CAROLINA DOS ANJOS

Fotoinativação de patógenos no leite experimentalmente contaminado

São Paulo
2016

CAROLINA DOS ANJOS

Fotoinativação de patógenos no leite experimentalmente contaminado

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Clínica Veterinária da Faculdade
de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de Concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3391
FMVZ

Anjos, Carolina dos
Fotoinativação de patógenos no leite experimentalmente contaminado / Carolina dos
Anjos. -- 2016.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani.

1. *Escherichia coli*. 2. *Mycobacterium fortuitum*. 3. *Listeria monocytogenes*. 4. Luz azul.
5. *Staphylococcus aureus*. I. Título.

São Paulo, 8th September 2016

CERTIFIED

We certify that the Research "Photoinactivation of pathogenes in experimentally contaminated milk", protocol number CEUAX 9579180816, under the responsibility Fabio Celidonio Pogliani, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day September 01, 2016.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Fotoinativação de patógenos no leite experimentalmente contaminado", protocolado sob o CEUAX nº 9579180816, sob a responsabilidade de Fabio Celidonio Pogliani, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 01 de setembro de 2016.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ANJOS, Carolina dos

Título: Fotoinativação de patógenos no leite experimentalmente contaminado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Cristina**, *in memoriam*, que me acompanha onde quer que eu esteja.

Ao meu pai, **Roberto**, exemplo de homem trabalhador e honesto, meu herói.

À minha irmã, **Fernanda**, minha amiga, minha mãe, meu alicerce e minha maior incentivadora.

Aos sobrinhos, **Manuela** e **Daniel**, por toda a alegria que me dão, por todo amor que tenho por vocês.

À minha avó **Zuleica**, minha tia **Lídia** e meu cunhado **Marcus**, por todo o carinho que sempre tiveram por mim, sei que torceram muito por isso.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Ao Profº. Drº. **Fabio Celidonio Pogliani**, meu orientador, pela oportunidade a mim concedida, pela confiança. Agradeço por todo incentivo, paciência, pelas palavras sábias e tranquilas que muito me ajudaram.

Ao **Fábio Parra Sellera**, por ter me apresentado ao mundo da PDT, por todo o incentivo e insistência, que possibilitaram a execução desse trabalho. Esteve sempre a postos para me ajudar durante a idealização deste trabalho, vibrando comigo a cada resultado.

Ao **Caetano Padial Sabino**, pela ajuda essencial em todas as fases de desenvolvimento deste trabalho, atentamente presente sempre que precisei. Agradeço toda paciência, ensinamentos, ideias compartilhadas, dedicação, preparo dos equipamentos, correções, protocolos e torcida. Sou muito grata por tudo.

Ao Profº. Drº. **Nilton Lincopan**, que abriu as portas do seu laboratório a nossa equipe. Agradeço a confiança, e todo o tempo despendido ao me ensinar com toda a paciência, e por toda ajuda. Toda a minha admiração pelo excelente trabalho que exerce.

À Profª. Drª. **Martha Simões Ribeiro**, que sempre recebe tão bem a nossa equipe. Sua ajuda é engrandecedora e nos acrescenta muito. Muito obrigada por tudo.

Ao Profº. Drº. **Maurício da Silva Baptista**, por ter acreditado no nosso trabalho e por ter proporcionado todo apoio, que possibilitou a execução do experimento.

À Profª. Drª. **Evelise de Oliveira Telles**, que acreditou na nossa ideia e prontamente nos ajudou. Seu apoio foi fundamental.

Ao **Ronaldo Gomes Gargano**, por ser grande companheiro na troca de conhecimento clínicos e a quem tenho muita admiração, por todos os seus ideais em compartilhar o conhecimento médico veterinário. Por todos os bons momentos, boas risadas e boa trilha sonora.

À **Bruna Stanigher Barbosa**, que compartilhou comigo momentos de alegrias e sufocos, mas sobretudo por ter permitido que aprendêssemos juntas mais sobre a neonatologia em bezerros. Por todos os momentos de boas risadas e fraternidade que tivemos juntas.

À **Edlen Medeiros** que esteve presente com a equipe durante o período do meu mestrado, por toda a ajuda, trabalho pesado e risadas compartilhadas.

À **equipe do LAB 240** (Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas), por toda a paciência que tiveram comigo durante as longas horas de utilização do laboratório, por todo o companheirismo, por tudo o que me ensinaram e por todo o apoio, além é claro dos momentos bons que compartilhamos. Muito orgulho de vocês e dos excelentes trabalhos que produzem.

À **Equipe Della Libera e Equipe Gregory**, vizinhos de sala, que sempre me socorreram nos momentos de dúvidas, que me deram boas sugestões e com quem sempre compartilho boas gargalhadas. Minha profunda gratidão.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica: Prof^a. Dr^a. **Alice Maria Melville Paiva Della Libera**, Prof^o. Dr^o. **Archivaldo Reche Junior**, Prof^a. Dr^a. **Carla Bargi Belli**, Prof^o. Dr^o. **Carlos Eduardo Larsson**, Prof^a. Dr^a. **Denise Saretta Schwartz**, Prof^o. Dr^o. **Enrico Lippi Ortolani**, Prof^o. Dr^o. **Fernando José Benesi**, Prof^a. Dr^a. **Lílian Gregory**, Prof^a. Dr^a. **Márcia de Oliveira Sampaio Gomes**, Prof^a. Dr^a. **Marcia Mery Kogika**, Prof^a. Dr^a. **Maria Cláudia Araripe Sucupira**, Prof^a. Dr^a. **Maria Helena Matiko Akao Larsson**, Prof^a. Dr^a. **Mitika Kuribayashi Hagiwara**, Prof^a. Dr^a. **Raquel Yvonne Arantes Baccarin**, Prof^a. Dr^a. **Silvia Regina Ricci**, Prof^a. Dr^a. **Viviani Gomes** e Prof^o. Dr^o. **Wilson Roberto Fernandes**, à vocês toda a minha admiração e gratidão.

Aos **Pós-graduandos da FMVZ**, por dividirem experiências profissionais e momentos que nos renderam boas risadas. Sucesso à todos.

Aos funcionários da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes- CBPR, **Luiz Cosmo Rodrigues** (Luizinho), **Edson Diogo** (Sr. Edson), **Francisco Antônio de Souza** (Sr^o. Francisco) e **Edilson Duque de Souza** (Duque) pelo bom convívio e por toda ajuda durante experimentos da equipe.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Veterinária, em especial a **Clara Mori, Edna Santana, Cláudia Regina Stricagnolo e Adelaide Borges** que sempre estiveram dispostas a sanar minhas dúvidas e me ajudar.

Aos **residentes e aprimorandos** da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes - CBPR dos anos de 2015 e 2016: **Adriano Macedo Debiazzi, Deisiane Soares Murta Nobre, Isabelle Joanny de Oliveira, Pedro Rubens Bernardino Müller, Raquel Grden Szinvelski, Karinne Ávila Bosco e Marcus Vinícius Diniz**, pela troca de conhecimentos, pelo companheirismo e pelas boas risadas.

À Prof^a **Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto**, Prof^o **João Paulo Elsen Saut** e Prof^o **Geison Morel Nogueira**, meus antigos e eternos orientadores. Vocês foram essenciais no caminho trilhado até aqui, foram meus motivadores, à vocês toda a minha admiração.

Ao amigo **Bruno Toledo Silva**, que há anos me acompanha e me apoia, estando por perto ou distante geograficamente. Sou muito grata a tudo o que faz por mim, por toda a ajuda e toda a amizade. Agradeço por estar sempre por perto nos momentos de glória ou perrengues. Minha vida em São Paulo foi muito mais divertida com sua companhia e do **Jefferson Lopes**.

Às amigas **Fernanda Tiagas, Taís Esposte, Layane Queiroz Magalhães, Bruna de Souza Teixeira, Lágila Martins e Sylvia Novo** que mesmo à distância se fizeram estar perto. Obrigada por me aguentarem e por sempre me motivarem.

Agradeço aos **animais**, que independentemente de não terem sido alvo direto desde projeto, meu amor à eles me fizeram chegar até aqui e me incentivam a cobiçar o adiante.

Agradeço à **Minha Família**, por todo o amor incondicional que tenho por eles. São os alicerces que me permitem edificar todas as realizações que almejo. Agradeço a educação que me deram e o exemplo que são para mim.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP**, que por meio do Projeto temático: "Fotossensibilização nas ciências da vida" Auxílio FAPESP: 2012/50680-5 sob responsabilidade do Prof^o Dr^o Mauricio da Silva

Baptista Instituto de Química/USP, custeou todos os gastos desse projeto.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço principalmente a Deus por ter permitido conhecer, conviver e aprender e com todos os supramencionados.

Muito obrigada!

“Nossa maior fraqueza é a desistência. O caminho mais certo para o sucesso é sempre tentar apenas uma vez mais.”

Thomas Alva Edison

RESUMO

ANJOS, C. dos. **Fotoinativação de patógenos no leite experimentalmente contaminado**. [Photoinactivation of pathogens in the experimentally contaminated milk]. 2016. 76 f. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A produção de leite e de seus derivados lácteos geram grande impacto no setor agroindustrial. Classificado como um dos alimentos mais completos, o leite é rico em nutrientes essenciais ao crescimento e à manutenção de uma vida saudável. Em contrapartida, os constituintes do leite propiciam excelente meio de cultura para o desenvolvimento de microrganismos, desde o momento da ordenha até a chegada ao consumidor final. Neste contexto, estudos acerca de novas alternativas que auxiliem no controle da qualidade do leite são essenciais. A fotoinativação com luz azul tem surgido como uma alternativa antimicrobiana em potencial na indústria alimentícia, pois exerce atividade antimicrobiana intrínseca, sem o envolvimento de substâncias fotossensibilizadoras exógenas. O objetivo deste estudo foi determinar a efetividade da fotoinativação por luz azul (LED azul, $\lambda = 410 \pm 15$ nm, 100 mW) sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium fortuitum* suspensos em leite integral UHT e solução PBS. Os resultados demonstraram a fotoinativação de todas as cepas empregadas no estudo pela luz azul, em tempos distintos, independentemente do meio utilizado, isto é, *M. fortuitum*, *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* apresentaram cinética de fotoinativação diferentes entre si, quando suspensos no leite ou no PBS ($p < 0,0001$). O fator de resistência R foi menor que 1 ($R < 1$) em meio leite, sendo 0,82, 0,78, 0,88 e 0,81 para *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *M. fortuitum*, nesta ordem, apresentando-se, portanto, mais sensíveis à luz azul nos tempos iniciais e ocorrendo fotoinativação em maior proporção neste período. Quando suspensos em PBS, à semelhança do meio leite, *L. monocytogenes* e *E. coli*, apresentaram valor de $R < 1$ (0,87 e 0,81, respectivamente), ao passo que *S. aureus* e *M. fortuitum* apresentaram $R > 1$, isto é, 1,06 e 1,46, respectivamente, demonstrando maior resistência à fotoinativação nos períodos iniciais e tornando-se mais sensíveis conforme o tempo de irradiação progredia. Concluiu-se que a luz azul foi capaz de fotoinativar, *in vitro*, cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *M. fortuitum*, suspensas em PBS e

em leite integral UHT. A fotoinativação com luz azul apresenta caráter inovador, sendo uma alternativa potencialmente promissora no controle da contaminação por microrganismos na indústria láctea.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. *Mycobacterium fortuitum*. *Listeria monocytogenes*.
Luz azul. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

ANJOS, C. dos. **Photoinactivation of pathogens in the experimentally contaminated milk** [Fotoinativação de patógenos no leite experimentalmente contaminado]. 2016. 76 f. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The production of milk and its dairy products have great impact on the agro-industrial sector. Considered as one of the most complete foods, milk is full of essential nutrients required for growth and maintenance of a healthy life. On the other hand, the composition of milk makes it an excellent growth medium for many microorganisms, from the moment of milking to its arrival to the final consumer. In this context, studies toward the search for new alternatives are essential for milk quality improvement. The photoinactivation by blue light has emerged as an alternative antimicrobial approach in the food industry due to its intrinsic antimicrobial properties without the involvement of exogenous photosensitizers. The aim of this study was to assess the effectiveness of blue light photoinactivation (blue LED, $\lambda = 410 \pm 15$ nm, 100 mW) on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium fortuitum* strains suspended in UHT whole milk and PBS medium. All used strains were successfully photoinactivated by the blue light, at different moments, regardless of the medium used, i.e., *M. fortuitum*, *S. aureus*, *E. coli* and *L. monocytogenes* presented different photoinactivation kinetics when suspended in the UHT whole milk or PBS ($p < 0.0001$). The resistance R factor was less than 1 ($R < 1$) in milk medium, with 0.82, 0.78, 0.88 and 0.81 for *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *M. fortuitum*, respectively, meaning that the strains were most sensitive to blue light in the initial times, when the photoinactivation was higher. When suspended in PBS, as occurred in the milk medium, *L. monocytogenes* and *E. coli* presented $R < 1$ (0.87 and 0.81, respectively), whereas *S. aureus* and *M. fortuitum* demonstrated $R > 1$, i.e., 1.06 and 1.46, respectively, indicating higher photoinactivation resistance in the initial stages and higher sensibility as the irradiation time progressed. We concluded that blue light promoted *in vitro* photoinactivation of the strains of *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *M. fortuitum*, suspended in PBS and UHT whole milk. The photoinactivation by blue light presents an innovative approach and a promising and exciting alternative for

microbial contamination control in dairy industry.

Key-words: Blue Light. *Escherichia coli*. *Listeria monocytogenes*. *Mycobacterium fortuitum*. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituição, tempos e parâmetros de irradiação dos diferentes microrganismos avaliados.....	46
Tabela 2 - Média do tempo de inativação e erro padrão referentes à dose letal para 90% (LD90), fator de resistência R e valor do coeficiente de determinação (R2)	55
Tabela 3 - Valores de dose letal (LD) estimados à partir do melhor valor ajustado para LD90	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Terapia de luz – <i>Finsen Medical Light Institute</i> (FMLI) 1897. Fotos do Museu de Medicina da Universidade de Copenhagen.....	37
Figura 2 -	Lesões de lúpus vulgaris curada após um ano de helioterapia. Fotografias do Museu de História Médica da unidade da Universidade de Melbourne.....	38
Figura 3 -	Emissão espectral do LED azul utilizado no experimento.....	42
Figura 4 -	Esquema utilizado para irradiação dos microrganismos, utilizando fonte de luz (LED azul, $\lambda=413\text{nm} \pm 20$, 314mW, diâmetro de 3,14 cm, irradiância de $100\text{mw}/\text{cm}^2$)	43
Figura 5 -	Esquema ilustrativo da sequência de preparo das amostras a serem irradiadas.....	45
Figura 6 -	Ilustração da sequência de diluição seriada realizada nas amostra.....	47
Figura 7 -	Placa de Petri apresentando a diluição seriada das colônias de <i>M. fortuitum</i> do grupo controle	48
Figura 8 -	Placa de Petri apresentando diluição seriada das colônias de <i>M. fortuitum</i> do grupo irradiado, representando a marcação para a contagem de colônias	49
Figura 9 -	Placas de Petri apresentando colônias de <i>M. fortuitum</i> suspensas em leite e semeadas a partir de diferentes diluições, demonstrando a redução de UFC após diferentes tempos de irradiação com luz azul: (a) controle, 0 min; (b) 7 min; (c) 14 min; (d) 21 min; (e) 28 min	54
Gráfico 1 -	Cinética de inativação para as diferentes cepas bacterianas em função do tempo de irradiação e do meio. (a) <i>S. aureus</i> ; (b) <i>E. coli</i> ; (c) <i>L. monocytogenes</i> ; (d) <i>M. fortuitum</i>	56
Gráfico 2 -	Cinéticas de inativação combinadas	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área
aBLT	<i>antimicrobial blue light therapy</i> – Terapia antimicrobiana com luz azul
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BHI	<i>Brain heart infusion</i> – Infusão de cérebro e coração
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium. tuberculosis</i>
DE	Densidade de energia
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FMLI	<i>Finsen Medical Light Institute</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
h	Hora
i	Percentual de inativação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB	Instituto de ciências biológicas
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LD ₉₀	Dose letal para redução de 90% da carga microbiana
LD _{99,9}	Dose letal para redução de 3 log ₁₀
LD ₁₀₀	Dose letal estimada para esterilização da amostra
LED	Light emitting diode - Diodo emissor de luz
Min	Minutos
MNT	Micobactérias nãotuberculosas
N	Carga microbiana final
N ₀	Carga microbiana inicial
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
P	Potência
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - Solução tamponada fosfatada
PDT	<i>Photodynamic therapy</i> – Terapia Fotodinâmica
PNMQL	Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
R	Fator de resistência
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SP	São Paulo
t	Tempo
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UI	Unidades Internacionais
UHT	<i>Ultra-high temperature</i> – Ultra alta temperatura
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
USP	Universidade de São Paulo

UV	Ultraviolet - Ultra violeta
UVC	short-wavelength ultraviolet light - luz ultravioleta de onda curta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	$x < y$ significa que x é menor que y
=	Igual
>	$x > y$ significa que x é maior que y
±	Mais ou menos
µg	Microgramas
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
g	Gramas
g	Força G
J	Joules
L	Litros
Log	Logarítmo
mA	Miliamperagem
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mW	Miliwatts
mWcm ²	Miliwatts por centímetro quadrado
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
W	Watt
λ	Lambda
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	LEITE.....	23
2.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.1.2	<i>Escherichia coli</i>	28
2.1.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	29
2.1.4	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	31
2.2	FOTOINATIVAÇÃO COM LUZ AZUL	32
2.2.1	Histórico da terapia com luz	33
2.2.2	Luz azul e fotoinativação	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.1.1	Objetivos específicos	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1	MICROORGANISMOS	41
4.2	FONTE DE LUZ.....	42
4.3	PREPARO DO INÓCULO.....	44
4.4	IRRADIAÇÃO	45
4.5	PREPARO DA DILUIÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	46
4.6	CONTAGEM DE COLÔNIAS.....	47
4.7	TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA CONTAGEM	48
5	ANALISE ESTATÍSTICA.....	50
6	RESULTADOS	52
7	DISCUSSÃO	57
8	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de leite e de seus derivados lácteos promovem grande impacto no setor do agronegócio, sendo uma importante fonte geradora de renda, empregos e tributos. Nos últimos anos, o Brasil apresentou aumento gradativo e significativo na produção de leite. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de 2005 à 2014 a produção nacional cresceu 43%, totalizando em 2014 a produção de 35,17 bilhões de litros de leite, com a média da produção de 1.525 litros/vaca/ano.

De acordo com dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture - USDA*), o Brasil é o quinto maior produtor de leite, atrás apenas da União Européia, Índia, Estados Unidos e China. Classificou-se como o segundo país com o maior número de vacas ordenhadas, ficando atrás apenas da Índia, que possui o maior rebanho mundial de bovinos. Realizou, somente no primeiro semestre de 2016, a aquisição de 11,03 bilhões de litros de leite cru pelos estabelecimentos que atuam sob algum tipo de inspeção sanitária federal, estadual ou municipal. A cadeia produtiva do leite desempenha importante papel social, na geração de empregos e renda para a população, sendo, o leite, considerado um dos produtos mais importantes da agropecuária brasileira (IBGE, 2016).

Classificado como um dos alimentos mais completos, o leite é rico em nutrientes essenciais ao crescimento e à manutenção de uma vida saudável, e propicia, por meio de processos industriais, a obtenção de diversos produtos (SANTOS; FONSECA, 2007). Devido à sua importância, consumidores buscam cada vez mais qualidade em seus produtos, o que tem atraído a atenção de toda a cadeia produtiva do leite. Deste modo, a busca por novas tecnologias que contribuam para a qualidade do produto final é essencial (VILELA, 2001).

A qualidade do leite visa tanto seus aspectos físico-químicos, como organolépticos (sabor e odor agradável), ausência de agentes patogênicos, reduzida carga microbiana, baixa contagem de células somáticas e ausência de contaminantes (antibióticos, pesticidas, micotoxinas) (BRESSAN; MARTINS, 2004).

Em virtude da riqueza dos seus constituintes, o leite é um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de diversos microrganismos, que pode ocorrer

desde o momento da ordenha até a chegada ao consumidor final. Por esse motivo, a indústria leiteira passa por período de intensas transformações em sua estrutura e a qualidade do leite é uma das principais exigências que promovem essas mudanças (GUERREIRO et al., 2005).

Sabemos que a qualidade do leite não pode ser melhorada pós-ordenha, apenas mantida, por isso são necessárias medidas preventivas para que a qualidade se mantenha da produção até seu consumo (BRITO; DIAS, 1998; DAMASCENO; BOUNDERMULLER FILHO; RAMOS, 2008). Por conta disso, programas governamentais, juntamente com instituições privadas, têm adotado medidas para a melhoria na qualidade do leite. Torna-se porém, essencial estudos de novas alternativas que poderão ser utilizadas como ferramenta complementares que auxiliem no controle da qualidade do leite.

Nos últimos anos, têm-se desenvolvido estudos que visam estratégias antimicrobianas, entre as quais destacam-se as terapias mediadas por luz, sobretudo a terapia fotodinâmica (*photodynamic therapy* - PDT) (GARCEZ et al., 2015; PANHÓCA et al., 2016; PROCHNOW et al., 2016; SELLERA et al., 2016), irradiação ultravioleta (LEE et al., 2015; MARTIN et al., 2016) e a fotoinativação por luz azul (DAI et al., 2013; AMIN et al., 2016; DURANTINI, 2016), investigadas intensivamente por suas propriedades microbicidas. Dentre as vantagens destas terapias, destaca-se a eficácia em promover a morte de microrganismos, independentemente de seu perfil de resistência a antimicrobianos (WAINWRIGHT, 1998).

A terapia antimicrobiana por luz azul (aBLT - *antimicrobial blue light therapy*), tem atraído a atenção da comunidade científica, devido à sua atividade antimicrobiana intrínseca, sem o envolvimento de fotossensibilizadores exógenos (DAI et al., 2012, 2013). Acredita-se que a luz azul provoca a excitação de porfirinas endógenas no meio intracelular, determinando, portanto, o comportamento destas substâncias como fotossensibilizadores endógenos (HAMBLIN et al., 2004; AMIN et al., 2016). Essa excitação promove a geração de radicais livres, como hidroxilas e os íons superóxido, resultantes da transferência de carga (reação do tipo I), e/ou podem promover a produção de oxigênio singleto via transferência de energia (reação do tipo II), atuando simultaneamente em várias biomoléculas de alta importância às funções celulares, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, e, portanto, apresenta baixo potencial para a seleção de microrganismos resistentes

(CASTANO et al., 2004; HAMBLIN; HASAN 2004).

A utilização de técnicas de fotoinativação microbiana na indústria alimentícia tem despertado grande interesse, por se apresentar como uma alternativa viável, visando a qualidade de produtos alimentícios (GHATE et al., 2013; GHATE et al., 2015a,b; GHATE et al., 2016).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir, será realizada revisão de literatura acerca das características desejadas do leite para consumo humano, bem como dos microrganismos contaminantes utilizados neste estudo.

2.1 LEITE

O leite é definido como um fluido secretado pela glândula mamária de todas as fêmeas de mamíferos para a nutrição de seus descendentes. Além de atender completamente os requisitos nutricionais do recém-nascido, o leite possui diversas funções fisiológicas, dentre elas: transferência de imunidade passiva por imunoglobulinas, hormônios e fatores de crescimento (FOX, 2011).

De maneira mais técnica, leite é definido, de acordo com o Artigo 475 do Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), como: *"Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda."*

Para a nutrição humana, o leite e seus derivados desempenham um papel nutricional importante, particularmente nos primeiros anos de vida, uma vez que fornecem proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais necessários ao desenvolvimento do organismo. Sabe-se que um litro de leite por dia supre todas as necessidades proteicas de crianças com até seis anos de idade e mais de 50% do conteúdo de proteínas requisitado pelos adultos. Em relação ao cálcio, o consumo de um litro de leite diário supre 100% das necessidades diárias deste mineral (FONSECA; SANTOS, 2000).

Devido à sua riqueza nutritiva, o leite constitui-se de excelente meio para o desenvolvimento de diversos microrganismos, que pode ocorrer desde o processo de produção até a chegada ao consumidor final (GUERREIRO et al., 2005). Sabe-se que a presença e multiplicação de microrganismos no leite causam modificações

físico-químicas, limitando a durabilidade e qualidade do produto (SOUZA et al., 1995). Por esse motivo, estas características tornaram-se os temas mais abordados na atualidade, dentro do cenário mundial de produção leiteira (TAFFAREL et al., 2015; MOORBY et al., 2016; VOGES et al., 2016; WERNCKE et al., 2016).

A qualidade do leite que chega à indústria de processamento é determinada pela qualidade do leite que sai da fazenda. Os principais fatores que contribuem para a perda da qualidade do leite são: presença de doenças no rebanho (brucelose, tuberculose, mastite), falta de higiene durante a ordenha, inadequada sanitização dos equipamentos e utensílios de ordenha, má qualidade da água, acondicionamento e transporte em condições de higiene e temperatura inadequada (SANTOS; FONSECA, 2007). Portanto, para que se mantenha a qualidade do leite são necessárias medidas preventivas durante todos os processos da produção (BRITO; DIAS, 1998; DAMASCENO; BOUNDERMULLER FILHO; RAMOS, 2008).

A proteção da saúde humana e preservação das propriedades nutritivas do leite, são determinadas por exigências de qualidade e higiene em toda a cadeia láctea (BRITO; BRITO, 1998). Por esse motivo, a indústria leiteira tem passado por um período de intensas transformações em sua estrutura. A correta adoção de medidas de higiene adequadas na produção, armazenamento e transporte do leite podem prevenir a contaminação, representando grave problema econômico para a indústria láctea (GUERREIRO et al., 2005). Sabe-se que, mesmo após a pasteurização, as enzimas produzidas pelos microrganismos estarão presentes nos produtos lácteos e continuarão a exercer sua ação de degradação dos componentes do leite. Portanto, esforços devem ser empregados para assegurar que o leite que chega a indústria seja de alta qualidade (BRITO; BRITO, 1998).

No ano de 1996, foi criado o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL). Este programa foi lançado pelo Governo Federal em maio de 1998 e regulamentado com a criação da Instrução Normativa 51 (IN51/2002) em 2002, que teve como objetivo fixar os requisitos mínimos que devem ser observados para a produção e qualidade dos diversos tipos de leite produzido no país, dando ao produto padrões de qualidade internacional (BRASIL, 2002).

O cronograma proposto pela IN 51/2002 buscava, dentro do período de seis anos, sair de uma situação de ausência total de limites para um patamar similar ao padrão europeu de contagem de células somáticas (CCS) do leite. Em 2011, houve a substituição pela Instrução Normativa 62 (IN 62/2012), que entrou em vigor em

1º de janeiro de 2012, em resposta às dificuldades ocorridas para implantação da IN 51/2002, estendendo os prazos para os produtores se adequarem aos limites máximos tolerados de contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS). As alterações nos prazos objetivaram a melhor adequação dos produtores de leite à nova legislação (BRASIL, 2011).

Desde a sua regulamentação, a IN 62 (BRASIL, 2011) vem reduzindo gradativamente, o limite padrão de valores aceitáveis na CBT e da CCS para o leite cru. Em julho de 2016, foram adotados os valores $1,0 \times 10^5$ UFC/mL (CBT) microrganismos aeróbios mesófilos e $4,0 \times 10^5$ cél/mL (CCS) para as regiões centro oeste, sul e sudeste, prorrogando a adequação desses valores para as regiões norte e nordeste para primeiro de julho de 2017.

A CCS é uma ferramenta precisa de avaliação da saúde da glândula mamária dos animais, tanto individualmente como de um rebanho. As células somáticas do leite são constituídas de leucócitos, principalmente neutrófilos, e células epiteliais, encontrando-se em elevado número em caso de mastite. Altas CCS resultam em perdas na produção e alterações nos componentes individuais do leite, com comprometimento sobre o rendimento e a qualidade de seus derivados (SANTOS; FONSECA, 2007).

São classificados microrganismos mesófilos, bactérias capazes de se multiplicarem numa faixa de temperatura entre 20 e 45°C, com temperatura ótima de crescimento a 32°C (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Incluindo a maioria dos contaminantes do leite, tanto deterioradores como patógenos, esse importante grupo é considerado bom indicador de qualidade microbiológica, sendo a contagem microbiana em placa realizada para se avaliar as condições higiênicas na qual o produto foi processado. Os microrganismos mesófilos, em termos gerais, predominam em situações em que não há condições básicas de higiene bem como na ausência de refrigeração adequada do leite (JAY, 1996; TEIXEIRA et al., 2000).

Os microrganismos psicrótrófos, mesmo em temperaturas abaixo de 10°C, encontram-se em ambiente favorável para multiplicação, possuindo amplo intervalo de temperatura ótima de crescimento, entre 2°C até, aproximadamente, 30°C, sendo 25°C a temperatura ótima para a maioria das espécies (FERREIRA et al., 2012).

Segundo a IN 62, o leite cru obtido em propriedades rurais, deve ser armazenado em tanque de refrigeração por expansão direta, dimensionado de modo que permita refrigerar o leite até a temperatura igual ou inferior a 4°C no tempo

máximo de 3 h após o término da ordenha (BRASIL, 2011). Esta norma, visa diminuir a multiplicação dos microrganismos mesófilos que causam a acidificação da secreção láctea, entretanto essa não impede a multiplicação dos microrganismos psicotróficos (FAGUNDES et al., 2006).

Estes últimos, quando presentes na matéria prima, provocam diversas alterações no leite e seus derivados, apresentando atividade lipolítica, as quais são predominantes no leite refrigerado. Quanto mais longo o tempo de estocagem sob baixas temperaturas, maiores serão as possibilidades de alterações no produto final (MARTINS et al., 2005).

Normalmente, se as condições higiênicas de produção e armazenamento do leite forem satisfatórias, as lipases bacterianas não apresentarão impacto importante na lipólise do leite antes da pasteurização. No entanto, devido às características destas enzimas resistirem à pasteurização, a sua atividade lipolítica passa a ser importante, principalmente quando a contagem de psicotróficos ultrapassa o intervalo de 10^6 - 10^7 UFC/mL (DOWNEY, 1980).

A aceitação do leite pelo consumidor, depende em grande parte das características sensoriais, tais como cor, sabor e aroma, assim como do seu valor nutricional, características essas que podem ser alteradas pela ação lipolítica e proteolítica de bactérias psicotróficas, diminuindo o tempo de vida de prateleira e a qualidade do leite pasteurizado (MA et al., 2000). Além disso, os níveis de contaminação por microrganismos psicotróficos têm-se tornado séria preocupação em relação à segurança alimentar, visto que, algumas espécies psicotróficas são patogênicas (SHIRAI, 2010).

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus representa um importante patógeno oportunista em humanos e uma das mais importantes espécies patogênicas em medicina veterinária. É considerado uma ameaça por causar efeitos deletérios sobre a saúde animal e por apresentar potencial para a transmissão de animais para humanos e vice-versa (PETON; LE LOIR, 2014).

S. aureus são cocos gram-positivos, que tendem a formar agrupamentos

semelhantes a cachos de uva, por isso a denominação que vem do grego: *staphyle* (cachos de uva) e *kokkos* (grãos ou sementes). Imóveis e não formadores de esporos, coagulase e catalase positiva, anaeróbico facultativo, tolera aerobiose no isolamento microbiano (QUINN et al., 2011). Cresce em uma ampla gama de temperaturas e pH, de 7 a 48,5 ° C, e de 4,2 a 9,3, respectivamente (BALABAN; RASOOLY, 2000).

De distribuição mundial, é comensal da pele de humanos e animais, sendo também encontrados em membranas mucosas do trato respiratório anterior, sistema urinário inferior e trato digestivo, estando presente em cerca de 50% de indivíduos saudáveis (BALABAN; RASOOLY, 2000; WENDLANDT et al., 2013). Possui grande importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos, em decorrência de sua alta prevalência e riscos de contaminação durante o processo de produção de alimentos e presença de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares (ZECCONI; HAHN, 2000).

Representa um dos patógenos mais importantes na bovinocultura de leite, e tem recebido atenção por causar grande impacto econômico. Considerado a principal causa de infecção da glândula mamária de vacas de leite, provoca perdas de produção, aumento da CCS na secreção láctea, gastos com tratamento do animal e descarte do leite (BURVENICH et al., 2003; PETON; LE LOIR, 2014).

A bactéria *S. aureus* é caracterizada pela produção de toxinas, as quais merecem destaque as enterotoxinas estafilocócicas (SE - *Staphylococcal enterotoxins*), que pertencem à família de toxinas pirogênicas. Estas toxinas podem causar choque tóxico e estão comumente associadas com intoxicações alimentares e diversas formas de doenças autoimunes e alergias. Fêmeas bovinas que apresentam mastite por *S. aureus* podem ter essas toxinas liberadas no leite, tornando o produto e seus derivados tóxicos para humanos (BALABAN; RASOOLY, 2000; BENITES; MELVILLE; RIBEIRO, 2016).

O consumo de leite e seus derivados lácteos contaminados com *S. aureus* constituem risco à saúde pública, pois esta bactéria e suas toxinas estão relacionadas com manifestações clínicas localizadas ou sistêmicas em humanos (BENITES; MELVILLE; RIBEIRO, 2016). Tratamentos térmicos do leite, tais como a pasteurização, são capazes de inativar o microrganismo mas não suas toxinas, consideradas estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos, sendo também resistentes à hidrólise por enzimas gástricas e jejunais (BERGDOLL, 1989; JAY,

1994).

Após a ingestão do alimento contaminado, o período de incubação varia de 1 a 6 h. As manifestações clínicas observadas na maioria dos casos inclui náuseas, vômito, contrações abdominais, diarreia, sudorese e cefaleia. A intoxicação geralmente não letal cessa em 1 ou 2 dias, podendo evoluir para quadros mais graves, dependendo da susceptibilidade do indivíduo. (BALABAN; RASOOLY, 2000; BENITES; MELVILLE; RIBEIRO, 2016). A simples presença de amostras toxigênicas de *S. aureus* no leite não implica na ocorrência de intoxicações, porém o risco existe, já que pequenas concentrações de toxinas são suficientes para causar doença em seres humanos, principalmente em crianças (CARDOSO; CARMO; SILVA, 2010).

2.1.2 *Escherichia coli*

A contaminação de alimentos por enteropatógenos é importante causa de diarreia em países em desenvolvimento, resultando em elevadas taxas de morbidade e mortalidade, com perdas econômicas significativas. (MARTINOVIĆ et al., 2016).

A presença de coliformes totais ou fecais em leite bovino é considerado indicador de sanidade, sendo sua presença sugestiva de deficiências de manejo na ordenha (SILVA et al., 2010). Os coliformes totais são compostos por membros da família *Enterobacteriaceae*, que possui como gêneros de importância clínica: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, dentre outros.

Dentro do gênero *Escherichia*, estão inseridas cinco espécies, das quais *Escherichia coli* é a espécie de maior importância clínica (SIQUEIRA et al., 2014). Apresentam-se no formato de cocobacilos gram-negativos, com ou sem cápsula, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, podem produzir hemolisinas e são capazes de fermentar lactose e produzir gás (RIBEIRO; LEITE; SIQUEIRA, 2016).

As diferentes linhagens de *E. coli* são responsáveis por causar diversas afecções, dentre elas destacam-se principalmente distúrbios entéricos, sendo agrupadas em seis patótipos: enterotoxigênicas, enteroinvasoras,

enteropatogênicas, enterohemorrágicas, enteroagregativas e de aderência difusa, subdivididas de acordo com a capacidade de produção de determinadas toxinas de invasão celular ou de manifestação de sintomas clínicos nos homens e animais (GYLES, 1992; RIBEIRO et al., 1999).

Considerado um dos principais indicadores de contaminação de alimentos e da água, está associado a infecções entéricas e extra–entéricas em humanos e animais (SIQUEIRA et al., 2014). A contaminação de alimentos direta ou indiretamente pelas fezes de origem animal, tem sido a maior fonte desses microrganismos. Populações comensais de *E. coli* eliminadas nas fezes dos bovinos representam um reservatório heterogêneo de sorotipos, dos quais alguns podem adquirir verocitotoxigenicidade tornando-se potenciais patógenos para o homem (BETTELHEIM et al., 2005).

Esta espécie é também a causa mais comum de mastite clínica em rebanhos leiteiros bem geridas com baixa contagem de células somáticas (CCS) no leite (BRADLEY; GREEN, 2001).

2.1.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma espécie de bacilo, gram positivo, aeróbio ou anaeróbio facultativo, não formador de esporo e não encapsulado, positivos para catalase e urease, e negativo para oxidase. Pode se multiplicar em ampla faixa de temperatura, entre 1°C e 45°C, móvel quando cultivado a temperatura de 25°C devido à presença de flagelos peritríquios, e imóvel à temperatura de 37°C. Está amplamente disseminado na natureza, com características que viabilizam sua sobrevivência e multiplicação em diferentes condições ambientais (BADER et al., 2016)(No prelo)¹. Sensível à pasteurização, porém resistente a ampla variação de pH (4,3 – 9,6), também é capaz de tolerar concentrações salinas elevadas ($\geq 10\%$) (BEAUREGARD et al., 1997).

Fazem parte do gênero *Listeria* sete espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* e *L. murrayi* (MENDONÇA; AFONSO,

¹ BADER, G.; AL-TARAWNEH, M.; MYERS, J. Review of Prosthetic Joint Infection from *Listeria monocytogenes*. **Surgical Infections**, v.17, 2016.

2016). Somente *L. monocytogenes* é consistentemente de importância, porém infecções ocasionais por *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii* tenham sido relatadas (CHAMBEL et al., 2007).

É um agente patogênico, amplamente vinculado a alimentos, causador da listeriose, doença que acomete humanos e grande variedade de animais (SILVA et al., 2011). A bactéria é transmitida para humanos principalmente por leite cru e derivados não pasteurizados, além de carne bovina e de frango, legumes e verduras contaminadas (KELLS; GILMORE, 2004; LIANOU; SOFOS, 2007; SILVA et al., 2011).

Os alimentos associados com a transmissão da doença, na maioria das vezes, são processados industrialmente e têm vida de prateleira longa em temperatura de refrigeração, e são capazes de permitir a multiplicação de *L. monocytogenes*. Na maioria dos casos, a contaminação nos alimentos ocorre posteriormente ao processamento, por meio de contaminação cruzada com instalações e superfície de trabalho contaminadas (WILKS et al., 2006).

Acredita-se que a capacidade de *L. monocytogenes* se multiplicar em temperatura de refrigeração e em ambientes com baixa atividade de água, medidas comumente utilizadas para o controle da multiplicação de patógenos em alimentos, seja o principal fator contribuinte para a transmissão da doença (MENA et al., 2004). Considerado psicrotrófico, *L. monocytogenes* é capaz de multiplicar-se sob refrigeração, o que torna seu controle um desafio árduo na cadeia de produção de alimentos (KOZAKE et al., 1996).

A listeriose é considerada uma saproozoonose, podendo haver, em algumas situações, transmissão direta e/ou indireta do patógeno de fontes animais, particularmente de ruminantes, para os humanos (MENDONÇA; AFONSO 2016). A bactéria encontra-se presente na microbiota normal de muitos mamíferos, com humanos e animais atuando como reservatório, é encontrada amplamente distribuída na natureza, fato que pode causar a contaminação dos alimentos durante sua produção e distribuição (BOER; BEUMER, 1999).

É considerado microrganismo ubíquo no ambiente de fazenda de gado leiteiro (VILAR et al., 2007; FOX et al., 2009) e vacas de leite podem ser expostas diretamente a *L. monocytogenes* por meio da ingestão de silagem indevidamente fermentada (pH > 5,0) e contaminada antes da ensilagem (FENLON, 1988). Pode também ser encontrada em tanques de expansão, como resultado de contaminação

fecal durante a ordenha (VISSERS et al., 2007).

O risco de desenvolver infecção por *L. monocytogenes*, após a ingestão de produto contaminado é baixo para a população em geral, mas ocorre ocasionalmente (RYSER; DONNELLY, 2001). A maioria dos indivíduos imunocompetentes supera a infecção inicial e elimina *L. monocytogenes* pelas fezes. Em contrapartida, a ingestão de alimentos contaminados por indivíduos que apresentam comprometimento do sistema imunológico, como idosos, gestantes, neonatos, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida ou portadores do vírus da imunodeficiência humana, câncer, cirrose, são considerados grupo de risco (SLUTSKER et al., 1999).

A listeriose pode manifestar-se em duas formas clínicas diferentes: infecção não invasiva limitada ao intestino e infecção invasiva localizada ou sistêmica. Em relação à primeira, é caracterizada como uma gastroenterite febril autolimitada acompanhada de vômitos, diarreia, náusea, vômito, dor de cabeça e mialgia, que se iniciam dentro de 12 a 24 horas após a exposição. A segunda forma é mais grave e compromete principalmente o sistema nervoso central, manifestando-se pelo aparecimento de meningite, encefalite e abscessos ou provocando aborto diagnosticada principalmente em pessoas pertencentes a grupos de risco (ROBERTS; WIEDMANN, 2003).

2.1.4 *Mycobacterium fortuitum*

As micobactérias são microrganismos que apresentam forma bacilar, retos ou ligeiramente curvos, pleomórficos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis e incapazes de formar esporos, conídeos ou cápsulas (COLLINS; GRANGE; YATES, 1997). Apresentam grande variação de tempo de multiplicação dentro do gênero, o que permite dividi-las em micobactérias de crescimento rápido (crescimento visível em menos de sete dias) e em micobactérias de crescimento lento (crescimento visível em mais de sete dias) (IKUTA; FERREIRA NETO, 2016).

Ainda que classificadas como gram-positivas, não são coradas pela coloração de Gram, mas pelos métodos de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun, técnicas que utilizam a carbolfucsina que confere coloração vermelha às micobactérias. Apresentam em sua

parede celular elevado conteúdo de lipídios, cerca de 40% do peso seco das bactérias, responsável pelo estabelecimento de ácido-resistente. Por resistirem ao descoramento com solução álcool-ácido, são denominados “bacilos álcool-ácido resistentes” (BAAR) (ROSEMBERG; TARANTINO, 2002). A composição lipídica da membrana celular restringe a passagem de muitos produtos químicos/drogas através do envelope celular, contribuindo para a resistência deste microrganismo de baixa permeabilidade e resistência incomum (JARLIER; NIKAIDO, 1994; ALDERWICK et al., 2007).

O gênero *Mycobacterium* é constituído pelas espécies do complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e as denominadas micobactérias não tuberculosas (MNT) (COLLINS; GRANGE; YATES, 1997). Em geral, as MNT são consideradas oportunistas e são classificadas, de acordo com sua capacidade de causar doença, como potencialmente patogênicas e não patogênicas (DAVIDSON, 1989; COLLINS; GRANGE; YATES, 1997).

Pertencente às MNT e classificada como patogênica oportunista, *M. fortuitum* possui crescimento rápido e já foi isolada de várias fontes ambientais, incluindo solo, plantas, aerossóis e sistemas de distribuição de água potável em todo o mundo (INDERLIED et al., 1993; ROIZ et al., 1995; FALKINHAM III, 1996; REDDY, 1998; COVERT et al., 1999; COSMA et al., 2003) sendo detectadas também em amostras de leite cru e pasteurizado em diversas localidades (KAZWALA et al., 1998; LEITE et al., 2003; SLANA et al., 2009; AYDIN et al., 2012; SGARIONI et al., 2014). É responsável por infecções da pele e dos tecidos moles, principalmente após inoculação traumática, cirúrgica ou não (CARRILLO-QUINTERO et al., 2014; GUERRERO et al., 2015). Raramente responsável por infecção disseminada ou em outro lugar que não na pele em hospedeiro imunocompetente, enquanto em pacientes imunocomprometidos pode levar à infecções graves (GARCÍA-MARTOS; GARCÍA-AGUDO, 2012; VALENCIA; QUILES, 2016).

2.2 FOTOINATIVAÇÃO COM LUZ AZUL

A seguir, serão apresentados detalhes acerca da fotoinativação mediada por luz azul, tal como o histórico do emprego da luz no tratamento de enfermidades e

seus mecanismos de ação já elucidados.

2.2.1 Histórico da terapia com luz

A luz tem sido empregada no tratamento de doenças desde a antiguidade. Muitas civilizações antigas fizeram uso do sol como fonte de irradiação, no entanto, apenas recentemente sua utilização tem sido explorada com o devido embasamento científico. Atualmente o emprego das terapias com luz são utilizadas em larga escala, e incluem diversas aplicações, como a terapia fotodinâmica, foto-deteção, laser terapia de baixa intensidade, uso de laser em procedimentos cirúrgicos, dentre outras aplicações (ACKROYD et al., 2001; HAMBLIN; HUANG, 2014).

A adoração ao sol foi base de muitas civilizações antigas, tanto pela importância do sol na agricultura, como pelo uso de suas propriedades curativas. Na Grécia, no século II a.C., o famoso médico Heródoto, pai da helioterapia, destacou a utilização da exposição ao sol para a restauração da saúde. Os gregos construíam áreas reservadas especiais, nas quais faziam exposição total do corpo ao sol (DANIELL; HILL, 1991).

Documentos históricos de mais de três mil anos atrás mencionam a utilização de substâncias extraídas das plantas em combinação com luz solar, utilizada pelos egípcios no tratamento de lesões superficiais de pele. No Egito, Índia e China, a luz solar foi usada para tratar doenças e algumas destas práticas estão descritas em textos antigos, como o Papiro de Ebers, que descreve a ingestão de extrato derivado de erva daninha nativa do rio Nilo, *Ammi majus* L. seguido de exposição ao sol para o tratamento de vitiligo, que foi erroneamente classificada como lepra (EL-MOFTY, 1968) e o livro sagrado indiano, Atharvaveda que descreve tratamento realizado por curandeiros, por meio da ingestão de sementes da planta Bavachee (*Psoralea corylifolia*) em associação à exposição à luz solar para o tratamento do denominado "leucoderma" (BLOOMFIELD, 1897).

Com o advento do cristianismo, tanto o culto pelo sol, quanto a utilização da luz solar como modalidade curativa passaram a ser consideradas como práticas pagãs (DANIELL; HILL, 1991). A fototerapia permaneceu então esquecida por muitos séculos, mas a partir do século XVIII, começaram a surgir descobertas

advindas de estudos tecnológicos da época e relatos médicos (HAMBLIN; HUANG, 2014).

No início da fototerapia moderna, descobertas criaram a base para a aplicação de fontes de luz artificial e modificadas. Essas descobertas incluem a de Isaac Newton (1642 - 1727) com a divisão de um feixe de luz em sete cores básicas, utilizando um prisma, e a descoberta da chamada roda de cores. Friedrich Wilhelm Herschel (1738-1822) descobre o espectro infravermelho do sol em 1800 e, em 1801, de forma independente, Johann Wilhelm Ritter (1776-1810) e William Hyde Wollaston (1766-1828) descobrem a radiação ultravioleta (UV). Hans Christian Oerstedt (1777-1851) descobre a corrente elétrica e cria o campo magnético e Michael Faraday (1791-1867) descreve mais tarde a indução eletromagnética como uma fonte de energia elétrica e constrói o primeiro gerador e o primeiro motor elétrico. Subsequentemente, Thomas Alva Edison (1847-1931) inventa a lâmpada elétrica e a bateria como fonte de energia (GRZYBOWSKI; PAWLIKOWSKI, 2016).

No final do século XIX houve o desenvolvimento de "sanatórios do sol", centros de helioterapia e hidroterapia, idealizados na tentativas de combater a epidemia de tuberculose, associando fototerapia com o tratamento climático (ROELANDTS, 2002). Em 1903, August Rollier (1874-1954), um dos pioneiros nesta terapêutica, aplica o tratamento climático em combinação com fototerapia para o tratamento da tuberculose óssea em sanatório localizado em Leysin, Suíça (ROLLIER, 1923). A partir deste momento, as descobertas da época (radiação ultravioleta, por exemplo) e invenções (o gerador e a lâmpada elétrica), assim como experiências do tratamento com a luz do sol, contribuíram para o desenvolvimento da fototerapia moderna. (GRZYBOWSKI; PAWLIKOWSKI, 2016)

A fototerapia popularizou-se e se desenvolveu em uma ciência a partir de 1901, por meio de Nils Ryberg Finsen, cientista e médico dinamarquês, que publicou o primeiro livro moderno sobre o tratamento de doenças com luz monocromática, intitulado "*La Phototherapie*" (A Fototerapia). Em seus estudos, observou que a luz azul não induzia respostas inflamatórias prejudiciais da mesma forma que a radiação UV, mas ainda assim era capaz de inativar algumas espécies de bactérias em poucos minutos (PENG; MOAN; NESLAND, 1996; ALLISON et al., 2004).

Finsen demonstrava que "raios" químicos refratados da luz solar ou a partir de uma lâmpada de arco voltaico poderiam ter efeito estimulante sobre os tecidos. Se a irradiação fosse muito forte, no entanto, poderia dar origem a danos nos tecidos.

Com a varíola, Finsen acreditava que várias cicatrizes poderiam ser evitadas se o paciente fosse protegido contra os “raios químicos”, porém a utilização de luz vermelha seria capaz de promover melhora na cicatrização. Por outro lado, os “raios químicos” isentos de calor poderiam ser utilizados para obter efeito benéfico no lúpus vulgar (tuberculose cutânea) ou outras doenças de pele (HAMBLIN; HUANG, 2014).

Entre os anos de 1895 e 1902, Finsen totalizou 800 pacientes tratados com luz, dos quais 56% mostraram resposta completa, 26% com bons resultados, 12% mostraram apenas pequena melhora e 6% não apresentaram resposta ao tratamento. O resultado positivo do tratamento apresentou-se estável durante aqueles anos independente da utilização de lâmpada de arco de carbono ou o sol como fonte de luz para o tratamento (Figuras 1 e 2). As experiências com pacientes foram bem sucedidas e o método de Finsen não era apenas eficiente, mas também quase indolor (FINSSEN, 1902).

Como resultado, muitas clínicas no norte da Europa adotaram as técnicas de Nilsen em suas próprias práticas. Em 1903, Finsen foi agraciado com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina *"em reconhecimento à sua contribuição para o tratamento de doenças, especialmente a tuberculose cutânea (lupus vulgaris), com radiação de luz concentrada, em que ele abriu um novo caminho para a ciência médica"* (site do Prémio Nobel).

No mesmo ano em que Finsen conquistou o Nobel, Hereon Henrian von Tappeiner descobriu que o oxigênio era necessário para o desenvolvimento de uma boa resposta nas reações mediadas pela luz (PENG; MOAN; NESLAND, 1996; ALLISON et al., 2004; BABILAS et al., 2005). Em paralelo às diversas pesquisas que investigavam a aplicabilidade da luz, Albert Einstein publicou, em 1916, uma teoria denominada “os princípios da luz pela emissão estimulada de radiação”, embasando os estudos que posteriormente culminaram no desenvolvimento do primeiro dispositivo batizado de Laser, uma abreviação de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, em 1960, por Theodore Maiman, proporcionando, assim, o desenvolvimento de uma série de pesquisas envolvendo a interação luz e tecido a partir desta década (FELDMAN, 2009).

Em 1956, iniciou-se a utilização da fototerapia no tratamento de icterícia neonatal, quando Jean Ward, no Hospital Geral Rochford em Essex, Inglaterra, observou que a luz do sol promovia a diminuição da icterícia neonatal (CREMER;

PERRYMAN; RICHARDS, 1958. MCDONAGH, 2001). Ao mesmo tempo, os bioquímicos hospitalares observavam que havia a diminuição da bilirrubina de amostras de sangue que permaneciam expostas à luz solar antes do processamento, surgindo então as primeiras evidências para a utilização da terapia com luz no tratamento de icterícia neonatal, que permanece até os dias atuais como importante forma de tratamento da doença (CHRISTENSEN; HASSAN, 2016).

Figura 1 - Terapia de luz – *Finsen Medical Light Institute* (FMLI) 1897. Fotos do Museu de Medicina da Universidade de Copenhague

Fonte: (MOLLER et al., 2005)

Nota: (a) Terapia de luz elétrica com o novo modelo da lâmpada de Finsen arco de carbono, FMLI 1899 (b), terapia de luz elétrica com o antigo modelo de lâmpada de Finsen de arco de carbono no FMLI 1897 (c), sistemas de compressão de pele usado para pressionar o sangue para fora da área a ser tratada 1899 (d).

Figura 2 - Lesões de lúpus vulgaris curada após um ano de helioterapia. Fotografias do Museu de História Médica da unidade da Universidade de Melbourne

Fonte: (DANIEL; HILL, 1991)

No final da década de 60 do século passado, novos benefícios terapêuticos utilizando outros segmentos do espectro eletromagnético começaram a ser explorados. O médico húngaro Endre Mester, utilizando laser de baixa potência rubi (694nm) em ratos e avaliando o potencial cancerígeno do mesmo, observou, efeitos de fotobioestimulação no crescimento dos pelos dos animais, abrindo assim novos caminhos nas pesquisas (BAROLET, 2008). Esta observação levou a outros estudos que forneceram apoio à utilização de fontes de luz coerentes (laser) e não coerentes (LED). Atualmente, a utilização de LED e laser é realizada no mundo todo, em condições das mais variadas (HAMBLIN; HUANG, 2014).

2.2.2 Luz azul e fotoinativação

Até recentemente, acreditava-se que o espectro de luz visível (400 à 700 nm) apresentava baixo efeito biocida, quando comparado com a luz UVC, devido à energia dos fótons ser menor dentro destes comprimentos de onda. No entanto, o comprimento de onda entre 400 e 430 nm tem demonstrado excelentes resultados antimicrobianos quando aplicados em feridas superficiais contaminadas (DAI et al., 2013; AMIN et al., 2016), na desinfecção de superfícies e de ambientes hospitalares (MCDONALD et al., 2013; MACLEAN et al., 2014).

Estudos demonstram a presença, nas bactérias, de compostos fotossensíveis conhecido como porfirinas, com capacidade de absorver a luz em comprimentos de ondas específicos (NITZAN; KAUFMANN, 1999). Até o presente momento, a hipótese aceita é que a luz azul provoca a excitação das porfirinas endógenas no meio intracelular, determinando, portanto, o comportamento destas substâncias como fotossensibilizadores endógenos (HAMBLIN; HASAN, 2004; AMIN et al., 2016).

Uma vez que uma fonte de luz ilumina as células bacterianas com um comprimento de onda específico para ser absorvido pelas porfirinas (400 e 430 nm), promovendo a mudança do oxigênio celular do estado fundamental para o estado excitado (GHATE et al., 2015) resultando na formação de radicais livres e morte bacteriana (LUKSIENE, 2003; CASTANO et al., 2004; HAMBLIN; HASAN 2004). Até o momento, é evidenciado que a morte do microrganismo ocorra por meio de danos oxidativos na membrana plasmática (DAI et al., 2013).

Estudos também demonstram a maior resistência aos danos oxidativos de células de mamíferos, quando comparadas com os microrganismos. Acredita-se que esta capacidade está provavelmente relacionada com mecanismos mais avançados de resistência e proteção das células eucariotas aos danos oxidativos em comparação com células microbianas, preservando as células do tecido do hospedeiro (DAI et al., 2013; ZHANG et al., 2014; AMIN et al., 2016).

A utilização de técnicas de fotoinativação na indústria alimentícia com foco no controle da contaminação tem despertado interesse e estudos têm apresentado resultados promissores (GHATE et al., 2013; GHATE et al., 2015a,b; GHATE et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a eficácia da luz azul ($\lambda = 410 \text{ nm}$) na inativação de patógenos bacterianos no leite experimentalmente contaminado.

3.1.1 Objetivos específicos

- Determinar se a luz azul (LED azul, $\lambda = 410 \text{ nm} \pm 15$, 100mW) é eficaz na fotoinativação de patógenos no leite integral UHT e em solução PBS (tampão salina fosfato), experimentalmente contaminados com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium fortuitum*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados no experimento encontram-se descritos a seguir.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas da Departamento de Microbiologia - ICB II, da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade do Prof. Dr. Nilton Lincopan.

4.1 MICRORGANISMOS

Para a execução do experimento, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, obtidos a partir da *American Type Culture Collection* (ATCC) e *Mycobacterium fortuitum* NCTC 8573 da *National Collection of Type Cultures* (NCTC). As cepas de *S. aureus* e *E. coli* foram fornecidas pelo Prof^o. Dr^o. Nilton Lincopan responsável pelo Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas do Departamento de Microbiologia - ICB II, da Universidade de São Paulo e as cepas de *L. monocytogenes* e *M. fortuitum* foram fornecidas pela Prof^a Dr^a Evelise de Oliveira Telles responsável pelo Laboratório de Higiene Alimentar do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo.

As cepas de *S. aureus* e *E. coli* foram cultivadas em ágar Muller Hinton (500 mL de água destilada + 19 g de ágar Muller Hinton), e as cepas de *L. monocytogenes* e *M. fortuitum* em ágar *brain heart infusion* (BHI) (500 mL de água destilada + 26 g de ágar BHI). O crescimento foi realizado em condições de aerobiose, à 36°C ± 1°C, durante 24 h, exceto para *M. fortuitum*, que foi mantido em estufa durante de 48 h. Após esse período, as placas foram mantidas na temperatura de 4°C durante período de até 40 dias, sendo posteriormente semeadas novamente.

4.2 FONTE DE LUZ

Foi utilizado como fonte de luz diodo emissor de luz (LED) azul, controlado e estabilizado por fonte analógica. O LED apresentava comprimento de onda (λ) de 413 ± 20 nm (Figura 3), diâmetro de 3,14 cm e 314 mW de potência de irradiação.

A fonte de luz foi fixada em suporte, 1 mm acima da superfície de uma microplaca de 24 poços, de forma a manter a área do feixe em $3,14 \text{ cm}^2$ (Figura 4), coincidindo com a área de um único poço da placa. A taxa padrão de exposição radiante de 100 mW/cm^2 , foi mensurada por meio de espectrofotômetro UV-VIS (Ocean Optics), de forma que o feixe de luz, na incidência de 90° com a placa, apresentasse intensidade altamente homogênea.

Figura 3 - Emissão espectral do LED azul utilizado no experimento

Fonte: (ANJOS, 2016)

Figura 4 - Esquema utilizado para irradiação dos microrganismos, utilizando fonte de luz (LED azul, $\lambda=413\text{nm} \pm 20$, 314mW, diâmetro de 3,14 cm, irradiância de $100\text{mw}/\text{cm}^2$)

Fonte: (ANJOS, 2016)

A densidade de energia (DE) aplicada sobre os microrganismos foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$DE = \frac{Pxt}{A} \rightarrow t = \frac{DExA}{P}$$

Onde:

DE = densidade de energia (J/cm^2);

P = potência do aparelho (W);

t = tempo (s);

A = área de secção transversal do feixe de luz (cm^2) do aparelho emissor.

Densidade de energia é a relação entre a energia administrada por um emissor de luz e a superfície de irradiação do feixe de luz. Refere-se à unidade de superfície irradiada e não à totalidade de energia emitida, podendo representar a dose de tratamento, assim como método de verificação da eficácia e referência da reprodutibilidade da terapia (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

4.3 PREPARO DO INÓCULO

Os inóculos foram preparados a partir de células dos microrganismos cultivados em seus respectivos meios de cultura em caldo. Foram mantidos em condições de aerobiose, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em estufa rotatória (tipo *shaker*), por 24 horas, com exceção da cepa de *M. fortuitum*, que permaneceu em estufa durante 48 horas.

Após o crescimento, os microrganismos foram acondicionados em tubos tipo *Eppendorff* e centrifugados a 7.378 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material ressuspensionado em 1 mL de PBS estéril (NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, pH = 7,0), com exceção da cepa de *M. fortuitum*, que foi ressuspensionada em PBS acrescido de 0,05% de Tween 80. O processo de lavagem do inóculo foi repetido duas vezes.

O ajuste do inóculo, foi determinado por meio de avaliação da turbidez da suspensão avaliado por espectrofotometria. A absorbância da suspensão em PBS estéril foi ajustada entre 0,08 e 0,10 à $\lambda = 625 \text{ nm}$, que resultou em suspensão contendo aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$. O inóculo foi diluído na proporção 1:10 em leite UHT integral e em PBS estéril, respectivamente, para a concentração de trabalho, que foi de $1 \text{ a } 2 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$. A partir do inóculo de trabalho, foram preparadas alíquotas em cinco tubos tipo *Eppendorff*, referentes aos quatro grupos de irradiação e ao grupo controle. As alíquotas foram então mantidas sob refrigeração e ao abrigo de luz até o momento da irradiação.

Figura 5 - Esquema ilustrativo da sequência de preparo das amostras a serem irradiadas

Fonte: (ANJOS, 2016)

4.4 IRRADIAÇÃO

Para a irradiação, 500µL da solução de inóculo na concentração de trabalho foram adicionados em placa de 24 poços e irradiados individualmente. Cada cepa, em leite ou em PBS, respectivamente, foi irradiada em quatro intervalos de tempos (Tabela 1) e comparadas ao controle (amostra não irradiada).

Tabela 1 - Constituição, tempos e parâmetros de irradiação dos diferentes microrganismos avaliados

Meio	Microrganismos	Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3		Tempo 4	
		Min	J/cm ²	Min	J/cm ²	Min	J/cm ²	Min	J/cm ²
PBS	<i>S. aureus</i>	30	180	60	360	90	540	120	720
	<i>E. coli</i>	10	60	20	120	30	180	40	240
	<i>L. monocytogenes</i>	50	300	100	600	150	900	200	1200
	<i>M. fortuitum</i>	15	90	30	180	45	270	60	360
LEITE	<i>S. aureus</i>	30	180	60	360	90	540	120	720
	<i>E. coli</i>	10	60	20	120	30	180	40	240
	<i>L. monocytogenes</i>	15	90	30	180	45	270	60	360
	<i>M. fortuitum</i>	07	42	14	84	21	126	28	168

Fonte: (ANJOS, 2016)

4.5 PREPARO DA DILUIÇÃO DAS BACTÉRIAS

Após o período de irradiação, foram transferidos 200 µL de cada amostra para uma placa de 96 poços e subsequentemente foi realizada diluição seriada em PBS até a concentração 10^{-5} , como o representado na figura 6.

Figura 6 - Ilustração da sequência de diluição seriada realizada nas amostra

Fonte: (ANJOS, 2016)

4.6 CONTAGEM DE COLÔNIAS

Por meio de uma pipeta multicanal, foram retiradas alíquotas, previamente homogenizadas, de 10 µL, relativo às diferentes concentrações: 10^x , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , pertencentes ao mesmo grupo tratamento ou controle. Em seguida, as amostras foram semeadas em forma de estrias, de acordo com a metodologia descrita por Jett et al. (1997), em triplicata e em seus respectivos meios de cultura. Durante a semeadura em placa de Petri, certificou-se que não houve fusão entre as gotas durante o processo de escoamento das mesmas, possibilitando a posterior contagem das colônias.

Figura 7 - Placa de Petri apresentando a diluição seriada das colônias de *M. fortuitum* do grupo controle

Fonte: (ANJOS, 2016)

4.7 TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA CONTAGEM

As amostras foram incubadas em estufa, em condições de aerobiose, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 h, exceto para *M. fortuitum*, mantido em estufa durante 72 h. A contagem das colônias foi efetuada conforme Jett et al. (1997) por meio de marcação correspondente, com caneta, na parte posterior das placas de Petri. Foram contadas colônias presentes em estrias que portaram entre 3 e 30 colônias.

Figura 8 - Placa de Petri apresentando diluição seriada das colônias de *M. fortuitum* do grupo irradiado, representando a marcação para a contagem de colônias

Fonte: (ANJOS, 2016)

5 ANALISE ESTATISTICA

Para as análises estatísticas, realizou-se média de fração de sobrevivência dos resultados obtidos de três experimentos independentes referente a cada grupo experimental. As médias foram normalizadas em relação ao máximo (N_0/N), indicando a fração de redução da contagem de UFC/mL (Unidade Formadora de Colônias por mililitro de suspensão). Subsequentemente os dados foram transformados em escala logarítmica de base 10 ($\log_{10}$). Por meio de adaptação do método estatístico de Weibull, calculou-se a dose letal teórica, prevendo a cinética de inativação para qualquer valor de dose de exposição radiante.

Equação de Weibull:

$$\log_{10} \left(\frac{N_0}{N} \right) = \left(\frac{Dose}{LD_{90}} \right)^R$$

Equação de Weibull modificada:

$$LD_i = LD_{90} \left(-\log_{10} \left(1 - \frac{i}{100} \right) \right)^R$$

Onde:

N_0 = carga microbiana inicial;

N = carga microbiana final;

Dose = exposição à luz (minutos)

LD_{90} = Dose letal para redução de 90% da carga microbiana;

R : fator de resistência;

i = percentual de inativação (%).

O ajuste da equação proposta por Weibull aos dados de inativação microbiana fornece valores de duas constantes referentes à cinética de inativação de cada grupo experimental, em termos de: dose letal para 90% (LD_{90}) e o fator de resistência R , referente à direção da concavidade da curva ajustada (ou seja, $R >$

1: concavidade para baixo; $R < 1$: concavidade para cima). Os valores LD_{90} e R obtidos a partir de cada conjunto de dados experimentais foram comparados pela soma dos quadrados do teste-F, para analisar se cada microrganismo descreve a sua própria curva de fração de sobrevivência. Os testes estatísticos foram realizados por meio do *software* GraphPad Prism (versão 5.0, GraphPad Software, Inc., CA, USA), onde todas as análises de inferência adotaram nível de significância $< 5\%$.

6 RESULTADOS

As diferentes cepas avaliadas no experimento, *Mycobacterium fortuitum* (Figura 9), *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* apresentaram fotoinativação em tempos distintos de irradiação por luz azul para os diferentes meios empregados.

A curva de inativação dos diferentes microrganismos avaliados, em leite e em PBS, em relação ao tempo de irradiação e densidade de energia empregados, estão apresentados nos gráficos 1 e 2.

Por meio da equação de Weibull, foi calculado o melhor valor ajustado para se alcançar a dose letal teórica de 90% (LD_{90}), referente a 1 $\log_{10}$ de redução para cada microrganismo, e o fator de resistência R. Os valores encontram-se apresentados na tabela 2, juntamente com o erro padrão das duas constantes avaliadas - LD_{90} e R.

A partir de valores encontrados para LD_{90} e o valor de R, foi possível calcular a dose letal estimada de 99,9% ($LD_{99,9}$) ou a redução de 3 $\log_{10}$, e a dose letal estimada para esterilização da amostra (LD_{100}), o que representa a redução teórica de 7 $\log_{10}$, considerando-se o inóculo inicial de 1 a 2×10^7 UFC / mL. Os dados encontram-se dispostos na tabela 3, onde são exibidas as variáveis tempo (em minutos) e a irradiância (J/cm^2) necessárias para a inativação.

O fator de resistência R, apresentado na tabela 2 informa numericamente a concavidade das curvas de inativação. Quando o $R > 1$, expressa concavidade para baixo, e demonstra a tendência dos microrganismos apresentarem inicialmente maior tolerância à fotoinativação, tornando-se porém, cada vez mais sensíveis. Antagonicamente, quando $R < 1$, caracteriza concavidade para cima, e demonstra a propensão dos microrganismos se apresentarem mais sensíveis inicialmente, porém, algumas células persistentes continuam a ser mais tolerantes à inativação.

De acordo com os dados, o fator de resistência R foi menor que 1 ($R < 1$) em todos os experimentos realizados em meio leite, com 0,82, 0,78, 0,88 e 0,81 para *S.aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *M. fortuitum*, respectivamente. Isto, portanto, demonstra que, ainda que de forma não acentuada, as bactérias estudadas, neste meio, apresentaram-se mais sensíveis à luz azul nos tempos iniciais, ocorrendo fotoinativação em maior proporção neste período, no meio leite (Tabela 2).

No entanto, no meio PBS, as mesmas cepas apresentaram valores de R distintos, isto é, $R < 1$, à semelhança do meio leite, para *L. monocytogenes* e *E. coli*, com 0,87 e 0,81, respectivamente, ao passo que *S. aureus* e *Mycobacterium fortuitum* apresentaram $R > 1$, com 1,06 e 1,46, respectivamente, demonstrando tendência a apresentar resistência inicial porém tornando-se mais sensíveis conforme o tempo de irradiação progredia (Tabela 2).

Graficamente, é possível observar o comportamento do fator de resistência R para cada bactéria empregada e, de acordo com os resultados, as cinéticas de inativação exibem concavidades não acentuadas em função dos resultados de R permanecerem próximos de 1, excetuando-se aquela relacionada ao *M. fortuitum* em meio PBS pois, em função de $R = 1,46$, destaca-se a concavidade para baixo da curva de cinética de inativação (Gráfico 1).

O sucesso do ajuste dos dados pela equação modificada de Weibull foi confirmado uma vez que todos valores de R^2 ajustado foram superiores a 0,87. Desta forma, há forte relação entre o tempo de irradiação com a luz azul e a taxa de inativação dos patógenos avaliados neste estudo.

A análise estatística realizada por meio da soma dos quadrados no teste F apresentou elevada significância ($p < 0,0001$), demonstrando diferente cinética de inativação, inclusive quanto ao meio em que os microrganismos foram avaliados (leite e PBS).

Figura 9 - Placas de Petri apresentando colônias de *M. fortuitum* suspensas em leite e semeadas a partir de diferentes diluições, demonstrando a redução de UFC após diferentes tempos de irradiação com luz azul: (a) controle, 0 min; (b) 7 min; (c) 14 min; (d) 21 min; (e) 28 min

Tabela 2 - Média do tempo de inativação e erro padrão referentes à dose letal para 90% (LD₉₀), fator de resistência R e valor do coeficiente de determinação (R²)

Meio	Microrganismos	Tempo		Erro padrão		R ²
		LD ₉₀ (min)	R	LD ₉₀ (min)	R	
PBS	<i>S. aureus</i>	30,17	1,06	3,12	0,09	0,96
	<i>E. coli</i>	12,36	0,81	1,42	0,09	0,95
	<i>L. monocytogenes</i>	8,48	0,87	0,98	0,05	0,94
	<i>M. fortuitum</i>	15,72	1,46	1,00	0,19	0,95
LEITE	<i>S. aureus</i>	16,36	0,82	3,13	0,08	0,98
	<i>E. coli</i>	4,54	0,78	0,96	0,08	0,87
	<i>L. monocytogenes</i>	46,15	0,88	11,14	0,16	0,93
	<i>M. fortuitum</i>	13,76	0,81	2,31	0,10	0,93

Fonte: (ANJOS, 2016)

Tabela 3 - Valores de dose letal (LD) estimados à partir do melhor valor ajustado para LD₉₀

Meio	Microrganismos	LD ₉₀		LD _{99,9}		LD ₁₀₀	
		min	J/cm ²	min	J/cm ²	min	J/cm ²
PBS	<i>S. aureus</i>	30,17	181,02	85,05	510,3	189,16	1.134,96
	<i>E. coli</i>	12,36	74,16	47,92	287,52	136,29	817,74
	<i>L. monocytogenes</i>	8,48	50,88	29,70	178,20	78,11	468,66
	<i>M. fortuitum</i>	15,72	94,32	33,33	199,98	59,50	357,00
LEITE	<i>S. aureus</i>	16,36	98,16	61,82	370,92	172,35	1.034,10
	<i>E. coli</i>	4,55	27,30	18,58	111,48	55,06	330,36
	<i>L. monocytogenes</i>	46,15	276,00	160,12	960,72	417,96	2.507,76
	<i>M. fortuitum</i>	13,76	82,56	52,87	335,22	149,29	897,74

Fonte: (ANJOS, 2016)

Gráfico 1 - Cinética de inativação para as diferentes cepas bacterianas em função do tempo de irradiação e do meio. (a) *S. aureus*; (b) *E. coli*; (c) *L. monocytogenes*; (d) *M. fortuitum*

Fonte: (ANJOS, 2016)

Gráfico 2 - Cinéticas de inativação combinadas

Fonte: (ANJOS, 2016)

7 DISCUSSÃO

A presente pesquisa demonstrou a fotoinativação *in vitro* de patógenos por meio do uso de luz azul, conforme estudos prévios demonstraram o potencial da técnica (DAI et al., 2013; AMIN et al., 2016; DURANTINI, 2016). O controle da contaminação e a ideia de substituição da pasteurização por tratamentos alternativos motivou a presente pesquisa a avaliar os patógenos no leite.

Estudos anteriores demonstraram a inativação de microrganismo no leite por luz pulsada (PL) (KRISHNAMURTHY, 2006; ELMNASSER et al., 2007; MILLER; SAUER; MORARU, 2012), luz UV contínua (MATAK et al., 2007) e a técnica de luz pulsada de alta intensidade (HIPL) (PALGAN et al., 2011). Contudo, a eficácia da utilização de LEDs azuis na fotoinativação bacteriana de microrganismos suspensos em leite ainda não foi relatada na literatura compulsada.

O intervalo de comprimento de onda utilizado neste experimento (413 ± 20 nm), garantiu resultados satisfatórios na inativação de microrganismos patogênicos e contaminantes do leite bovino. De forma similar, estudos avaliaram a eficácia da aplicação de luz com comprimento de onda entre 400 e 430 nm em feridas superficiais contaminadas (DAI et al., 2013; AMIN et al., 2016) e na desinfecção de superfícies e de ambientes hospitalares (MCDONALD et al., 2013; MACLEAN et al., 2014), apresentando excelentes resultados antimicrobianos.

Por meio do experimento proposto, foi avaliada a fotoinativação de inóculo contendo 1 a 2×10^7 UFC/mL, representando uma contaminação muito acima dos níveis aceitáveis pela indústria do leite. Conforme regulamentado pela IN 62 (BRASIL, 2011), o valor máximo aceitável na contagem bacteriana total (CBT) é de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL, existindo, portanto, diferença significativa entre a carga bacteriana experimentalmente avaliada e a carga bacteriana encontrada em condições externas, considerada contaminante e permissiva por meio de regulamentação. O valor da concentração microbiana do inóculo foi estabelecido de acordo com o padrão utilizado em outros ensaios antimicrobianos, tais como antibiogramas e concentração inibitória mínima (CLSI, 2016).

Esta nítida e proposital diferença é importante fator de desafio à técnica e, desta forma, em função dos resultados obtidos, destaca sobremaneira a eficácia da luz azul no experimento. Por conseguinte, à medida que a atividade antimicrobiana

da luz azul apresentou-se efetiva para a situação experimentalmente desenvolvida, a atividade de fotoinativação por meio da luz azul em concentrações microbianas menores que a empregada poderá ser classificada como um desafio mais facilmente superado.

Atuando como uma barreira física à luz, esperava-se que o leite, por meio de fenômenos de espalhamento e absorção, interferisse negativamente na precisão do cálculo de dosimetria. De acordo com estudo de Miller et al. (2012), a eficácia da luz pulsada foi limitada às concentrações de sólidos totais e gordura do leite. No entanto, o presente estudo não verificou tal influência ao utilizar luz de LED azul sobre o leite.

Os parâmetros gerados pelo modelo matemático não linear de Weibull possibilitaram quantificar a cinética de fotoinativação deste estudo, reforçando a confiabilidade do modelo utilizado em estudos anteriores (LE MARC et al., 2009; VAITONIS; LUKSIENE, 2010; GHATE et al., 2015; GHATE et al., 2016), demonstrando, portanto, a viabilidade e acurácia da técnica.

Segundo afirmações de Ghate e seus colaboradores (2013), a equação de Weibull pode ser aplicada como modelo de análise no qual a curva de sobrevivência é uma distribuição cumulativa de efeitos colaterais. Historicamente, este modelo estatístico tem sido frequentemente empregado em indústrias, como exemplo, a aeroespacial e automotiva, para estimar a confiabilidade no tempo de vida de peças mecânicas (WEIBULL, 1981).

A partir dos valores de LD₉₀, calculados por meio da equação de Weibull, foi possível relatar a cinética de inativação para qualquer dose letal. Observou-se diferença nos tempos encontrados para a fotoinativação de *S. aureus*, *E. coli* e *M. fortuitum* no leite (16,36, 4,54 e 13,76 min, respectivamente) quando comparados com os tempos necessários para fotoinativar as mesmas cepas suspensas em PBS (30,17, 12,36 e 15,72 min, respectivamente). Segundo, Grzelak et al. (2001), a presença de riboflavina em meios de cultura celular irradiados com fonte de luz (504 - 529 nm) foi responsável pela geração das EROs, sendo esta produção potencializada por meio da presença de triptofano, tirosina, piridoxina e ácido fólico. Considerando a maior eficácia de fotoinativação encontrada para a maioria das bactérias no meio leite, os resultados poderiam ser justificados por meio da presença natural de riboflavina e triptofano no leite, constituintes presentes no leite integral, independentemente do processamento utilizado, nas concentrações de

1800 µg/kg e 540 µg/kg, respectivamente (NOHR; BIESALSKI; BACK, 2011).

Destarte, todos os resultados encontrados para o fator de resistência R no meio leite ($R < 1$), indicaram que a maior velocidade de inativação das cepas ocorria nos momentos iniciais da irradiação. Este fato pode estar relacionado à maior produção de EROs neste momento devido à maior concentração e consumo de riboflavina e triptofano nos momentos iniciais. Alvitra-se que à medida que o tempo de irradiação aumentava, estas substâncias poderiam ter sido fotodegradadas, não mais contribuindo para a formação de radicais tóxicos (JOSHI, 1985).

Em meio PBS, *S. aureus* e *M. fortuitum* exibiram cinética de inativação diferente ($R > 1$), apresentando maior tolerância à irradiação no início do experimento e aumentando a sensibilidade de acordo com o tempo. Possivelmente, a ausência de substâncias no meio PBS que promovam maior formação de EROs, ao contrário do observado no leite, contribuiu significativamente para este resultado. Contudo, *E. coli* e *L. monocytogenes* exibiram padrão distinto das demais quando suspensas e irradiadas em meio PBS, apresentando $R < 1$, mantendo o padrão de sensibilidade encontrado quando suspensas no leite. Desta forma, mais estudos são necessários para elucidação dos padrões de sensibilidade/fatores de resistência destas cepas bem como a influência dos constituintes do leite na fotoinativação destes microrganismos.

A fotoinativação de *L. monocytogenes* exibiu tempo consideravelmente maior para a fotoinativação no leite (46,15 min) quando comparado com o tempo necessário no meio PBS (8,48 min), diferentemente das demais cepas. Possivelmente, a fotoinativação desta cepa, ao contrário das demais, não foi afetada pelas EROs geradas por meio das substâncias presentes no leite UHT. A sua fotoinativação poderia ser atribuída especialmente pela formação de EROs a partir da porfirinas endógenas da bactéria.

É necessária, portanto, melhor elucidação dos mecanismos que promoveram a significativa diferença no tempo de inativação de *L. monocytogenes* entre os meios empregados. Particularmente, esta bactéria exibe características de resistência importantes sendo capaz de desenvolver mecanismos de resposta adaptativa muito rapidamente quando exposta a agentes estressores em doses subletais, tais como calor, ácidos, oxidantes, falta de nutrientes e alta osmolaridade, (JORGENSEN et al., 1995; LADO; YOUSEF, 2007).

Da mesma forma, a literatura relata mecanismos de resistência da bactéria contra agentes oxidativos em função da presença das enzimas superóxido dismutase e catalase, sendo a primeira a mais importante. Ambas atuam conjuntamente contra processos oxidativos, convertendo radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio para, em seguida, serem clivados em água e oxigênio molecular, respectivamente (HAAS; GOEBEL, 1992; FISHER et al., 2000; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; LADO; YOUSEF, 2007).

Todos os microrganismos avaliados pela cinética de fotoinativação foram selecionados por apresentarem grande importância na indústria leiteira e demonstraram resultados satisfatórios de inibição bacteriana ($p < 0,0001$) entre as curvas.

A utilização da cepa de *Listeria monocytogenes* baseou-se na importância deste microrganismo, amplamente vinculado a doenças transmitidas por alimentos. Sabe-se que dentre as principais formas de transmissão está a ingestão do leite cru ou derivados não pasteurizados (KELLS; GILMORE, 2004; LIANOU; SOFOS, 2007; SILVA et al., 2011) e, por ser um microrganismo psicotrófico, o controle de *L. monocytogenes* é um desafio para cadeia de produção de alimentos (KOZAKE et al., 1996).

Devido à sua importância para a saúde pública e ao seu potencial zoonótico, foi fundamental investigar a cinética de inativação de *Mycobacterium* spp por meio da luz azul. Segundo a Organização Mundial da Saúde, é recomendado para estudos preliminares com micobactérias, o uso da cepa de *M. fortuitum*. Considerado um patógeno oportunista e, embora não exista relato de doenças associadas à sua transmissão pelo leite cru, apresenta crescimento rápido e menor risco ao operador (RUSSELL; YARNYCH; KOULIKOVSKII, 1984; MCFADDEN et al., 1992), o que conferiu segurança e determinou sua escolha para este estudo.

O uso de *S. aureus* no experimento foi imprescindível por representar um dos patógenos mais importantes na bovinocultura de leite, estando entre os principais causadores de mastite nos bovinos (BURVENICH et al., 2003; PETON; LE LOIR, 2014). Da mesma forma, é um importante patógeno de origem alimentar, provocando intoxicações alimentares, doenças autoimunes e alergias (BALABAN; RASOOLY, 2000; BENITES; MELVILLE; RIBEIRO, 2016). Sabe-se que suas toxinas não são inativadas durante o processo de pasteurização (BERGDOLL, 1989; JAY, 1994), sendo, portanto, essencial o controle deste microrganismo bem

como das consequências provocadas pelas toxinas. O sucesso na fotoinativação desta importante bactéria reside não somente na morte desta, mas também na prevenção da multiplicação e da consequente produção de toxinas.

Considerado um dos principais indicadores de contaminação de alimentos, por via fecal direta ou indireta, *E. coli* está associado a infecções entéricas e extra-entericas em humanos e animais (SIQUEIRA et al., 2014). Sua inclusão neste estudo foi realizada por se tratar de um microrganismo gram negativo, frequentemente encontrado no leite quando medidas de sanitização/higienização adequadas não são empregadas durante a ordenha.

A eficácia demonstrada pela fotoinativação microbiana de todas as cepas utilizadas neste estudo demonstram a relevância desta tecnologia como ferramenta para o controle do leite e seus derivados.

Um aspecto importante a ser considerado seria a exposição prolongada de alimentos à luz, efeito conhecido por induzir prejuízos aos mesmos. Esta deterioração poderia ser causada pela produção de radicais livres por meio de reações fotoquímicas (KOUTCHMA, 2009). Variação na qualidade de produtos alimentícios processados por métodos que utilizam a luz não são investigados intensamente (OMS-OLIU et al., 2008) e, até o presente momento, são encontrados na literatura somente estudos sensoriais em amostras de leite tratados com UV e PL (MATAK et al., 2007; ELMNASSER et al., 2008). Nos estudos retro-referidos, o leite foi submetido à irradiação por tempo muito inferior ao utilizado no presente experimento. Este fato implica na necessidade de estudos futuros que avaliem o impacto de irradiações prolongadas e possíveis alterações no leite.

Neste estudo, não avaliamos o controle de temperatura do LED e da solução irradiada. Contudo, vale ressaltar que a irradiância de 100 mw/cm^2 não produz efeito fototérmico (PRATES et al., 2009). Os resultados encontrados são, portanto, atribuídos unicamente a efeitos de fotoinativação não térmica.

A vantagem em se utilizar a luz azul (405 nm) baseia-se no fato de que esta tecnologia é segura para células eucariotas quando comparadas às células mais primitivas (MCDONALD et al., 2013; DAI et al., 2013a,b). Assim, a luz azul tem sido desenvolvida para operar de forma contínua, permitindo a descontaminação de ambientes ocupados por pessoas, como ambientes industriais e enfermarias hospitalares (MACLEAN et al., 2010; MACLEAN et al., 2013). Esta técnica demonstra muito mais segurança à saúde dos frequentadores quando comparada

à radiação UV, visto que esta pode provocar efeitos mutagênicos às células (KLEINPENNING et al., 2010; LIEBMANN; BORN; KOLB-BACHOFEN, 2010).

O emprego da luz azul em indústrias de captação e processamento do leite ou mesmo em propriedades leiteiras, seria extremamente interessante pois não necessita de cuidados e medidas especiais. Visando a garantia da qualidade do leite, os sistemas de LED poderiam ser implementados no período de intervalo entre a ordenha, a captação e o processamento do leite. O armazenamento do leite cru neste período, em tanque de refrigeração, deve apresentar temperatura igual ou inferior a 4°C, o que garante o controle da multiplicação dos microrganismos mesófilos, mas não impede a multiplicação dos microrganismos psicrótróficos (FAGUNDES et al., 2006). Além disso, estudos anteriores (Fisher et al., 2000) demonstraram a influência da temperatura no controle de bactérias contaminantes de alimentos, sobretudo *L. monocytogenes*, por meio da técnica de ozônio. Estes autores, ressaltaram que a taxa de inativação de patógenos pode ser duplicada quando a temperatura é reduzida de 37 à 4°C.

De acordo com nossos resultados, a técnica utilizada garantiu não só o controle como a inativação microbiana, e portanto, a aplicação desta técnica poderia contribuir para manutenção da qualidade do leite. No entanto, a eficácia do emprego da luz azul deve ser avaliado em condições de refrigeração, tais como aquelas encontradas nas propriedades leiteiras, e recomendadas por lei, como medida complementar e potencial para a melhoria da eficiência e dos resultados encontrados, principalmente para fotoinativação de patógenos suspensos no leite.

Os resultados demonstrados neste estudo revelam a capacidade do uso da luz azul em promover a fotoinativação de microrganismos patogênicos e contaminantes do leite. Estudos futuros devem ser dirigidos para se avaliar esta tecnologia, sobretudo em relação a outros parâmetros de qualidade do alimento, avaliando-se a influência da técnica sobre os constituintes do leite e características organolépticas, tempo de conservação e a melhor condição de aplicação da tecnologia de LED durante o processamento do leite e de produtos lácteos. Estes dados poderão determinar melhores condições para se manter a segurança e a qualidade na cadeia do leite.

8 CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos, concluiu-se que:

1. A luz azul foi capaz de fotoinativar, *in vitro*, cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria Monocytogenes* e *Mycobacterium fortuitum*, suspensas em PBS e em leite integral UHT.
2. A fotoinativação por luz azul apresenta caráter inovador, sendo uma alternativa potencialmente promissora no controle da contaminação por microrganismos na indústria láctea.
3. O fato de não existirem trabalhos na literatura envolvendo a fotoinativação por luz azul em microrganismos suspensos em leite torna esse estudo pioneiro.
4. Tendo em vista os resultados satisfatórios obtidos neste experimento, tornam-se necessários estudos subsequentes que fundamentem sua futura aplicação na indústria.

REFERÊNCIAS

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

ALDERWICK, L. J.; BIRCH, H. L.; MISHRA, A. K.; EGGELING, L.; BESRA, G. S. Structure, function and biosynthesis of the Mycobacterium tuberculosis cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1325-1328, 2007.

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X. H.; CHILDS, C. J. H.; SIABATA, H. C. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 27-42, 2004.

AMIN, R. M.; BHAYANA, B.; HAMBLIN, M. R.; DAI, T. Antimicrobial blue light inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* by photo-excitation of endogenous porphyrins: In vitro and in vivo studies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 48, n. 5, p. 562-568, 2016.

AYDIN, F. E.; ULGER, M.; EMEKDAŞ, G.; ASLAN, G.; GÜNAL, S. Isolation and identification of Mycobacterium bovis and non-tuberculous mycobacteria in raw milk samples in Mersin province. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 46, n. 2, p. 283-289, 2012.

BABILAS, P.; KARRER, S.; SIDOROFF, A.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M. Photodynamic therapy in dermatology - an update. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 21, p. 142-149, 2005.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International journal of food microbiology**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2000.

BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. In: **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 27, n. 4, p. 227-238, 2008.

BEAUREGARD, K. E.; LEE, K. D.; COLLIER, R. J.; SWANSON, J. A. pH dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 7, p. 1159-1163, 1997.

BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, M. G. Estafilococcias. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infeciosas em animais de produção e companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 300-326.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. (Ed.). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 464-523.

BETTELHEIM, K. A.; KUZEVSKI, A.; GILBERT, R. A.; KRAUSE, D. O.; MCSWEENEY, C. S. The diversity of Escherichia coli serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 699-709, 2005.

BLOOMFIELD, M. **Sacred books of the East**: Hymns of Atharva-Veda. Oxford: Clarendon Press, 1897, v. 42.

BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of food Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 119-130, 1999.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1845-1849, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 172, 20 set. 2002. Seção I, p. 8-13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62 de 29 de Dezembro de 2011. Aprova os regulamentos Técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite cru refrigerado e do leite pasteurizado, a coleta do leite cru refrigerado e o transporte. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 dez. 2011a. Seção I, p. 6-11.

BRESSAN, M.; MARTINS, M. C. Segurança alimentar na cadeia produtiva do leite e alguns de seus desafios. **Revista de Política Agrícola**, v. 13, n. 3, p. 27-37, 2004.

BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. A qualidade do leite. Juiz de Fora: Embrapa/Tortuga, 1998. 98 p.

BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 521-564, 2003.

CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p. 7-10, 2000.

CARRILLO-QUINTERO, D.; BOLAÑOS-RIVERO, M.; HERNÁNDEZ-CABRERA, M.; CAÑAS-HERNÁNDEZ, F. Aislamiento de micobacterias de crecimiento rápido a partir de muestras de piel y tejidos blandos. Una etiología a tener en cuenta. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. 10, p. 692-693, 2014.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.

CHAMBEL, L.; SOL, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; ZILHÃO, I.; BARATA, B.; JORDAN, S.; PERNI, S.; SHAMA, G.; ADRIÃO, A.; FALEIRO, L.; REQUENA, T.;

PELÁEZ, C.; ANDREW, P.W.; TENREIRO, R. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 52-63, 2007.

CHRISTENSEN, R. D.; YAISH, H. M. Hemolysis in Preterm Neonates. **Clinics in Perinatology**, v. 43, n. 2, p. 233-240, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Development of In vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters**. 4th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016. (M23).

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Identification os species. In: _____. **Tuberculosis bacteriology: organization and practice**. 2. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997. 139 p.

COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 57, p. 641-676, 2003.

COVERT, T. C.; RODGERS, M. R.; REYES, A. L.; STELMA JR., G. N. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2492-2496, 1999.

CREMER, R. J.; PERRYMAN, P. W.; RICHARDS, D. H. Influence of light on the hyperbilirubinaemia of infants. **The Lancet**, v. 271, n. 7030, p. 1094-1097, 1958.

DAI, T.; TEGOS, G. P.; ZHIYENTAYEV, T.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 1, p. 38, 2010.

DAI, T.; GUPTA, A.; MURRAY, C. K.; VRAHAS, M. S.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Blue light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond?. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 4, p. 223-236, 2012.

DAI, T.; UPTA, A.; HUANG, Y. Y.; YIN, R.; MURRAY, C. K.; VRAHAS, M. S.; SHERWOOD, M. E.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Blue light rescues mice from potentially fatal *Pseudomonas aeruginosa* burn infection: efficacy, safety, and mechanism of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1238-1245, 2013.

DAMASCENO, J. C.; BOUNDERMÜLLER FILHO, A.; RAMOS, C. E. C. O.; SANTOS, J.; SANTOS, G. D. O papel do homem na gestão e controle de qualidade da produção de leite. In: SANTOS, G. T.; UHLIG, L.; BRANCO, A. F.; JOBIM, C. C.; DAMASCENO, J. C.; CECATO, U. (Ed.). **Inovação tecnológica na cadeia produtiva do leite e a sustentabilidade da pecuária leiteira**. Maringá: Eduem, 2008. p. 271-284.

DAMASCENO, J. C.; BOUNDERMÜLLER FILHO, A.; RAMOS, C. E. C. O. O papel DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A history of photodynamic therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 61, n. 5, p. 340-348, 1991.

DAVIDSON, P. T. The diagnosis and management of disease caused by *M. avium* complex, *M. kansasii*, and other mycobacteria. **Clinics in Chest Medicine**, v. 10, n. 3, p. 431-443, 1989.

DOWNEY, W. K. Review of the progress of dairy science: flavour impairment from pre and postmanufacture lipolysis in milk and dairy products. **Journal Dairy Research**, Cambridge, v. 47, p. 237- 252, 1980.

DURANTINI, E. N. New insights into the antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 7, n. 5, p. 1-2, 2016.

ELMNASSER, N.; DALGALARRONDO, M.; ORANGE, N.; BAKHROUF, A.; HAERTLÉ, T.; FEDERIGHI, M.; CHOBERT, J. M. Effect of pulsed-light treatment on milk proteins and lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 1984-1991, 2008.

EL-MOFTY, A. M. Clinical experience in the treatment of vitiligo with psoralens. In: ELLIOTT, J.A, Jr.: **Vitiligo and psoralens**. ed. Oxford, UK: Pergamon Press, 1968. p. 147.

FAGUNDES, C. M.; FISHER, V.; SILVA, V.P.; CARBONERA, N.; ARAUJO, M.R. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.

FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 177-215, 1996.

FELDMAN, B. C. **Avaliação clínica dos efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento não-cirúrgico da periodontite crônica**. 2009. 94 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Duque de Caxias, 2009.

FENLON, D. R.; WILSON, J.; WEDDELL, J. R. The relationship between spoilage and *Listeria monocytogenes* contamination in bagged and wrapped big bale silage. **Grass and Forage Science**, v. 44, n. 1, p. 97-100, 1989.

FERREIRA, A. A.; DE ALMEIDA MARQUES, K.; BARBOSA, J. B.; MARTINS, E. M. F.; DE OLIVEIRA PINTO, C. L.; MARTINS, M. L. Influencia da atividade enzimática de *Pseudomonas Fluorescens* 041 em Labneh. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 67, n. 385, p. 17-24, 2012.

FINSEN, N. R. **Om bekæmpelse af *Lupus Vulgaris*, med em redeg_else for de i Danmark opnaaede resultater**. Copenhagen, Denmark: Gyldendalske Boghandels Forlag, 1902, p. 3–10.

FISHER, C. W.; D. LEE, B. A.; DODGE, K. M.; HAMMAN, J. B.; ROBBINS, S. E. MARTIN. Influence of catalase and superoxide dismutase on ozone inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1405-1409, 2000.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Irradiation in the production, processing and handling of food. Silver Spring, MD: FDA, 1996. v. 21, pt. 179, p.

FOX, E.; O'MAHONY, T.; CLANCY, M.; DEMPSEY, R.; O'BRIEN, M.; JORDAN, K. *Listeria monocytogenes* in the Irish dairy farm environment. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p. 1450-1456, 2009.

FOX, P. F. Milk. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of dairy sciences**. Academic Press, 2011. p. 458-466.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

GARCEZ, A. S.; ARANTES-NETO, J. G.; SELLERA, D. P.; FREGNANI, E. R. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 4, p. 575-580, 2015.

GARCÍA-MARTOS, P.; GARCÍA-AGUDO, L. Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 4, p. 192-200, 2012.

GHATE, V. S.; N. G, K. S.; ZHOU, W.; YANG, H.; KHOO, G. H.; YOON, W. B.; YUK, H. G. Antibacterial effect of light emitting diodes of visible wavelengths on selected foodborne pathogens at different illumination temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 3, p. 399-406, 2013.

GHATE, V.; LEONG, A. L.; KUMAR, A.; BANG, W. S.; ZHOU, W.; YUK, H. G. Enhancing the antibacterial effect of 461 and 521 nm light emitting diodes on selected foodborne pathogens in trypticase soy broth by acidic and alkaline pH conditions. **Food Microbiology**, v. 48, p. 49-57, 2015a.

GHATE, V.; KUMAR, A.; ZHOU, W.; YUK, H. G. Effect of organic acids on the photodynamic inactivation of selected foodborne pathogens using 461 nm LEDs. **Food Control**, v. 57, p. 333-340, 2015b.

GHATE, V.; KUMAR, A.; ZHOU, W.; YUK, H. G. Irradiance and Temperature Influence the Bactericidal Effect of 460-Nanometer Light-Emitting Diodes on *Salmonella* in Orange Juice. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 4, p. 553-560, 2016.

GRZELAK, A.; RYCHLIK, B.; BARTOSZ, G. Light-dependent generation of reactive

oxygen species in cell culture media. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 12, p. 1418-1425, 2001.

GRZYBOWSKI, A.; SAK, J.; PAWLIKOWSKI, J. A brief report on the history of phototherapy. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 5, p. 532-537, 2016.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. D. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

GUERRERO, I.; GARCÍA-AGUDO, L.; GALÁN, F.; GARCÍA-MARTOS, P. Diferenciación de especies del complejo *Mycobacterium fortuitum* mediante espectrometría de masas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 1, p. 67-67, 2015.

GYLES, C.L. Escherichia coli cytotoxins and enterotoxins. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 734-746, 1992.

HAAS, A.; GOEBEL, W. Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. **Free radical Research Communications**, v. 16, n. 3, p. 137-157, 1992.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

HAMBLIN, M. R.; HUANG, Y.Y. Introduction: Historical Vignettes from the Field of Photomedicine. In: HAMBLIN, M. R.; HUANG, Y.Y. **Handbook of photomedicine**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2014. p. 3-10.

IKUTA, C. Y.; FERREIRA NETO, J. S. Micobacterioses e tuberculose em cães e gatos. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 413-422.

INDERLIED, C. B.; KEMPER, C. A.; BERMUDEZ, L. E. M. The *Mycobacterium avium* Complex. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 266-310, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estatística da produção pecuária**. Brasília: IBGE, 2014. p.1-31. < http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf >. Acesso em: 12 abr. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estatística da produção pecuária**. Brasília: IBGE, 2016. p.1-40. < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201601comentarios.pdf >. Acesso em: 12 abr. 2016.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 123, n. 1-2, p. 11-18, 1994.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 804p.

JETT, B. D.; HATTER, K. L.; HUYPKE, M. M.; GILMORE, M. S. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **Biotechniques**, v. 23, n. 4, p. 648-650, 1997.

JORGENSEN, F.; STEPHENS, P. J.; KNØCHEL, Susanne. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, n. 3, p. 274-281, 1995.

JOSHI, P. C. Comparison of the DNA-damaging property of photosensitised riboflavin via singlet oxygen (1O_2) and superoxide radical (O_2^-) mechanisms. **Toxicology letters**, v. 26, n. 2-3, p. 211-217, 1985.

KAZWALA, R. R.; DABORN, C. J.; KUSILUKA, L. J. M.; JIWA, S. F. H.; SHARP, J. M.; KAMBARAGE, D. M. Isolation of *Mycobacterium* species from raw milk of pastoral cattle of the Southern Highlands of Tanzania. **Tropical Animal Health and Production**, v. 30, n. 4, p. 233-239, 1998.

KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 167-174, 2004.

KLEINPENNING, M. M.; SMITS, T.; FRUNT, M. H.; VAN ERP, P. E.; VAN DE KERKHOF, P.; GERRITSEN, R. M. Clinical and histological effects of blue light on normal skin. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 26, n. 1, p. 16-21, 2010.

KOZAK, J.; BALMER, R.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: incidence in dairy products. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 215-221, 1996.

KRISHNAMURTHY, K. Decontamination of milk and water by pulsed UV-light and infrared heating. 2006. [76 p.]. PhD Thesis (Doctor of Philosophy) - Pennsylvania State University, University Park, 2006.

LADO, B. H.; YOUSEF, A. E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors, 157-213. In: *Listeria, listeriosis, and food safety*. Elliot T. Ryser and Elmer H. Marth. -- 3rd ed, CRC Press, FL, 2007, 873 p.

LEE, O. M.; KIM, H. Y.; PARK, W.; KIM, T. H.; YU, S. A comparative study of disinfection efficiency and regrowth control of microorganism in secondary wastewater effluent using UV, ozone, and ionizing irradiation process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 295, p. 201-208, 2015.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.;

COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

LIANOU, A.; SOFOS, J. N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 9, p. 2172-2198, 2007.

LIEBMANN, J.; BORN, M.; KOLB-BACHOFEN, V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 1, p. 259-269, 2010.

LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 39, n. 12, p. 1137-1150, 2003.

MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M. A.; BOOR, K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 264-274, 2000.

MACDONALD, F.; SUTHERLAND, A. D. Effect of heat treatment on *Listeria monocytogenes* and Gram-negative bacteria in sheep, cow and goat milks. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 4, p. 336-343, 1993.

MACLEAN, M.; MCKENZIE, K.; ANDERSON, J. G.; GETTINBY, G.; MACGREGOR, S. J. 405 nm light technology for the inactivation of pathogens and its potential role for environmental disinfection and infection control. **Journal of Hospital Infection**, v. 88, n. 1, p. 1-11, 2014.

MARC, Y. L.; BUCHOVEC, I.; GEORGE, S. M.; BARANYI, J.; LUKSIENE, Z. Modelling the photosensitization-based inactivation of *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 1006-1011, 2009.

MARTINOVIĆ, T.; ANDJELKOVIĆ, U.; GAJDOŠIK, M. Š.; REŠETAR, D.; JOSIĆ, D. Foodborne pathogens and their toxins. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 226-235, 2016.

MARTINS, M. L.; DE ARAÚJO, E. F.; MANTOVANI, H. C.; MORAES, C. A.; VANETTI, M. C. Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 102, p. 203-211, 2005.

MATAK, K. E.; SUMNER, S. S.; DUNCAN, S. E.; HOVINGH, E.; WOROBO, R. W.; HACKNEY, C. R.; PIERSON, M. D. Effects of ultraviolet irradiation on chemical and sensory properties of goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3178-3186, 2007.

MCDONAGH, A. F. Phototherapy: from ancient Egypt to the new millennium. **Journal of Perinatology**, v. 21, n. 8, p. S7-S12, 2001.

MCDONALD, R.; GUPTA, S.; MACLEAN, M.; RAMAKRISHNAN, P.; ANDERSON, J.; MACGREGOR, S.; MEEK, D.; GRANT, M. 405 nm light exposure of osteoblasts and inactivation of bacterial isolates from arthroplasty patients: potential for new disinfection applications?. **European Cells and Materials**, v. 25, p. 204-214, 2013.

MCFADDEN, J. J.; COLLINS, J.; BAEMAN, B.; ARTHUR, M.; GITNICK, G. Mycobacteria in Crohn's disease: DNA probes identify the wood pigeon strain of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* from human tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3070-3073, 1992.

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**, v. 21, n. 2, p. 213-216, 2004.

MENDONÇA, C. L.; AFONSO, J. A. B. **Listeriose**. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em animais de produção e companhia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 404-412.

MILLER, B. M.; SAUER, A.; MORARU, C. I. Inactivation of *Escherichia coli* in milk and concentrated milk using pulsed-light treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 5597-5603, 2012.

MOLLER, K. I.; KONGSHOJ, B.; PHILIPSEN, P. A.; THOMSEN, V. O.; WULF, H. C. How Finsen's light cured lúpus vulgaris. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 21, n. 3, p. 118-124, 2005.

MOORBY, J. M.; ELLIS, N. M.; DAVIES, D. R. Assessment of dietary ratios of red clover and corn silages on milk production and milk quality in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7982-7992, 2016.

NITZAN, Y.; KAUFFMAN, M. Endogenous porphyrin production in bacteria by δ -aminolaevulinic acid and subsequent bacterial photoeradication. **Lasers in Medical Science**, v. 14, n. 4, p. 269-277, 1999.

NOHR, D.; BIESALSKI, H. K.; BACK, E. I. Niacin. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of dairy sciences**. Stuttgart: Academic Press, 2011a. p.691-692.

NOHR, D.; BIESALSKI, H. K.; BACK, E. I. Riboflavin. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of dairy sciences**. Stuttgart: Academic Press, 2011b. p.704-706.

OMS-OLIU, G.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Pulsed light treatments for food preservation. A review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 1, p. 13-23, 2010.

PALGAN, I.; CAMINITI, I. M.; MUÑOZ, A.; NOCI, F.; WHYTE, P.; MORGAN, D. J.; LYNNG, J. G. Effectiveness of high intensity light pulses (HILP) treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 14-20, 2011.

PANHÓCA, V. H.; ESTEBAN FLOREZ, F. L.; CORRÊA, T. Q.; PAOLILLO, F. R.; DE SOUZA, C. W. O.; BAGNATO, V. S. Oral Decontamination of Orthodontic Patients Using Photodynamic Therapy Mediated by Blue-Light Irradiation and Curcumin Associated with Sodium Dodecyl Sulfate. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 34, n. 9, p. 411-417, 2016.

PENG, Q.; MOAN, J.; NESLAND, J. M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. **Ultrastructural Pathology**, v. 20, n. 2, p. 109-129, 1996.

PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 602-615, 2014.

PRATES, R. A.; SILVA, E. G.; YAMADA, A. E.; SUZUKI, L. C.; PAULA, C. R.; RIBEIRO, M. S. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. **Laser Physics**, v. 19, n. 5, p. 1038-1044, 2009.

PROCHNOW, E. P.; MARTINS, M. R.; CAMPAGNOLO, C. B.; SANTOS, R. C.; VILLETTE, M. A.; KANTORSKI, K. Z. Antimicrobial photodynamic effect of phenothiazinic photosensitizers in formulations with ethanol on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 291-296, 2016.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. *Staphylococcus* species. In: **Veterinary microbiology and microbial disease**. Chichester: Wiley & Blackwell, 2011. cap. 8, p. 43-47.

REDDY, V. M. Mechanism of *Mycobacterium avium* complex pathogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 525-531, 1998.

RIBEIRO, M. G.; LEITE, D. S.; SIQUEIRA, A. K. Enfermidades por *Escherichia coli*. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em animais de produção e companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 243-273.

RIBEIRO, M. G.; SILVA, E. O. T. R.; PINTO, J. P. A. N. *Escherichia coli* O157:H7. De hambúrguer, leite e outros gêneros alimentícios à colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, p. 88-99, 1999.

ROBERTS, A. J.; WIEDMANN, M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, n. 5, p. 904-918, 2003.

ROIZ, M. P.; PALENQUE, E.; GUERRERO, C.; GARCIA, M. J. Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing *Mycobacterium avium* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1389-1391, 1995.

ROLLIER, A. **Heliotherapy**. Oxford: Oxford Medical Publications, 1923.

RUSSELL, A. D.; YARNYCH, V. S.; KOULIKOVSKII, A. **Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases**. Geneva: World Health Organization, 1984. 62 p.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314 p.

SELLERA, F. P.; SABINO, C. P.; RIBEIRO, M. S.; GARGANO, R. G.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; POGLIANI, F. C. In vitro photoinactivation of bovine mastitis related pathogens. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 276-281, 2016.

SGARIONI, S. A.; HIRATA, R. D. C.; HIROYUKI HIRATA, M.; LEITE, C. Q. F.; PRINCE, K. D.; LEITE, S. R. D. A.; VEDOVELLO FILHO, D.; SIQUEIRA, V. L. D.; CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; CARDOSO, R. F. Occurrence of *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in raw and pasteurized milk in the northwestern region of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 707-711, 2014.

SHIRAI, M. A. **Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SILVA, A. S.; ARAGON, C. C.; SANTANA, E. H. W.; DESTRO, M. T.; REZENDE COSTA, M.; ALEGRO, L. C. A. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos no Brasil: Uma revisão. **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 1, p. 59-67, 2011.

SILVA, V. A. D. M. D.; RIVAS, P. M.; ZANELA, M. B.; PINTO, A. T.; RIBEIRO, M. E. R.; SILVA, F. F. P. D.; MACHADO, M. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma Granja Leiteira no RS. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 1, p. 51-57, 2010.

SIQUEIRA, A. K.; ALVES, T. D. S.; FERRAZ, M. M. G.; FRANCO, M. M. J.; MOTTA, R. G.; LISTONI, F. J. P.; SILVA, A.V.; RIBEIRO, M.G.; LEITE, D. D. S. Resistência antimicrobiana em coliformes totais isolados de tanques de refrigeração de leite bovino. **Atas de Saúde Ambiental**, v. 2, n. 3, p. 02-15, 2014.

SLANA, I.; LIAPI, M.; MORAVKOVA, M.; KRALOVA, A.; PAVLIK, I. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative IS900 and F57 real-time PCR. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 89, n. 3, p. 223-226, 2009.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker; 1999.

SOUZA, M. R., RODRIGUES, R., FONSECA, L. M., CERQUEIRA, M. M. O. P. Pasteurização do leite. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG**, n. 13, p.85-93,1995.

TAFFAREL, L. E.; COSTA, P. B.; TSUTSUMI, C. Y.; KLOSOWSKI, E. S.; PORTUGAL, E. F.; LINS, A. C. Variação da composição e qualidade do leite em função do volume de produção, período do ano e sistemas de ordenha e de resfriamento. **Semina: ciências agrárias**, v. 36, n. 3, p. 2287-2300, 2015.

TEIXEIRA, A. M.; MASSAGUER, P. R.; FERREIRA, E. C.; TOSELLO, R. M. Agilizando a contagem de bactérias em leite cru brasileiro. **Indústria de Laticínios**, v. 4, n. 25, p. 46-49, 2000.

VAITONIS, Z.; LUKŠIENĖ, Ž. LED-based light sources for decontamination of food: modelling photosensitization-based inactivation of pathogenic bacteria. **Lithuanian Journal of Physics**, v. 50, n. 1, p. 141-145, 2010.

VALENCIA, M. E.; QUILES, M. I. Infección urinaria por *Mycobacterium fortuitum* en paciente con infección por el VIH. **Revista Española de Quimioterapia Advance**, v. 29, n. 4, p. 226-227, 2016.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; HAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; KREFT, J. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.

VILAR, M. J.; YUS, E.; SANJUÁN, M. L.; DIÉGUEZ, F. J.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Prevalence of and risk factors for Listeria species on dairy farms. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 11, p. 5083-5088, 2007.

VILELA, Duarte. A importância econômica, social e nutricional do leite. **Revista Batavo**, n. 111, p. 1-2, 2001.

VISSERS, M. M. M.; DRIEHUIS, F.; TE GIFFEL, M. C.; DE JONG, P.; LANKVELD, J. M. G. Short communication: quantification of the transmission of microorganisms to milk via dirt attached to the exterior of teats. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3579-3582, 2007.

VOGES, J. G.; THALER NETO, A.; DA SILVA KAZAMA, D. C. Qualidade do leite e a sua relação com o sistema de produção e a estrutura para ordenha. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 3-4, p. 171-175, 2016.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

WEIBULL, G. W. Citation classic-a statistical distribution function of wide applicability. **Current Contents/Engineering Technology & Applied Sciences**, n. 10, p. 18-18, 1981.

WENDLANDT, S.; SCHWARZ, S.; SILLEY, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a food-borne pathogen?. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 117-139, 2013.

WERNCKE, D.; GABBI, A. M.; ABREU, A. S.; FELIPUS, N. C.; MACHADO, N. L.;

CARDOSO, L. L.; SCHMID, F. A.; ALESSIO, D. R. M.; FISCHER, V.; THALER NETO, A. Qualidade do leite e perfil das propriedades leiteiras no sul de Santa Catarina: abordagem multivariada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 506-516, 2016.

WILKS, S. A.; MICHELS, H. T.; KEEVIL, C. W. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 93-98, 2006.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v. 345, p. 15-18, 2000.

ZHANG, Y.; ZHU, Y.; GUPTA, A.; HUANG, Y.; MURRAY, C. K.; VRAHAS, M. S.; SHERWOOD, M. E.; BAER, D. G.; HAMBLIN, M. R.; DAI, T. Antimicrobial blue light therapy for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a mouse burn model: implications for prophylaxis and treatment of combat-related wound infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 12, p. 1963-1971, 2014.