



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



EFEITO DO GÁS OZÔNIO NA CONSERVAÇÃO DE QUEIJO COALHO

LUANA SANTIAGO DE MAGALHÃES

MANAUS - AMAZONAS

Novembro, 2019

LUANA SANTIAGO DE MAGALHÃES

EFEITO DO GÁS OZÔNIO NA CONSERVAÇÃO DE QUEIJO COALHO

Orientador: Pedro de Queiroz Costa Neto, Dr.

Coorientadora: Expedita Maria de Oliveira Pereira, Dra.

Coorientador: Joel Lima da Silva Júnior, Dr.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal-PPGCAN da Universidade Federal do Amazonas-UFAM como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

MANAUS - AMAZONAS

Novembro, 2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M188e Magalhães, Luana Santiago de
Efeito do gás ozônio na conservação do queijo coalho / Luana Santiago de Magalhães. 2019
41 f.: 31 cm.

Orientador: Pedro de Queiroz Costa Neto
Orientador: Expedita Maria de Oliveira Pereira
Coorientador: Joel Lima da Silva Júnior
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Segurança alimentar. 2. Bactérias. 3. Qualidade. 4. Atmosfera modificada. I. Costa Neto, Pedro de Queiroz II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

A DEUS, o autor da vida.

Aos meus pais (Maria Consoêlo e Alcides Paulo), que me deram muito apoio nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus irmãos (Márcio Rogério, Marcos e Ramon), que estiveram sempre ao meu lado, e nunca mediram esforços para me ajudar.

Aos meus amigos por terem me ajudado a concluir esta jornada, pelos incentivos que foram me transmitidos, pelos esforços prestados.

Aos meus professores que me ensinaram que por mais que achamos que o nosso conhecimento já está bem profundo, estamos enganados, pois o conhecimento é algo que está sempre se renovando.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre estar ao meu lado e dando-me forças para enfrentar todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, que me ensinaram, confiaram e me apoiaram em tudo. E mesmo com dificuldades deram condições para alcançar meus objetivos, a eles devo tudo o que tenho e o que sou, pois sempre foram um exemplo de força, coragem, dignidade e caráter.

Aos meus irmãos pelo amor, apoio e paciência, pelo orgulho que sentem por mim.

Aos meus amigos, namorado, companheiros de pesquisas e irmãos na amizade que fizeram parte do mestrado, que compartilharam comigo muitos momentos felizes, mas também difíceis, que me ajudaram e incentivaram. E vão continuar presentes em minha vida.

Aos meus orientadores pelo apoio, orientação e pela confiança que depositaram em mim.

Aos técnicos laboratoriais do INPA e da UFAM que ajudaram nas análises bromatológicas.

Serei para sempre grata.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.

Theodore Roosevelt

RESUMO

Os queijos contêm microrganismos desejáveis que contribuem positivamente para o desenvolvimento das características organolépticas do produto. Entretanto, alguns microrganismos indesejáveis podem estar contidos, estes são chamados de deteriorantes e/ou patogênicos. A utilização do ozônio nos processos da indústria de alimentos vem crescendo ao longo dos anos, uma vez que tem gerado resultados positivos, pois o seu mecanismo de ação atua diretamente nos componentes celulares. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de alterações na composição química e na carga microbiológica de queijo tipo coalho comercializado em Manaus – AM, antes e após a exposição ao gás ozônio. As amostras de queijo coalho artesanal foram coletadas em quatro feiras municipais da cidade de Manaus-AM. Foram coletadas três amostras com peso de 250 g/amostra, por banca de venda, totalizando nove amostras por feira. As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa n° 62 (MAPA, 2011) e para as análises bromatológicas foram usadas metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Com base na análise estatística, os resultados significativos da aplicação do gás ozônio foi o tempo de 6 horas em relação a redução da carga microbiana, e não houve alterações relevantes na composição química do queijo analisado.

Palavras-chave: Qualidade. Segurança alimentar. Bactérias.

ABSTRACT

Cheeses contain desirable microorganisms that contribute positively to the development of the organoleptic characteristics of the product. However, some undesirable microorganisms may be contained, these are called spoilage and / or pathogens. Ozone utilization in food industry processes has been increasing over the years, as it has generated positive results, as its action mechanism acts directly on cellular components. The objective of this work was to evaluate the occurrence of changes in chemical composition and microbiological load of rennet cheese marketed in Manaus - AM, before and after exposure to ozone gas. The samples of artisanal coalho cheese were collected at four municipal fairs in Manaus-AM. Three samples weighing 250g / sample were collected per sales stand, totaling nine samples per fair. Microbiological analyzes were performed according to Normative Instruction n° 62 (MAPA, 2011) and for the bromatological analyzes methodologies described were used by the Adolfo Lutz Institute (2008). Based on the statistical analysis, the significant results of ozone gas application was the 6 hours time in relation to microbial load reduction, and there were no relevant changes in the chemical composition of the cheese analyzed.

Keywords: Quality. Food Safety. Bacteria.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Médias da contagem de UFC/g coliformes totais das feiras municipais.....	26
Gráfico 2: Médias da contagem de UFC/g <i>Escherichia coli</i> das feiras municipais	27
Gráfico 3: Médias da contagem de UFC/g <i>Staphylococcus aureus</i> das feiras municipais	27
Gráfico 4: Médias da contagem de UFC/g fungos das feiras municipais.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índices de qualidade do queijo coalho, segundo RTIQ de produtos lácteos.	16
Tabela 2: Níveis apropriados de aplicação do ozônio	18
Tabela 3: Médias dos valores de UFC/g de queijo coalho exposto ao ozônio.	29
Tabela 4: Médias dos valores bromatológicos do queijo coalho exposto ao ozônio.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Geração do ozônio através do processo corona (Adaptado de GUZEL-SEYDIM <i>et al.</i> , 2004).....	17
--	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	OBJETIVOS.....	12
	2.1 Geral:	12
	2.2 Específicos:.....	12
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
	3.1 Queijo coalho.....	13
	3.2. Qualidade microbiológica do queijo	13
	3.2.1 Microrganismos indicadores de qualidade	14
	3.3 Parâmetros químicos do queijo	16
	3.4 Ozônio	16
	3.4.1 Processo de geração do ozônio.....	17
	3.4.2 Segurança no uso do gás ozônio.....	18
	3.4.3 Efeito antimicrobiano do ozônio	18
	3.4.4 Fatores que afetam a ação antimicrobiana do ozônio.....	19
	3.4.5 Aplicação do ozônio no processamento de alimentos.....	19
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
	4.1 Amostragem	22
	4.2 Preparação dos meios de culturas.....	22
	4.3 Preparo das amostras e tratamento com gás ozônio	22
	4.4 Preparação das amostras frescas para análises microbiológicas	22
	4.5 Metodologia para análises microbiológicas	23
	4.5.1 Pesquisas de Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	23
	4.5.2 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> em placa.....	23
	4.5.3 Pesquisas de <i>Salmonella</i> spp	23
	4.5.4 Pesquisas de Bolores e Leveduras	24
	4.6 Análises bromatológicas.....	24
	4.7 Análise Estatística	24
5.	RESULTADOS	26
6.	DISCUSSÃO.....	32
7.	CONCLUSÕES.....	35
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

A qualidade dos alimentos é um fator primordial na indústria alimentícia mundial, pois deve cumprir as normas técnicas para a segurança alimentar. Apesar da legislação brasileira estabelecer que o leite utilizado na fabricação de queijos deva ser submetido à pasteurização ou a tratamento térmico equivalente, ainda há fabricação de queijo de forma artesanal ou com falhas no processo industrial.

As bactérias, bolores e leveduras são os microrganismos de maior destaque como agentes potenciais de deterioração e como eventuais patógenos ao homem. Em qualquer tipo de processamento industrial ou artesanal a manutenção das condições higiênico-sanitária é um requisito essencial. Sabe-se que a carga microbiana contaminante do produto final é a somatória dos microrganismos presentes na matéria-prima e aqueles que se agregam ao produto ao longo das várias etapas do processo.

Dentre os organismos que podem participar de processos de formação de biofilmes e gerar problemas de saúde pública, destacam-se: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

O desafio que as queijarias artesanais enfrentam é o desenvolvimento de tecnologia de controle da contaminação no processamento dos produtos. Há necessidade de utilização de processos que propiciem segurança microbiológica na produção e ocorra mínimas alterações físico-químicas nos queijos. As tecnologias de conservação não devem agredir o meio ambiente e não causar alterações indesejáveis nos produtos. Dentre estas tecnologias para conservação, destaca-se o processo de ozonização.

O ozônio (O₃) é um agente antimicrobiano, com a reatividade elevada e decomposição espontânea em produtos não tóxicos. A aplicação de ozônio tem sido avaliada em diversos produtos cárneos, derivados lácteos, aves, peixes, frutas e vegetais, e os resultados obtidos nas pesquisas afirmam que ocorre aumento da vida de prateleira dos produtos.

Na área de alimentos, poucas pesquisas têm sido realizadas e ainda não existe legislação específica que oriente aplicações nesta área, embora seja eficiente e considerado mais seguro que os sanitizantes tradicionais utilizados pela indústria alimentícia, pois não deixa resíduos capazes de alterar as características organolépticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade do queijo coalho bovino submetido a atmosfera modificada pelo gás ozônio, a uma concentração de 6,0 ppm em diferentes tempos de exposição.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da aplicação direta de ozônio em tempos diferentes;

Verificar o efeito da ozonização sobre os principais componentes do queijo;

Avaliar o nível de redução de microrganismos contaminantes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Queijo coalho

O queijo de coalho é aquele que se obtém pela coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, sendo comercializado normalmente com até dez dias de fabricação (BRASIL, 2001).

Apesar da legislação brasileira estabelecer que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou a tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996), em 85% dos casos, o leite utilizado na elaboração deste queijo não é pasteurizado (NASSU *et al.*, 2001), o que representa um risco em potencial para o consumidor devido à possibilidade de veiculação de microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp. e *S. aureus* e microrganismos do grupo coliforme. Outro fator agravante é o fato do queijo coalho ser, na maioria das vezes, consumido cru, ou seja, sem nenhum tratamento químico ou térmico (DUARTE *et al.*, 2005).

Atualmente, em função do grande consumo, já existe legislação nacional específica, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (RTIQ), o qual estabelece os padrões de identidade e os requisitos mínimos de qualidade que o queijo coalho deve cumprir para ser destinado ao consumo humano (FREITAS FILHO *et al.*, 2009).

3.2 Qualidade microbiológica do queijo

Os queijos que contêm microrganismos desejáveis são aqueles que contribuem positivamente para o desenvolvimento das características organolépticas do produto. Entretanto, alguns microrganismos indesejáveis podem estar contidos, estes são chamados de deteriorantes e/ou patogênicos, os quais exercem um efeito negativo na qualidade sensorial do produto e podendo, em alguns casos, provocar doenças. A contaminação microbiana de queijos possui um importante impacto socioeconômico (CARVALHO, 2014).

3.2.1 Microrganismos indicadores de qualidade

Os principais bioindicadores de contaminação em queijos, incluem as bactérias do grupo coliformes, bactérias patogênicas como *S. aureus*, *Salmonella* spp. e, ainda, leveduras e alguns bolores. A presença desses microrganismos no alimento está relacionada à má qualidade da matéria-prima e adoção de técnicas higiênicas inadequadas, que comprometem a segurança do produto final (CARVALHO, 2014).

3.2.1.1 Coliformes

Coliformes são um grupo de bacilos Gram-negativos, da família Enterobacteriaceae, móveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos fermentadoras de lactose e sacarose a 35-37 °C produzindo ácido, gás e aldeído, entre 24-48 horas. São também oxidase-negativo e não esporulados (PEREIRA, 2003). Nesse grupo de bactérias incluem-se os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, e encontram-se coliformes termotolerantes e coliformes fecais que podem crescer a 45 °C. Os termotolerantes distinguem-se coliformes fecais pelo fato destes ocorrerem na vegetação e solo, e *E. coli* decorrer em grande número, exclusivamente tanto no trato digestivo como nas fezes dos humanos e animais (FORSYTHE, 2013).

O padrão permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, conforme Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, para coliformes fecais é de $5,0 \times 10^2$ UFC/g para os queijos. Apesar de não estar estabelecido limite máximo de coliformes totais pelos órgãos competentes estes microrganismos são considerados indicadores de qualidade sanitária.

3.2.1.2 *Staphylococcus coagulase positivo*

São bactérias do gênero *Staphylococcus*, cocos Gram-positivos da família Micrococcaceae. São facultativas anaeróbicas, com maior crescimento sob condições aeróbicas, sob o qual produzem catalase. Os estafilococos são mesófilos com a temperatura ótima de desenvolvimento entre 35 a 40 °C e temperaturas extremas de 7 a 47.8 °C. Entre 10 a 46 °C, formam enterotoxinas e temperatura ótima situada aos 35 °C. Os surtos de intoxicação alimentar são provocados por alimentos que permanecem neste intervalo de temperatura por tempo variável (SILVA *et al.*, 2007).

O padrão permitido pela ANVISA, conforme Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, para *Staphylococcus* coagulase positiva é de $5,0 \times 10^2$ UFC/g para os queijos de coalho.

3.2.1.3 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos Gram-negativos não produtores de esporos e são anaeróbios facultativos. O pH ótimo para o seu crescimento fica próximo de 7,0 e a temperatura ideal para sua multiplicação é 35-37 °C, sendo a mínima de 5 °C e a máxima de 47 °C (FRANCO *et al.*, 1996).

A *Salmonella* é normalmente, encontrada no trato intestinal de animais domésticos e selvagens, especialmente, aves e répteis, tem como principais veículos de disseminação alimentos e a água (FRANCO *et al.*, 1996).

A presença de *Salmonella* em queijos pode ocorrer durante a fabricação, pela manipulação de portador com hábitos de higiene inadequados, ou pela utilização de matéria prima contaminada em processos anteriores à elaboração do produto (PERESI *et al.*, 2001).

A ANVISA, conforme Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, determina ausência de *Salmonella* em 25 g do produto.

3.2.1.4 Bolores e leveduras

Os bolores e leveduras são, em sua maioria, originários do solo ou do ar e constituem um grande grupo de microrganismos, sendo, os bolores extremamente versáteis e capazes de assimilar qualquer fonte de carbono derivada de alimentos, enquanto as leveduras, são mais exigentes que os bolores, sendo incapazes de assimilar nitrato e carboidratos (SILVA, 2010).

Os bolores são formados por filamentos denominados hifas, que, em conjunto, formam o micélio. O micélio é o responsável pelo aspecto seco, compacto, aveludado, gelatinoso e com várias colorações que são características das colônias formadas. Já as leveduras são definidas como fungos cuja forma predominante é unicelular. Elas podem ser esféricas, ovóides, cilíndricas ou triangulares e algumas são bastante alongadas formando filamentos semelhantes às hifas dos bolores. A presença de fungos filamentosos (bolores) e leveduras viáveis em números elevado podem indicar deficientes condições higiênicas de equipamentos, falhas no processamento e/ou armazenamento, além de produzir micotoxinas (LIMA, 2014).

Na legislação brasileira não há limites de bolores e leveduras para os queijos minas frescal, coalho, colonial, tipo minas e requeijão marajoara (BRASIL, 2001).

3.3 Parâmetros químicos do queijo

Os principais fatores que determinam a composição do queijo são as proporções relativas de água, gordura, proteínas e minerais, a natureza e extensão da fermentação, sendo influenciadas pela tecnologia de fabricação (BRASIL, 1996).

Tabela 1 - Índices de qualidade do queijo coalho, segundo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Produtos Lácteos

Índice	Após a salga
% de umidade	36 – 60
% de proteína total	20 – 26
% de lipídios totais	35 – 60

Fonte: Magalhães, L.S. (2019)

3.4 Ozônio

O gás ozônio foi descoberto em 1839, por Schonbein que estudava a decomposição eletrolítica da água. É uma molécula instável formada pela adição de um átomo de oxigênio na molécula diatômica de oxigênio. A instabilidade molecular facilita a liberação de um átomo de oxigênio, de forma que o ozônio age como poderoso oxidante e agente antimicrobiano (LAPOLLI *et al.*, 2003).

O ozônio tem uma meia-vida maior no estado gasoso do que em solução aquosa. Apresenta rápida degradação em água sendo ainda mais rápida quando em soluções impuras, ou seja, aquelas que contem duas ou mais substâncias diferentes (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004).

A ação do ozônio foi evidenciada na aplicação como desinfetante no tratamento de água, e outros modos de utilização vem sendo estudados ao longo do tempo para descontaminar outros utensílios, locais onde necessite de cuidados antimicrobianos. No entanto, a aplicação

do ozônio no processamento de alimentos é relativamente recente, sendo necessário o aprimoramento desta tecnologia (LAPOLLI *et al.*, 2003).

3.4.1 Processo de geração do ozônio

O ozônio pode ser produzido por três técnicas: exposição do O_2 à luz ultravioleta, eletrólise do ácido perclórico e descarga elétrica. A técnica mais importante comercialmente é por descarga elétrica, conhecida como efeito corona, pois gera uma quantidade maior de ozônio com menor custo (SILVA *et al.*, 2011). Nesse método, o ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre os dois eletrodos, um de alta tensão e outro de baixa tensão, submetidos a uma elevada diferença de potencial elétrico de, aproximadamente, 10.000 V (GONÇALVES *et al.*, 2011).

Quando os elétrons possuem energia suficiente para dissociar a molécula de oxigênio, começam a ocorrer colisões, que causam a dissociação do oxigênio e a consequente formação do ozônio (USEPA, 1999), (Figura 1).

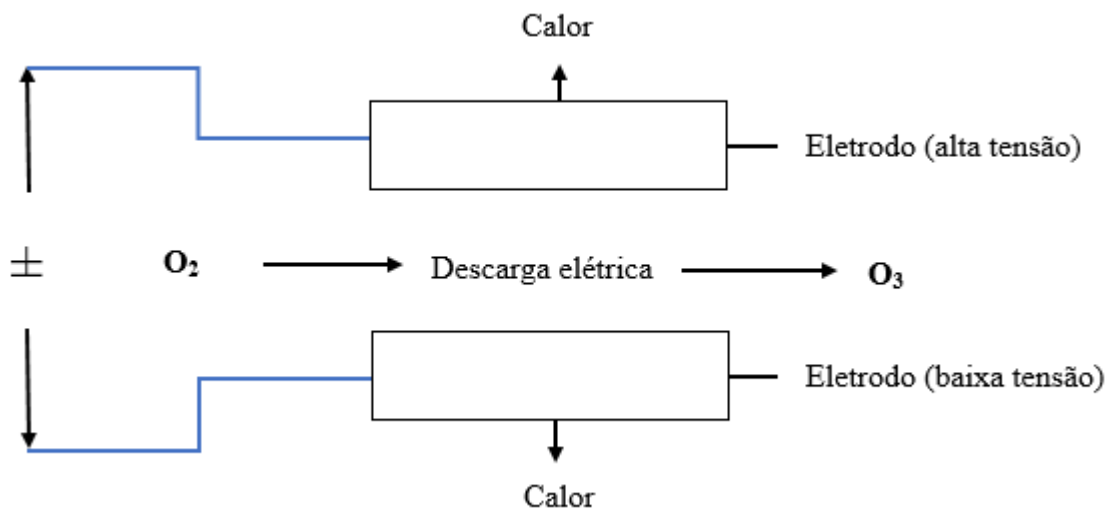


Figura 1 - Geração do ozônio através do processo corona
Fonte: Adaptado de Guzel-Seydim *et al.* (2004)

3.4.2 Segurança no uso do gás ozônio

A toxicidade do ozônio varia com a sua concentração e a duração da exposição. Tem alta ação oxidante e pode causar doenças graves e até a morte aos animais, plantas e organismos vivos se inalado em quantidade elevada. Os sinais de toxicidade são acentuados, irritação no nariz e garganta que podem surgir imediatamente após contato com o gás à concentração de 0,1 ppm. Perda de visão pode surgir após três a seis horas de exposição em concentrações de 0,1 a 0,5 ppm além de cefaleia, angina no peito, tosse e garganta seca. Maiores níveis de ozônio (5-10 ppm) podem causar aumento do pulso e edema pulmonar (PIRANI, 2011).

Tabela 2 - Níveis apropriados de aplicação do ozônio

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

Fonte: Adaptado de Pirani (2011)

3.4.3 Efeito antimicrobiano do ozônio

O ozônio inativa uma diversidade de bactérias, incluindo Gram-negativas e Gram-positivas, células vegetativas e formas esporuladas e esporos fúngicos, sendo utilizado em concentrações relativamente baixas e pouco tempo de contato (PIRANI, 2011).

A inativação das bactérias pelo ozônio é um processo complexo, que age sobre componentes celulares, incluindo proteínas, lipídios insaturados e enzimas respiratórias nas membranas celulares, peptidoglicanos dos envelopes celulares, enzimas e ácidos nucleicos no citoplasma e cápsulas virais. Alguns pesquisadores enfatizam que o ozônio molecular é o principal inativador de microrganismos, enquanto outros afirmam que a atividade antimicrobiana é realizada pelos subprodutos de decomposição do ozônio tais como $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2$ e HO_3 (PIRANI, 2011).

A oxidação e inativação pelo ozônio são rápidas, sendo alvo da oxidação a membrana celular, além de agir na atividade enzimática das bactérias. Existem dados que evidenciam a

ação do ozônio sobre as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos da *E. coli* (LAPOLLI *et al.*, 2003).

3.4.4 Fatores que afetam a ação antimicrobiana do ozônio

A ação do ozônio como antimicrobiano pode ser afetada de acordo com alguns parâmetros como a temperatura, umidade, aditivos e quantidade de matéria orgânica (PIRANI, 2011).

Segundo Silva *et al.* (2011), desvantagem da utilização de ozônio como desinfetante é a sua instabilidade. O grande desafio é prever como o ozônio reage com a matéria orgânica; o gás pode oxidar o composto, ou espontaneamente, decompor-se em oxigênio e radicais livres. Os mecanismos de decomposição do ozônio são processos complexos, que dependem de fatores como os tipos de radicais formados em solução e o tipo de matéria orgânica presente. Portanto, é difícil generalizar que uma dada concentração particular de ozônio num determinado percentual será efetiva para inibição dos microrganismos presentes nos produtos alimentícios (LANGLAIS *et al.*, 1991).

A presença de substâncias orgânicas pode competir com os microrganismos pela interação com o ozônio. Os vírus e as bactérias associadas à matéria orgânica, resíduos celulares, ou fezes são resistentes ao ozônio, mas os vírus purificados são prontamente inativados (PIRANI, 2011).

3.4.5 Aplicação do ozônio no processamento de alimentos

A utilização do ozônio nos processos da indústria de alimentos vem crescendo ao longo dos anos, uma vez que tem gerado resultados positivos. São exemplos de aplicações a ozonização na lavagem de alimentos, nas embalagens e equipamentos (PIRANI, 2011).

Selma *et al.* (2007) avaliaram a eficiência da aplicação de ozônio na inativação de *Shigella sonnei* em alface. Os resultados mostraram que para um minuto de contato a 1,6 e 2,2 ppm de ozônio, a população de *S. sonnei* inoculada em água, diminuiu de 3,7 e 5,6 log UFC/mL, respectivamente.

Lanita *et al.* (2008) evidenciaram bom desempenho no controle de bolores e leveduras durante o processo de maturação de queijo parmesão com a aplicação de ozônio na

concentração de 0,03 ppm em câmara mantida a 11 °C e umidade relativa entre 80 - 85% por 60 dias.

Tiwari *et al.* (2012) citaram a ação do ozônio como ferramenta de desinfecção em frutas e legumes (alface, maçã, coentro, cenoura, melão, batata, mirtilo, aipo e pepino). O principal propósito da ozonização de frutas e legumes, além da inativação de microrganismos patogênicos e deteriorantes, é a destruição de resíduos de pesticida e de outros produtos químicos.

O uso da ozonização na cadeia da carne também pode ser na fase gasosa ou aquosa (POHLMAN, 2012). Castillo (2003) avaliou o impacto da lavagem de carcaças com *spray* de água ozonizada comparando com água não ozonizada. As carcaças foram contaminadas com *E. coli* e *S. typhimurium*.

Kim *et al.* (2000) analisaram a eficiência da aplicação em meio aquoso do ozônio, do peróxido de hidrogênio e do ácido ascórbico em solução salina sobre files de peixes. Em todos os três tratamentos os resultados foram positivos, aumentando o tempo de prateleira, com pequenas alterações na rancidez oxidativa e na cor. No tratamento com ozônio ocorreu um aumento de 25% do tempo de prateleira.

A oxidação da superfície dos alimentos pode ocorrer devido as aplicações de altas concentrações do gás, resultando na descoloração e alterando o sabor e odor. As alterações nos atributos sensoriais ou físico-químicos dependem da composição química do alimento, da dosagem do ozônio e condições do ambiente (KIM *et al.*, 1999).

Güzel-Seydim *et al.* (2004) estudaram o uso de água ozonizada a 10 °C, como técnica de limpeza prévia de superfície metálica comum em equipamentos da indústria de laticínios, comparando com a limpeza convencional, que é feita com água aquecida a 40 °C. As taxas de remoção foram de 84% dos resíduos de leite pela água ozonizada, enquanto a água morna removeu 51%.

Pesquisas com ozônio na indústria de leite foram realizadas por Greene *et al.* (1993), o qual compararam a efetividade da água ozonizada com um sanitizante clorado para desinfecção de superfícies de metal contaminadas com leite UHT inoculado com colônias de *Pseudomonas fluorescens* e *Alcaligenes faecalis*, e concluíram que ambos os tratamentos tiveram alta eficiência, com 99% de redução da microbiota.

A utilização do gás ozônio sobre o leite fluido produz redução nas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos enterocetérias, psicotróficos, *S. aureus*, bolores e leveduras foi observado durante dez minutos, ocorrendo uma significativa redução destes

microrganismos. A partir da aplicação por 15 minutos houve reduções mais significativas das bactérias (COUTO *et al.*, 2016).

Utilizando 5, 10 e 15 minutos, Sheelamary *et al.* (2011) estudaram os efeitos da ozonização sobre a população de *L. monocytogenes* em amostras de leite e observaram que a partir de dez minutos o efeito antimicrobiano do ozônio foi eficiente, pois, houve eliminação total do microrganismo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

No período entre julho e dezembro de 2018, foram realizadas quatro coletas de amostras de queijo coalho artesanal em quatro feiras municipais da cidade de Manaus-AM. Foram coletadas três amostras com peso de 250 g/amostra, por banca de venda, totalizando nove amostras por feira.

As amostras foram adquiridas, acondicionadas, identificadas e transportadas em caixa isotérmica com gelo reciclável até ao Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana para as análises microbiológicas e ao Laboratório de Tecnologia do Pescado I para análises bromatológicas e mantidas sob refrigeração 8 °C até o momento da análise.

4.2 Preparação dos meios de culturas

Os meios de culturas foram preparados obedecendo as instruções do fabricante quanto às proporções e esterilização. Para os plaqueamentos foram utilizadas placas de Petri estéreis descartáveis.

4.3 Preparo das amostras e tratamento com gás ozônio

Foram utilizadas as amostras dos queijos coalho pesando 250 g, devidamente identificadas com o nome da feira e a banca, as amostras foram acondicionadas em bandejas de isopor e alocados dentro de uma caixa de isopor com vedação, na qual foi conectada com gerador de ozônio modelo OP 32 fabricada pela empresa Interozone do Brasil.

As amostras foram submetidas ao gás ozônio com concentração de 6,0 ppm, com período de exposição diferenciado, sendo os tempos de 3 horas e 6 horas. Após atingir o tempo determinado, foram retiradas as amostras devidamente identificadas com o tempo de exposição e posteriormente foram realizadas as análises microbiológicas e bromatológicas.

4.4 Preparação das amostras frescas para análises microbiológicas

Foi utilizada faca e pinça esterilizada para retirar 25 g de cada amostra de 250 g de queijo e transferidos para um Erlenmeyer, onde foram adicionados 225 mL de solvente água

peptonada 0,1% e feito uma homogeneização obtendo-se assim a diluição inicial do queijo, destas foram preparadas as diluições sucessivas 10^{-1} a 10^{-3} .

4.5 Metodologia para análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram efetuadas conforme a Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011.

4.5.1 Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

A pesquisa de coliformes totais e *E. coli* foi realizada a partir das diluições sucessivas de 10^{-1} a 10^{-3} em meio de cultura ágar biliar vermelho violeta (VRB) para coliformes totais e ágar eosina azul metileno (EMB) para *E. coli*. As colônias de coliformes totais tipicamente são roxas avermelhadas com ou sem uma zona de precipitados ao redor da colônia. As colônias de *E. coli* tipicamente apresentam um centro preto e normalmente têm um brilho verde metálico, foram semeados em placas incubadas a 37 °C/48 h. Após incubação, foram contadas as unidades formadoras de colônias, selecionando as placas que continham entre 25 a 250 colônias.

4.5.2 Contagem de *Staphylococcus aureus*

A pesquisa de *Staphylococcus* foi realizada a partir das diluições sucessivas de 10^{-1} a 10^{-3} em meio de cultura ágar manitol, foi semeado em placas incubadas a 37 °C/48 h. As colônias de *S. aureus* produzem um crescimento exuberante de colônias amarelas com possível halo amarelo ao redor da colônia. Após incubação, foram contadas as unidades formadoras de colônias de *S. aureus* selecionando as placas que continham entre 25 a 250 colônias.

4.5.3 Contagem de *Salmonella* spp.

Para *Salmonella* spp. foi realizado o pré enriquecimento de 25 g de amostra em 225 mL de água peptonada a 1% (incubação a 36 °C/16-20 h), enriquecimento seletivo em 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (41 °C/24-30 h) e 9 mL de caldo Selenito Cistina (41 °C/24-30 h) sendo suspeitos os caldos turvos após o tempo de incubação, sendo isolado em ágar Salmonella-Shiguella (SS) e ágar verde brilhante. As colônias suspeitas no meio (SS) para *Salmonella* spp. positivas para a presença de H₂S, produzem colônias com centros pretos e no

meio Ágar Verde Brilhante produz colônias opacas branco-rosadas circundadas por um meio vermelho brilhante. Foram selecionadas cinco por amostras para os testes de identificação bioquímica pelo TSI, LIA e SIM. O resultado foi expresso como: ausência ou presença de *Salmonella* spp. em 25 g.

4.5.4 Contagem de bolores e leveduras

A pesquisa de bolores e leveduras foi realizada a partir das diluições sucessivas de 10^{-1} a 10^{-2} em meio de cultura ágar batata glicose (BDA) 2% acidificado com ácido tartárico 10% para cada 100 mL de meio, foi semeado em placas incubadas a 25 °C/2-7 dias. Após incubação, foram contadas as unidades formadoras de colônias, selecionando as placas que continham entre 25 a 250 colônias.

4.6 Análises bromatológicas

As amostras de 100 g de queijo coalho foram submetidas ao processo de liofilização para analisar o teor de umidade e matéria seca, após o processo, foram raladas até obtenção de tamanhos homogêneos antes de serem submetidas às análises seguintes.

Para as análises de proteína bruta foi utilizado o método Kjeldahl, lipídeos totais pelo método Bligh & Dyer, cinzas por método de resíduos por incineração e teores de cloreto pelo método de Mohr, metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.7 Análise estatística

Nas análises microbiológicas o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com esquema fatorial 3x4 com três repetições. Os valores foram submetidos ao fator de correção e calculada a média aritmética para a obtenção da quantidade de UFC/g. Os valores foram posteriormente transformados em Log para normalização e submetidos a análise de variância com auxílio do programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011) onde as médias significativas foram submetidas ao Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

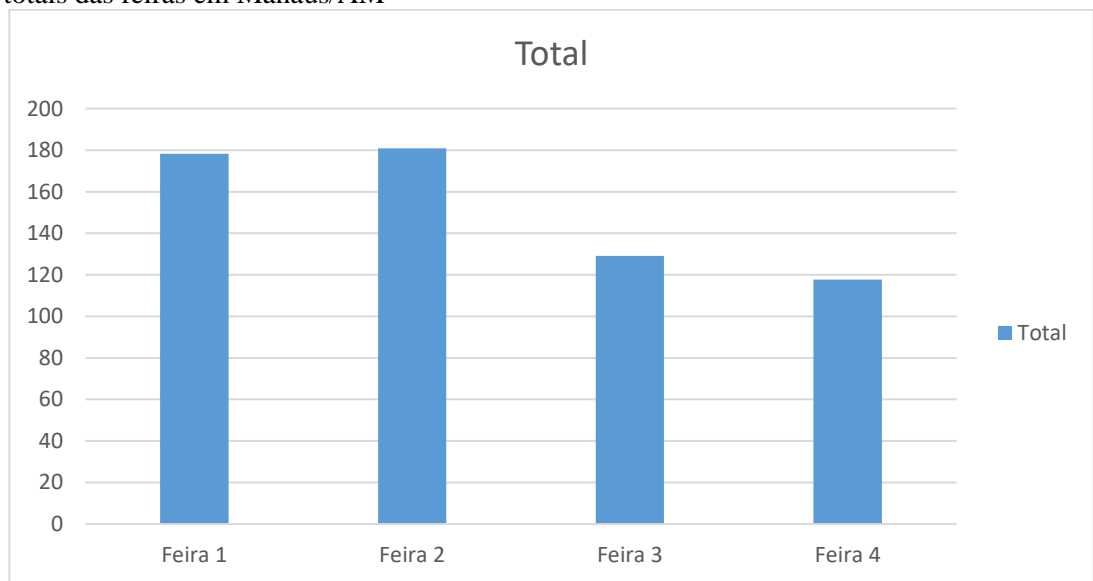
Para as análises físico-químicas foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial 3x6 com três repetições. Os valores foram transformados em decimais e calculada a média aritmética para obtenção da quantidade em g. Os valores foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa SISVAR 5.6

(FERREIRA, 2011), onde as médias significativas foram submetidas ao Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS

Os valores registrados nas análises microbiológicas das amostras de queijo coalho coletadas em feiras municipais da cidade de Manaus apresentaram altos níveis de contaminação, variando de acordo com os tipos de bactérias como demonstrado nos gráficos a seguir.

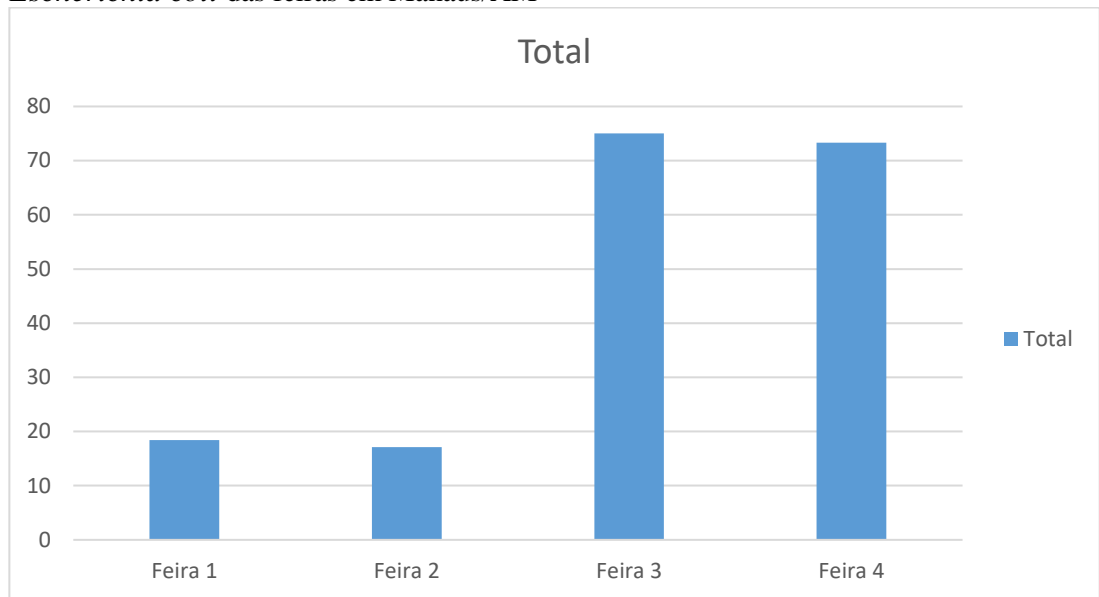
Gráfico 1 - Médias da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g) para coliformes totais das feiras em Manaus/AM



Fonte: Magalhães, L.S. (2018)

Neste gráfico 1 nota-se que as feiras 1 e 2 foram os locais de coleta das amostras que tiveram o maior nível de contaminação por coliformes totais e a feira 4, com a menor contagem desta bactéria.

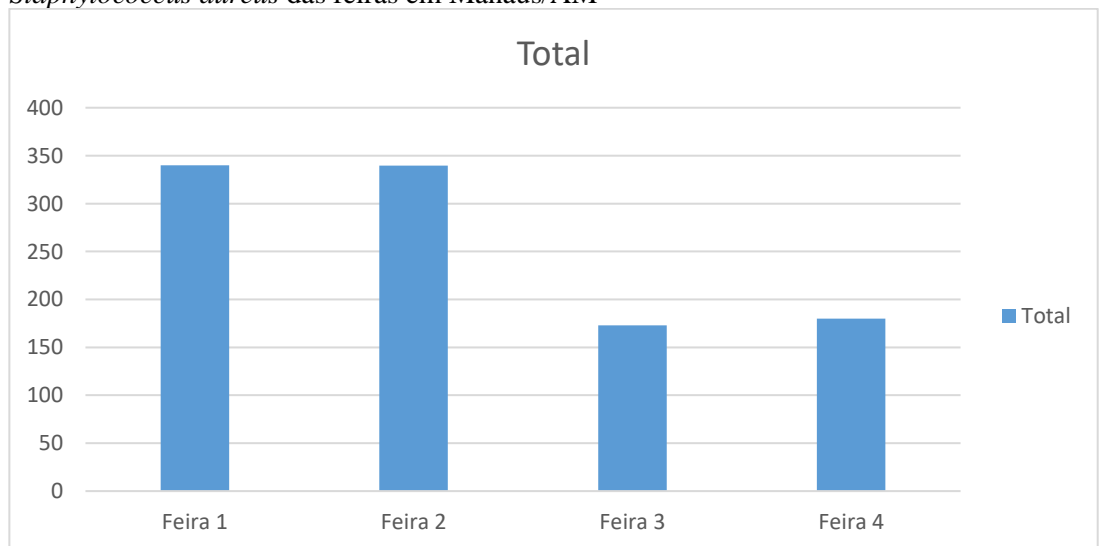
Gráfico 2 - Médias da contagem de unidade formadora de colônias (UFC/g) para *Escherichia coli* das feiras em Manaus/AM



Fonte: Magalhães, L.S. (2018)

O gráfico 2 demonstra os níveis de contaminação por *E. coli* e pode-se observar que as feiras 3 e 4 tem maiores valores na contagem dessa bactéria enquanto as feiras 1 e 2 tem níveis menores de contaminação.

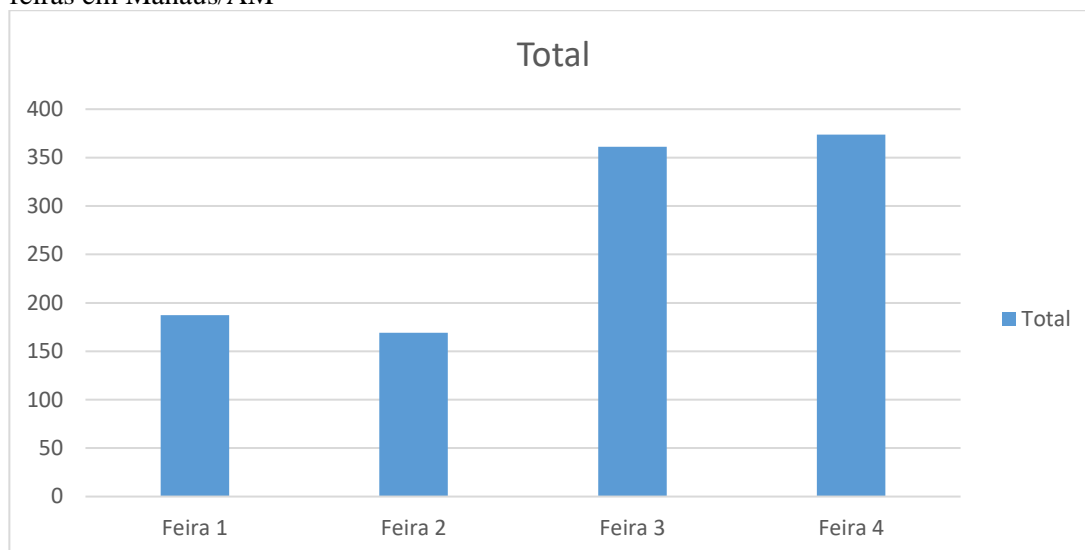
Gráfico 3 - Médias da contagem de unidade formadora de colônias (UFC/g) para *Staphylococcus aureus* das feiras em Manaus/AM



Fonte: Magalhães, L.S. (2018)

Neste gráfico 3 observou-se grande diferença quanto a contagem de *S. aureus*, pois as feiras 1 e 2 apresentaram expressiva contaminação por essa bactéria, enquanto nas feiras 3 e 4 houve contaminação, porém numa proporção menor em relação às outras.

Gráfico 4 - Médias da contagem de unidade formadora de colônias (UFC/g) para fungos das feiras em Manaus/AM



Fonte: Magalhães, L.S. (2018)

No gráfico 4 representa os valores de contaminação por fungos e as feiras 1 e 2 apresentaram as menores médias nas contagens em relação às feiras 3 e 4.

As amostras de queijo coalho foram submetidas a exposição do gás ozônio e analisadas subsequentemente quanto à qualidade microbiológica e características bromatológicas.

De acordo com a análise estatística, houve variação significativa ($p > 0,05$) na redução da contagem de *S. aureus*, coliformes totais e fungos, em decorrência da interação concentração do ozônio e período de exposição do gás (Tabela 3). Entretanto, as interações entre esse binômio foram mais significativas no período de exposição mais longo que foi durante 6 horas.

O tempo de exposição do queijo não foi significativo para *E. coli*, apesar da redução quando submetido ao tratamento com o gás ozônio em relação ao controle.

A redução mais expressiva dentre os contaminantes foram os fungos, pois ocorreu redução significativa nos dois períodos em relação aos demais.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada e houve redução dos níveis de contaminação, porém ainda ocorreu a presença no tempo de 3 horas de exposição ao gás em algumas amostras de queijo. Mas durante o tempo de 6 horas *Salmonella* spp. foi ausente, evidenciando efeito positivo para a eliminação deste contaminante.

Tabela 3 - Médias dos valores de unidade formadora de colônia (UFC/g) em queijo coalho quando exposto ao gás ozônio (6 ppm)

Tratamentos		UFC/g	p-valor
Controle		1,88 x 10 ⁶ c	0,00*
3 horas		3,07 x 10 ⁵ b	
6 horas		8,57 x 10 ⁴ a	
Microrganismos			
<i>Staphylococcus aureus</i>		1,18 x 10 ⁶ bc	0,0005*
Coliformes totais		5,97 x 10 ⁵ c	
<i>Escherichia coli</i>		2,72 x 10 ⁵ a	
Bolores e leveduras		9,86 x 10 ⁵ ab	
Microrganismos x Tratamentos			0,0323**
Coliformes totais	6 horas	6,25 x 10 ⁴ a	0,0468**
	3 horas	2,13 x 10 ⁵ ab	
	Controle	1,52 x 10 ⁶ b	
<i>Escherichia coli</i>	6 horas	3,67 x 10 ⁴ a	0,00*
	3 horas	7,45 x 10 ⁴ b	
	Controle	7,06 x 10 ⁵ b	
Bolores e leveduras	6 horas	1,75 x 10 ⁴ a	0,00*
	3 horas	2,11 x 10 ⁵ b	
	Controle	2,73 x 10 ⁶ c	
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 horas	2,26 x 10 ⁵ a	0,00*
	3 horas	7,28 x 10 ⁵ b	
	Controle	2,58 x 10 ⁶ b	
Tratamentos x Microrganismos			0,0323**
3 horas	Coliformes totais	2,13 x 10 ⁵ a	0,2339 ^{ns}
	<i>Escherichia coli</i>	7,45 x 10 ⁴ a	
	Bolores e leveduras	2,11 x 10 ⁵ a	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	7,28 x 10 ⁵ a	
6 horas	Coliformes totais	6,25 x 10 ⁴ c	0,00*
	<i>Escherichia coli</i>	3,67 x 10 ⁴ ab	
	Bolores e leveduras	1,75 x 10 ⁴ a	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,26 x 10 ⁵ bc	
Controle	Coliformes totais	1,52 x 10 ⁶ a	0,5423 ^{ns}
	<i>Escherichia coli</i>	7,06 x 10 ⁵ a	
	Bolores e leveduras	2,73 x 10 ⁶ a	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,58 x 10 ⁶ a	
CV (%)		28,84	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey. *Efeito significativo ($p < 0,01$); **Efeito significativo ($p < 0,05$); ns - não significativo; CV – Coeficiente de variação

Fonte: Magalhães, L.S. (2018)

Os valores da tabela 3 demonstram que no tempo de 6 horas, a redução dos contaminantes são significativos estatisticamente entre os tempos de exposição.

As amostras controles do queijo coalho possuem valores altos em relação às demais amostras submetidas aos tratamentos com o gás ozônio. Dessa forma, evidenciando a similaridade dos níveis de contaminação, pois não diferem entre si.

De acordo com a análise estatística para os valores bromatológicos não houve variação significativa ($p < 0,05$) em decorrência da interação do gás ozônio com as amostras de queijo coalho, exceto para valores de proteína (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias dos valores bromatológicos do queijo coalho exposto ao gás ozônio (6 ppm)

Tratamento x Composição		(%)	0,0827^{ns}
Controle	Cinzas	3,45	0,7785 ^{ns}
3 horas		3,19	
6 horas		3,87	
Controle	Cloreto	1,95	0,9844 ^{ns}
3 horas		1,92	
6 horas		1,78	
Controle	Lipídios	40,27	0,3381 ^{ns}
3 horas		39,89	
6 horas		38,89	
Controle	Matéria seca	59,32	0,3975 ^{ns}
3 horas		58,18	
6 horas		58,18	
Controle	Proteína bruta	26,10 a	0,0066*
3 horas		29,21 b	
6 horas		27,85 ab	
Controle	Umidade	40,68	0,1933 ^{ns}
3 horas		41,82	
6 horas		42,42	
CV (%)		8,26	p-valor

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey. *Efeito significativo ($p < 0,01$); ns – não significativo; CV – coeficiente de variação
Fonte: Magalhães, L.S. (2018)

Pode-se observar na tabela 4 que a alteração significativa ocorreu nos níveis de proteínas bruta das amostras quando comparadas nos diferentes tempos de exposição ao gás ozônio. Enquanto os outros componentes mantiveram-se estáveis com mínimas variações sem mudanças nos níveis em relação às amostras controle.

Nas cinzas não houve diferença significativa de minerais, apesar de que cada amostra de queijo é oriunda de locais e matéria prima distintas, estatisticamente não ocorreu mudanças em relação aos tratamentos.

A matéria seca manteve-se em quantidade compatível em relação à umidade da amostra, notando-se que o teor de umidade é elevado seguindo o padrão de identidade do queijo coalho e sem alterações significativas quanto à exposição ao gás ozônio.

Os teores de cloreto apesar de não ter uma mudança significativa nos níveis pode-se observar que houve uma mínima alteração.

A proteína e lipídios são os principais componentes do leite e conseqüentemente para a produção de queijos, pois tem a sua importância no valor nutricional do alimento a ser consumido por humanos. É notar que não houve a redução destes componentes quando submetidos ao tratamento, é um ponto positivo para o uso da tecnologia com o gás ozônio. Contudo, notou-se um aumento de proteína em consequência da proteína microbiana, devido a alta carga de contaminação.

De modo geral, os parâmetros químicos não tiveram indício de que reagem de forma negativa quando o queijo coalho foi exposto ao tratamento com o gás. Observando os valores dos níveis dos componentes percebe-se que seguem dentro dos padrões do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos.

6 DISCUSSÃO

Foi investigada a incidência de coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e fungos, em 36 amostras de queijos artesanais comercializados na cidade de Manaus. Todas foram submetidas às análises microbiológicas e observado contaminação em todas as amostras coletadas.

Estudos têm reportado a ocorrência de microrganismos patogênicos e deterioradores em números que excedem no queijo coalho. Nas quais destacam-se as bactérias pesquisadas neste trabalho, evidenciando a problemática nos queijos artesanais (MENESES *et al.*, 2012).

A grande maioria dos municípios do estado do Amazonas produtores de leite fabrica o queijo coalho de forma artesanal. Embora a legislação que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho estabeleça que o leite a ser utilizado deva ser submetido a pasteurização ou tratamento térmico equivalente, ainda é encontrado queijo coalho produzido com leite cru. Além disso, por se tratar de produto altamente manipulado torna-se viável a contaminação por microrganismos e bactérias potencialmente patogênicas (BRASIL, 2001).

O transporte do queijo para os outros municípios, inclusive para Manaus é feito por via fluvial e/ou terrestre à temperatura ambiente, e o que ocorre muitas vezes na fase de comercialização do produto que fica exposto nas feiras e mercados da cidade em condições de higiene insatisfatória, expondo a população em risco de intoxicação alimentar (OPAS/OMS, 2009).

Todas as amostras coletadas neste trabalho estavam fora dos padrões permitidos pela ANVISA, portanto impróprio para o consumo humano. A contaminação de queijo coalho principalmente nos artesanais, em níveis superiores ao permitido pela legislação, também foi observada em outros trabalhos (RUVÉR *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2017; SANTIAGO *et al.*, 2019).

Contudo, os queijos apesar de não possuírem selo de certificação por órgão competente, estes estavam sendo comercializados normalmente em feiras da cidade de Manaus. Nota-se a necessidade da conscientização e através de políticas públicas proporcionar capacitação aos produtores.

Os alimentos podem conter uma ampla variedade e quantidade de microrganismos que devem interferir na vida de prateleira ou causar doenças (SILVA *et al.*, 2010). Desse modo, destaca-se a importância de boas práticas e tecnologias desenvolvidas para combater e reduzir

os níveis de contaminação para que esteja dentro dos limites permitidos pela ANVISA e ser um alimento sem riscos à saúde humana.

Os resultados obtidos demonstraram que o ozônio é capaz de reduzir a contagem de coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e fungos. Entretanto, *S. aureus* se mostraram mais resistentes à ação do ozônio e *Salmonella* spp. estava presente em algumas amostras no período de 3 horas de exposição ao ozônio, porém no período de 6 horas estava ausente.

A composição e estrutura do queijo coalho pode ter afetado a eficácia do gás ozônio como agente antimicrobiano. Alguns trabalhos comprovam o efeito positivo do gás ozônio na inativação de microrganismos, tais como fungos, bactérias e vírus (NASCIMENTO *et al.*, 2003; VEIGA, 2003; GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004). Dentre as bactérias já pesquisadas e sensíveis ao gás ozônio, podem ser destacadas *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Salmonella* spp., *S. aureus* (LEZCANO *et al.*, 2001; TALBOT *et al.*, 2012; SUNG *et al.*, 2014).

O ozônio atua inicialmente na membrana celular, sendo a superfície da célula o primeiro alvo a ser atacado. Sua ação é decorrente da oxidação de glicolipídeos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular, alterando a permeabilidade e causando a rápida lise (SILVEIRA, 2004). A inativação de microrganismos pela ozonização depende da concentração de ozônio, do tempo de aplicação e dos microrganismos envolvidos (SILVA *et al.*, 2011). Cada microrganismo apresenta uma sensibilidade inerente ao ozônio, sendo as bactérias mais sensíveis as Gram-negativas em relação às Gram-positivas (PASCUAL *et al.*, 2007).

Nesse trabalho foi confirmada a sensibilidade de bactérias Gram-negativas ao ozônio em comparação às Gram-positivas. As reduções nas contagens de *E. coli*, coliformes totais foram maiores que as reduções de *S. aureus*, enquanto a *Salmonella* spp. teve eliminação completa no tratamento de 6 horas. É possível que a maior sensibilidade das bactérias Gram-negativas esteja associada à diferença na estrutura da parede celular, sendo mais suscetíveis ao rompimento mecânico, enquanto as Gram-positivas são constituídas por várias camadas de peptidoglicano que formam uma estrutura mais rígida (TORTORA, 2012).

Outro fator que pode ter afetado a eficácia do gás ozônio foi a estrutura dimensional do queijo coalho. Não há pesquisas semelhantes em relação ao uso do gás ozônio para conservação do queijo com intuito de redução de bactérias. Mas houveram trabalhos que foi utilizado o gás em alimentos, mas a área analisada foi a parte externa (CASTILLO, 2003; SELMA *et al.*, 2007; LANITA *et al.*, 2008; TIWARI *et al.*, 2012; POHLMAN, 2012).

O queijo coalho artesanal analisado neste trabalho teve altos índices de contaminação, os microrganismos indesejados poderiam estar contidos na área interna do queijo. O tempo de ação do gás ozônio não foi suficiente para a eliminação completa, pois observamos a gradual

redução da contagem de bactérias e também o fator dimensional pode ter impedido a penetração total do gás. Além disso, pode ser considerado a concentração do gás um fator que possa ter limitado a potencialidade de ação e penetração do gás na estrutura do queijo analisado.

A composição do queijo coalho pode ter interferido na eficácia do gás ozônio. Há trabalhos que indicam a baixa eficiência do gás pela interferência de compostos orgânicos. Segundo Couto *et al.* (2016), foi avaliado o efeito do gás ozônio sobre *S. aureus* que é uma bactéria Gram-positiva, em leite integral homogeneizado e em leite desnatado, nas concentrações de 34,7 e 44,8 mg/L por até 25 min, e o resultado foi a baixa eficiência do gás e interferência da gordura do leite.

No processo de ozonização, a natureza dos compostos orgânicos presentes no meio determinará a reatividade do gás. Compostos com grupos funcionais específicos, como anéis aromáticos e hidrocarbonetos insaturados, são propensos ao ataque do gás ozônio, enquanto outros como hidrocarbonetos saturados, álcoois e aldeídos, são considerados resistentes.

Portanto, a composição química do meio determina a reatividade potencial do ozônio. Assim pode-se também relacionar a menor redução da contagem das bactérias à rápida decomposição do ozônio.

As reduções das contagens de fungos foram expressivas, podendo ser considerado um potencial antifúngico para aplicação em alimentos. Outros trabalhos relatam o efeito positivo na eliminação de fungos e bolores em alimentos (LANITA *et al.*, 2008).

As características bromatológicas das amostras do queijo coalho não foram alteradas em decorrência do processo de ozonização na concentração 6,0 ppm, nos tempos de 3 horas e 6 horas. Resultados semelhantes foram obtidos em pesquisas realizadas por Santos (2013), uma vez que as análises não apresentaram alterações significativas nos parâmetros do leite cru que foi submetido à ozonização a uma concentração de 3 mg/L por 0,75 min e 1,5 min. O uso do gás ozônio em conservação de filé de peixe, apresentou pequena mudança na rancidez oxidativa e na cor. As alterações nos atributos sensoriais ou físico-químicos dependem da composição química do alimento, da dosagem do ozônio e condições do ambiente (KIM *et al.*, 1999).

7 CONCLUSÕES

A ocorrência de microrganismos contaminantes no queijo coalho artesanal comercializado em feiras municipais em Manaus é alta, indicou que há risco de possível intoxicação alimentar.

A eficiência do gás ozônio no controle de microrganismos indicadores da qualidade higiênica e sanitária como *Salmonella* spp. está diretamente relacionada com o tempo de exposição do queijo ao gás.

A maior resistência ao gás ozônio demonstrada por *S. aureus* indicou que o tipo de bactéria Gram-positiva pode ser eliminada de modo mais demorado.

A utilização do gás ozônio em queijo coalho artesanal não afetou as características do padrão de qualidade exigido pela legislação.

O aumento do tempo de exposição do queijo à concentração de 6 ppm do gás ozônio deve ser avaliada quanto à possibilidades de alteração físico-química e na redução de UFC's de microrganismos.

8 REFERÊNCIAS

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Portaria nº 146**, de 7 de março de 1996. Diário Oficial da União. Brasília, 11 mar. 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Instrução Normativa nº 30**, de 26 de junho de 2001. Diário Oficial da União. Brasília, 16 jul. 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Instrução Normativa nº 62**, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União.

CASTILLO, A. Ozone treatment for reduction of *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella* serotype *typhimurium* on beef carcass surfaces, **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 5, p. 775-779, 2003.

COUTO, E.P. *et al.* Efeito da ozonização sobre a contagem da *Staphylococcus aureus* inoculado em leite. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 1911-1918, 2016.

DUARTE, D.A.M. *et al.* Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, p. 297-302, 2005.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. United Kingdon, Wiley-Blackwell, 2º ed., p.496, 2013.

LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Doenças microbianas de origem alimentar provocadas por enteropatógenos. **Revista de Ciências Farmaceuticas**, v. 17, p. 77-113, 1996.

FREITAS FILHO, J.R. *et al.* Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 6, n. 8, p. 35-49, 2009.

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

GONÇALVES, A.A.; KECHINSKI, C.P. Ozone Technology in the Food Industry. *In*: SIEGLER, B.C. Food Engineering. New York. Ed: **Nova Science Pub**, 2011, cap. 2, p. 85-146.

GUZEL-SEYDIM, Z.B.; GREENE, A.K.; SEYDIM, A.C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 37, n. 4, p. 453-460, 2004.

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

KIM, T.J. *et al.* Influence of ozone, hydrogen peroxide, or salt on microbial profile, TBARS and color of channel catfish fillets. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1210-1213, 2000.

LANITA, C.S.; SILVA, S.B. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 3, p. 182-189, 2008.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D.A.; BRINK, D.R. Ozone in water treatment: Application and engineering. Chelsea: **AWWARF and Lewis Publishers**, 1991. 568 p.

LAPOLLI, F.R. *et al.* Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. *In*: GONÇALVES, R.F. (Coord.) Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: Aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica. Vitória: **PROSAB**, 2003. p. 169-208.

LEZCANO, I. *et al.* Ozone inactivation of microorganisms in water: Gram positive bacteria and yeast. **Ozone: science & engineering**, v. 23, n. 2, p. 183-187, 2001.

MAGALHÃES, L.S. *et al.* Análises de coliformes em queijo coalho comercializado em Manaus-AM. **Scientia Amazonia**, v. 8, n. 2, p. RP1-RP5, 2019.

MENESES, R.B. *et al.* Comércio de queijo coalho na orla de Salvador, Bahia: Trabalho infantil e segurança de alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 381-392, 2012.

NASCIMENTO, M.S. *et al.* Effect of different disinfection treatments on the natural microbiota of lettuce. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1697-1700, 2003.

NASSU, R.T. *et al.* Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará. **Higiene alimentar**, v. 15, n. 89, p. 28-36, 2001.

OPAS/OMS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Guias para o gerenciamento dos riscos sanitários em alimentos. Rio de Janeiro: **Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doença**, 2009.

PASCUAL, A.; LLORCA, I.; CANUT, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. S29-S35, 2007.

PEREIRA, M.T.C.; RIBEIRO, S.C.A.; CARVALHO, S.F.M. Revisão sobre o uso do ozônio no tratamento da mastite bovina e melhoria da qualidade do leite. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 2, p. 109-114, 2003.

PERESI, J.T.M. Queijo minas tipo frescal artesanal e industrial: Qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene alimentar**, v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.

PIRANI, S.M.G. **Application of ozone in food industries**. 2011. 133 f. Tese (Doutorado em Nutrição Animal e Segurança Alimentar) - Programa de Nutrição Animal e Segurança Alimentar, Università degli Studi di Milano, Milão, Itália, 2011.

POHLMAN, F.W. Ozone in meat processing. *In: O'DONNELL, C.P. et al. Ozone in Food Processing*, 1ª ed., Blackwell Publishing, 2012.

RUVER, C.M.; MOURA, J.F.; GONÇALVES, M.J.F. Surtos de doenças transmitidas por alimentos em Manaus, Amazonas (2005-2009): O problema do queijo coalho. **Revista Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2 p. 60-66, 2011.

SÃO PAULO. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 5. ed. São Paulo, 2008.

SANTOS, A.J.P. **Avaliação da utilização de ozônio como método de beneficiamento de leite**. 2013. 46 f. Monografia (Curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013.

SELMA, M.V. *et al.* Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in shredded lettuce and water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 492-499, 2007.

SHEELAMARY, M.; MUTHUKUMAR, M. Effectiveness of ozone in inactivating *Listeria monocytogenes* from milk samples. **World Journal Young Researchers**, v. 1, n. 3, 40, 2011.

SILVA, S.A.; FURTADO, S.C.; VARGAS, B.L. Avaliação microbiológica do queijo coalho produzido com leite pasteurizado sob refrigeração. **Revista Nanbiquara**, v. 6, v1 – jan/jun, 2017.

SILVA, P.H.C. **Leite produzido e beneficiado no Distrito Federal e região entorno: Adequação às normas estabelecidas pela Instrução Normativa nº 51**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010.

SILVA, S.B. *et al.* Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 659-682, 2011.

SILVEIRA, I.C.T. **Cloro e ozônio aplicados a desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em DAPHNIA SIMILIS**. 2004. 173 f. Tese (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SUNG, H.J. *et al.* Combination effect of ozone and heat treatments for the inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 147-153, 2014.

TIWARI, B.K. *et al.* Ozone in fruit and vegetable processing. *In: O'DONNELL, C.P. et al. Ozone in Food Processing*, 1ª ed., Blackwell Publishing, 2012.

TALBOT, P. *et al.* Ozone inactivation of resistant microorganisms: Laboratory analysis and evaluation of the efficiency of plants. **Water Research**, v. 46, n. 18, p. 5893-5903, 2012.

VEIGA, S.M.O.M. **Sanificação de carcaças de frango: processos alternativos**. 2003. 291 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual**. 1999. Disponível em: <https://goo.gl/C9XBp47>. Acesso em: 20 nov. 2017.