus aureus*. **Nat. Commun.**, v. 1, n. 26, 1-9, 2010.
- TZAGOLOFF, H.; NOVICK R. Geometry of cell division in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 129, n. 1, 343-350, 1977.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual**, 1999. Disponível em: <http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2013.
- VENEGAS, J.G. et al. A comprehensive equation for the pulmonary pressure-volume curve. **American Physiological Society**, v.84, n.1, p.389-395, 1998.
- VITTORI, J. et al. Qualidade microbiológica de leite UHT caprino: pesquisa de bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*. **Ciência Rural**. v. 38, n. 3, p. 761–765, 2008.

ANEXOS

Tabela 2.3 – Contagens do número de colônias de *Staphylococcus aureus* antes e depois da ozonização de leite integral.

Tempo (min.)	Ensaio 1			Ensaio 2		
	Contagem Inicial (UFC/mL)	Contagem Final (UFC/mL)	Variação	Contagem inicial UFC/mL)	Contagem final (UFC/mL)	Variação
5	1,84x10 ⁴	1,85x10 ⁴	100	1,75 x10 ⁴	1,81 x10 ⁴	600
	4,1x10 ⁴	3,9x10 ⁴	-2000	2,83 x10 ⁴	2,6 x10 ⁴	-2300
	5,4x10 ⁴	5,9 x10 ⁴	5000	2,26 x10 ⁴	2,77 x10 ⁴	5100
Média	3,78x10 ⁴	3,88x10 ⁴	1033,33	2,28x10 ⁴	2,39 x10 ⁴	1133,333
10	1,64x10 ⁴	1,67 x10 ⁴	300	3,56 x10 ⁴	2,88 x10 ⁴	-6800
	5,7x10 ⁴	5,1 x10 ⁴	-6000	3,39 x10 ⁴	2,44 x10 ⁴	-9500
	7,85x10 ⁴	7,25 x10 ⁴	-6000	3,47 x10 ⁴	3,32 x10 ⁴	-1500
Média	5,06 x10 ⁴	4,67 x10 ⁴	-3900	3,47 x10 ⁴	2,88 x10 ⁴	-5933,33
15	1,97x10 ⁴	9,7x10 ³	-10000	6,25 x10 ⁴	4,85 x10 ⁴	-14000
	1,71x10 ⁴	1,14 x10 ⁴	-5700	4,55 x10 ⁴	3,45 x10 ⁴	-11000
	7,25x10 ⁴	6,35 x10 ⁴	-9000	5,7 x10 ⁴	4,4 x10 ⁴	-13000
Média	3,64 x10 ⁴	2,82 x10 ⁴	-8233,33	5,5 x10 ⁴	4,23 x10 ⁴	-12666,7
20	1,23x10 ⁴	6,6x10 ³	-5700	5,6 x10 ⁴	2,53 x10 ⁴	-30700
	1,75x10 ⁴	7,2x10 ³	-10300	4,7 x10 ⁴	2,2 x10 ⁴	-25000
	4,37x10 ⁴	2,06 x10 ⁴	-23100	3,8 x10 ⁴	1,9 x10 ⁴	-19000
Média	2,45 x10 ⁴	1,14 x10 ⁴	-13033,3	4,7 x10 ⁴	2,21 x10 ⁴	-24900
25	1,59x10 ⁴	7,8x10 ³	-8100	5,81 x10 ⁴	2,1 x10 ⁴	-37100
	3,72x10 ⁴	1,17 x10 ⁴	-25500	4,8 x10 ⁴	1,0 x10 ⁴	-32000
	4,04x10 ⁴	1,41 x10 ⁴	-26300	4,45 x10 ⁴	1,85 x10 ⁴	-26000
Média	3,11 x10 ⁴	1,12 x10 ⁴	-19966,7	5,02 x10 ⁴	1,85 x10 ⁴	-31700

Ensaio 1: colônias inoculadas em leite desnatado; concentração de ozônio a 21mg/L.

Ensaio 2: colônias inoculadas em leite desnatado; concentração de ozônio a 31mg/L.

Tabela 2.4 – Contagens do número de colônias de *Staphylococcus aureus* antes e depois da ozonização de leite integral.

Tempo (min.)	Ensaio 3			Ensaio 4		
	Contagem Inicial (UFC/mL)	Contagem Final (UFC/mL)	Variação	Contagem inicial UFC/mL)	Contagem final (UFC/mL)	Variação
5	5,7 x10 ⁴	5,8 x10 ⁴	1000	3,2 x10 ⁴	2,9 x10 ⁴	-3000
	4,4 x10 ⁴	4,0 x10 ⁴	-4000	3,7 x10 ⁴	4,2 x10 ⁴	5000
	6,5 x10 ⁴	6,6 x10 ⁴	1000	5,1 x10 ⁴	6,0 x10 ⁴	9000
Média	5,53 x10 ⁴	5,46 x10 ⁴	-666,667	4,00 x10 ⁴	4,36 x10 ⁴	3666,667
10	6,0 x10 ⁴	5,0 x10 ⁴	-10000	5,1 x10 ⁴	4,6 x10 ⁴	-5000
	4,3 x10 ⁴	4,0 x10 ⁴	-3000	5,0 x10 ⁴	4,0 x10 ⁴	-10000
	3,6 x10 ⁴	2,3 x10 ⁴	-13000	5,7 x10 ⁴	4,0 x10 ⁴	-17000
Média	4,63 x10 ⁴	3,76 x10 ⁴	-8666,67	5,26 x10 ⁴	4,2 x10 ⁴	-10666,7
15	3,9 x10 ⁴	2,3 x10 ⁴	-16000	6,0 x10 ⁴	6,1 x10 ⁴	1000
	3,9 x10 ⁴	3,7 x10 ⁴	-2000	4,7 x10 ⁴	3,7 x10 ⁴	-10000
	4,7 x10 ⁴	3,9 x10 ⁴	-8000	3,2 x10 ⁴	3,0 x10 ⁴	-2000
Média	4,16 x10 ⁴	3,3 x10 ⁴	-8666,67	4,63 x10 ⁴	4,26 x10 ⁴	-3666,67
20	4,1 x10 ⁴	2,2 x10 ⁴	-19000	6,4 x10 ⁴	3,5 x10 ⁴	-29000
	3,2 x10 ⁴	2,4 x10 ⁴	-8000	4,0 x10 ⁴	3,6 x10 ⁴	-4000
	4,5 x10 ⁴	3,2 x10 ⁴	-13000	5,4 x10 ⁴	2,7 x10 ⁴	-27000
Média	3,93 x10 ⁴	2,6 x10 ⁴	-13333,3	5,26 x10 ⁴	3,26 x10 ⁴	-20000
25	3,6 x10 ⁴	2,2 x10 ⁴	-14000	4,7 x10 ⁴	3,4 x10 ⁴	-13000
	4,7 x10 ⁴	3,2 x10 ⁴	-15000	3,5 x10 ⁴	1,9 x10 ⁴	-16000
	3,2 x10 ⁴	2,0 x10 ⁴	-12000	4,1 x10 ⁴	2,4 x10 ⁴	-17000
Média	3,83 x10 ⁴	2,46 x10 ⁴	-13666,7	4,10 x10 ⁴	2,56 x10 ⁴	-15333,3

Ensaio 3: colônias inoculadas em leite integral; concentração de ozônio a 21mg/L.

Ensaio 4: colônias inoculadas em leite integral; concentração de ozônio a 31mg/L.