

ATUAÇÃO DE OZÔNIO SOBRE BIOFILME DE
***Listeria monocytogenes* EM TUBULAÇÃO DE**
AÇO INOXIDÁVEL

DÉLCIO BUENO DA SILVA

2009

DÉLCIO BUENO DA SILVA

**ATUAÇÃO DE OZÔNIO SOBRE BIOFILME DE *Listeria*
monocytogenes EM TUBULAÇÃO DE AÇO
INOXIDÁVEL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Doutorado
em Ciências dos Alimentos, área de concentração
em Tecnologia de leite, para obtenção do título de
“Doutor”.

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Délcio Bueno.

Atuação de ozônio sobre biofilme de *Listeria monocytogenes* em tubulação de aço inoxidável / Délcio Bueno Silva. – Lavras : UFLA, 2009.

92 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.

Bibliografia.

1. Sanificação. 2. Higienização. 3. Leite. 4. Hipoclorito de sódio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

DÉLCIO BUENO DA SILVA

**ATUAÇÃO DE OZÔNIO SOBRE BIOFILME DE *Listeria*
monocytogenes EM TUBULAÇÃO DE AÇO
INOXIDÁVEL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Doutorado
em Ciências dos Alimentos, área de concentração
em Tecnologia de leite, para obtenção do título de
“Doutor”.

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Prof. Dr. Eric Batista Ferreira	UNIFAL
Profa. Dra. Nelma de Mello Silva Oliveira	UNIFENAS
Profa. Dra. Maria Emília de Souza G. Pimenta	UFLA

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu
UFLA
(orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Dedico este trabalho à minha filha Isadora e à minha esposa Mara pelo amor, paciência, compreensão, ajuda e respeito oferecidos durante todo o tempo necessário para a conclusão deste. E também à minha mãe e à memória de meu pai que apoiaram desde o princípio a educação e a busca incessante pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente a Deus por fazer de mim um homem capaz física e psicologicamente de alcançar os próprios objetivos.

Agradeço também a todos os meus familiares em especial aos meus irmãos Douglas, Eliane, Dênis e Danilo e amigos presentes durante a execução deste trabalho.

Agradeço ao Professor Luiz Ronaldo pela paciência, compreensão e pelos conhecimentos a mim transmitidos que permitiram a conclusão deste trabalho.

Agradeço à White Martins que, como demonstração de confiança, financiou parte do protótipo e disponibilizou, além de tecnologias com gás ozônio, materiais importantes para a pesquisa.

Agradeço à minha Co-orientadora Professora Roberta Hilsdorf Piccoli pelas idéias e pelos conhecimentos que enriqueceram o trabalho e permitiram que este se concretizasse.

Agradeço ao Prof. Eric que disponibilizou seus conhecimentos em estatística engrandecendo de modo definitivo este trabalho.

Agradeço ao Prof. Fiorini que me disponibilizou o Laboratório de microbiologia da UNIFENAS, permitindo a pesquisa e também a conclusão do trabalho.

Agradeço à Maria do Laboratório de Microbiologia da UNIFENAS pelo auxílio, paciência e principalmente pela disponibilidade, alegria e otimismo que fizeram do processo prático uma tarefa menos árdua e mais eficiente.

Agradeço aos meus amigos Flademir e Gilberto, meus companheiros de república, que dividiram alegrias, tristezas, conhecimentos, sorrisos, piadas, jantares e principalmente me deram força para continuar seguindo em frente.

Agradeço ao meu amigo Maurício Macedo que, sempre disposto, demonstrou companheirismo e preocupação nos momentos importantes. Compartilhou conhecimentos, que mesmo não relacionados à medicina veterinária foram parte fundamental em minha caminhada.

Agradeço ao meu sobrinho Gustavo que tem o coração do tamanho de sua altura, sempre me tirando dos “apertos” urgentes do inglês.

Agradeço a Creusa do Laboratório de Tecnologia de leite da UFLA que se mostrou presente e disposta a ajudar durante o decorrer do trabalho, compartilhando comigo

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Biofilme.....	3
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	8
2.3 A higienização de tubulações.....	16
2.4 O ozônio.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Local.....	43
3.2 Protótipo.....	43
3.3 Microrganismo utilizado para a formação do.....	45
3.4 Preparo do meio para a formação do biofilme.....	46
3.5 Inoculação do leite com <i>listeria monocytogenes</i>	47
3.6 Higienização dos segmentos de curva e reta.....	47
3.7 Formação de biofilme na tubulação.....	48
3.8 Marcação dos tubos de aço inoxidável.....	49
3.9 Contagem das células do biofilme.....	50
3.10 Preparo das soluções utilizadas na higienização.....	51
3.11 Análise do ph das soluções utilizadas nas higienizações.....	53
3.12 Higienização da tubulação.....	53
3.13 contagem das células do biofilme após a higienização.....	54
3.14 análise da densidade das soluções.....	55
3.15 análise da viscosidade das soluções.....	56
3.16 análises estatísticas.....	58
3.16.1 teste de kruskal-wallis.....	59
3.16.2 teste de wilcoxon.....	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1 Análises físico-química e microbiológica do leite.....	62
4.2 Adesão e formação de biofilme.....	63
4.3 Determinação da turbulência das soluções utilizadas nas limpezas.....	65
4.4 Efeito das higienizações no segmento de reta e curva.....	68
5 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

RESUMO

SILVA, Délcio Bueno. **Atuação de ozônio sobre biofilme de *Listeria monocytogenes* em tubulação de aço inoxidável.** 2009. 92 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A busca incessante por qualidade e preços justos, faz com que surjam novos elementos, como o ozônio, que higienizam os equipamentos da indústria de laticínios com eficiência e sem o desmonte, por meio do sistema *Clean in Place* (CIP). Um fator que dificulta a higienização no sistema CIP é a formação de biofilme, populações bacterianas em matriz-fechada, aderentes às superfícies. Pode-se citar a *L. monocytogenes*, que além da capacidade de formação de biofilme, é um agente patogênico emergente. A eficiência na higienização com pouca emissão de poluentes, traz como destaque o ozônio, devido ao alto poder oxidante, à potencialidade na higienização e à versatilidade. Os objetivos deste trabalho foram: verificar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* na superfície interna de tubulações em aço inoxidável utilizando leite integral como meio de cultura; verificar o efeito dos agentes sanificantes em relação ao tempo de aplicação; avaliar o efeito da água ozonizada como agente de limpeza do sistema CIP; avaliar a eficácia do hipoclorito de sódio e da água ozonizada como agentes sanitizantes da superfície interna de tubulação de aço inoxidável, com presença de biofilme de *L. monocytogenes*, no sistema CIP. Para a realização deste trabalho, dois segmentos de tubulação de aço inoxidável foram incubados em meio com leite integral e *L. monocytogenes* por 10 dias a 28°C sob agitação, após a formação do biofilme os segmentos foram levados a um protótipo que proporcionava a circulação de líquidos impulsionados por uma bomba hidráulica, possibilitando a limpeza por circulação tipo *Clean in Place* (CIP). Os segmentos acoplados no protótipo sofreram higienizações com oito tratamentos sendo: H1- lavagem com soda 1%(10 minutos/56°C) e sanificação com água (3 minutos); H2 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com cloro 100ppm (3 minutos); H3 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com água ozonizada 4,9ppm (3 minutos); H4 - lavagem com água ozonizada 5,1ppm (10 minutos) e sanificação com água ozonizada 4,9ppm (3 minutos); H5 - lavagem com soda 1%(10 minutos/56°C) e sanificação com água (10 minutos); H6 - lavagem com soda 1%(10 minutos/56°C) e sanificação com cloro 100ppm (10 minutos); H7 - lavagem com soda 1%(10 minutos/56°C) e sanificação com água ozonizada 5,1ppm (10 minutos); H8 - lavagem com água

Comitê Orientador: Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA (Orientador),
Profa. Dra. Roberta Hildorf Piccoli - UFLA.

ozonizada 5,1ppm (10 minutos) e sanificação com água ozonizada 5,1ppm (10 minutos), utilizou-se na análise estatística o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Wilcoxon. Concluiu-se que: ocorreu formação de biofilme maduro de *L. monocytogenes* na superfície interna da tubulação de aço inoxidável, em ambos os segmentos; no segmento de reta os tratamentos que apresentaram as melhores performances, promovendo uma eliminação total do biofilme foram o H6 e H7. No segmento de curva, os tratamentos que não apresentaram diferença entre contagem inicial e final significativa foram H4 e H8. O tempo de contato de dez minutos foi fator determinante para a eficiência da sanitização da superfície interna de tubulação de aço inoxidável quando aplicado no sistema CIP de higienização. A água ozonizada a 5,1ppm, não obteve turbulência suficiente para eficiência na limpeza, não sendo recomendada para limpeza de tubulação no sistema CIP.

Palavras-chave: sanificação, higienização, leite, hipoclorito de sódio.

ABSTRACT

SILVA, Délcio Bueno. **Action of ozone upon biofilm of *Listeria monocytogenes* on stainless steel pipeline.** 2009. 92p. Thesis (Doctorate in Food Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The ceaseless search for good quality and fair prices brought about new elements, such as ozone, that efficiently clean the equipments of the dairy industry without dismantling them, through the Clean in Place (CIP) system. A factor that hinders the CIP system sanitizing is the formation of biofilm, bacterial population in closed matrix, adhered to surfaces. *L. monocytogenes* is one of them, that, aside from its ability of forming biofilm, is also an emergent pathogenic agent. The sanitizing efficiency, with little pollutant emission, brings forward the importance of the ozone due to its high oxidant power, sanitizing potentiality and versatility. The objectives of this study were: to verify the formation of biofilm by *L. monocytogenes* in the inner surface of stainless steel pipeline using whole milk as culture medium; to verify the effect of sanitizing agents with regard to the application period of time; to validate the effect of ozonized water as a CPI sanitizing agent; to measure the efficacy of sodium hypochlorite and ozonized water as sanitizing agents of inner surface of stainless steel pipeline containing *L. monocytogenes* biofilm in the CIP system. To carry out this study, two stainless steel pipeline segments were incubated in medium with whole milk and *L. monocytogenes* for 10 days in a temperature of 82.40°F under agitation. After the biofilm formation, the segments were taken to a prototype that supplied liquid circulation, propelled by a hydraulic pump, allowing the CIP sanitization by circulation. The segments connected to the prototype were submitted to 8 different sanitization treatments: H1-washing with 1% Sodium Hydroxide (10 minutes/ 132.80°F) and sanification with water (3 minutes); H2-washing with 1% Sodium Hydroxide (10 minutes/ 132.80°F) and sanification with 100ppm chlorine (3 minutes); H3-washing with 1% Sodium Hydroxide (10 minutes/ 132.80°F) and sanification with 4.9ppm ozonized water (3 minutes); H4- washing with 5.1ppm ozonized water (10 minutes) and sanification with 4.9ppm ozonized water (3 minutes); H5-washing with 1% Sodium Hydroxide (10 minutes/ 132.80°F) and sanification with water (10 minutes); H6-washing with 1% Sodium Hydroxide (10 minutes/ 132.80°F) and sanification with 100ppm chlorine (10 minutes); H7-washing with 1% Sodium Hydroxide (10 minutes/ 132.80°F) and sanification with 5.1ppm ozonized water

Guidance Committee: Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu - UFPA (Adviser),
Prof.Dra. Roberta Hildorf Piccoli - UFPA

(10 minutes); H8- washing with 5.1ppm ozonized water (10 minutes) and sanification with 5.1ppm ozonized water (10 minutes). It was used the Kruskal-Wallis and the Wilcoxon Tests in the statistic analysis. It was concluded that: it occurred the *L. monocytogenes* biofilm formation in the inner surface of stainless steel pipeline in both segments; in the straight segment the treatments that presented the best performances, promoting a total elimination of biofilm, were H6 and H7; in the curved segment, the treatments that did not presented any difference between the initial and final counting were H4 and H8. The contact period of 10 minutes was a determining factor for the sanification efficiency of the inner surface of stainless steel pipeline when applied in the CIP system. The 5.1ppm ozonized water had not adequate turbulence regarding sanification efficiency not being recommended for the CIP system pipeline sanification.

Keywords: sanification, hygienization, milk, sodium hypochlorite

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a alta competitividade do mercado busca eficiência e exigem adaptações, como a melhoria da qualidade de produtos naturais e sem resíduos. O mercado consumidor é exigente e, entre outros requisitos, procura produtos de alta qualidade e preços justos. O resultado desta busca é o surgimento de novos desafios tecnológicos.

A qualidade do leite pode ser abordada sob vários aspectos, dentre eles destacam-se: qualidade físico-química, contagem de células somáticas, integridade, qualidade sensorial e estética e a qualidade microbiológica. A qualidade microbiológica do leite, além de ser visada pela saúde pública, é prioridade, interferindo e sendo afetada de forma significativa pelos outros parâmetros. A busca incessante por qualidade e baixo custo, faz com que novos equipamentos surjam constantemente na indústria de laticínios. Desta forma, a necessidade de higienizá-los com eficiência e rapidez, sem o desmonte dos mesmos, tem feito com que o sistema *Clean in Place* (CIP) se torne cada vez mais comum.

Um fator que dificulta os processos de higienização no sistema CIP é a formação de biofilme, populações bacterianas envolvidas por matriz de exopolissacarídeo aderidas às superfícies, que propiciam maior resistência às bactérias aderidas (sésseis), sendo fonte de recontaminação, devido à biotransferência. Existem várias bactérias capazes de aderir e formar de biofilme, dentre elas destaca-se a *Listeria monocytogenes*.

A dificuldade na higienização e a necessidade de processos adequados têm ditado novos conceitos industriais como: a necessidade de eficiência na higienização, pouca emissão de poluentes ao meio ambiente e baixo custo operacional. Adequando-se a estes requisitos, o ozônio tem destaque devido ao

alto poder oxidante e à sua potencialidade na higienização, agindo como potente bactericida, não poluente, não deixando resíduos tóxicos e sem necessidade de armazenamento, sendo produzido no local de uso. A ausência da necessidade de estocagem diminui custos e aumenta a eficiência do processo. A versatilidade do ozônio, já comprovada em outros sistemas, gera expectativas quanto ao seu eficiente efeito na sanificação em sistema CIP e a criação de tecnologia promissora.

A busca de novos recursos de higienização eficientes e tecnológicos é ocasionada também pela existência de bactérias como a *L. monocytogenes*, que além da capacidade de formação de biofilme, é um agente patogênico emergente, causador de Doença Transmissível por Alimentos (DTA) em humanos, podendo causar septicemia, meningite e aborto. A sua ocorrência em indivíduos imunossuprimidos provoca alta mortalidade.

A combinação destes fatores apresentados resultou nos seguintes objetivos: a) Verificar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* na superfície interna de tubulação de aço inoxidável utilizando leite integral como meio de cultura; b) avaliar do efeito da água ozonizada como agente de limpeza quando utilizada no sistema *Clean in Place* (CIP); c) Avaliar a eficiência do hipoclorito de sódio e da água ozonizada como agente sanificante da superfície interna de tubulação de aço inoxidável AISI 304 com presença de biofilme de *L. monocytogenes*, no sistema CIP; d) Verificar a influência do tempo de exposição, três e dez minutos, ao efeito dos agentes sanificantes sobre o biofilme de *L. monocytogenes*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biofilme

Biofilmes são definidos como populações bacterianas em matriz-fechada aderentes umas às outras e/ou a superfícies ou interfaces. Esta definição inclui agregados microbianos, flocos e também populações aderentes dentro dos espaços dos poros de meios porosos (Costerton & Lewandowski, 1995). Basicamente os biofilmes são constituídos por bactérias e biopolímeros extracelulares que elas produzem (Arcuri, 2000). Podendo também conter fungos e/ou protozoários, de modo isolado ou em combinação (Jay, 2005). Durante a formação do biofilme, um agregado de células se insere em uma matriz de substâncias exopoliméricas que dão origem a uma estrutura rígida de três dimensões (Demuth & Lamont, 2006).

Em geral, o biofilme se apresenta como uma camada limosa de aproximadamente 10µm de espessura, com massa irregular de microrganismos que se estende em até 200 µm acima. Os microrganismos situados acima da camada limosa vivem em condições aeróbicas, os do interior vivem em condições anaeróbicas. Os biofilmes podem ser encontrados em qualquer parte onde haja água e um suporte sólido para se desenvolverem (Tortora et al., 2002).

A formação do biofilme pode ser descrita como um processo de três etapas: desenvolvimento de um filme condicionado, colonização primária, e amadurecimento dos biofilmes associados com a produção de exopolissacarídeos extracelulares (EPS) e resíduos (Mittelman, 1998).

Segundo Characklis & Cooksey (1983), o desenvolvimento do biofilme pode ser considerado o resultado dos processos físicos, químicos e biológicos, sendo eles: o transporte de moléculas orgânicas e células microbianas para a superfície molhada; a adsorção de moléculas orgânicas na superfície molhada,

resultando em superfície “condicionada”; a adesão de células microbianas na superfície condicionada; o metabolismo por aderência de células microbianas, resultando em mais aderência de células e associação de material; o deslocamento de porções de biofilme.

Busscher & Weerkamp (1987) propõem o seguinte mecanismo de adesão bacteriano: em distâncias superiores a 50nm entre a célula e a superfície somente as forças atrativas de Van der Waal operam, uma vez que essa distância não ocorre à oposição de forças e o reconhecimento de componentes específicos de superfície. A aproximação celular é mediada por propriedades não específicas de sua superfície; já em distâncias entre 10 e 20nm ocorrem interações secundárias devido à repulsão eletrostática. Nesta etapa a adesão é considerada reversível, porém, com o passar do tempo pode diminuir a reversibilidade ou tornar essencialmente irreversível, devido ao rearranjo da superfície da célula bacteriana, levando as interações de curta distância. Para que isto ocorra, o filme de água precisa ser removido da interação entre as superfícies (bactéria/suporte). O papel fundamental da hidrofobicidade e dos componentes hidrofóbicos na superfície de aderência bacteriana, provavelmente, é a razão do efeito desidratante nesse filme de água, o que permite a ocorrência de interações específicas de curta distância; em distâncias de separações menores que 1,5nm, em que uma barreira da energia potencial já foi ultrapassada, interações específicas, como as que podem se originar de forças polares de curta distância podem ocorrer. Estas interações conduzirão a uma ligação essencialmente irreversível.

Wirtanen et al. (1996) consideraram biofilme a concentração de células na superfície de 10^3 UFC/cm². Andrade et al. (1998) consideram um biofilme microbiano estabilizado quando há um grande número de células, acima de 10^7 células por cm². As células num biofilme podem entrar num estado de vida em

que são viáveis, mas não cultiváveis (VBNC – viable-but-non-culturable) (Arcuri, 2000).

Biofilmes são importante fonte de bactérias patogênicas e deterioradoras no processamento do leite na indústria. A fisiologia das bactérias sésseis difere das bactérias planctônicas, fator importante no seu aparente diferencial de resistência antimicrobiana (Mittelman, 1998).

A estrutura do EPS do biofilme proporciona às bactérias proteção contra ampla gama de agentes antimicrobianos. A combinação de barreiras difusionais inespecíficas, vinculadas à carga molecular associada aos EPS, é um anti-oxidante intrínseco reduzindo a eficácia antimicrobiana drasticamente (Mittelman, 1998). Assim pode-se dizer que os microrganismos, no biofilme, são mais resistentes à sanificação e também à limpeza (Jay, 2005).

Biofilmes podem ser formados dentro de poucas horas, porém o biofilme “completo” pode levar dias ou semanas para atingir seu perfeito equilíbrio. *Pseudomonas aeruginosa* aderem ao aço inoxidável dentro de 30 segundos de exposição. *Pseudomonas fragi* aderem dentro de 30 minutos num fluxo de leite constante a 25°C e a 4°C, dentro de 2 horas (Arcuri, 2000).

É importante compreender as interações entre as bactérias e as superfícies específicas de transformação de alimentos nos ambientes de serviços e os impactos da associação da superfície e bactérias sobre limpeza e saneantes, para fornecer as medidas mais eficazes na prevenção da formação do biofilme e na remoção do mesmo (Wong, 1998).

Incrustações são as indesejáveis formações de depósitos inorgânicos e/ou orgânicos nas superfícies. Estes depósitos podem impedir o fluxo de calor em toda a superfície, aumentando a resistência do atrito dos fluidos com a superfície e aumentando a taxa de corrosão da superfície em todos os casos, resultando em perda de energia e material. Vários tipos de incrustações e suas combinações podem ocorrer, entre elas, as incrustações biológicas ou

bioincrustações. As incrustações biológicas resultam em: desenvolvimento de um biofilme consistindo de microrganismos e seus produtos; deposição de microrganismos depósito de detritos variados (Characklis & Cooksey, 1983).

Boari (2008) observou a capacidade do *Staphylococcus aureus* e *Aeromonas hydrophila* de formar biofilme em aço inoxidável, utilizando o leite desnatado como fase aquosa em diversas temperaturas, constatando que no cultivo multiespécie a 18°C ocorreu a formação de biofilme com dois ciclos logaritmos menos de células sésseis que em condições de monocultivo, observando que no cultivo multiespécie o *S. aureus* reduziu a quantidade de *A. hydrophila* no biofilme quando comparado com o monocultivo.

Tide et al. (1999) estudaram a influência dos procedimentos de soldagem sobre colonização bacteriana do aço inoxidável, obtendo resultados que sugerem que a atual prática de afiação e polimento das soldaduras, para alcançar acabamento superficial que atenda atuais normas da indústria alimentar, não tem influência significativa sobre curto prazo de adesão bacteriana.

A higienização para a remoção de biofilmes necessita de tratamentos mecânicos e a quebra química da matriz de polissacarídeos, que pode inibir a penetração do desinfetante devido à perda de propriedades umectantes, necessita de atividade de detergência para remoção de sua camada externa (Forsythe, 2002).

Vários autores utilizaram em suas pesquisas o ozônio para o combate de biofilmes. Greene et al. (1993) utilizaram a água ozonizada (5ppm/10 minutos) e sanificantes clorados (100ppm/2 minutos), que foram comparados pela eficácia contra biofilmes formados em superfícies em contato com leite. Chapas de aço inoxidável foram incubadas em leite UAT inoculados com culturas puras de *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 949) ou *Alcaligenes faecalis* (ATCC 337). Os tratamentos por ozonização e cloração reduziram as populações bacterianas acima de 99% na superfície de aço inoxidável.

Khadre & Yousef (2001a) concluíram que o ozônio é eficaz sanificante com potenciais aplicações na descontaminação dos materiais de embalagem e de superfícies de contato de equipamentos alimentares, após estudos que avaliaram a ação do ozônio na inativação de contaminantes naturais, biofilmes bacterianos, filmes secos de esporos de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* em embalagem multifoliadas asséptica de alimentos e superfície de aço inoxidável, observaram também que o ozônio agiu sobre biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* de forma mais eficaz em aço inoxidável do que em embalagens multifoliadas.

Hems et al. (2005) avaliaram o potencial do ozônio como agente antibacteriano “in vitro” comparado ao hipoclorito de sódio utilizando o *Enterococcus faecalis* como a espécie de teste. O ozônio teve efeito antibacteriano em células de *E. faecalis* planctônicas, mas pouco efeito quando em biofilme.

Robbins et al. (2005) avaliaram a eficácia do ozônio, cloro e peróxido de hidrogênio em destruir células planctônicas e sésseis de *Listeria monocytogenes*. A *L. monocytogenes* foi sensível ao ozônio (O₃), cloro, e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As células planctônicas foram destruídas pelo ozônio, sendo necessário aumento considerável da concentração do ozônio (16 vezes) para que ocorresse a completa eliminação das células do biofilme.

Florjanic & Kristl (2006) verificaram que os sistemas de purificação, armazenamento e distribuição da água na temperatura ambiente são altamente suscetíveis à contaminação e à formação do biofilme, logo, investigaram por quatro anos as contagens de placa heterotróficas e a concentração dos compostos orgânicos totais na água com concentrações de ozônio em 70 +/- 20ppb na produção e 250 +/- 50ppb no regime de desinfecção. Concluíram que o nível especificado do ozônio impede o crescimento e a formação de biofilme no sistema da distribuição de água.

Fielding et al. (2007) observaram que a redução da qualidade da cerveja pode surgir do desenvolvimento de biofilme em suas linhas de transporte. As comparações entre as limpezas químicas tradicionais e a limpeza com água ozonizada (2,3mg/L) foram realizadas utilizando modelo de sistema de distribuição, contra organismos isolados de uma cervejaria (*Enterobacter* e levedura) e concluíram que o potencial para a utilização da água ozonizada em substituição de produtos químicos na limpeza das linhas da cervejaria foi demonstrado, uma vez que resulta em uma melhora significativa da redução microbiana não deixando resíduos no sistema, levando também a uma redução de manchas.

2.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é conhecida desde o início do século XX, mas sua identificação definitiva como espécie bacteriana foi feita somente em 1940, sendo seu nome derivado de Lister (Lorde Joseph Lister, cirurgião inglês), e *monocytogenes*, da observação inicial sobre a capacidade em causar monocitose em coelhos, mas não observada em humanos (Campos & Silva, 2008).

Listeria monocytogenes é um bacilo gram-positivo pleomórfico, não produtor de endosporo nem de cápsula móvel. São aeróbicas facultativas, fermentadoras de glicose e capazes de crescer em temperaturas entre 4°C e 45°C. Suportam variações de pH entre 6,0 e 9,0 e concentração de sal de mais de 20% (Campos & Silva, 2008).

Franco et al. (2003) citam que o pH ideal para a *L. monocytogenes* é de 6,0 a 8,0, a temperatura de crescimento varia de 2,5°C a 44°C e a atividade ótima de água para seu crescimento é próxima de 0,97, sendo capaz de se multiplicar em atividade de água de 0,92, considerada baixa para um patógeno.

Microrganismo ubiqüitário, bem adaptado ao ambiente, capaz de ser isolado de diversas fontes ambientais como água, solo, produtos alimentares,

animais e humanos (Campos & Silva, 2008; Jay, 2005, Franco et al., 2003; Walker, 2003). Possui vários fatores de virulência como a internalinas (inlA e inlB), listeriolisina O (LLO), fosfolipase C (PlcA e PlcB), ActA (actin Nucleating Factor), Autolisina (Ami), Hidrolase (p60), metaloprotease (Mpl) e capacidade de captação de ferro, sendo estes fatores os que possibilitam sua capacidade de invadir e sobreviver dentro da célula do hospedeiro, escapando assim, do sistema imune (Campos & Silva, 2008; Franco et al., 2003; Walker, 2003).

A listeriose é considerada uma Doença Transmissível por Alimentos (DTA), que embora conhecida, é considerada emergente uma vez que sua ocorrência está frequente, provocando surtos em vários países, evidenciando a fragilidade dos programas de prevenção e controle. No Canadá, Estados Unidos da América, Japão, países da Comunidade Européia e países latino-americanos, as DTA são ocasionadas por bactérias como *Campylobacter jejuni*, *Cyclospora cayetanensis*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. *Vibrio cholerae*, entre outros. As investigações no Canadá e nos Estados Unidos de surtos ocasionados durante os últimos anos por *Listeria monocytogenes* demonstram sua estreita associação com os alimentos. Nos Estados Unidos, em 1999, os Centros para o Controle e a Prevenção de Doenças (CDC) fizeram uma compilação e análise da informação de vários sistemas de vigilância e estimaram que nesse país ocorreram 76 milhões de casos de DTA, 325.000 hospitalizações e 5.020 mortes por ano. Patógenos como *Listeria*, *Salmonella* e *Toxoplasma* são responsáveis por 1.500 mortes a cada ano. Durante o ano de 1999, 22 países enviaram informações ao sistema, indicando a ocorrência de 3.577 surtos, 113.349 casos e 210 mortes. O alimento associado a estes surtos foi identificado em 2.540 dos casos (74,5%). Os alimentos de origem animal tiveram a participação mais alta (1.457 surtos), o que representa

61,7% do total, conforme a Organização Pan-Americana da Saúde, OPAS (2000).

As infecções por *L. monocytogenes* ocorrem geralmente após a ingestão de alimentos contaminados, sendo o sítio primário de entrada no hospedeiro, o trato gastrointestinal. O período de incubação pode variar em 20h após a ingestão de alimentos contaminados no caso de gastroenterite; de 20 a 30 dias, no caso de doenças invasivas. A dose infectante parece ser alta (10^9 bactérias) (Campos & Silva, 2008).

Os pacientes mais suscetíveis são aqueles que apresentam deficiências fisiológicas e patológicas que afetam a imunidade mediada por células T., estando neste grupo de risco às mulheres grávidas, neonatos, pacientes imunocomprometidos, idosos e adultos debilitados com doenças intercorrentes (Campos & Silva, 2008).

Doenças como infecção na gestação, infecção neonatal, bacteremia, meningites, abscessos cerebrais, endocardites e infecções localizadas, são causadas por *L. monocytogenes* (Campos & Silva, 2008; Franco et al. 2003; Levinson & Jawetz, 2005).

A *Listeria monocytogenes* é bastante resistente podendo, em alguns casos, sobreviver à pasteurização, contaminar a água de rios, de lagoas e mar. Essa bactéria, considerada altamente patogênica, assim como outras, pode contaminar e se disseminar ainda mais no meio ambiente, assim como também pode contaminar outras fontes de alimentos. Muito embora seja conhecida sua ampla distribuição na natureza, a *L. monocytogenes* tornou-se alvo de estudos uma vez que foi estabelecido seu papel como patógeno de origem alimentar e até hoje não se sabe quantitativamente, qual é a importância real de um hospedeiro com Listeriose inaparente (hospedeiro reservatório, sem a doença), na distribuição da bactéria no meio ambiente e para hospedeiros susceptíveis (Nascimento & Nascimento, 2000).

Os casos de listeriose em humanos são raros, mas a severidade da infecção é elevada. A sintomatologia é do tipo gastrointestinal, mas também pode originar o aparecimento de septicemia e meningoencefalites com mortalidade elevada. Em 2005, foi reportado por 23 Estados-Membros e dois não membros da União Européia, um total de 1439 casos, sendo a taxa de incidência de 0,3 casos por 100 mil habitantes, similar a 2004 e a 2003 (Sá & Ferreira, 2007).

A *L. monocytogenes* em alimentos, representa perigo em potencial para a saúde coletiva, devendo-se intensificar a fiscalização de produtos de origem animal quanto à inocuidade alimentar conclusão de Mantilla et al. (2007), em seu trabalho sobre a importância da *L. monocytogenes* em alimentos de produtos de origem animal.

O'Donnell (1995) pesquisou tanques de leite cru em fazendas na Inglaterra e no País de Gales por 15 meses entre 1992-93. Foram analisadas para *Listeria ssp.* um total de 2009 amostras, destas, 310 (15,43%) foram encontradas positivas para *Listeria spp.*, 102 (5,08%) das amostras positivas produziram *L. monocytogenes*, o que representou 33% dos isolamentos de *Listeria*. Houve um aumento significativo na taxa de isolamento para listerias entre outubro e março, em consonância com o período durante o qual as vacas foram alojadas em espaços interiores.

Franscescato et al. (2002) verificaram a frequência de patógenos emergentes relacionados a doenças transmitidas por alimentos em áreas selecionadas no estado de São Paulo - julho de 1998 a julho de 2000, estas áreas eram dos municípios de Botucatu, Marília e alguns distritos administrativos de São Paulo (Consolação, Jardim Paulista, Cerqueira César, Saúde e Vila Mariana). Não foi constatada a presença de *Listeria sp.* em Botucatu e Marília mas constatou-se um caso (0,2%) de *Listeria sp.* no município de São Paulo entre os 460 resultados positivos para bactérias.

Costa et al. (1986) pesquisaram a etiologia da mastite bovina no estado de São Paulo, realizaram exames em 2533 amostras de leite de propriedades de exploração leiteira e verificaram que em 5,64% das amostras foram isoladas várias bactérias, entre elas a *Listeria sp.* Leal et al. (1999) pesquisaram a ocorrência de mastite clínica e/ou subclínica por *L. monocytogenes* em glândulas mamárias de bovinos leiteiros em lactação e identificaram a *L. monocytogenes* em apenas uma (0,98%) das 102 amostras analisadas, procedentes de 45 animais em lactação.

Reuben et al. (2003) determinaram a presença de 3% de *L. monocytogenes* em 100 amostras de leite não pasteurizado provenientes das principais zonas produtoras da Costa Rica. Catão & Ceballos (2001) investigaram a qualidade do leite “in natura” e pasteurizados da linha de produção no estado da Paraíba e obtiveram como resultado 73,3% das amostras de leite cru e 30% das amostras de leite pasteurizados estavam contaminados por *Listeria sp.*, sendo que destas, 51% das amostras de leite cru continham a *L. monocytogenes* e todas as amostras de leite pasteurizados eram de *L. monocytogenes*.

Arcuri et al. (2006) avaliaram a qualidade microbiológica do leite obtido mecanicamente e refrigerado em 24 rebanhos nas regiões Sudeste de Minas Gerais e Norte do estado do Rio de Janeiro, não sendo observado o isolamento de *L. monocytogenes*. Nero (2005), em sua tese de doutorado, estudou amostras de leite cru obtidas em 210 fazendas leiteiras localizadas nos Estados do Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, selecionadas de acordo com as diferentes práticas de ordenha e de equipamentos disponíveis. Os resultados indicaram ausência de *L. monocytogenes* em todas as amostras estudadas. Padilha et al. (2001) verificaram a qualidade do leite em Recife (PE) analisando 250 amostras de leite pasteurizado tipo “C” e não encontraram a presença de *L. monocytogenes*. Em Portugal a pesquisa de *Listeria* é efetuada desde 1996, em

leites crus e para produção de queijo. Em 2005, segundo o relatório apresentado pela DGV (Direção Geral de Veterinária) e EU (União Européia), foram examinados 653 leites e queijos e 251 outros produtos de origem animal crus e alguns "pronto a comer", tendo-se encontrado *L. monocytogenes* em 27 produtos (Sá & Ferreira, 2007)

Brigido et al. (2004) avaliaram amostras de queijos minas frescal, verificando a suas conformidades com a legislação, constataram que 4,5% das amostras continham *L. monocytogenes*. Acuña et al. (2006) analisaram queijos brancos artesanais expostos na praça do mercado de Cáqueza – Cundinamarca (Colômbia), demonstrando a presença de *Listeria spp.* em 16,7% dos queijos, sendo que, das amostras positivas para *Listeria spp.*, 80% estavam positivas para *L. monocytogenes* e 20% para *L. innocua*, indicando prevalência da espécie patogênica para os humanos. Zaffari et al. (2007) verificaram a qualidade de queijos artesanais (tipo Colonial, tipo Provolone, tipo Ricota e tipo Caccio Cavallo) sendo que 16% continham *Listeria sp.*, sendo 3,7% identificadas como *L. monocytogenes*. Constatou também que a primavera foi considerada a estação do ano com maior número de isolamentos. Feitosa et al. (2003) pesquisaram *Salmonella sp.*, *Listéria sp* e microrganismos indicadores higiênico sanitários nos queijos produzidos no estado do Rio Grande do norte, a *Listeria sp.* foi constatada em 9% e 15% das amostras de queijos coalho e manteiga, respectivamente não sendo encontrado a *L. monocytogenes* em nenhuma amostra. Borges et al. (2003) avaliaram 43 amostras de queijo coalho em diferentes microrregiões do estado do Ceará, tendo observado a presença de *Listeria sp.* em 6,9% das amostras e confirmando a presença de *L. monocytogenes* em 2,3% das amostras. Leite et al. (2002) analisaram 32 amostras de queijos coalhos, com e sem Serviço de Inspeção Federal, sendo encontrado *L. monocytogenes* em 17 amostras. Duarte et al. (2005) avaliaram a incidência de *L. monocytogenes*, *Salmonella sp.* e microrganismos indicadores

de contaminação fecal, em 127 amostras de queijo de coalho produzidos e comercializados no Estado de Pernambuco das quais 9,5% foram positivas para *Listeria* sp. e 5,5% positivas para *L. monocytogenes*.

Vários tipos de produtos alimentares vendidos em Portugal foram analisados para a presença de *L. monocytogenes*. Em 1035 amostras, 72 (7,0%) foram positivas para *L. monocytogenes*, sendo a maioria, a partir de matérias-primas (leite, carne, peixe, farinha); embora alguns alimentos sofressem o calor no processamento ou fermentação, estes também foram positivos. Em Portugal, uma predileção por queijo fresco foi indicada como um potencial risco para os consumidores (Mena et al., 2004).

No México após análises em leite cru de tanque a granel, constatou-se que 23% das amostras eram positivas para *Listeria* sp., sendo destas, 13% positivas para *L. monocytogenes* (Vázquez et al., 2001).

Fedio & Jackson (1992), em fazendas com histórico positivo de *L. monocytogenes* na coleta a granel de leite cru, investigaram as possíveis fontes de *Listeria* e outras espécies. As amostras testadas incluíram o tanque de leite, as vacas leiteiras, o quarto mamário asséptico, os alimentos para animais, as fezes, o chorume, o solo, a cama e as unidades físicas e constataram a mais baixa incidência no quarto mamário asséptico, 1 / 262, e mais elevados nas amostras fecais, 10/69 (14,5%). O organismo também foi encontrado em alimentos para animais e de amostras ambientais. Um estudo comparativo das três fazendas sem histórico de *L. monocytogenes* em leite cru, revelou que o organismo esteve presente em 15/114 (13,2%) das amostras fecais.

Chae & Schraft (2001) verificaram que cepas diferentes de *L. monocytogenes* têm crescimento diferenciado no biofilme devido à variação da composição das substâncias poliméricas extracelulares e diferentes fisiologia das células. A diferença de formação de biofilmes por diferentes cepas de *L. monocytogenes* também foram contatadas por Harvey et al. (2007).

Chae et al. (2006) avaliaram cepas de *L. monocytogenes* freqüentemente envolvidas em doenças transmitidas por alimentos (cepas epidêmicas) e cepas esporádicas, comparando a fixação e a subsequente crescimento de biofilme em lâminas de vidro a 37°C. Estirpes epidêmicas em 3h de incubação tiveram fixação significativamente mais elevada do que as cepas esporádicas, mas posteriormente o crescimento de biofilme com mais de 24 h não foi dependente da primeira fixação. Concluindo também que, os altos níveis extracelulares de hidratos de carbono produzidos pela *L. monocytogenes* aumentaram a sua capacidade de formar biofilme, indicando a importância desta característica de uma determinada estirpe na capacidade de formação de biofilme.

Folsom & Frank (2006) desafiaram 13 cepas de *Listeria monocytogenes* após a formação de biofilmes cultivados em cupons de aço inoxidável, sendo estes biofilmes expostos a 60 ppm de hipoclorito de sódio. Dos biofilmes, 11 cepas sobreviveram à exposição a 60 ppm de cloro e concluíram que a densidade celular do Biofilme não está associada à resistência ao cloro, e que, os biofilmes que sobreviveram ao tratamento pelo cloro exibiram diferentes morfologias.

Mai & Conner (2007) investigaram a fixação da *L. monocytogenes* em aço inoxidável na concentração de 10^7 UFC, em várias temperaturas (4°C, 20°C, 30°C, 37°C, ou 42°C). Verificaram que à medida que a temperatura aumenta a fixação da *L. monocytogenes* também aumenta, observando que na temperatura de 42°C a fixação foi menor que a fixação a 37°C e 30°C.

Adrião et al. (2008), em seu estudo observaram que a *L. monocytogenes* em baixo pH ou alta concentração de NaCl de forma sub-letal, aumentam as células aderentes ao aço inoxidável. Algumas estirpes adaptadas à alta concentração de sal reforçaram a aderência de algumas estirpes de *L. monocytogenes* ao poliestireno. No caso de adaptação ao sal ou ao pH pode aumentar a sobrevivência das células sésseis expostas à desinfecção por

hipoclorito. Esta condição de aumento da concentração de sal e baixo pH podem ser encontrados em processamento e fabricação de queijos.

Rieu et al. (2008) estudando a interação entre *L. monocytogenes* e *S.aureus* na formação de biofilmes, concluíram que a *L. monocytogenes* pode ter a colonização e persistência facilitada na presença de *S. aureus*.

Oliveira (2009) investigou a formação de biofilme pela cepa ATCC19117 de *L. monocytogenes* na superfície de aço inoxidável AISI 304(#4) e a sensibilidade deste agente aos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf e *Cymbopogon nardus* (L) Rendle citrae, observando células de *L. monocytogenes* aderidas após 3 horas e biotransferência a partir de 96 horas e que os óleos essenciais mostraram ser efetivos sanitizantes com atividade antibacterianas frente às células planctônicas e sésseis, sendo que a combinação dos óleos essenciais reduziu em 100% o número de células aderidas após 60 minutos de contato.

Veiga et al. (2003) conseguiram a inativação de 100% da *L. monocytogenes* suspensa em água destilada utilizando a saturação do ozônio na concentração de 0,6mg/mL, nos tempos de 05 a 15 segundos de exposição.

2.3 A higienização de tubulações

A higienização na indústria de alimentos visa basicamente a preservação da pureza, da palatabilidade e da qualidade microbiológica dos alimentos. Auxilia, portanto, na obtenção de um produto que, além das qualidades nutricionais e sensoriais, tenha uma boa condição higiênica sanitária, não oferecendo riscos a saúde do consumidor (Andrade & Macêdo, 1996).

Os principais fatores envolvidos no desenvolvimento satisfatório da higienização pelo método de circulação, são a velocidade do fluxo, o tempo de circulação, a temperatura e a concentração do detergente químico (Hankinson & Carver, 1968).

Andrade & Macêdo (1996) citam a seguinte equação para uma higienização eficiente:

HE= Energia Química X Energia Mecânica X Energia Térmica X Tempo

Energia química é a ação dos detergentes e sanificantes; energia mecânica pode ocorrer esfregando-se manualmente os agentes químicos ou através da velocidade das soluções; energia térmica é onde se utiliza a temperatura para aumentar a eficiência da higienização; tempo é necessário para que as reações químicas dos detergentes e sanificantes ocorram.

Andrade & Macêdo (1996) descrevem como procedimentos gerais de higienização as seguintes etapas: pré-lavagem, lavagem com detergente, enxágüe, sanificação e avaliação do procedimento.

Higienização por circulação, também conhecida como CIP (*Clean in Place*) ou limpeza no lugar, é um sistema automático e permanente, no qual os equipamentos e tubulações são higienizados sem desmontagem. A partir de tanques com soluções de limpeza, são bombeados agentes alcalinos e ácidos mais fortes e a temperaturas mais elevadas, quando comparados a outros processos de higienização (Andrade & Macêdo, 1996). Contreras et al. (2002) define o sistema como sendo um processo de limpeza através da utilização de bombas e pulverizadores adequados.

Em geral, o equipamento deve ser enxaguado com água morna (100°F a 110°F) imediatamente após a utilização, para evitar a secagem dos sólidos do leite nas superfícies. Água muito quente pode causar a desnaturação de proteínas e provocar filme de proteínas sobre superfícies; enquanto que, a água muito fria pode causar cristalização da gordura e formação de um filme gorduroso em superfícies (Jones, 2001).

É importante remover os sólidos das superfícies o mais rapidamente possível, pois a sua aderência à superfície aumenta com o tempo, com a desidratação dos sólidos, e aquecimento, formando um depósito de difícil remoção. Os sólidos orgânicos são principais componentes orgânicos do leite: gorduras, proteínas e açúcares. Os sólidos minerais, ou sais inorgânicos provêm de diversos minerais (cálcio, magnésio ou ferro) do leite ou da água, são precipitados por condições alcalinas ou calor, podendo no equipamento, ocorrer a combinação com os sólidos orgânicos formando um depósito chamado pedra de leite (Jones, 2001) .

Gordon et al. (1968) estudaram alguns fatores que influenciam a deposição de resíduos, no leite aquecido, nas superfícies das tubulações, observando que os depósitos aumentaram linearmente como a temperatura diferencial entre leite aquecido e água de aquecimento. Depósitos significativos foram observados no aquecimento onde a temperatura da água encontrava-se 52° C acima da temperatura da entrada do leite (3°C). A diminuição da acidez do leite ($\text{pH} \leq 6,1$) aumenta os depósitos de sólidos e a rugosidade das tubulações também afeta a quantidade de depósitos de sólidos do leite.

Herreid & Luetscher (1963) citam que, as proteínas do soro de leite cru frio, são mais rapidamente adsorvidas, embora não inteiramente seletivas, sobre as superfícies quentes se a temperatura apresentar diferença entre o aquecimento médio e o produto é aproximadamente 200°F a 250°F. Isto é provavelmente devido à maior viscosidade do produto frio.

A remoção de depósitos de leite em tubos metálicos utilizando apenas fluxo fluido, sem se beneficiar de materiais detergentes, foi estudada por Hankinson & Carver, (1968). Neste estudo, a taxa remoção foi linear em fluxos entre 4.000 e 30.000 kg/hora. A subcamada laminar torna-se progressivamente mais fina com o aumento da vazão. Assim, a eficácia da limpeza é devido, tanto

a turbulência, quanto a penetração na subcamada laminar que provocam um encisilhamento viçoso, quando o sólido está submerso.

Herreid & Luetscher (1963) citam em seu artigo a necessidade de aplicação de uma energia com certo vigor para a remoção de sólidos do leite pela solução detergente. No caso da limpeza manual esta força é aplicada com esponjas e escovas; no caso do CIP é a movimentação da solução de detergente em alta velocidade provocando fricção e turbulência o que acelera a remoção dos sólidos. A turbulência pode ser estimada pelo número de Reynolds (Rn). Por meio deste número verifica-se a ação eficiente na remoção de sólidos que começa quando é de Rn = 25,00 aumentando a eficiência de remoção quando atinge cerca de Rn = 90,00. Citam também que o aumento da temperatura da solução detergente aumenta o efeito da turbulência e quando ela diminui necessita de uma maior habilidade de remoção de sólidos pelo detergente.

O número de Reynolds é calculado pela seguinte fórmula:

$$Rn = \frac{v \cdot d \cdot \rho}{\eta}$$

v: velocidade em cm/seg.

d: diâmetro do tubo em cm

ρ : densidade em g/mL

η : viscosidade em poises

Sobre a entrada de ar Herreid & Luetscher (1963) citam que excessivo ar no fluido de produtos de leite irá acelerar a adsorção de sólidos em aquecedores devido ao aumento da área da espuma.

Os procedimentos com o CIP automatizado com comandos eletrônicos e dispositivos de tempo, requerem supervisão de pessoal altamente treinado, com experiência em fábricas, devido à complexidade, o tamanho e o investimento em equipamentos para o mercado do leite e plantas de produtos lácteos. É essencial que todo o pessoal responsável pelas operações limpeza e sanitização tenham um conhecimentos aprofundados sobre todos os equipamentos e suas funções e tenham a iniciativa e a capacidade de manter padrões elevados de desempenho (Herreid & Luetscher, 1963).

Sinde & Carballo (2000) estudaram a fixação de cepas de *Salmonella* ssp e *L. monocytogenes* no aço inoxidável, borracha e polytetrafluorethylene, sob efeito de sanificantes comerciais (compostos de amônio quartenário e diethylenetriamine), constataram que os compostos de amônio quartenário foi mais eficazes contra a *Salmonella* ssp.; que o diethylenetriamine tem efeito similar para ambas as bactérias; e que o aço inoxidável é menos aderente do que borracha ou polytetrafluorethylene e deve ser privilegiado na indústria alimentar, sempre que possível.

Herreid & Luetscher (1963), em seu trabalho, citam os cuidados que se deve ter com o aço inoxidável: existem três ligas de aço inoxidável. A austeniticos é utilizada em equipamentos de produtos lácteos é não magnética. É conhecida como séries 18-8 ou 300 e contém aproximadamente 8% de níquel, 18% crômio, 74% Ferro, e vestígios de carbono. O ferríticos e martensiticos, ligas séries 400 não contém níquel e são magnéticas. Aço inoxidável é relativamente não corrosivo. O metal seco exposto ao ar rapidamente constitui um filme de óxido que o protege contra a corrosão. Por esse motivo todas as superfícies devem ser secas depois que estejam limpas, porque a água impede a

formação do filme de óxido acelere a corrosão. As juntas devem ser removidas de suas posições para permitir que o ar chegue a superfícies normalmente. Para evitar a corrosão, bactericidas não devem permanecer nas superfícies do metal por mais de 20 minutos. Todos têm metais diferentes potenciais elétricos, que variam em intensidade. Quando dois metais diferentes são unidos em uma linha de processamento, a corrente elétrica desenvolve corrosão que ocorre nas articulações. A quantidade de corrosão é proporcional a quantidade de corrente, que é aumentada pelo fluido dos produtos lácteos, água dura, detergentes ácidos e alcalinos e, em especial, a altas temperaturas. Escovas com fios de metais não devem ser utilizadas na remoção de resíduos, porque fragmentos de metais podem vir a se embutir nas superfícies de equipamentos e criar centros de corrosão. É necessário usar somente fibra como pincéis e esponjas. Finalmente, todos os motores e equipamento devem ser devidamente aterrados para desviar correntes, o que também pode causar corrosão.

Os detergentes devem molhar os sólidos, dissolver ou dispersar as proteínas, remover os sais, emulsificar a gordura, seqüestrar minerais, ser facilmente removidos, não ser corrosivos. Devem também ter pouco odor e ser insípido, não ser tóxico nem irritante e ser quimicamente e fisicamente adaptável à limpeza automática e econômica (Herreid & Luetscher, 1963).

O procedimento habitual CIP é remover sólidos soltos com água e, em seguida, circular uma solução alcalina, seguido por outro com ácido. Em algumas plantas, uma quantidade relativamente pequena de ácido é distribuída em primeiro lugar, seguido por uma solução alcalina. Podem-se apresentar razões teóricas lógicas para primeiro circular uma solução ácida que retire sais complexos de suas proteínas, bem como o leite sólido que iria se dissolver mais depressa na solução alcalina (Herreid & Luetscher, 1963).

Arnold & Maxcy (1970) estudaram a taxa de remoção dos sólidos e a sua natureza. A pesquisa utilizou um pasteurizador comercial HTST (High

Temperature Short-Time). O sistema de recirculação comercial foi alterado para possibilitar uma única passagem da solução de limpeza pelo equipamento para observar o processo de limpeza. Os resultados mostraram tanto a natureza e a tenacidade do material quanto à taxa de remoção. Os triglicerídeos foram os componentes predominantes no resíduo, resistiram à remoção por limpeza através de circulação, estando nas soluções depois vários minutos de limpeza.

Geralmente detergentes alcalinos clorados (detergente alcalino com adição de cloro), seguido por um detergente ácido, contêm bases alcalinas, fosfatos, agentes molhantes, e agentes quelantes. Eles dissolvem gorduras, proteínas e carboidratos, afrouxam e suspendem partículas dos sólidos que podem ser removidas por ação mecânica, ou seja, por escova ou limpeza por circulação. O cloro auxilia na remoção de depósitos de proteínas e impede a formação do filme, neste caso não é agente sanificante. Detergentes ácidos eliminam ou previnem depósitos minerais ou “pedras de leite” (Jones, 2001).

O hidróxido de sódio (soda cáustica) é a substância detergente que apresenta o maior teor de alcalinidade cáustica, apresentando um pH próximo a 13, quando em solução a 1%. Em resumo, suas características principais são as seguintes: ótima ação contra gorduras e proteínas, uma baixa ação de molhagem, nenhuma eficácia para eliminar a dureza; poder corrosivo muito forte contra alumínio cobre e superfícies galvanizadas. Não ataca o aço inoxidável (Andrade & Macêdo, 1996).

Jennings (1959) trabalhando com hidróxido de sódio na limpeza por circulação em várias temperaturas (36-82°C) mostraram que a taxa de remoção dos sólidos com hidróxido de sódio é proporcional à concentração do íon hidroxila (OH^-). A temperatura aumenta a eficácia da ação dos íons hidróxido e da água que não é inerte tendo ação detergente ativa no sistema. Uma das melhores temperaturas a de 56°C.

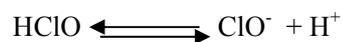
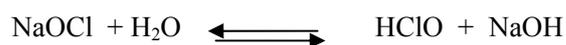
A reutilização de soluções caustica é comum na indústria de laticínios. Alvarez et al. (2007) constataram o efeito do aumento de sólidos suspensos e uma diminuição da tensão superficial durante a limpeza no local (CIP) em soluções de soda cáustica reciclada utilizada na limpeza de diversos equipamentos, utilizados em produtos lácteos. Constataram que as soluções com uma baixa diminuição da tensão superficial resultaram em uma taxa muito mais rápida de limpeza. A presença de sólidos suspensos foi principalmente prejudicial para a taxa de limpeza. Para uma eficiente taxa de limpeza, alto pH e baixa diminuição da tensão superficial, foram importantes. Uma solução reutilizada de NaOH, com baixa diminuição da tensão superficial e baixa concentração de sólidos suspensos, era tão rápida como a solução detergente comercial na mesma temperatura (50°C).

Sanificantes são produtos químicos germicidas que destroem praticamente todas as bactérias, exceto as formas esporuladas, das superfícies equipamentos. A sanitização satisfatória pode ser conseguida com vapor ou água fervente. A escolha de qualquer das substâncias químicas ou do calor dependerá dos recursos disponíveis. Sanificantes químicos deverão: destruir microorganismos rapidamente, ser estáveis contra todos os outros materiais orgânicos e inorgânicos, ter estabilidade química sob todas as condições ambientais de armazenamento, ser não corrosivos para aço inoxidável durante tempo de contato, sem odor, não tóxicos, não voláteis, e não prejudiciais às pessoas, e não devem apresentar graves perigos de manipulação. Se a água quente ou vapor são utilizados na sanitização de equipamento fechado, suas temperaturas na saída devem ser pelo menos, 175°F e 185°F (79,44°C e 85°C), respectivamente (Herreid & Luetscher, 1963).

O cloro é um dos desinfetantes mais utilizados na indústria alimentícia e aparentemente, há mais de um mecanismo de ação do cloro sobre formas vegetativas de bactérias. Um deles, proposto por volta de 1950, sugere que o

ácido hipocloroso penetra através da membrana celular e elimina a célula microbiana por meio de inibição da via glicolítica. Neste caso, o cloro oxidaria os grupos sulfidíricos de certas enzimas importantes no metabolismo de carboidratos. A aldolase foi considerada o principal sitio de ação no processo inibitório do cloro. Para utilização em imersão e circulação, se recomenda 100mg/L. Pesquisas posteriores propuseram outros mecanismos para a ação do cloro: I) reage com proteínas da membrana celular, formando composto N-cloro tóxicos; II) é responsável por danos à membrana, o que dificulta o transporte de carboidratos e aminoácidos, podendo resultar no extravasamento de componentes celulares; III) reage com DNA, oxida bases purínicas e pirimidínicas e paralisa a síntese protéica; IV) provoca a descarboxilação oxidativa de aminoácidos formando nitrilas e aldeídos; V) é causador de aberrações cromossomáticas e VI) inibe o consumo de oxigênio e afeta a fosforilação oxidativa (Andrade & Macêdo, 1996).

As hidrólises dos compostos clorados inorgânicos como o hipoclorito de sódio (NaOCl) resultam em ácido hipocloroso, ácido fraco que em solução aquosa se dissocia para formar o íon hidrogênio(H⁺) e o íon hipoclorito (ClO⁻) (Andrade & Macêdo,1996; Contreras et al. 2002).



Ambos os compostos são desinfetantes, porém o HClO é muito mais eficiente que o ClO⁻. Em determinadas condições o ClO⁻ é apenas cerca de 2% “tão bactericida” como o HClO (São Paulo, 1974).

O pH é importante na solução clorada, pois em pH 10 tem-se apenas 0,3% de ácido hipocloroso, o valor atinge 99,7% em pH 5,0. Portanto os compostos clorados são mais efetivos em valores de pH baixo, quando a presença de ácido hipocloroso é dominante (Andrade & Macêdo, 1996).

Jones (2001) enfatiza a importância da análise da água de abastecimento quanto ao conteúdo mineral ou dureza, escolhendo um composto para a limpeza que seja compatível com a água. Quanto à dureza da água pode ser necessário o aumento das concentrações dos detergentes. Os bicarbonatos, sulfatos, cloretos de cálcio ou magnésio, presentes na água dura, podem neutralizar detergentes, diminuindo a rinsabilidade, criar filmes sobre equipamentos e causando problemas com os aquecedores de água.

Os procedimentos de higienização das superfícies corretos que entram em contato com os alimentos, devem ser estabelecidos num Programa de Procedimento Operacional Padrão de Higiene (SSOP's – Sanitizing Padrão Operating Procedures) (Arcuri, 2000).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento na Resolução Nº 10, DE 22 de maio de 2003 (Brasil, 2003a) estabelecem no artigo 1º, a Instituição do Programa Genérico de Procedimentos – Padrão De Higiene Operacional – PPHO, são procedimentos descritos, desenvolvidos, implantados e monitorizados, q visam estabelecer a forma rotineira pela qual o estabelecimento industrial evitará a contaminação direta ou cruzada e a adulteração do produto, preservando sua qualidade e integridade por meio da higiene antes, durante e depois das operações industriais, com o objetivo de evitar a contaminação direta ou cruzada ou a adulteração dos produtos por meio das superfícies dos equipamentos, utensílios, instrumentos de processo e manipuladores de alimentos (Brasil, 2003a).

Medidas de Segurança na higienização (Jones, 2001): produtos químicos de limpeza e saneantes devem ser armazenados e trancados

em um local inacessível para as crianças e pessoal não autorizado. O armazenamento deve ser em local fresco e iluminado para que os rótulos possam ser lidos. No armazenamento, aberturas de tambores devem ser mantidas apertadas para evitar dissipação de ingredientes para a atmosfera. Produtos químicos devem ter contenção de derrame e fichas de segurança do material devem ser mantidas em arquivo; luvas resistentes a detergente ácido, segurança adequada de proteção dos olhos ou de um escudo de rosto quando da mistura de produtos químicos, calçado protetor para evitar escorregões devem sempre ser usados; todos os produtos químicos de limpeza e saneantes devem ser devidamente etiquetados; o rótulo do fabricante e suas instruções devem ser lidos; produtos químicos devem ser misturados em uma área aberta e ventilada; deve-se ter extrema cautela quanto a mistura ou manipulação dos cáusticos ou ácidos; deve-se adicionar produtos químicos lentamente na água, especialmente os Cáusticos; nunca adicionar água a produtos químicos e nunca adicionar a água quente; nunca misturar compostos de cloro com outros detergentes ou ácidos podendo ser produzido o mortal cloro gasoso; o programa de limpeza ou instruções deve ser fixado em cada equipamento de tratamento do leite, sendo que as instruções da limpeza de cada programa específico deve conter a temperatura, quantidade de água utilizada em cada ciclo, e as quantidades de cada produto químico; nunca subir em um tanque fechado, porque pode ocorrer falta de oxigênio, os vapores químicos inalados podem queimar tecidos sensíveis dos olhos, mucosas do nariz, cavidades dos seios e pulmões; qualquer produto químico detergente em contato com a pele deve ser lavado imediatamente com água durante 15 minutos. Deve-se remover qualquer roupa que tenha sido contaminado por detergentes químicos e lavar a área afetada e quando necessário chamar assistência médica.

2.4 O ozônio

O ozônio, considerado alótropo do oxigênio, sofre ebulição a -112°C e é um gás azul endoergônico, explosivo e altamente reativo. Sua molécula é angular (117°), é um agente oxidante instável e altamente agressivo (Shriver, 2003).

O ozônio pode ser preparado fazendo passar oxigênio através de descargas elétricas, seguido pela condensação do O_3 . Na forma líquida oferece muito risco podendo tornar-se altamente explosivo. O ozônio é um oxidante extremamente poderoso em solução aquosa (Mahan & Myers, 2005)

O ozônio (O_3) de forma instável e triatômica do oxigênio é formado pela excitação do oxigênio molecular (O_2), levando a sua ruptura em um ambiente energizado. Em seguida, a recombinação de alguns átomos de oxigênio permite a formação do ozônio (Torres et al., 1996). O ozônio é um potente agente oxidante com potencial de oxiredução igual a 2,07 volts (Wickramanayabe, 1994). Trata-se de um gás potente, porém instável, que deve ser produzido no local a ser utilizado (Hiddink, 1995; Torres et al., 1996).

O ozônio pode ser gerado por descarga corona ou por radiação ultravioleta sendo que este último método gera concentrações mais baixas (Gurley, 1985).

O ozônio é mais estável na fase gasosa do que na fase aquosa. Sua semi-vida na fase gasosa é de 12 horas e na fase aquosa, é de 30 minutos. Mesmo sendo estável na forma gasosa, o ozônio não pode ser armazenado para posterior utilização (Wickramanayabe, 1994). Devido à alta instabilidade, o gás ozônio tem sido incorporado a fluidos, como por exemplo, óleo vegetal (oliva ou girassol) e soluções isotônicas (Riva Sanseverino, 1989).

Torres et al. (1996), em um levantamento histórico do ozônio, citam que no ano de 1881, foi verificada a capacidade de o ozônio destruir bactérias

presentes na água, sendo que o primeiro experimento, utilizando ozônio no tratamento da água, foi realizado em 1893 em Leyde, Holanda, no tratamento da água do rio Reno. Em 1906, em Nice na França, produziu-se o primeiro sistema de sanitização de vegetais com água ozonizada, em escala industrial.

Sobre a ação do ozônio na bactéria Giese et al. (1954) sugeriram que o foco primário de ataque do ozônio era a parede celular bacteriana. O mesmo propôs Murray et al. (1965), que acreditam que, após este ataque, ocorra uma alteração da permeabilidade celular e eventualmente uma lise. Outra teoria do mecanismo é a de que a ação do ozônio é que este desnatura enzimas de leveduras, resultando na perda da permeabilidade da membrana celular (Hinze et al., 1987).

Gurley (1985) postulou que o ozônio, através da oxidação, destrói o envoltório protéico externo que protege os ácidos nucleicos (DNA e RNA) dos microorganismos; e ainda, que o alto potencial de oxidação do ozônio é o responsável pela sua capacidade de eliminar vírus e bactérias no tratamento industrial da água e no manuseio terapêutico de feridas tratadas com a mistura de oxigênio e ozônio, sob a forma gasosa. Isto ocorre, pois, é um gás altamente reativo capaz de oxidar inúmeros componentes bioquímicos, incluindo ácidos graxos insaturados, aminoácidos, proteínas contendo grupos sulfidrílicos, entre outros.

Bolton et al. (1982) sugerem que o dano à dupla membrana lipídica levaria à desnaturação das membranas protéicas, causando uma perturbação da estrutura da membrana ou fragilizando-a, permitindo o aparecimento de áreas desintegradas, apresentando fragilidade osmótica.

Segundo Pryor et al. (1995) a ação do ozônio se dá devido ao seu alto poder oxidante que, quando age sobre as duplas ligações dos carbonos nos ácidos graxos insaturados, provoca a formação de peróxidos.

Bocci (2000) sugeriu que a ozonólise dos ácidos graxos insaturados da dupla membrana levariam à formação de produtos, os quais reagirão intensamente com o material intracelular gerando ligações com lipídios entre proteínas e ligações protéicas. A inativação biológica poderia ocorrer como resultado direto da disfunção protéica decorrente do aparecimento dessas ligações (ou “crosslinks”).

Mahapatra et al. (2005) citam que, quando o ataque por vírus, bactérias, fungos provoca o stress de uma célula, o seu nível energia é reduzido pela saída de elétrons e ela torna-se eletropositiva. O ozônio possui o terceiro átomo de oxigênio, que é eletrofilico, ou seja, o ozônio tem uma pequena carga elétrica de radicais livres no terceiro átomo de oxigênio, que visa o equilíbrio elétrico próprio com outros materiais de carga desequilibrada. Células enfermas por vírus, bactérias nocivas e outros agentes patogênicos são portadas de tal carga, e assim, atrair o ozônio e seus subprodutos. Células saudáveis normais não podem reagir com ozônio ou os seus subprodutos, pois elas possuem uma carga elétrica equilibrada e forte sistema enzimático. Devido ao seu elevado potencial de oxidação-redução, o ozônio atua como um oxidante dos elementos constitutivos das paredes celulares penetrando nos interiores dos microorganismos e oxidando certos componentes essenciais, por exemplo, ácidos graxos insaturados, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, etc. Quando uma grande parte da membrana é destruída, causando um vazamento do conteúdo da célula, a bactéria ou protozoário lisam, resultando em gradual ou imediata destruição da célula. A maioria dos patogênicos e micróbios dos alimentos é suscetível a esse efeito oxidante.

Ozônio (O_3) é um forte agente antimicrobiano com numerosas aplicações potenciais na indústria alimentícia. Apresenta alta reatividade, penetrabilidade, e decomposição espontânea de produto tóxico. O ozônio torna-se um desinfetante viável e ajuda a garantir a segurança microbiológica dos

produtos alimentares. O ozônio, gasoso ou em fases aquosas, é eficaz contra a maioria dos microrganismos testados pelos numerosos grupos de investigação. Ozônio tem sido utilizado com sucesso para inativar microflora contaminante da carne, aves, ovos, peixes, frutas, legumes, e alimentos secos (Kim et al., 1999).

A indústria de alimento é interessada consideravelmente em usar o ozônio para aumentar a vida de prateleira (shelf-life) e a segurança dos alimentos e em explorar novas aplicações de sanitização após a ação mecânica necessária, de modo a expor os microrganismos à ação do sanitizante. Os constituintes orgânicos prontamente disponíveis no alimento, entretanto, competem com os microrganismos com ozônio aplicado e a eficácia do tratamento é diminuída. A indústria de alimento também está interessada em usar o ozônio como descontaminante no processamento da água e diminuição de produto químico e demanda biológica do oxigênio. Esta aplicação melhora a reutilização do processamento da água e permite operações de processamento amigável ao meio ambiente (Kim et al., 2003).

Baird (2002) cita o ozônio como elemento opcional na desinfecção da água, sendo usado particularmente na França países da Europa Ocidental e algumas cidades da América do Norte. O ozônio para este fim é gerado no local, envolvendo descargas elétricas em ar seco. O ar resultante deste processo é borbulhado através da água por cerca de 10 minutos. Acredita-se que sua principal ação deva-se aos radicais livres, como hidroxila e hidroperóxi, que são produzidos quando o ozônio reage com a água. O ozônio devido ao curto tempo de vida das moléculas, não dá a água proteção residual que evite contaminação futura.

Nascimento et al. (2005), em sua revisão sobre sanificação de água e alimentos destacaram alguns microrganismos que vêm apresentando resistência ao cloro, além de, a sua utilização para a desinfecção de água e alimentos que pode levar à formação de subprodutos químicos potencialmente carcinogênicos

(trihalometanos). As aplicações do cloro orgânico e do ozônio, bem como da tecnologia do ultra-som, têm sido recentemente investigadas, como alternativas para a descontaminação de alimentos.

Oliveira & Valle (2000) revisaram os aspectos microbiológicos dos produtos hortícolas minimamente processados ressaltando a eficiência do peróxido de hidrogênio e do ozônio como sanitizantes, pois se trata de agentes altamente oxidantes e de rápida degradação, que reduzem a contagem microbiana, aumentando a vida de prateleira das frutas e hortaliças, sem deixar sabor residual nos produtos. O sanitizante mais utilizado na indústria alimentícia é o hipoclorito de sódio, que apresenta a grande desvantagem de deixar sabor residual no alimento.

Mahapatra et al. (2005) concluem em sua revisão, que o ozônio é um potente sanitizante com aplicações promissoras na indústria de produtos alimentares e agrícolas. É eficaz contra um amplo espectro de microrganismos em concentrações relativamente baixas e, em pequena exposição tempo. Além disso, ele não deixa perigosos resíduos em produtos alimentares ou em superfícies de contato de alimentos. Ele é geralmente mais eficaz contra células bacterianas vegetativas do que em esporos de bactérias e fungos. O ozônio tem de ser produzido no local, isso conduz a diminuições consideráveis nos custos de transporte e armazenagem de sanitizantes. No entanto, as atuais aplicações de ozônio na indústria alimentícia são, na sua maioria, relacionadas com a descontaminação da superfície do produto e como tratamento da água. Mais investigação e desenvolvimento são exigidos antes de ser usado para aplicações na polivalente indústria transformadora alimentar.

A deterioração oxidativa dos constituintes dos alimentos é de interesse primordial para os estudos dos alimentos, estas reações nos alimentos podem resultar em destruição de valiosos nutrientes, sabores e odores o que afeta a palatabilidade dos alimentos, e mesmo na geração de compostos tóxicos,

Korycka-Dahl & Richardson (1980) verificaram que a ação do ozônio nos alimentos constituintes pode produzir peróxidos que podem iniciar reações na cadeia oxidativa.

O ozônio pode ser usado durante a lavagem do produto antes que ele seja embalado e enviado para supermercados, mercearias lojas, e restaurantes. Com uma taxa de mortalidade de 99,9% é, de longe, mais eficaz do que os métodos saneantes atuais, no comércio de frutas e produtos hortícolas lavados. Além disso, os resfriadores pós-colheita de frutas ou legumes utilizando água com aproximadamente 1°C podem se utilizar da ozonização desta água para evitar a contaminação do produto. Sistemas de processamento de frutas e vegetais que incorporem geradores de ozônio na tecnologia serão capazes de produzir alimentos limpos, enquanto usando substancialmente menos água, destruirão bactérias que podem causar prematuro desperdício de frutas e produtos hortícolas, e ao mesmo tempo, garantirem um produto seguro para o consumidor sem quaisquer resíduos tóxicos. O ozônio se dissipa dentro de alguns minutos após a lavagem processo. O enxágüe ou lavagem de carnes, aves, mariscos e ovos reduz a contaminação microbiana (Mahapatra et al., 2005).

A aplicação do ozônio e sua ação do foi estudada no leite e em produtos lácteos por Garcia et al. (2000b), que verificaram a influência do gás ozônio sobre a microbiota do leite bovino "in natura" e mediram o índice de pH e a temperatura das amostras antes e após a ozonização, concluíram que o ozônio apresentou ação bactericida eficiente sobre o número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) sendo que os índices de pH do leite não se alteraram após ozonização.

Garcia et al. (2000c) verificaram os resultados das provas físico-químicas do leite após a ozonização, determinando a densidade, gordura e a acidez de leite. Os resultados obtidos para a densidade e a acidez apresentaram

diferenças significativas entre os grupos tratados e o controle para densidade e gordura e, no caso da acidez, a diferença não foi significativa embora em todos os casos os valores encontrados sempre estiveram, na sua média, dentro dos padrões mínimos exigidos pelo Ministério da Agricultura.

Garcia et al. (2000a) pesquisaram a utilização do ozônio para a conservação do leite com possibilidade de oxidação de gorduras, utilizando a técnica de Kreiss e a prova do Azul de Nilo para pesquisa de ranço na manteiga de leite. Os resultados observados em uma prova não foram observados na outra, denotando falta de reprodutibilidade e confiabilidade nestas duas técnicas, fazendo-se necessário o desenvolvimento de uma técnica para pesquisa de ranço na gordura do leite "in natura" que seja rápida, de fácil execução, confiável e que detecte o ranço no seu estágio inicial.

Garcia et al. (1999) submetem leite bovino "in natura" à ozonização por borbulhamento e mensuraram-se os níveis de ozônio residual por técnica preconizada pela APHA (1980). Foram observados índices médios de 0,0001751 mg/l e 0,0002055 mg/l de ozônio, respectivamente, para os tempos de 5 e 10 minutos de borbulhamento. Concluíram esta como a técnica adequada para a dosagem e que os índices de ozônio residual encontrados nas amostras sempre estiveram dentro dos limites permitidos, e tidos como inócuos para a saúde humana.

As salas de maturação de queijos criam um ambiente que estimula o crescimento de bolores, a aplicação do ozônio neste ambiente foi avaliada no ar e nas superfícies, resultando na redução da carga aérea viável de bolores; mas não afetou os bolores viáveis em superfícies (Serra et al., 2003).

Garcia et al. (2001) verificaram a eficiência do ozônio na redução de bactérias aeróbicas mesófilas presentes em efluentes de matadouros-frigoríficos e concluíram que a ozonização das amostras dos efluentes por 10 minutos

apresentou ação bactericida eficiente sobre o número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias).

As pesquisas do ozônio têm avançado na área da carne e frigoríficos, Bosilevac et al. (2005) conseguiram reduzir significativamente a cargas de patógenos (*Escherichia coli* O157: H7), no setor de carne e couros, utilizando a ozonização (2ppm) e a oxidação eletrolítica das águas de descontaminação das carnes e couros sendo estas umas das principais fontes de patógenos que contaminam na pré-evisceração das carcaças durante o processamento da carne comercial. O tratamento com água ozonizada (95mg/l), utilizando um pulverizador, na redução *Escherichia coli* O157: H7 e *Salmonella typhimurum* sobre superfícies de carcaça quente após aplicação da lavagem com água, não conseguiu nenhuma melhora significativa na redução de agentes patogênicos nas superfícies das carcaças (Castillo et al., 2003). Novak & Yuan (2003) avaliaram microorganismos (*Clostridium perfringens*, *E. coli* O157: H7 e *L. monocytogenes*) que sobrevivem após tratamento das superfícies da carne com doses subletais de água ozonizada (3 ppm/5 minutos) e concluíram que os patógenos sobreviventes ao tratamento de ozônio na carne são menos susceptíveis de por em perigo a segurança alimentar do que os sobreviventes aos tratamentos térmicos subletais. Al-Haddad et al. (2005) utilizaram peitos de frango refrigerados e inocularam com *Salmonella infantis* ou por *Pseudomonas aeruginosa* e, em seguida trataram com ozônio gasoso 2000ppm em tempos variados e armazenaram sob 70% de CO₂: 30% N₂; a 7° C. Concluindo que o tratamento de ozônio pode ser utilizado para reduzir a contaminação de carcaças frango com salmonelas e melhorar o seu prazo de validade.

No campo da tecnologia de peixes, Campos et al. (2005) utilizaram o “slurry ice”, tanto sozinho, como em combinação com o ozônio, comparando com o gelo fabricado tradicionalmente na conservação de sardinhas, conseguindo maior período de validade quando o ozônio foi utilizado, levando

de modo significativo a queda de contagens de aeróbios mesófilos, bactérias psicotrópicas, anaeróbios, coliformes, e microrganismos lipolíticos e proteolíticos no músculo das sardinhas, e contagens de bactérias psicotróficas e mesófilos na pele da sardinha, demonstrando que o uso combinado “slurry ice” e ozônio para o armazenamento de sardinha pode ser recomendado para melhorar a qualidade e ampliar a validade deste espécies piscícolas.

Oliveira et al. (2008) estudaram os efeitos da desinfecção microbiológica e suas possíveis conseqüências nos parâmetros físico-químicos e sensoriais nos filés de tilápia comparando a ação do dicloroisocianurato, dicloroisocianurato e ultra-som, água ozonizada e água ozonizada com ultra-som observaram que a água ozonizada mais o ultra-som mostraram-se mais eficazes em reduzir microrganismos patogênicos e deteriorantes.

A utilização de ozonização previa nos peixes vivos e a sua viabilidade no armazenamento em baixa temperatura, avaliando fatores sensoriais, químicos, físicos e testes bacteriológicos em intervalos preestabelecidos, concluíram que a combinação da utilização prévia do ozônio com armazenamento a 0°C parece ser um modo adequado para prolongar a vida de prateleira da tilápia (Gelman et al., 2005).

Kim et al. (2000) relatam que o ozônio, peróxido de hidrogênio, ou sal na refrigeração mostraram serem eficazes na repressão do número inicial de coliformes totais e psicotrópicos e devem ser considerados como potenciais ajudas para preservar filetes frescos de Catfish (*Ictalurus punctatus*) sendo que, o ozônio com (10 ppm) prolonga em 25% o prazo de validade. Manousaridis et al. (2005) verificaram o efeito da ozonização em solução aquosa (1 mg / L, tempo de ozonização: 60 e 90 minutos) sobre o prazo de validade de mexilhões embalados à vácuo e armazenados sob refrigeração realizando acompanhamento das mudanças microbiológicas, químicos e sensoriais que ocorrem nas amostras mexilhão, por um período de 12 dias, conseguindo uma extensão de 35% no

prazo de validade de mexilhões frescos. Pastoriza et al. (2008) utilizaram da água ozonizada para lavar os peixes e para fabricar gelo na conservação de pescada (*Merluccius merluccius*) os resultados, quando comparados com aqueles obtidos pelo método tradicional, apontam uma maior estabilidade e qualidade da Pescada.

Realizaram também o tratamento combinado expondo ovos contaminados a UV e ozônio. A sanitização de casca de ovos contaminados com Salmonella, gases ozônio (0 a 15 lb/in² de 0 a 20 minutos) e à radiação UV (100 a 2,500 microW/cm² de 0 a 5 minutos), sendo que a ação do gás de ozônio e da radiação de UV reduziu a contaminação bacteriana e quando combinados ocorreu sinergismo com inativação da Salmonella (Rodriguez-Romo & Yousef, 2005).

O ozônio gasoso ou em fases aquosas, é eficaz contra a maioria dos microrganismos testados pelos numerosos grupos de investigação. Baixas concentrações de ozônio e curto tempo de contato são suficientes para inativação de bactérias, bolores, leveduras, parasitas e vírus. No entanto, as taxas de inativação são maiores em sistemas de demanda livre de ozônio, quando o meio contém substâncias orgânicas oxidáveis (Kim et al., 1999).

O ozônio, em solução aquosa foi estudado como antimicrobiano. Velano et al. (2001) realizaram um trabalho com a finalidade de avaliar o efeito do gás ozônio, dissolvido em água, sobre o *S. aureus* obtendo resultados que demonstraram que o efeito antibacteriano mais rápido da água previamente ozonizada (0,6mg/ml), para a água não previamente ozonizada, frente ao *S. aureus*. O mesmo efeito foi verificado na pesquisa utilizando água ozonizada frente a *Escherichia coli* (Velano et al., 2002).

Cardoso et al. (1999) avaliaram a eficiência microbiológica da sanitização de latões de leite utilizando o ozônio e concluíram que é um processo

de sanirização de latões utilizando ozônio é viável pois reduz significativamente o número de microrganismos mesófilos presentes no latão.

Cardoso et al. (2003) avaliaram o ozônio como o método alternativo na sanificação de galões de água de 20 litros quanto à contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos heterotróficos, q apresentou o número mais provável (NMP) de coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas spp*, e observaram que a contagem média de unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos heterotróficos no estágio de pré-lavagem foi de 5,7/cm² enquanto que o tratamento com a água ozonizada reduziu este valor para 0,003/cm², além de promover a negatização das análises para coliformes *Pseudomonas spp*. e somente 13,3% das amostras apresentaram-se positivas para *Staphylococcus aureus* após a sanificação. Concluíram que o tratamento com utilização de ozônio foi eficiente, nas condições testadas.

O desempenho da ozonização e da cloração utilizados na pré-oxidação de água, com elevada concentração de microalgas e cianobactérias foi investigado por Mondardo et al. (2006) demonstrando que o emprego da ozonização pode ser uma excelente alternativa para o pré-tratamento de água com elevada concentração de microalgas e cianobactérias que utilizam a técnica da filtração direta como processo de potabilização.

Khadre & Yousef (2001) compararam ação esporicida (esporos de *Bacillus sp*) do ozônio (11mg/ml) e peróxido de hidrogênio (10%), observando que o peróxido de hidrogênio, foi menos eficaz do que o ozônio contra esporos do *Bacillus sp.*, constatando também que a resistência dos esporos ao ozônio foi mais elevada para *Bacillus stearothermophilus* e mais baixa para *B. cereus*.

Souza (2006) realizou estudos de desinfecção comparativos, em condições experimentais similares, entre hipoclorito de sódio, ácido peracético; ozônio e o processo de desinfecção seqüencial ozônio/cloro para águas; sendo o desempenho dos desinfetantes avaliado segundo a inativação de três

microrganismos indicadores, *Escherichia coli* ATCC 11229, Colifagos e *Clostridium perfringens* ATCC 13124, sendo o ozônio considerado efetivo para inativação dos três microrganismos indicadores, apresentando melhores resultados que os demais desinfetantes, na inativação dos fagos e na etapa da desinfecção seqüencial as inativações de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* foram substancialmente superiores às inativações obtidas com ozônio e cloro individuais.

Aplicações de Ozônio (0,6 ppm para 1 min e 10 min), cloro (100 ppm para 2 min) e calor ($77 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 min), foram comparadas na eficácia de destruir bactérias alimentares em caldas sintéticas (*Pseudomonas fluorescens* (ATCC 948), *Pseudomonas fragi* (ATCC 4973), *Pseudomonas putida* (ATCC 795), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 35028), *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030) e *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580)), houve diferenças significativas entre os 10-minutos de ozonização, cloro ou calor na inativação de todas as bactérias exceto *B. licheniformis* sendo que, dez minutos de ozonização causaram a maior redução da população bacteriana de todas as espécies (Dosti et al., 2005).

O gás ozônio também foi pesquisado com o agente antimicrobiano. Pereira et al. (2005) expuseram grupos de quinze laminocultivos, semeados com e três cepas das seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus*, a ação dos gases dióxido de carbono e o hélio na concentração de 99,99% para ambos; o ozônio a 0,4% e ar comprimido como controle, e observaram que o ozônio promoveu a esterilização de 100% dos laminocultivos; os demais gases não alteraram significativamente nenhuma das culturas em relação aos controles.

A atividade bactericida do ozônio (0,4 ppm por 10 minutos) sob formas esporuladas (*Bacillus stearothermophilus*) de bactérias gran-positivas (*Staphylococcus aureus*) e negativas (*Escherichia coli*), foi estudada quando na

presença de gorduras, proteínas e carboidratos, sendo observado que o amido tem poucos ou nenhuns efeitos de proteção, a goma alfarroba forneceu um nível intermediário de proteção, enquanto a caseína e creme batido forneceram os maiores níveis de proteção às populações bacterianas (Güzel-Seydim et al., 2004).

Crapo et al. (2004) testaram a eficácia da água ozonizada (0.6-1.5 ppm) como um agente bactericida para desinfecção por contacto no tratamento de superfícies e mariscos crus. A presença de ozônio reduziu substancialmente os níveis bacterianos sobre superfícies de aço inoxidável e, em menor grau, em plástico. O ozônio foi tão eficaz quando o cloro na redução dos níveis de *Listeria* inócuos ou inoculados nas superfícies alimentar. No processamento de peixe, resíduos orgânicos presentes na superfície reduzem a eficácia do sanitizante, sendo que, em condições de muitos resíduos orgânicos, a água clorada foi ligeiramente mais eficaz do que água ozonizada. No entanto, a água ozonizada aplicada em filetes de peixe e ovas não foi eficaz para o controle bacteriano. A presença de material orgânico, especialmente com filetes, reduziu a eficácia do ozônio. O ozônio acelerou o desenvolvimento de rancidez em filetes congelados e ovas, o que resulta em redução da validade. Recomendamos ozônio só como um sanitizante de marisco e em contato com superfícies limpas.

A superfície mais utilizada na tubulação de transporte e beneficiamento de leite é o aço inoxidável e neste utilizaram o ozônio para sua limpeza e desinfecção. Tatarchenko & Shapovalova (2005) observaram que os aços inoxidáveis podem utilizados na execução dos processos de oxidação com o uso de ozônio.

Guzel-Seydim (2000) utilizou-se de placas de aço inoxidável impregnado no leite em pó reconstituído sem gordura e autoclavado, comparando o potencial da limpeza da água morna e água ozonizada no enxágüe sendo que a água ozonizada foi mais eficiente que a água morna na

remoção da película do material na superfície do metal observado por microscopia eletrônica.

Urano & Fukuzaki (2001) estudaram a ação do ozônio gasoso na facilitação de limpeza de alumínio (Al_2O_3) manchados com partículas após o tratamento térmico de albumina sérica bovina (BSA), concluindo que as moléculas de BSA adsorvidas em Al_2O_3 tratadas, foram parcialmente decompostas em fragmentos pela ação prévia do ozônio, resultando na facilitação da remoção de BSA durante limpeza por alcalinos.

Moore et al. (2000) avaliaram sob condições do laboratório, a eficácia do ozônio como um desinfetante sobre microorganismos de diferentes importâncias à indústria de alimento, inoculados em quadrados do aço inoxidável e incubados em várias temperaturas e em umidades relativas, sendo que a exposição das superfícies contaminadas ao ozônio resultou em uma redução na viabilidade microbiana. Principalmente das bactérias gram-negativas mais sensíveis ao ozônio do que organismos gram-positivos.

A ação do Ozônio é estudada nos pesticidas e toxinas. O gás também é útil na desintoxicação e eliminação de resíduos de pesticidas micotoxinas e de alguns produtos agrícolas (Kim et al., 1999).

Young et al. (2006) verificaram que dez micotoxinas tricotecenos produzidas por *Fusarium* spp., foram degradadas pela água ozonizada (25 ppm) sem observação de produtos intermediários. Quando utilizado níveis inferiores de água ozonizada (0,25 ppm), os produtos intermédios foram observados.

Wu et al. (2007a), através de seus estudos, sugerem que a ozonização poderia ser utilizado para a desintoxicação de água beber e alimentos contaminados por pesticidas organoclorados como diazinon, paration e metil – paration, sem formação de toxicidade na junção de comunicação intercelular (Gap juncional intercelular).

Wu et al. (2007b) estudaram a degradação de quatro pesticidas dissolvidos pelo ozônio (1,4-2,0 mg / l), a fim de estabelecer os efeitos sobre: methylparathion, parathion, diazinon e cipermetrina comumente utilizados como em amplo espectro no controle pragas, tendo sido detectados em alto níveis residuais em produtos hortícolas e concluíram que a ozonização é um seguro e promissor processo para a remoção de pesticidas testados a partir de uma solução aquosa na superfície de legumes sob condições domésticas.

Existem numerosas evidências e consensos sobre os efeitos tóxicos para o ser humano e dos animais especialmente, quando inalado afetando brônquios e pulmões, verificaram também muitas evidências que quando utilizado por outras vias de administração pode exercer efeitos benéficos como tratamento de diversas enfermidades (González et al., 2004)

Brunner (1958), já alertava que embora não tenham sido reportados casos fatais humanos como resultado da exposição ao ozônio, em concentrações superiores a 0,1 ppm, os efeitos são evidentes: edema pulmonar e hemorragia são os mais pronunciados. Locais onde ozonizadores estão instalados devem ser postados de avisos e as pessoas advertidas para não ocupar esses ambientes mais tempo do que o necessário.

A toxicidade do ozônio é o critério mais importante para aprovação do ozônio nas unidades de transformação alimentar e de laticínios. É importante para monitorar pessoas que possam ter contato com ozônio na indústria. No ser humano, o ozônio afeta principalmente as vias respiratórias. Os sintomas da toxicidade do ozônio incluem dor de cabeça, tontura, uma sensação de queimadura nos olhos e garganta, um forte sabor e cheiro e tosse. Toxicidade crônica pode causar sintomas como dor de cabeça, fraqueza, diminuição da memória, aumento da prevalência de bronquite e aumento da excitabilidade muscular (Hoof, 1982).

Oyarzún (2000) cita que os efeitos do ozônio derivam principalmente da formação de radicais livres. A exposição aguda ao ozônio causa, em seres humanos, dor retroesternal em inspiração profunda, diminuição de CVF (Capacidade Vital Forçada) e VEF₁ (Volume Expiratório no Primeiro Segundo) e inflamação das vias aéreas associada à hiperreatividade bronquial. A exposição prolongada produz bronquiolitis respiratória crônica que pode levar a uma remodelação da estrutura pulmonar. Em crianças observadas por 3 anos, se associa ao ozônio uma diminuição do crescimento do CVF, VEF1 e FEM_{50%} (Fluxo Expiratório Máximo Cinquenta Por Cento). A susceptibilidade ao ozônio varia segundo a exposição, sendo especialmente sensíveis as crianças e pessoas com enfermidades respiratórias preexistentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas (MG) e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Protótipo

Para a realização desta pesquisa, foi desenvolvido um protótipo de sistema de tubulação em aço inoxidável (figura 1). Sua finalidade foi simular o sistema de tubulação de transporte de leite na indústria de laticínios. O protótipo foi montado no laboratório de Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos, com tubulação de 3,45cm de diâmetro, em aço inoxidável AISI 304 com 1mm de espessura, em circuito fechado com 5,64m linear.

Este protótipo foi composto por uma válvula de três vias que possibilitou a entrada de soluções para o preenchimento do circuito (A). Uma válvula de três vias (A1), onde foi acoplado um tubo de 0,75m que foi utilizado para o esvaziamento do sistema com inclinação suficiente para a saída de líquido(B); ou permanecendo na posição vertical (B1), com a válvula aberta, possibilitando a saída do excesso de gás e de pressão durante a injeção do gás ozônio no sistema.

Uma bomba sanitária centrífuga (C) acoplada a um motor de 2 HP (D), com finalidade de impulsionar as soluções de limpeza e desinfecção do sistema.

Uma válvula (E) acoplada à tubulação de gás ozônio (F) que permitia a introdução deste gás dentro do circuito.

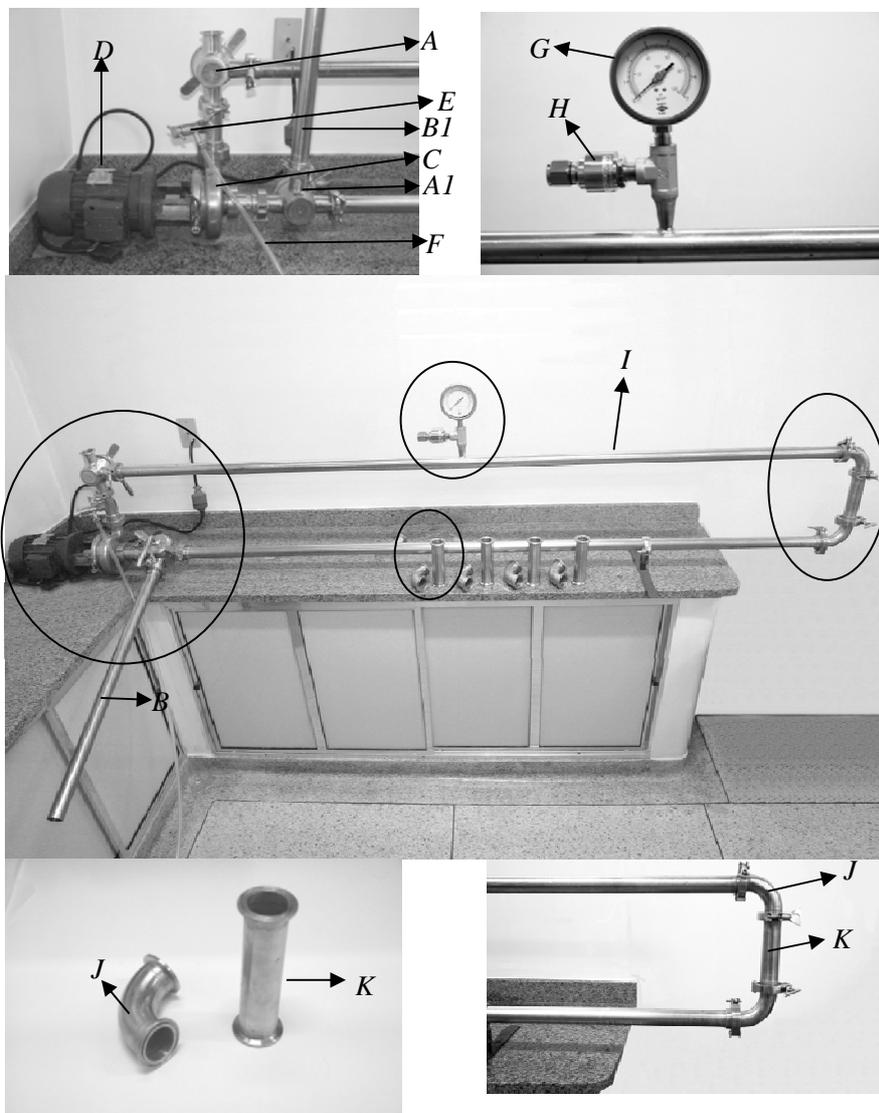


FIGURA 1 Protótipo de circuito fechado de tubulação em aço inoxidável. Válvula de três vias (A), válvula de três vias (A1), tubo de esvaziamento do sistema (B); tubo de liberação de gás (B1), bomba sanitária centrífuga (C); motor de 2 HP (D), válvula de injeção de ozônio (E), tubulação de gás ozônio (F), tubulação horizontal superior (I), manômetro em aço inoxidável (G), válvula de escape de líquido em aço inoxidável (H), segmento de curva (J) e um segmento de reta (K).

Foi acoplado à tubulação horizontal superior (I) um manômetro em aço inoxidável (G) com capacidade de 7kgf (graduado 0,05kgf) que mede a pressão interna da tubulação e uma válvula de escape de líquido em aço inoxidável (H) com capacidade de dois BAR que possibilitou o escape de líquidos em caso de aumento da pressão.

Acoplados no protótipo, na extremidade oposta à das válvulas, foi instalado um segmento de curva (J) e um segmento de reta (K). Estes segmentos foram retirados do protótipo e colocados em meio rico em células de *L. monocytogenes*, onde, sob agitação, se formou o biofilme e em seguida verificou-se a eficiência das higienizações.

3.3 Microrganismo utilizado para a formação do biofilme

A bactéria utilizada foi *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117) pertencente à coleção do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A cultura foi transportada, em caixa isotérmica com gelo, até o Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas-MG, onde foram realizados os experimentos.

Na conservação da cepa, foi realizada uma cultura para criopreservação em nitrogênio líquido a -200°C e outra para ser mantida sob refrigeração a 2°C. Na manutenção da cepa sob refrigeração, realizaram-se repiques quinzenais, sendo a cepa transferida para um novo meio (Ágar Brain Heart Infusion - BHI), incubada a 35,5°C por 24 horas e transferida para a refrigeração após adição de óleo mineral estéril à cultura estoque obtida.

A obtenção da cepa em fase log. para realização dos experimentos, foi feita pelo repique da cultura estoque mantida sob refrigeração, onde uma alíquota foi semeada em ágar BHI inclinado e incubada a 35,5°C por 24 horas.

Alíquotas da cultura em fase log., foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina estéril, até que se obtivesse turvação deste, idêntica a do tubo número 10 da escala de Mac Farland, que corresponde presuntivamente a $3,0 \times 10^9$ UFC/mL. Para a confirmação deste valor, foram realizadas as quantificações de microrganismos na suspensão preparada. Pela diluição de 1,0mL da suspensão em 9,0mL de solução salina, obtendo a diluição de 1/10 (10^{-1}). Este processo foi repetido sucessivamente até obtenção da diluição 1/10000000 (10^{-7}). As diluições foram plaqueadas, em triplicata, seguindo a técnica de plaqueamento por profundidade, onde 1,0mL da diluição foi dispensado em uma placa estéril. Posteriormente, foram adicionados 25mL de Agar tripitona e soja (TSA), mantidos a 42°C, seguindo homogeneização e solidificação a temperatura ambiente (25°C). As placas foram incubadas a 35,5°C por 24 horas e posteriormente realizou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtidas, sendo o resultado expresso em UFC / mL.

3.4 Preparo do meio para a formação do biofilme

O leite integral com *L. monocytogenes*, foi o meio utilizado para a formação do biofilme no segmento de curva e de reta.

Foram utilizados dois lotes de 80 litros de leite processados pelo sistema UAT (Ultra Alta Temperatura) e adquiridos no comércio da cidade de Alfenas - MG. Foram retiradas duas amostras de cada lote equivalente a 10% do total (8 litros), para análises físico-químicas e microbiológicas.

As análises físico-químicas das amostras foram realizadas de acordo com as técnicas descritas por Brasil (2006): acidez, determinada pelo teste da

acidez titulável de leite fluído - método B; lipídeos, determinados pelo método C, butirométrico para leite fluído; Extrato Seco Total (EST) e Desengordurado (ESD), determinados pelo método B, disco de Ackermann; Estabilidade ao álcool.

As amostras foram pré-incubadas por sete dias, a temperatura de 35 a 37°C, então realizou-se observações quanto a alterações de embalagens, acidez estabilidade ao etanol e diferenciação sensível das características sensoriais (Brasil, 1996).

3.5 Inoculação do leite com *Listeria monocytogenes*

Para a formação de biofilme, foram utilizados quatro litros de leite UAT, inoculados com 1,0 ml/L da suspensão bacteriana, previamente preparada e quantificada, obtendo-se uma concentração final de $3,0 \times 10^7$ UFC/mL de leite inoculado. Este processo foi repetido a cada 48 horas, durante dez dias.

3.6 Higienização dos segmentos de curva e reta

Para a higienização, por metodologia adaptada de Rossoni & Gaylarde (2000), os segmentos de curva e de reta foram primeiramente limpos, utilizando-se swabs com acetona a 100%. Em seguida, realizou-se a higienização, onde os segmentos foram lavados para imersão em detergente neutro durante 1h, enxaguados em água destilada estéril, secos e limpos com álcool a 70% (v/v). Após os tubos serem novamente lavados com água destilada estéril e secos por 2h/60°C, foram então colocados em um recipiente de alumínio (P), figura 2, com capacidade de 5 litros devidamente tampado e o conjunto foi autoclavado a 121°C/15minutos.

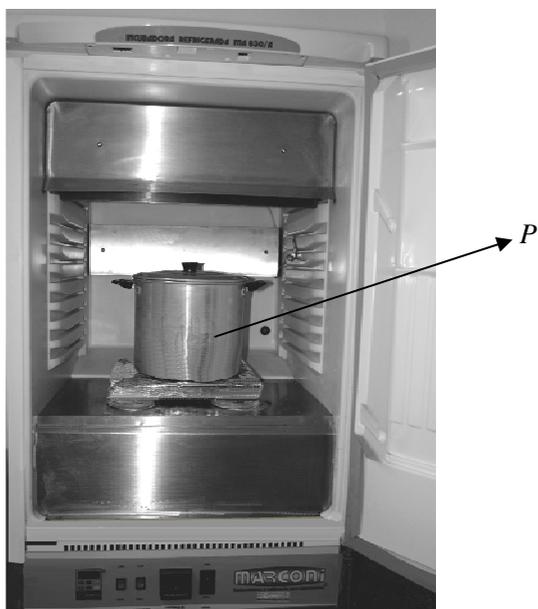


FIGURA 2 Incubadora refrigerada com agitador orbital (MA 830/A Marconi®) com o recipiente de alumínio (P).

3.7 Formação de biofilme na tubulação

O leite inoculado com a suspensão de *L. monocytogenes*, foi transferido para um recipiente estéril de alumínio (P) contendo quatro segmentos de curva e quatro de reta, todos previamente limpos e estéreis, com quantidade suficiente (4,0 litros) para encobrir todos os segmentos. Seguiu-se a incubação a 28°C, sob agitação de 80 rpm, em incubadora refrigerada com agitador orbital (MA 830/A Marconi®) (figura 2), por dez dias. A cada 48 horas, o leite inoculado foi renovado, de forma que a fermentação e acidificação do leite não interferissem no crescimento e fixação da *L. monocytogenes* e, conseqüentemente, na formação do biofilme.

3.8 Marcação dos tubos de aço inoxidável

Os segmentos de reta e de curva tiveram uma área (x) em suas extremidades destinada à coleta do biofilme conforme a figura 3.

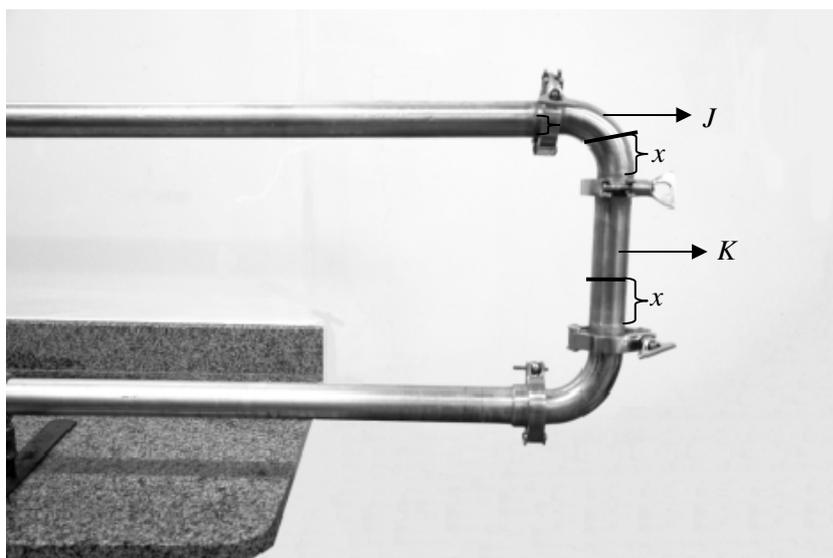


FIGURA 3 Tubulação de aço inoxidável e local de coleta do biofilme (x). Segmento de curva (J) e um segmento de reta (K).

Para a divisão do perímetro interno em duas partes iguais traçou-se uma linha demarcatória mediana no segmento de curva (a - b) e de reta (c - d), paralela à tubulação horizontal superior (I), que divide o perímetro interno em dois setores iguais, 1 e 2, escolhidos aleatoriamente. Em cada setor, foi coletada uma amostra; no setor 1, a amostra foi coletada antes da higienização, no setor 2, após a mesma (figura 4).

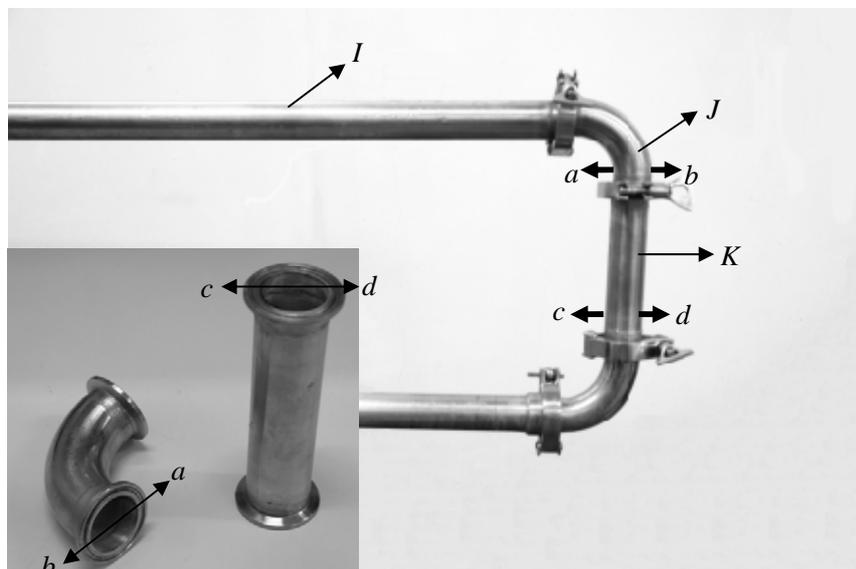


FIGURA 4 Marcação dos setores de coleta do biofilme. Segmento de curva (J) e um segmento de reta (K), tubulação horizontal superior (I), linha demarcatória horizontal superior (I), linha demarcatória mediana (a - b), linha demarcatória mediana (a - b).

3.9 Contagem das células do biofilme

Após o décimo dia de incubação, os segmentos de reta e de curva foram retirados do meio e rinsados com solução salina tamponada estéril sob agitação manual. Esta rinsagem teve por finalidade a remoção de resíduos de leite e de células não aderidas ao tubo (planctônicas). Na extremidade do tubo, no setor 1, utilizando o swab até a profundidade de 3 cm e semi-circunferência de aproximadamente 5,41 cm, delimitou-se uma área de coleta de 16,25 cm². Para a remoção e contagem das células desta área, os swabs foram friccionados sob a superfície delimitada, removendo as células fixas na superfície interna dos tubos.

Este swab foi transferido a um tubo de ensaio contendo 10 mL de água peptonada 0,1%(p/v) e agitado em agitador de tubos tipo Vortex (QUIMIS®) por 2 minutos. Após a agitação, foram realizadas diluições decimais seriadas até 10¹⁰. Foi feito plaqueamento das diluições, pela técnica de plaqueamento em

profundidade, onde uma alíquota de 1,0 mL de cada diluição foi colocada em placas de Petri estéreis. Nas placas foram colocados lentamente 25 mL de TSA e após a homogeneização aguardou-se solidificação do meio. As placas foram incubadas a 35,5°C/24-48h. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada diluição. O procedimento de contagem de colônias foi realizado de acordo com anexo IV (Brasil, 2003b), sendo os resultados anotados em tabela própria.

3.10 Preparo das soluções utilizadas na higienização

Solução de hipoclorito de sódio (100 ppm): esta solução foi preparada no momento do uso. Foi utilizado hipoclorito de sódio comercial com 2 a 2,5% de concentração no momento da fabricação e água na temperatura ambiente. A solução foi monitorada quanto à sua concentração, por titulação com iodo (APHA, 1992), apresentando pH final de 9,22.

Solução de hidróxido de sódio (1%): esta solução foi preparada utilizando hidróxido de sódio em escamas e água na temperatura ambiente. Após a solubilização do hidróxido de sódio, a solução foi aquecida à temperatura de 56°C, apresentando pH final de 12,6.

Água ozonizada: Por ser muito instável, também foi preparada no momento do uso. O ozônio foi produzido em um sistema fechado (figura 5), no próprio Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS.

A fonte de oxigênio foi um cilindro de 100 kg (L) da White Martins. O gerador de ozônio (M) utilizado foi da marca Ozone, modelo EAS 470DC com capacidade de 10 g/h a 3% de concentração em peso de ozônio gerado, quando operado com uma vazão de oxigênio de 4,2 litros/minuto a 1,0 kgf/cm². A vazão do oxigênio do cilindro foi controlada por um regulador de pressão (N) e um fluxômetro (O). Foram utilizados nove litros de oxigênio por minuto sob pressão de 0,5 kgf/cm². O ozônio produzido foi levado até o protótipo por uma

mangueira de silicone (F) e injetado no circuito de aço inoxidável que foi preenchido por 3,91 litros de água na temperatura ambiente. A água foi submetida à circulação através da bomba sanitária e simultaneamente era injetado o gás. No término da desinfecção, foi calculada a concentração de ozônio na água por titulação, pelo método iodimétrico, utilizando - se como solução titulante o tiosulfato de sódio a 0,1N (APHA, 1992).

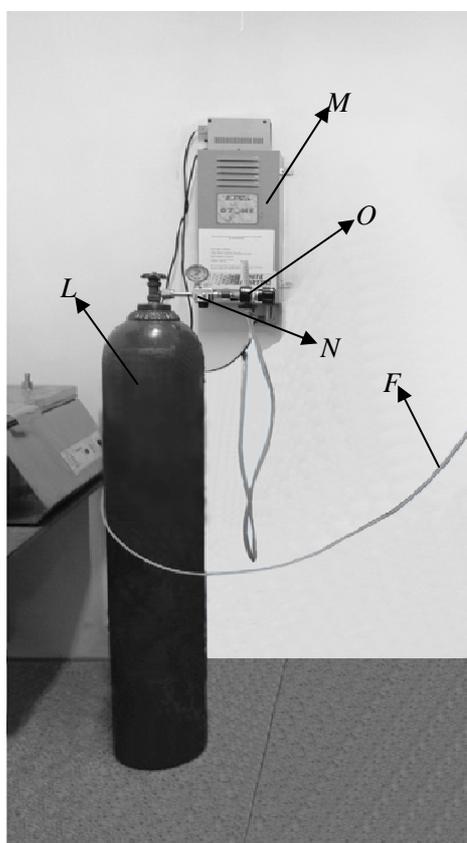


FIGURA 5 Sistema de geração de ozônio. Cilindro oxigênio (L), gerador de ozônio (M), regulador de pressão (N), fluxômetro (O), mangueira de silicone (F).

3.11 Análise do pH das soluções utilizadas nas higienizações

A determinação do pH foi realizada no pHMetro Digimed Mod. DM20. Para a realização do teste, primeiramente foi realizada a calibração do aparelho com tampão pH 4,00 e 6,86. Para tanto, retirou-se o envoltório que protege o bulbo do eletrodo contendo solução de KCl 3M e o eletrodo foi lavado com jatos de água destilada, com o auxílio de uma pisseta, e secou-se o eletrodo com papel absorvente fino. O eletrodo foi introduzido na solução tampão de referência (pH = 4,00) e aguardou-se até que o valor fosse registrado pelo aparelho. O mesmo procedimento foi realizado com o tampão de pH 6,86, sendo o eletrodo lavado e secado antes deste procedimento.

Realizada a calibração, partiu-se para a determinação do pH das soluções de limpeza e desinfecção. Após a introdução do eletrodo na solução, foi requisitada a leitura ao aparelho e esperou-se até a estabilização do valor para que o resultado fosse anotado. Entre os intervalos das análises o eletrodo foi lavado e secado, bem como ao término das análises.

3.12 Higienização da tubulação

As higienizações foram realizadas pelo processo CIP (*Clean In Place*). Nesta pesquisa avaliou-se a ação de oito higienizações distintas (tabela 1) sobre o biofilme de *L. monocytogenes* formados nos segmentos de curva e de reta.

As higienizações do circuito ocorreram utilizando a seguinte rotina:

-pré-lavagem por circulação de água em temperatura ambiente (TA), por 5 minutos;

-lavagem por circulação com solução detergente por 10 minutos. Como detergente utilizou-se solução de hidróxido de sódio (NaOH) na temperatura de 56°C e água ozonizada na temperatura ambiente (TA);

TABELA 1 Métodos de higienização da tubulação de aço inoxidável com biofilme de *L. monocytogenes*.

Hig.	Pré-lavagem	Lavagem	Enxágüe triplo	Desinfecção
H1	Água 5 min	NaOH 1%/56°C/10 min.	Água 5 min.	Água TA/3 min.
H2	Água 5 min	NaOH 1%/56°C/10 min.	Água 5 min.	NaClO (100ppm) /3 min.
H3	Água 5 min	NaOH 1%/56°C/10 min.	Água 5 min.	Água + O ₃ (4,9 ppm) /3 min.
H4	Água 5 min	Água + O ₃ (5,1ppm)/10 min.	Água 5 min.	Água + O ₃ (4,9ppm)- 3 min.
H5	Água 5 min	NaOH 1% 56°C/10 min.	Água 5 min.	Água TA/10 min.
H6	Água 5 min	NaOH 1%/56°C/10 min.	Água 5 min.	NaClO (100ppm) /10min
H7	Água 5 min	NaOH 1%/56°C/10 min.	Água 5 min.	Água+O ₃ (5,1 ppm)/10 min.
H8	Água 5 min	Água + O ₃ (5,1 ppm)/10 min.	Água 5 min.	Água + O ₃ (5,1 ppm) /10 min.

-enxágüe triplo por circulação de água na temperatura ambiente (TA) durante 5 minutos. Este enxágüe tem como finalidade retirar o material orgânico que a lavagem removeu da tubulação e evitar a permanência de resíduos da solução detergente na tubulação. O controle da possível permanência de resíduos

foi determinado através do pH da água no final do enxágüe, que ficou próximo ao pH da mesma água antes do enxágüe (pH 7,2).

-desinfecção por circulação de soluções na temperatura ambiente (TA) por tempo de três minutos utilizados em quatro Higienizações (H1, H2, H3 e H4) ou 10 minutos utilizado no restante das higienizações (H5, H6, H7 e H8). Foi utilizado como solução desinfetante o hipoclorito de sódio (NaClO) nas higienizações H2 e H6 e água ozonizada nas higienizações H3, H4, H7 e H8. No ensaio branco foi utilizada água no lugar da solução desinfetante (H1 e H5).

3.13 Contagem das células do biofilme após a higienização

Após a higienização, os segmentos de curva e de reta foram retirados do circuito. Na extremidade de cada segmento no local de coleta x (figura 3), identificou-se o setor 2 e realizou-se o mesmo processo de coleta da amostra feito no setor 1 antes da higienização.

A remoção e contagem de células aderidas foram realizadas conforme técnica descrita no item 3.9.

3.14 Análise da densidade das soluções

Para a determinação da densidade relativa das soluções utilizadas na higienizações, foi utilizado um picnômetro limpo e seco.

Primeiramente, realizou-se a calibração do picnômetro com água destilada. Esta consistiu na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa do picnômetro com água destilada medida à 25°C. Pesou-se o picnômetro vazio e anotou-se o peso. Em seguida, foi colocada a água destilada a uma temperatura de 25°C no picnômetro, procedendo à pesagem e anotando seu peso.

Após a calibração do picnômetro, foi realizada a determinação da densidade aparente das soluções e do padrão. A amostra (25°C) foi colocada no

aparelho e, após a remoção do excesso das soluções, pesou-se o picnômetro. Foi obtido o peso da amostra em gramas através da diferença:

$$PA = \text{Peso do picnômetro com a amostra} - \text{Peso do picnômetro vazio.}$$

A densidade relativa foi encontrada através da divisão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 25°C.

$$\text{Densidade relativa} = \text{massa amostra} / \text{massa da água}$$

3.15 Análise da viscosidade das soluções

A viscosidade relativa foi calculada empregando-se o equipamento de Copo Ford®. A determinação foi realizada medindo o tempo de escoamento das soluções preparada em relação ao padrão.

A calibração do equipamento foi realizada com a água na temperatura de 25°C, juntamente com a determinação da constante K, que foi empregada na fórmula que determina a viscosidade das amostras analisadas.

As amostras, padrão e soluções preparadas, foram termostatizadas a 25°C antes de se realizar as análises.

Para as análises, o orifício do Copo Ford® foi fechado com o dedo e o copo foi preenchido até o nível mais elevado com água, que foi colocada lentamente para não haver formação de bolhas. A temperatura da água no copo foi verificada, com o auxílio de um termômetro, para que o escoamento se realizasse quando esta estivesse a 25°C ($\pm 0,1$). Assim, passou-se a placa de vidro plana na superfície do Copo Ford® para a remoção do excesso de água e retirou-se o dedo do orifício. A placa foi removida, pela lateral, e acionou-se o cronômetro quando a água começou a correr pelo orifício.

Quando houve a primeira descontinuidade do fluxo da água, o cronômetro foi parado e anotou-se o tempo transcorrido em segundos. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Este mesmo procedimento foi realizado para a determinação do tempo de escoamento do padrão e das soluções preparadas.

Para se obter o valor da viscosidade da água, em Centipoise (cP), utilizou-se a tabela 2, que contém estes valores nas diversas temperaturas:

TABELA 2 Viscosidade padrão da água em diversas temperaturas.

°C	η (cP)
16	1,110
17	1,082
18	1,055
19	1,029
20	1,004
21	0,980
22	0,957
23	0,936
24	0,915
25	0,895
43	0,653
56	0,466

A fórmula utilizada para a determinação da constante K da água foi:

$$\eta = k \cdot t \cdot d$$

ou

$$k = \frac{\eta}{t \cdot d}$$

em que:

η = viscosidade relativa em centipoise (cP) baseando na tabela anterior.

k = constante a uma dada temperatura.

t = tempo de escoamento em segundos.

d = densidade da água a 25°C.

A determinação do K da água foi utilizada para determinação da viscosidade do líquido das soluções.

3.16 Análises estatísticas

Foram realizados dois experimentos para verificar a eficiência de oito tratamentos para a desinfecção de tubulações. Um deles sendo a desinfecção na reta e outro, a desinfecção na curva. Foi ajustado um modelo de análise da variância, considerando um delineamento inteiramente casualizado (DIC), mas, devido às características dos dados (muitos valores zero, variâncias grandes, falta de homogeneidade de variâncias, variável resposta discreta) fizeram com que as pressuposições da análise da variância não fossem atendidas, impedindo tal análise.

Utilizou-se de técnicas da estatística não-paramétrica para a análise de dados. Foram elas: o teste de Kruskal-Wallis, que é o equivalente ao DIC na estatística não-paramétrica; a comparação múltipla de médias não-paramétrica, para comparar os tratamentos quanto a contagem bacteriana final; e o teste de Wilcoxon para verificar a eficiência de cada tratamento (diferença entre a contagem inicial e final).

3.16.1 Teste de Kruskal-Wallis

O teste de Kruskal-Wallis foi introduzido por estes autores em 1952, como um competidor ou um substituto do Teste F do campo paramétrico (Kruskal & Wallis, 1952).

Sua finalidade é estabelecer confronto entre k amostras independentes (k tratamentos).

A hipótese nula deste teste é a de igualdade entre todas as médias.

Procede-se a classificação conjunta das $N = \sum_{i=1}^k n_i$ observações,

dando ordem 1 à menor e ordem N à maior delas.

Define-se a estatística:

$$\chi^2_{\mathcal{E}} = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

em que R_i é a soma das ordens atribuídas ao tratamento i.

Confronta-se $\chi^2_{\mathcal{E}}$ com o quantil $\chi^2_{(1-\frac{\alpha}{2}, N-1)}$ para a tomada de decisão.

2) Comparações múltiplas envolvendo todos os pares de tratamentos (Caso de pequenas amostras)

Para cada par de tratamentos, calcula-se a diferença.

$$|R_i - R_j|$$

para $i = 1, 2, \dots, k - 1$ e $j = i + 1, \dots, k$, em que R_i e R_j representam as somas das ordens atribuídas aos tratamentos i e j respectivamente, nas n repetições.

Daí confronta-se essas diferenças com um valor tabelado para determinar a sua significância.

3.16.2 Teste de Wilcoxon

No Teste dos Sinais, leva-se em consideração apenas o sentido da diferença dentro de cada par. No teste de Wilcoxon pode-se considerar não só o sentido, mas o valor das diferenças, sendo assim este teste é mais poderoso. O teste de Wilcoxon atribui maior ponderação a um par que acusa maior diferença (a dos sinais, não) (Wilcoxon, 1945).

① Seja d_i = a diferença entre os escores de cada par (todos considerados no mesmo sentido).

② Atribui-se postos aos d_i 's independentes dos sinais (positivos ou negativos). Ao menor d_i , o posto 1, o posto 2, ao seguinte, etc. Quando se atribui postos independentes de sinais, um valor $d_i = -1$, tem posto inferior tanto a $d_i = -2$ como a $d_i = 2$. Em seguida, se d_i é negativo, então o posto associado também o será, se d_i é positivo, então o posto associado também o será.

③ Sob H_0 , quando se somam os postos com sinal "+" e os postos com sinal "-", essas duas somas devem ser aproximadamente iguais, o que indica que não existe diferença entre os tratamentos. Se, entretanto, essas somas diferem muito, podemos concluir que os tratamentos diferem, devendo então rejeitar H_0 .

④ Empates

a) Se $d_i = 0$, despreza-se da análise

b) Se tem-se $d_1 = -1$, $d_2 = -1$ e $d_3 = 1$, então a cada d_i será atribuído o posto 2, pois $(1+2+3)/3 = 2$, onde 1, 2 e 3 seriam os postos atribuídos se os d_i 's fossem diferentes, logo os postos ficariam -2, -2 e 2 respectivamente. O próximo posto de d_i , pela ordem será 4, pois já foi utilizado os postos 1, 2 e 3.

c) Se dois postos acusam d_i 's = 1, ambos recebem o posto 1, 5 e o próximo receberá o posto 3, pois $(1+2)/2 = 1,5$.

⑤ Hipóteses:

H_0 : não existe diferença entre os tratamentos $\Sigma p_i(+)=\Sigma p_i(-)$

H_1 : existe diferença entre os tratamentos $\Sigma p_i(+)\neq \Sigma p_i(-)$

$\Sigma p_i(+)> \Sigma p_i(-)$

$\Sigma p_i(+)< \Sigma p_i(-)$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados foram citados em tópicos de modo a facilitar a discussão.

4.1 Análises físico-química e microbiológica do leite

O leite utilizado como meio de cultivos para *L. monocytogenes* para a formação de biofilme na superfície interna da tubulação de aço inoxidável, foi analisado para obter seus parâmetros físico-químicos (tabela 4)

O leite utilizado no experimento foi incubado a 35 a 37°C por sete dias, não sofrendo modificações que alterassem a embalagem, permanecendo estável ao etanol 68%v/v, não ocorrendo alterações de acidez e não apresentando modificações perceptíveis nas características sensoriais dos leites UHT sem incubar; estando dentro do padrão (Brasil, 1996)

TABELA 4 Análise físico-químicas realizadas nas amostras de leite UHT utilizadas como meio de cultivo de *L. monocytogenes* para formação de biofilme na tubulação de aço inoxidável no segmento de reta e curva

Análises físico-químicas	Resultados	Padrão (Brasil, 1996)
Acidez (g. de Ac. Láctico/100ml)	0,15	0,14 a 0,18
Matéria gorda (%)	3,1	Mínimo 3,0
Extrato Seco Desengordurado	9,0	Mínimo 8,2
Estabilidade ao etanol	Estável	Estável

4.2 Adesão e formação de biofilme

Os dados referentes à contagem de *L. monocytogenes* dos swabs realizado na superfície interna da tubulação de aço inoxidável, nos segmentos de curva e reta do protótipo (figura 1), estão apresentados na tabela 5. Ressalta-se que foi utilizado o mesmo processo para promover a formação de biofilme nos dois segmentos (reta e curva).

TABELA 5 Média da contagem de *Listeria monocytogenes* (UFC/cm²) na superfície interna da tubulação de aço inoxidável, nos segmentos de reta e curva.

Segmento	Média (UFC/cm²)
Reta	8,75 x 10 ⁸
Curva	8,05 x 10 ⁸

Essas contagens (tabela 5) indicam que ocorreu a formação de biofilme estabilizado em ambos os segmentos. As variáveis aplicadas para a formação de biofilme na superfície interna da tubulação de aço inoxidável: tempo (10 dias), temperatura (28°C), meio de cultura (leite integral) e agitação (80rpm), foram suficientes para a formação e estabilização do biofilme de *Listeria monocytogenes* na superfície de aço inoxidável, nos segmentos de reta e curva. A população encontrada está 1 ciclo logaritmo acima daquela (10^7) estabelecida pelos autores Andrade et al., 1998, como a contagem limite para que a estrutura seja considerada biofilme estabilizado.

O depósito de matéria orgânica e os biofilmes maduros proporcionam às bactérias sésseis, proteção contra o agente antimicrobiano (Mittelman, 1998; Wong, 1998; Kim et al., 1999, 2003; Güzel-Seydim et al., 2004; Crapo et al. 2004; Robbins et al. 2005; Hems et al., 2005; Adrião et al., 2008) dificultando muito a sanificação da tubulação. Entretanto esse fato cria a possibilidade de realizar testes mais confiáveis de agentes de limpeza e sanificação, em condições adversas.

Na figura 6 estão apresentados os dados referentes à mediana (z) e variação dos resultados de UFC/cm² em ambos os segmentos (reta e curva). Embora não apresente diferença aparente entre as medianas da reta e da curva, pode-se observar maior variação dos resultados no segmento de curva. Isso indica que há distribuição mais homogênea do biofilme no segmento de reta, provavelmente devido aos movimentos do leite dentro da tubulação, durante o período de incubação, exercendo pressões diferentes nos dois segmentos, já que sabidamente a turbulência na reta é diferente daquela na curva. Observa-se também a presença de dois pontos discrepantes (*outliers*) no segmento de reta (x).

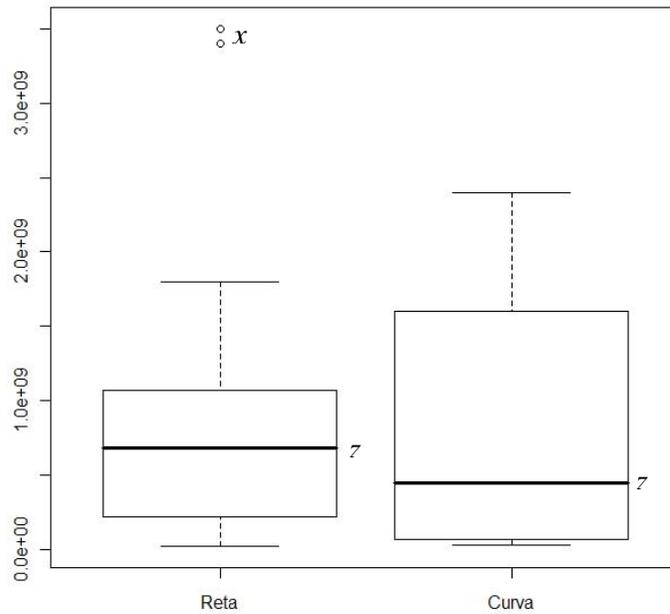


FIGURA 6 Média do log do número de células de *L. monocytogenes* aderidas na superfície interna da tubulação de aço inoxidável no segmento de reta e segmento de curva. Mediana(z); outliers (x).

4.3 Determinação da turbulência das soluções utilizadas nas limpezas

Após a confirmação da formação de biofilme nas superfícies internas dos segmentos de reta e curva, do protótipo em estudo, utilizou-se soluções de limpeza, mensurando-se as variáveis densidade e viscosidade necessárias para se calcular a turbulência (energia mecânica) das soluções, que juntamente com temperatura e tempo de ação, constituem os fatores básicos para a boa higienização. Os resultados de densidade e viscosidade estão apresentados na tabela 6.

TABELA 6 Densidade e viscosidade das soluções utilizadas na higienização das tubulações de aço inoxidável contendo biofilme de *L. monocytogenes*.

Soluções	Densidade (Kg/L)	Viscosidade (poises)
Água + O ₃ (5,1ppm)/10 minutos	1,0024	83,7000
Solução de NaOH 1% 43°C	1,0088	63,1400
Solução de NaOH 1% 56°C	1,0083	45,0000
Média das soluções de NaOH	1,0086	54,0700

Os resultados das turbulências calculados pela equação de Reynolds, utilizando os dados da tabela 6, juntamente com o diâmetro e vazão dos fluxos, estão apresentados na figura 7.

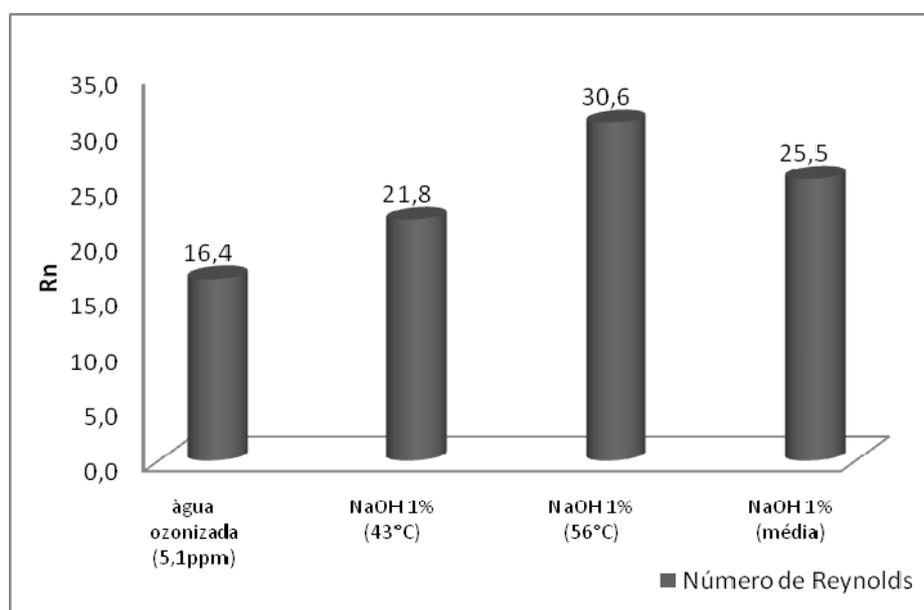


FIGURA 7 Número de Reynolds (Rn) das soluções utilizada na limpeza das tubulações de aço inoxidável contendo biofilme de *L. monocytogenes*.

A turbulência elevada da solução detergente é fator de grande importância para a remoção de sólidos da superfície de tubulações. No caso específico do sistema CIP é a movimentação da solução detergente em alta velocidade que provoca a fricção e turbulência, o que por sua vez, acelera a remoção dos sólidos. Segundo Herreid & Luetscher (1963), a ação eficiente na remoção de sólidos de um sistema de limpeza, tem seu início quando o número de Reynolds atinge 25,00, tendo sua eficiência máxima quando esse número atinge 90,00. Os autores Hankinson & Carver, (1968); Andrade & Macedo (1996); Jones (2001) confirmam e enfatizam a importância da velocidade do fluxo e de sua ação mecânica provocada pela passagem da solução, na remoção de sólidos.

Utilizou-se soluções de NaOH a 1%/56°C e água ozonizada a 5,1ppm em temperatura ambiente, na limpeza da tubulação do protótipo. A solução detergente de NaOH (1%) a 56°C possui Rn de 30,6 o que é considerado como valor de turbulência acima do mínimo (Rn=25,00) necessário para a remoção de sólidos. Essa mesma solução atingiu, no final do período de limpeza, temperatura de 43°C (Rn = 21,8387), estando este valor abaixo do mínimo estipulado como adequado à remoção de sólidos. Esses resultados mostram claramente que é necessário observar sempre a manutenção da temperatura durante todo o processo de limpeza, pois muitas vezes inicia-se com a temperatura recomendada para cada agente de limpeza e ignora-se o fato de que há perda de temperatura durante o processo e essa deve ser mantida durante o processo.

A média das soluções de NaOH (1%) a 56°C e 43°C teve Rn=25,4957 tendo o mínimo de eficiência e provocando turbulência eficiente para a remoção dos sólidos da parede da tubulação.

A água ozonizada (5,1ppm), também utilizada na limpeza interna das tubulações de aço inoxidável, teve o número de Reynolds igual a 16,4

insuficientes segundo Herreid & Luetscher (1963), para provocar turbulência necessária para remoção de sólidos na limpeza da tubulação.

Esses resultados vêm confirmar o que já foi observado nas práticas de limpeza, ou seja, para limpeza eficiente, é de fundamental importância observar a correta temperatura de utilização do agente de limpeza. Sabidamente, temperaturas elevadas potencializam a ação do detergente, aumentando a penetrabilidade, a interação com os sólidos a serem removidos e a dispersão. Não menos importante é a diminuição da viscosidade causada pela temperatura elevada, que segundo a equação, é o fator isolado mais importante no aumento do número de Reynolds.

4.4 Efeito das higienizações no segmento de reta e curva

A individualização dos tratamentos e os dados referentes à suas respectivas ações sobre os biofilmes de *L. monocytogenes* na superfície de aço inoxidável nos segmentos de reta e curva, estão respectivamente na figura 8 e na figura 9.

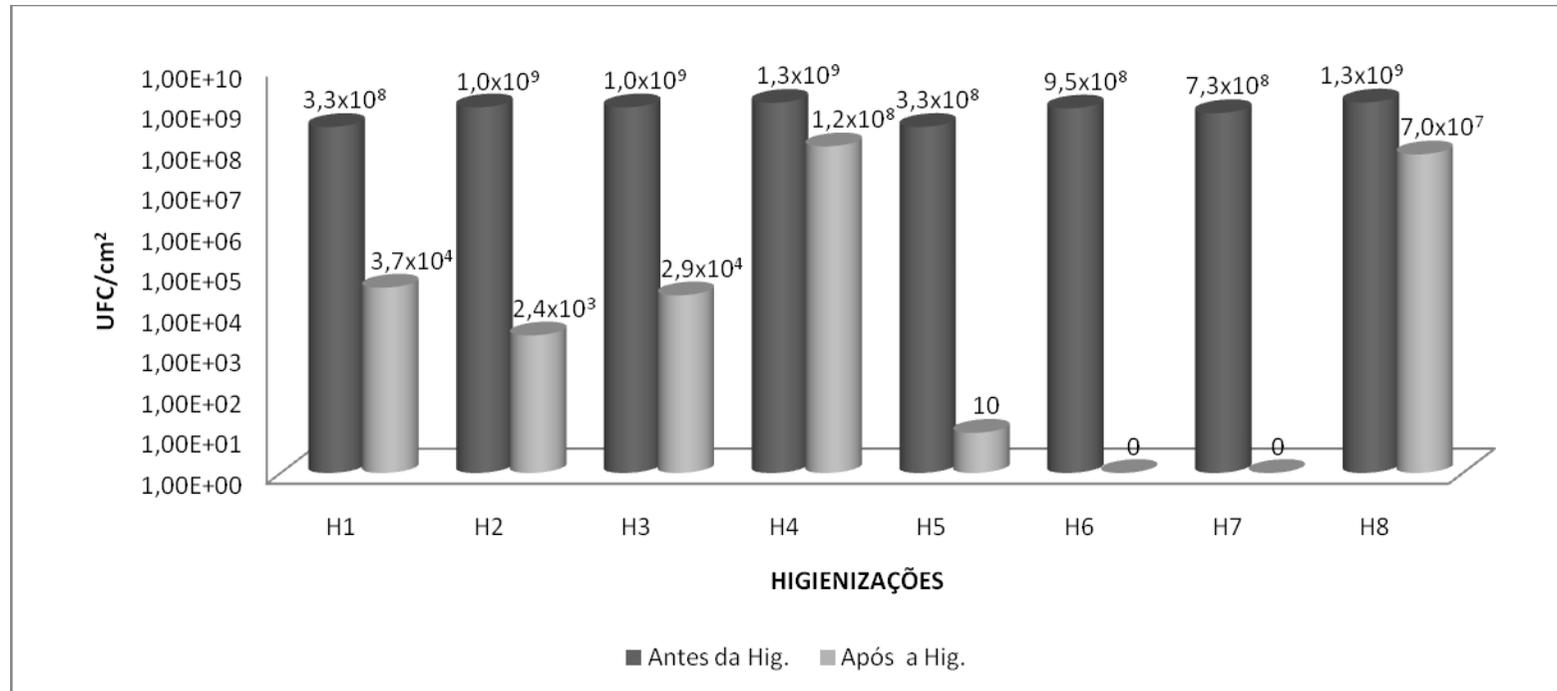


FIGURA 8 Contagem (UFC/cm²) de *L. monocytogenes* antes (preto) e após (cinza) a higienização da tubulação de aço inoxidável no segmento de reta. H1- lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com água (3 minutos); H2 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com cloro 100ppm (3 minutos); H3 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com água ozonizada 4,9ppm (3 minutos); H4 - lavagem com água ozonizada 5,1ppm (10 minutos) e sanificação com água ozonizada 4,9ppm (3 minutos); H5 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com água (10 minutos) – H6 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com cloro 100ppm (10 minutos); H7 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com água ozonizada 5,1ppm (10 minutos); H8 - lavagem com água ozonizada 5,1ppm (10 minutos) e sanificação com água ozonizada 5,1ppm (10 minutos);

A análise estatística de comparação entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis Kruskal-Wallis rank sum test (segmento de reta)

$$\chi^2 = 17.6582 \text{ df}=7$$

Detectou diferença significativa entre os tratamentos p-value = 0,01361.

Por isso, em seguida foi feita a comparação múltipla de médias não paramétricas (tabela 7):

TABELA 7 Comparação múltipla não paramétrica dos oito tratamentos (H1 a H8) quanto à contagem microbiana final, no segmento reta.

Tratamento	Contagem
H6	0 a
H7	0 a
H5	10 b
H2	2440 b
H3	23727 bc
H1	36670 bc
H8	70085667 c
H4	110870000 c

Comprovação da eficiência (contagem inicial vs final), pareada, por tratamento, no segmento de reta (tabela 8) de acordo com o teste de Wilcoxon.

TABELA 8 Comparação múltipla não paramétrica dos oito tratamentos (H1 a H8) quanto à eficiência de desinfecção do segmento reta.

Tratamento	p-valor
H1	0,1
H2	0,1
H3	0,1
H4	0,2
H5	0,1
H6	0,064
H7	0,064
H8	0,2

Todo valor superior a 0,1 indica que aquele tratamento não promoveu redução significativa na contagem bacteriana. Quanto menor o p-valor, mais drástica foi essa redução.

No geral, os resultados obtidos no segmento de reta indicam que: a soda na concentração utilizada (NaOH 1%) foi o único agente eficiente no processo de limpeza, uma vez que todas os tratamentos contendo soda apresentaram “p-valor” (tabela 8) iguais ou inferiores a 0,1. Além disso, pode-se inferir que o ozônio não se presta como agente de limpeza. Concernente à sanificação, pode-se observar que o cloro e o ozônio foram eficientes e que o tempo de exposição interferiu diretamente na eficiência do processo.

Especificamente, os dados obtidos no segmento de reta indicam que: quando foi utilizada soda como agente de limpeza e água como sanificante, ocorreu queda significativa na contagem sem, entretanto, ocorrer a eliminação total da bactéria do biofilme, indicando que a soda é eficiente no processo de remoção (limpeza) do biofilme, uma vez que, sabidamente a água não é agente sanificante; o que pode ser comprovado pela não influência do tempo de exposição, pois 3 e 10 minutos produziram o mesmo efeito. Embora a água não seja agente sanificante, esse tratamento (soda +

água) foi aplicado, para quantificar o número de bactérias removidas pela soda no processo de limpeza, o que pode ser comprovado pelos resultados dos tratamentos H1 e H5.

Pode-se também observar que o cloro foi eficiente como agente sanificante, sendo o tempo de exposição fator determinante para sua ação, já que a eliminação total somente aconteceu no tempo de 10 minutos (figura 8).

Com referência ao ozônio, pode-se observar comportamento semelhante ao do cloro, conseguindo também eliminação total das bactérias quando o tempo de exposição foi suficiente, conjugado com eficiente processo de limpeza. Ratificando o efeito antibacteriano do ozônio demonstrado por vários autores Pereira et al. (2005), Tatarchenko & Shapovalova (2005), Rodriguez-Romo & Yousef (2005), Dosti et al. (2005), Mondardo et al. (2006), Florjanic & Kristl (2006), Souza (2006), Pastoriza et al. (2007) e Fielding et al. (2007).

Os tratamentos utilizando ozônio como agente de limpeza e sanificação (H4 e H8) demonstraram que esse gás, nas condições deste estudo, embora seja eficiente agente sanificante, não se presta como agente de limpeza. Provavelmente, esse fato ocorreu devido à baixa turbulência, quando se utilizou água ozonizada (figura 7), com Rn igual a 16,4, valor abaixo do 25,00, valor este, estipulado por Herreid & Luetscher (1963) como o mínimo para que uma turbulência seja considerada como eficiente no processo de limpeza CIP.

Os dados referentes à higienização no segmento de curva da tubulação do protótipo encontram-se na figura 9.

A análise estatística de comparação entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis Kruskal-Wallis rank sum test (segmento de curva)

$$\chi^2 = 17.6582 \text{ df}=7$$

Detectou diferença significativa entre os tratamentos p-value = 0,01361

Por isso, em seguida foi feita à comparação múltipla de médias não paramétricas (tabela 9)

TABELA 9 Comparação múltipla não paramétrica dos oito tratamentos (H1 a H8) quanto a contagem microbiana final, no segmento curva.

Tratamento	Contagem
H6	138 a
H5	610 a
H1	682 a
H2	2400 a
H3	3480 a
H7	4008 a
H8	120202000 b
H4	168533333 b

Comprovação da eficiência (contagem inicial vs final), pareada, por tratamento, no segmento de reta (tabela 10) de acordo com o teste de Wilcoxon.

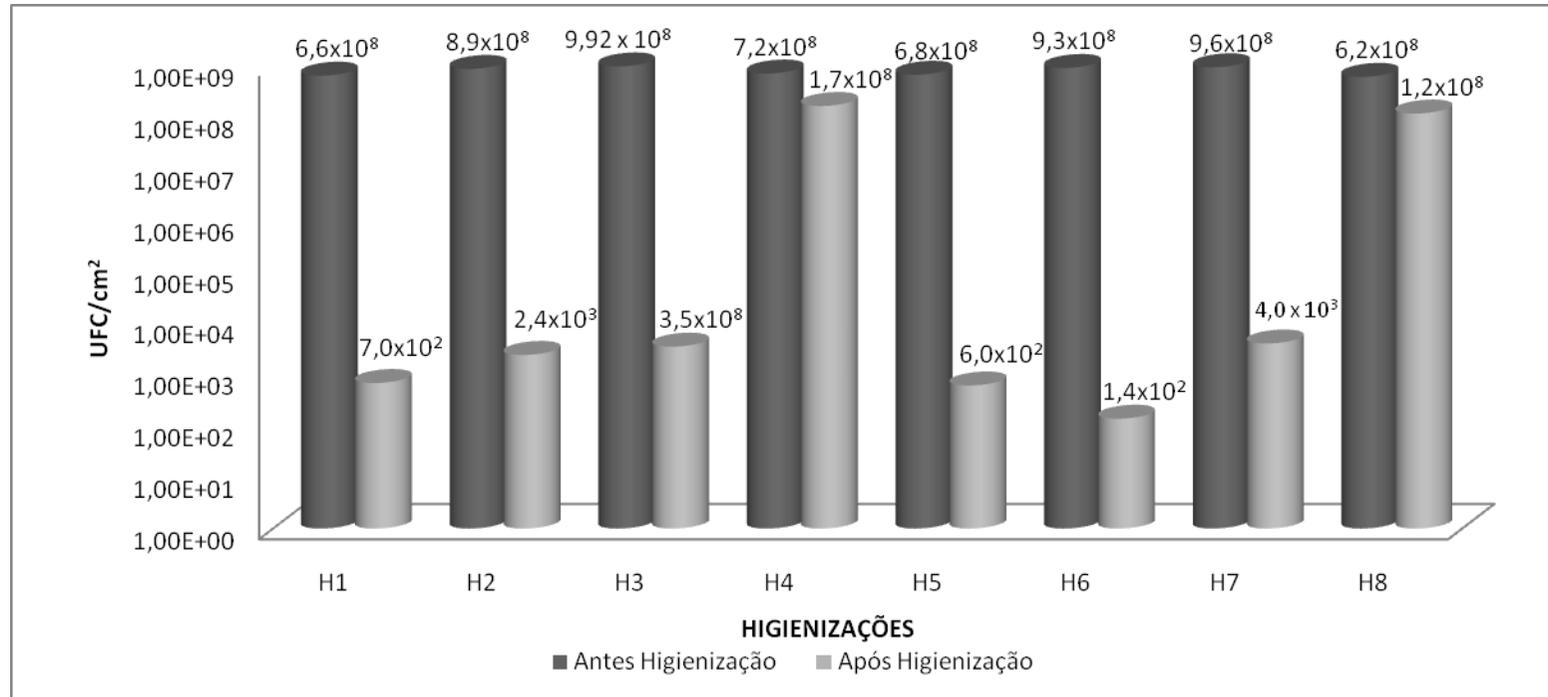


FIGURA 9 Contagem (UFC/cm²) de *L. monocytogenes* antes (preto) e após (cinza) a higienização da tubulação de aço inoxidável no segmento de curva. H1- lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com água (3 minutos); H2 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com cloro 100ppm (3 minutos); H3 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com água ozonizada 4,9ppm (3 minutos); H4 - lavagem com água ozonizada 5,1ppm (10 minutos) e sanificação com água ozonizada 4,9ppm (3 minutos); H5 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com água (10 minutos) – H6 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com cloro 100ppm (10 minutos); H7 - lavagem com soda 1% (10 minutos/56°C) e sanificação com água ozonizada 5,1ppm (10 minutos); H8 - lavagem com água ozonizada 5,1ppm (10 minutos) e sanificação com água ozonizada 5,1ppm (10 minutos);

TABELA 10 Comparação múltipla não paramétrica dos oito tratamentos (H1 a H8) quanto à eficiência de desinfecção do segmento curva.

Tratamento	p-valor
H1	0,1
H2	0,1
H3	0,1
H4	0,2
H5	0,1
H6	0,1
H7	0,1
H8	0,2

Todo valor superior a 0,1 indica que aquele tratamento não promoveu redução significativa na contagem bacteriana. Quanto menor o p-valor, mais drástica foi essa redução.

No geral, os dados indicam que a higienização no segmento de curva foi igual para todos os tratamentos (tabela 10), com exceção do H4 e do H8 (p-valor = 0,2), os quais obtiveram piores resultados, semelhantes ao que ocorreu com o segmento de reta. Estas duas higienizações (H4 e H8) utilizaram a água ozonizada 5,1ppm com baixa turbulência ($Rn=16,4$), como agente de limpeza.

Comparando os dois segmentos, reta e curva, pode-se inferir que no segmento de curva é mais difícil obter uma completa higienização, visto que em nenhum tratamento foi possível obter uma eliminação total das bactérias da superfície, ao contrário do que ocorreu quando se utilizou os tratamentos H6 e H7 no segmento de reta. Pode-se especular que no segmento de curva, o impacto da solução de limpeza não é o mesmo em todo o perímetro interno da superfície que compõe o segmento de curva, ou seja, há pontos da superfície na curva em que o líquido detergente impacta com pressão menor que em outras. Esse fato parece não ter a mesma importância em relação ao agente sanificante, pois esse

não depende de impacto sobre a superfície, mas sim do contato direto com a bactéria aderida à superfície.

Os resultados obtidos em ambos os segmentos, indicam que em um sistema de higienização de tubulação de aço inoxidável AISI 304 cujo perfil apresente segmentos retos e curvos, o hidróxido de sódio na concentração de 1% é eficiente na remoção da matéria orgânica (limpeza) no segmento de reta, desde que a temperatura da solução seja mantida constante a no mínimo 56° C em um tempo de circulação não inferior a 10 minutos, com turbulência mínima de $Rn=25,00$. No segmento de curva, devem-se proceder, modificações em pelo menos um dos parâmetros estudados, ou seja, elevar a temperatura da solução ou o tempo de circulação ou ambos; o ozônio definitivamente não deve ser utilizado com agente de limpeza.

Concernente aos agentes sanificantes ficou demonstrado que o cloro e o ozônio possuem eficiências semelhantes e que ambos agem eficientemente em superfície de aço inoxidável submetida a uma completa limpeza.

5 CONCLUSÕES

Nas condições deste trabalho:

Ocorreram adesão e formação de biofilme maduro de *L. monocytogenes* na superfície interna da tubulação de aço inoxidável tanto no segmento de reta quanto no segmento de curva.

A água ozonizada a 5,1ppm, não obteve turbulência suficiente para uma eficiente higienização.

No segmento de reta os tratamentos que apresentaram as melhores performances, promovendo uma eliminação total de bactérias foram: limpeza com NaOH 1% a 56°C por 10 minutos e sanificação com hipoclorito de sódio a 100ppm; o tratamento no qual se utilizou de soda 1% a 56°C por 10 minutos na limpeza e água ozonizada 5,1ppm na sanificação.

No segmento de curva, os únicos tratamentos que não apresentaram diferença entre contagem inicial e finais significativas foram: limpeza e sanitização a água ozonizada a 5,1ppm e 4,9ppm respectivamente e o tratamento no qual se utilizou a água ozonizada a 5,1ppm na limpeza e na sanitização.

A sanitização da superfície interna de tubulação de aço inoxidável (CIP) só foi eficiente com o tempo de contato de dez minutos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, D.M.B.; GONZÁLEZ, A.M.B.; CAMPUZANO, S. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos artesanales expendidos en la plaza de mercado de Cáqueza, Cundinamarca. **Nova: Publicación Científica**, Cundinamarca, v.4, n.6, p.1-114, jun./dic. 2006.

ADRIÃO, A.; VIEIRA, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; SOL, M.; TENREIRO, R.P.; CHAMBEL, L.; BARATA, B.; ZILHAO, I.; SHAMA, G.; PERNI, S.; JORDAN, S.J.; ANDREW, P.W.; FALEIRO, M.L. Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, London, v. 123, n.1/2, p.142-150, Mar. 2008.

AL-HADDAD, K.S.H.; AL-QASSEMI, R.A.S.; ROBINSON, R.K. The use of gaseous ozone and gas packaging to control populations of *Salmonella infantis* and *Pseudomonas aeruginosa* on the skin of chicken portions. **Food Control**, Oxford, v.16, n.5, p.405-410, June 2005.

ALVAREZ, N.; GÉSAN-GUIZIOU, G.; DAUFIN, G. The role of surface tension of re-used caustic soda on the cleaning efficiency in dairy plants **International Dairy Journal**, Oxford, v.17, n.4, p.403-411, Apr. 2007.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for examination water and wastewater**. 19.ed. Washington, 1992. 1268p.

ANDRADE, N.J.; BRIDGEMAN, A.T.; ZOTTOLA, E.A. Bacterial activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.7, p.883-838, July 1998.

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 189p.

ARCURI, E.F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Leite e Derivados**, São Paulo, v.9, n.53, p.40-45, jul. 2000.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.3, p.440-446, jun. 2006.

ARNOLD, R.G.; MAXCY, R.B. Evaluating circulation cleaning soil depletion from surfaces by analysis of soil depletion from surfaces. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.53, n.11, p.1540-1544, Nov. 1970.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622p.

BOARI, C.A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. 2008. 80p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BOCCI, V. **Ossigeno-ozonoterapia**: comprensione dei meccanismi di azione e passibilita terapeutiche. Milano: Ambrosiana, 2000. 324p.

BOLTON, D.C., TARKINGTON, B.K., ZEE, Y.C.; OSEBOLD, J. W. An in vitro system for studying the effects of ozone on mammalian cell cultures and virus. **Environmental Research**, San Diego, v.27, n.2, 466-475, 1982.

BORGES, M.F.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; MUNIZ, C.R.; AZEVEDO, É.H.F.; FIGUEIREDO, E.A.T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisas de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.21, n.1, p.31-40, jan./jun. 2003.

BOSILEVAC, J.M.; SHACKELFORD, S.D.; BRICHTA, D.M.; KOOHMARAIE, M. Efficacy of ozonated and electrolyzed oxidative waters to decontaminate hides of cattle before slaughter. **Journal Food Protection**, Ames, v.68, n.7, p.1393-8, July 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07/03/1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, v.134, n.48, p.3977-3986, 11 mar. 1996. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 10, de 22/05/2003. Institui o programa genérico de procedimento - Padrão de Higiene Operacional PPHO. **Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil**, Brasília, v.154, n.102, 29 maio 2003a. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12/12/2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais para controle de leite e produtos lácteos. **Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, v.143, n.238, p.8-32, 14 dez. 2006. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. Oficializa os métodos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p.14, 18 set. 2003b. Seção 1.

BRIGIDO, B.M.; FREITAS, V.P.S.; MAZON, E.M.A.; PISANI, B.; PRANDI, M.A.G.; PASSOS, M.H.C.R. Queijo minas frescal: avaliação da qualidade e conformidade com a Legislação. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.63, n.2, p.177-185, dez. 2004.

BRUNNER, J.R. Ozone—caution! **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.41, n.2, p.315, 1958

BUSSCHER, H.J.; WEERKAMP, A. H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.6, p.2, p.165, June 1987.

CAMPOS, C.A.; RODRÍGUEZ, O.; LOSADA, V.; AUBOURG, S.P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.103, n.2, p.121-30, Aug. 2005.

CAMPOS, L.C.; SILVA, D.C.V. *Listeria monocytogenes*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, A. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu. 2008. p.237- 245.

CARDOSO, C.C.; FIORINI, J.E.; GURJÃO, J.W.B.; NASCIMENTO, L.C.; AMARAL, L.A. Avaliação microbiológica da eficiência de um processo de sanitização de latões de leite com ozônio. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v.54, n.309, p.13-21, 1999.

CARDOSO, C.C.; VEIGA, S.M.O.M.; NASCIMENTO, L.C.; FIORINE, J.E.; AMARAL, L.A. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com utilização de ozônio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.1, p.59-61, abr. 2003.

CASTILLO, A.; MCKENZIE, K.S.; LUCIA, L.M.; ACUFFI, G.R. Ozone treatment for reduction of *Escherichia coli* 0157:H7 and Salmonella serotype typhimurium on beef carcass surfaces. **Jornal Food Protection**, Ames, v.66, n.5, p.775-779, May 2003.

CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.3, p.281-287, set./dez. 2001.

CHAE, M.S.E.; SCHRAFT, H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Microbiology**, Oxford, v.18, n.1, p.103-112, Feb. 2001.

CHAE, M.S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L.T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, London, v.23, n.3, p.250-259, May 2006.

CHARACKLIS, W.G.; COOKSEY, K.E. Biofilm and microbial fouling. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v.29, p.93-137, 1983.

CONTRERAS, C.C.; BROMBERG, R.C.; BITTENCOURT, K.M.V.A.; MIYAGUSKU, L. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**, São Paulo: Livraria Varela, 2002.

COSTA, E.O.; COUTINHO, S.D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C.M.; GAMBALE, W.; GANDRA, C.R.P.; PIRES, M.F.C. Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.17, n.2, p.107-12, abr./jun. 1986

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.49, p.711-745, 1995.

CRAPO, C.; HIMELBLOOM, B.; VITTS, S.; PEDERSEN, L. Ozone efficacy as a bactericide in seafood processing. **Journal Aquatic Food Product Technology**, New York, v.13, n.1, p.111-123, Mar. 2004.

DEMUTH, D.R.; LAMONT, R.J. **Bacterial cell-to-cell communication**: role in virulence and pathogenesis. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. 313p

DOSTI, B.; GUZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A.K. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, v.58, n.1, p.19-24, Feb. 2005

DUARTE, D.A.M.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, AM.M.; SILVA, J.V.D.; MOTA, R.A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.297-302, jul./set., 2005.

FEDIO, W.M.; JACKSON, H. On the origin of *Listeria monocytogenes* in raw bulk-tank milk. **International Dairy Journal**, Barking, v.2, n.3, p.197-208, 1992.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v. 23, p.162-165, dez. 2003.

FIELDING, L.M., HALL, A., PETERS, A.C. An evaluation of ozonated water as an alternative to chemical cleaning and sanitisation of beer lines. **Journal of Foodservice**, Trumbull, v.18, n.2, p.59-68, 2007.

FLORJANIC, M.; KRISTL, J. Microbiological quality assurance of purified water by ozonization of storage and distribution system. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Philadelphia, v.32, n.10, p.1113-1121, Nov./Dec 2006.

FOLSOM, J.P.; FRANK, J.F. Chlorine resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms and relationship to subtype, cell density, and planktonic cell chlorine resistance. **Journal Food Protection**, Ames, v.69, n.6, p.1292-1296, June 2006.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artimed, 2002. 424p.

FRANCESCATO, R.F.; SEBASTIÃO, P.C.A.; SANTOS, H.H.P. Frequência de patógenos emergentes relacionados com doenças transmitidas por alimentos em áreas selecionadas no Estado de São Paulo - julho de 1998 a julho de 2000.

REUNET - DTA, São Paulo, v.2, n.1, jan. 2002. Disponível em:

<ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/revp02_vol2n1.pdf> Acesso em: 12 dez. 2008.

FRANCO, B.D.G.M.; ANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003.

GARCIA, C.A.; BARCELOS, W.L.S.; ROSSI, D.A.; LIMA, A.M.C.; SILVA, N.R.; CAMPOS, V.A.. Pesquisa de alterações oxidativas no leite bovino "in natura" ozonizado. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.75, p.67-75, ago.2000a.

GARCIA, C.A.; PARREIRA, V.F.; ROSSI, D.A.; CAMPOS, V.A.; ANUNCIÇÃO, D.G. Eficiência do ozônio na redução de bactérias aeróbicas mesófilas, em efluentes de matadouros-frigoríficos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.90/91, p.60-63, nov./dez. 2001.

GARCIA, C.A.; SILVA, N.R. da; LUQUETTI, B.C.; MARTINS, I.P.; SILVA, R.T. da; VIEIRA, R.C. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite "in natura". **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.70, p.36-50, mar. 2000b.

GARCIA, C.A.; SILVA, N.R. da; MARTINS, I.P.; SILVA, R.T. da; LUQUETTI, B.C.; VIEIRA, R.C. Características de densidade, gordura e acidez do leite bovino in natura submetido a diferentes tempos de ozonização. **Higiene Alimentar**, São Paulo, n.14, n.73, p.60-73, jun. 2000c.

GARCIA, C.A.; SILVA, N.R.; SILVA, R.T.; MARTINS, I.P.; LUQUETTI, B.C. Quantificação de ozônio no leite bovino in natura. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.65, p.55-61, out. 1999.

GARCIA, C.A.; SILVA, N.R.; MARTINS, I.P.; SILVA, R.T.; LUQUETTI, B.C.; VIEIRA, R.C. Características de densidade, gordura e acidez do leite bovino in natura submetido a diferentes tempos de ozonização. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.68, n.4, p.778-84, Apr. 2005.

GARCIA, C.A.; SILVA, N.R.; MARTINS, I.P.; SILVA, R.T.; LUQUETTI, B.C.; VIEIRA, R.C. Características de densidade, gordura e acidez do leite bovino in natura submetido a diferentes tempos de ozonização. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.27, n.2, p.101, 1954.

GELMAN, A.; SACHS, O.; KHANIN, Y.; DRABKIN, V. GLATMAN, L. Effect of ozone pretreatment on fish storage life at low temperatures. **Journal of Food Protection**, Ames, v.68, n.4, p.778-784, Apr.2005.

GIESE, A.C.; CHRISTENSER, E. Effects of ozone on organisms. **Physiological Zoology**, Chicago, v.27, n.2, p.101-115, 1954.

GONZÁLEZ, R.; ROMAY, C.; DÍAZ LLERA, S. Estudios sobre genotoxicidad del ozono. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas**, La Habana, v.23, n.3, p.3, p.177-183, jul./sept. 2004.

GORDON, K.P.; HANKINSON, D.J.; CARVER, C.E. Deposition of milk solids on heated surfaces. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.51, n.4, p. 520-526, Apr. 1968.

GREENE, A.K.; FEW, B.K.; SERAFINI, J.C. A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.11, p.3617-3620, Nov. 1993

GURLEY, B., Ozone: pharmaceutical sterilant of the future? **Journal of Parenteral Science and Technology**, Philadelphia, v.39, n.6, p.256-261, Nov./Dec.1985.

GÜZEL-SEYDIM, Z.B; BEVER, P.I.; GREENE A.K. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. **Food Microbiology**, London, v.21, n. 4, p.475-479, Aug. 2004.

GÜZEL-SEYDIM, Z.B.; WYFFELS, J.T.; GREENE, A.K.; BODINE, A.B. Removal of dairy soil from heated stainless steel surfaces: use of ozonated water as a prerinse. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n.8, p.1887-91, Aug. 2000.

HANKINSON, D.J.; CARVER, C. E. fluid dynamic relationships involved in circulation cleaning. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.51, n.11, Nov. 1951.

HARVEY, J.; KEENAN, K.P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, London, v.24, n.4, p.380-392, June.

HEMS, R.S.; GULABIVALA, K.; NG, Y.L.; READY, D.; SPRATT, D.A. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, Oxford, v.38, n.1, p.22- 29, Jan. 2005.

HERREID, E.O.; LUETSCHER, L.R. Cleaning and sanitizing dairy equipment **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.46, n.11, p.1309-1314, Nov. 1963.

HIDDINK, J. Water supply, sources, quality and water treatment in the dairy industry. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Amsterdam, n.308, p.16-32, 1995.

HINZE, H.; PRAKASH, D.; HOLZER, K. Effect of ozone on ATP cytosolic enzyme and permeability of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, New York, v.147, n.2, p.105-108, Mar. 1987

HOOF, F.V. Professional risks associated with ozone. In: MASSCHELEIN, W.J. (Ed.). **Ozonation manual for water and waste water treatment**. New York: Wiley/Interscience, 1982. p. 200-2001.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JENNINGS, W.G. Circulation cleaning. III. The kinetics of a simple detergent system. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.42, n.11, p.1763-1771, Nov. 1959.

JONES, G.M. **Cleaning and sanitizing milking equipment extension dairy scientist, milk quality & milking management**. 2001. (Virginia Tech Publication, n. 404-400). Disponível em: <<http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-400/404-400.html>> Acesso em: 15 dez. 2008.

KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E. Decontamination of a multilaminated aseptic food packaging material and stainless steel by ozone. **Journal of Food Safety**, Westport, v.21, n.1, p.1-13, May 2001.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal Food Protection**, Ames, v.62, n.9, p.1071-1087, Sept. 1999.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; KHADRE, M.A. Ozone and its current and future application in the food industry. **Advances in Food and Nutrition Research**, New York, v.45, p.167-218, 2003.

KIM, T.J.; SILVA, J.L.; CHAMUL, R.S.; CHEN, T.C. Influence of ozone, hydrogen peroxide, or salt on microbial profile, TBARS and color of channel catfish fillets. **Journal of Food Science**, Ames, v.65, n.7, p.1210-1213, Oct. 2000.

KORYCKA-DAHL, M.; RICHARDSON, T. Initiation of oxidative changes in foods. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.63, n.7, p.1181-1198, July 1980.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, Alexandria, v.47, n.260, p.583-621, 1952.

LEAL, D.D.M.; CARVALHO, E.P.de; COSTA, E.O.da; BATISTA, L.R. Caracterização e identificação de *Listeria monocytogenes* em mastite clínica e subclínica bovina. **Napgama**, São Paulo, v.2, n.3, p.12-14, maio/jun. 1999.

LEITE, C.C.; GUIMARÃES, A.G.; RIBEIRO, N.S.; SILVA, M.D.; ASSIS, P.N. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em queijo do tipo “coalho” comercializado em Salvador (BA) importância para a saúde pública. **Revista Analytica**, São Paulo, v.2, p.38-41, nov. 2002.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 632p.

MAHAN, B.M.; MYERS, R.J. **Química: um curso universitário**. 2.ed. São Paulo: E. Blücher, 2005. 582p.

MAHAPATRA, A.K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; JULSON, J. L. Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review critical reviews in. **Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.45, n.6, p.447-461, 2005.

MAI, T.L.; CONNER, D.E. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, London, v.120, n.3, p.282-286, Dec. 2007.

MANOUSARIDIS, G.; NERANTZAKI, A.; PALEOLOGOS, E.K.; TSIOTSIAS, A.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. **Food Microbiology**, London, v.22, n.1, p.1-9, Jan. 2005.

MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; SANTOS, E.B., GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.14, n.1, p. 80-192, 2007.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, London, v.21, n.2, p.213-216, Apr. 2004.

MITTELMAN, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.10, p.2760-2764, Oct. 1988.

MOHAMMED, A.K; YOUSEF, A.E. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, London, v.71, n. 2/3, p.131-138, Dec. 2001.

MONDARDO, R.I.; SENS, M.L.; MELO FILHO, L.C. Pré-tratamento com cloro e ozônio para remoção de cianobactérias. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v.11, n.4, p.337-342, out./dez. 2006.

MOORE, G.; GRIFFITH, C.; PETERS, A. Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. **Journal of Food Protection**, Ames, v.63, n.8, p.1100-1106, Aug. 2000.

MURRAY, R.G.E.; PAMELA, S.; ELSON, H.E. Location of mucopeptide of selections of the cell wall of *E.coli* and other gram-negative bacteria. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.11, n.3, p.547-560, 1965.

NASCIMENTO, L.C.; LIMA, L.C.O.; VALLE, R.H.P.; VEIGA, S.M.O.M.; FIORINI, J.E.. Uso de derivados clorados, ozônio e ultra-som na sanificação de água e alimentos - revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n.136, p.48-57, out. 2005.

NASCIMENTO, M.G.F.; NASCIMENTO, E.R. **Importância da avaliação microbiológica na qualidade e segurança dos alimentos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 11p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 120).

NERO, L.A. **Listeria monocytogenes e Salmonella spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil**: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. 2005. 145p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

NOVAK, J.S.; YUAN, J.T. Viability of *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* surviving mild heat or aqueous ozone treatment on beef followed by heat, alkali, or salt stress. **Journal Food Protection**, Ames, v.66, n.3, p.382-389, Mar.2003.

O'DONNELL, E. T. The incidence of Salmonella and Listeria in raw milk from farm bulk tanks in England and Wales. **International Journal of Dairy Technology**, London, v.48, n.1, p. 25-29, Feb. 1995.

OLIVEIRA, E.C.M.; VALLE, R.H.P. Aspectos microbiológicos dos produtos hortícolas minimamente processados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.78/79, p.50-54, nov./dez. 2000.

OLIVEIRA, M.M.M. **Formação de biofilme em aço inoxidável, biotransferência e sensibilidade de Listeria monocytogenes a óleos essenciais**. 2009. 154p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, N.M.S.; OLIVEIRA, W.R.M.; NASCIMENTO, L.C.; SILVA, J.M.S.F.; VICENTE, E. FIORINE, J.E.; BRESSAM, M.C. Avaliação físico-química de filetes de tilápia (*Oreochromis niloticus*) submetidos a sanitização. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p.83-89, mar. 2008.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Inocuidade dos alimentos**. Washington, 2000. 16p. 126. Sessão do Comitê Executivo.

OYARZÚN, G.M. Efectos del ozono sobre el sistema respiratorio. **Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias**, Santiago, v.16, n.1, p.25-33, ene./mar. 2000.

PADILHA, M.R.F.; FERNANDES, Z.F.; LEAL, T.C.A.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na Cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.34, n.2, p.49-52, mar./abr. 2001.

PASTORIZA, L.; BERNARDEZ, M.; SAMPEDRO, G.; CABO, M.L.; HERRERA, J.J.R. Use of sterile and ozonized water as a strategy to stabilize the quality of stored refrigerated fresh. **Food Control**, Oxford, v.19, n.8, p.772-780, Aug. 2008.

PEREIRA, M.M.S.; NAVARINI, A.; MÍMICA, L.M.J.; PACHECO, J.R., A. M.; SILVA, R. A. Efeito de diferentes gases sobre o crescimento bacteriano: estudo experimental “in vitro”. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v.32, n.1, p.12-14, jan./fev. 2005.

PRYOR, W.A.; SQUADRITO, G.L.; FRIEDMAN, M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v.19, n.6, p.935-941, Dec. 1995.

REUBEN, A.; TREMINIO, H.; ARIAS, M.L.; CHAVES, C. Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* en alimentos de origen animal en Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.53, n.4, p.389-392, dic. 2003.

RIEU, A.; LEMAÎTRE, J.P.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, London, v.126, n.1/2, p.76-82, Aug. 2008.

RIVA SANSEVERINO, E. Knee-joint disorders treated by oxygen-ozone therapy. **Europa Medicophysica**, Torino, v.25, n.3, p.163-170, giul./set. 1989.

ROBBINS, J.B.; FISHER, C.W.; MOLTZ, A.G.; MARTIN, S.E. Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. **Journal of Food Protection**, Ames, v.68, n.3, p.494-498, Mar. 2005.

RODRIGUEZ-ROMO, L.A.; YOUSEF, A.E. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by ozone and UV radiation. **Journal of Food Protection**, Ames, v.68, n.4, p.711-7, Apr. 2005.

ROSSONI, E.M.M; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, London, v.61, n.1, p. 81-85, Oct. 2000.

SÁ, M.I.; FERREIRA, C. Importância das zoonoses na segurança alimentar. **Segurança e Qualidade Alimentar**, São Paulo, n.2, p. 14-17, maio 2007.

SÃO PAULO. Secretaria dos Serviços e Obras Públicas. **Desinfecção de águas**. São Paulo: CETESB, 1974. 210p.

SERRA, R.; ABRUNHOSA, L.; KOZAKIEWICZ, Z.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Use of ozone to reduce molds in a cheese ripening room. **Journal Food Protection**, Ames, v.66, n.12, p.2355-2358, Dec. 2003.

SHRIVER, D.F.; ATKINS, P.W. **Química inorgânica**. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2003. 816p.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, Oxford, v.17, n.4, p.439-447, Aug. 2000.

SOUZA, J.B. **Avaliação de métodos para desinfecção de água, empregando cloro, ácido peracético, ozônio e o processo de desinfecção combinado ozônio/cloro**. 2006. 176p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos.

TATARCHENKO, G.O.; SHAPOVALOVA, I.N. The effect of ozone on the corrosion of steels in the processes of oxidation of pyridines. **Protection of Metals**, New York, v.41, n.5, p. 479-483, Sept./Oct. 2005.

TIDE, C.; HARKIN, S.R.; GEESEY, G.G.; BREMER, P.J.; SCHOLZ, W. The influence of welding procedures on bacterial colonization of stainless steel weldments. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.42, n.2, p. 85-96, Nov. 1999.

TORRES, E.A.F.S; REGÊ FERREIRA, A.F; RÍMOLI, C.D. Estudo das propriedades desinfetantes do ozônio em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.42, p.18-23, 1996.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L.. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827p.

URANO, H.; FUKUZAKI, S. Facilitation of cleaning of alumina surfaces fouled with heat-treated bovine serum albumin by ozone treatment. **Journal Food Protection**, Ames, v.64, n.1, p.108-112, Jan. 2001.

VÁZQUEZ, S.C.; RODAS, S.O.; QUIÑONES, R.E.I. Occurrence of Listeria species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. **Food Microbiology**, Oxford, v.18, n.2, p.177-181, Apr. 2001.

VEIGA, S.O.M.; NASCIMENTO, L.C.; CARVALHO, E.P.; CARDOSO, C.C.; FIORINI, J.E. Eficácia da água ozonizada contra patógenos encontrados em água e alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.106, p.95-99, mar. 2003.

VELANO, C.E.; VELANO, H.E.; NASCIMENTO, L.C.; FERREIRA, L.R.; CARDOSO, C.C.; BARROS, L.M.; BRAGA, E.C.; PANZERI, H. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente a *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Química e Terapêutica**, São Paulo, v.28, n.6, p.226-231, nov. 2002.

VELANO, H.E.; NASCIMENTO, L.C.; BARROS, L.M.; PANZERI, H. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. **Pesqui sa Odontologica Brasileira**, São Paulo, v.15, n.1, p.18-22, jan./mar. 2001.

WALKER, R.L. Listeriose. In. HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap.42, p.212-215.

WICKRAMANAYABE, G.B.. Disinfection and sterilization by ozone. In: BLOCK, S.S. (Ed.). **Disinfections, sterilization and preservation**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Fabiger Publishers, 1994. p.182-190.

WILCOXON, F. Individual comparisons by Ranking Methods. **Biometrics**, Washington, v.1, p.80-83, 1945.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with Bacillus biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.7, p.727-733, July 1996.

WONG, A.C.L. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.10, p.2765-2770, Oct. 1998.

WU, J.; LIN, L.; LUAN, T.; GILBERT, Y.S.C.; LAN, C. Effects of organophosphorus pesticides and their ozonation byproducts on gap junctional intercellular communication in rat liver cell line. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.45, n.10, p.2057-2063, Oct. 2007.

WU, J.; LUAN, T.; LAN, C.; LO, T.W.H.; CHAN, G.Y.S. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. **Food Control**, Oxford, v.18, n.5, p.466-472, May 2007.

YOUNG, J.C.; ZHU, H.; ZHOU, T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.44, n.3, p.417-424, Mar. 2006.

ZAFFARI, C.B.; MELLO, J.F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.862-867, jun. 2007.