

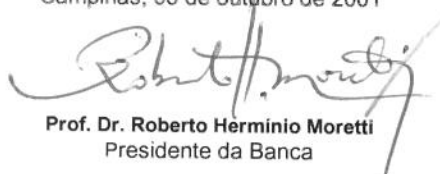
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA,
ESTABILIDADE OXIDATIVA, PROPRIEDADES
FUNCIONAIS E CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DE
GEMA DE OVO LÍQUIDA TRATADA POR
RADIAÇÃO GAMA**

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
Lília Maria Rosamiglia Marques,
aprovada pela Comissão Julgadora
em 03 de outubro de 2001.

Campinas, 03 de outubro de 2001



Prof. Dr. Roberto Herminio Moretti
Presidente da Banca

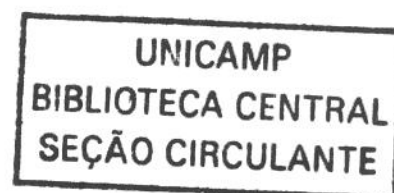
Lília M. Rosamiglia Marques
(Mestre em Tecnologia de Alimentos)

Prof. Dr. Roberto H. Moretti
(Orientador)

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP para
obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Campinas

2001



UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP
M348a
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 47213
 PROC. 16-837/02
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 15-01-2002
 N.º CPD

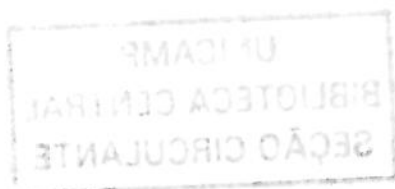
CM00162400-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

M348a Marques, Lilia Maria Rosamiglia
 Avaliação de qualidade microbiológica, estabilidade oxidativa, propriedades funcionais e características sensoriais de gema de ovo líquida tratada por radiação gama / Lilia Maria Rosamiglia Marques. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Roberto Hermínio Moretti
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Ovos – Microbiologia. 2.Gema – Oxidação.
 3.Antioxidantes. I.Moretti, Roberto Hermínio. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
 III.Título.

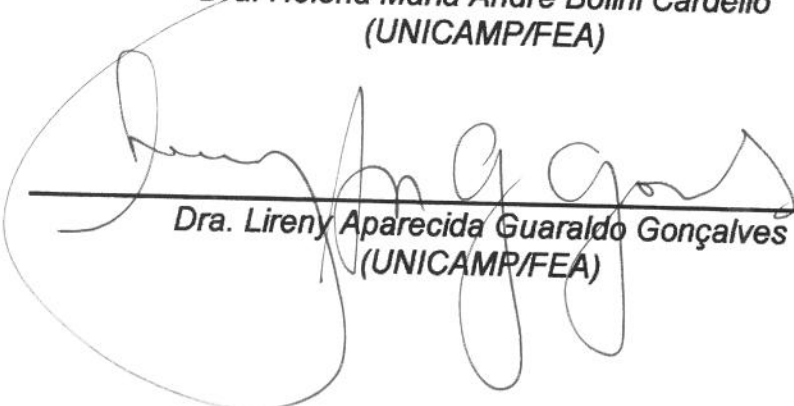


BANCA EXAMINADORA



Dr. Roberto H. Moretti – Orientador
(UNICAMP/FEA)

Dra. Helena Maria André Bolini Cardello
(UNICAMP/FEA)



Dra. Lirenny Aparecida Guaraldo Gonçalves
(UNICAMP/FEA)

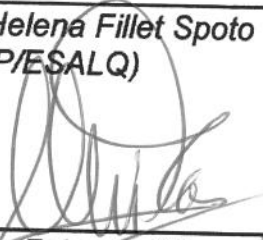
Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
(ITAL)



Dra. Marisa A. B. Regitano D'Arce
(USP/ESALQ)



Dra. Marta Helena Fillet Spoto
(USP/ESALQ)



Dr. Mauro Faber Leitão
(UNICAMP/FEA)

AO JOÃO FERNANDO, COM AMOR
DEDICO

AO LUIS FELIPE E GIULIA, MINHAS AMADAS CRIAÇÕES,
CONJUNTAS COM DEUS E JOÃO FERNANDO
DEDICO

AO MEU PAI, PASCHOALINO, PELO EXEMPLO DE VIDA
(IN MEMORIAM)
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Roberto H. Moretti pela oportunidade, confiança e orientação.

Ao Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP que gentilmente efetuou as irradiações das amostras assim como pelo acompanhamento dosimétrico, cedendo inclusive os dosímetros

Aos Engenheiros Elizabeth Somessari e Carlos Gaia do IPEN, pelo acompanhamento das irradiações especialmente pela compreensão das nossas necessidades sincronizadas com a produção da indústria.

À Salto's Alimentos especialmente na pessoa do Engenheiro Júlio César Baldin pelo apoio irrestrito no fornecimento das amostras de gema, atendendo todas nossas solicitações, sem o que não teríamos conseguido finalizar o trabalho.

À ITO pelo fornecimento de ovos para execução de parte do trabalho.

À Refinações de Milho Brasil pela elaboração das maioneses e pelas informações cedidas.

Ao CTC-ITAL, especialmente à engenheira Kátia Cipolli pela execução da análise sensorial de maionese

Aos doutores Lirenny Aparecida Guaraldo Gonçalves, Daniel Barrera Allerano e Renato Grimaldi pelas orientações e sugestões no decorrer do trabalho.

Ao Dr. R. Abril da empresa OMEGA – USA que nos forneceu amostra do antioxidante tocoferol

Ao laboratório de Higiene e sanitização do DTA pela realização das análises de microrganismos patogênicos, especialmente para Dirce Y. Kabuki que gentilmente acompanhou nossos trabalhos.

À Ana Lurdes Gândara pelas orientações nas análises de microbiologia.

À amiga Nora Emma Jochas Rúa pela grande ajuda nas análises sensoriais, pelo carinho e amizade

À amiga Daniela De Grandi Freitas pela inestimável colaboração nas análises microbiológicas, inclusive nos longos finais de semana.

À Margarida Maria Hoepfner Zaroni pela ajuda e dedicação na execução da parte estatística, além da amizade e incentivo.

À Mônica Luri Guiboshi pela formatação da tese

Aos provadores que colaboraram na análise sensorial, pela disponibilidade e paciência

À banca examinadora pelas correções e sugestões

Ao meu irmão Antonio César Rosamiglia pela colaboração em todos os momentos

À Roseli Maria de Andrade por me proporcionar a tranquilidade da estrutura do lar, com competência e assiduidade, além do carinho e atenção dispensados para meus filhos.

Aos amigos do DTA e laboratório de tecnologia de frutas e hortaliças pelo convívio e amizade especialmente às técnicas Ana Eipien Koon e Priscilla Albertini

Ao meu marido João Fernando, que carinhosamente soube compreender as minhas ausências e aos meus filhos Luis Felipe e Giulia, que mesmo com a pouca idade tiveram a maturidade para colaborar e me incentivar.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos, que de alguma forma, colaboraram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE.....	XIX
RESUMO	XXI
SUMMARY	XXIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE GEMA DE OVO.....	5
2.2. GEMA: PRINCIPAIS CONSTITUINTES	6
2.2.1. Proteínas	6
2.2.2. Lipídeos	10
2.2.3. Carotenóides	12
2.3. ESTABILIDADE OXIDATIVA DA FRAÇÃO LIPÍDICA E ANTIOXIDANTES ...	15
2.4. ANTIOXIDANTES EM PRODUTOS DE OVOS.....	19
2.5. PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	22
2.5.1. Solubilidade protéica.....	25
2.5.2. Viscosidade.....	26
2.5.3. Propriedade Emulsificante.....	27
2.5.3.1. Fatores que afetam a formação de emulsão	28
2.5.3.2. Tipos de desestabilização.....	29
2.5.3.3. Avaliação das propriedades emulsificantes	31
2.6. MICROBIOLOGIA DE OVOS.....	33
2.6.1. Salmonela em ovos.....	36
2.7. PASTEURIZAÇÃO TÉRMICA DE PRODUTOS DE OVOS.....	39

2.8. IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS	42
2.8.1. Aspectos químicos e nutricionais	45
2.8.2. Aspectos microbiológicos	47
2.9. IRRADIAÇÃO DE PRODUTOS DE OVOS	50
3. MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1. DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS	53
3.2. IRRADIAÇÃO DA GEMA LÍQUIDA	53
3.3. ENSAIO MICROBIOLÓGICO	54
3.3.1. Obtenção da gema líquida	54
3.3.2. Estudo da dose mínima de radiação gama para destruição de <i>Salmonella Enteritidis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	54
3.3.2.1. Preparação do inóculo	55
3.3.2.2. Inoculação	55
3.3.2.3. Irradiação	56
3.3.3. Estimativa da vida de prateleira de gema líquida em função da dose de radiação gama	57
3.3.3.1. Preparação dos tratamentos	58
3.3.3.2. Metodologia estatística	59
3.3.4. Análises físico-químicas	60
3.3.5. Análises microbiológicas	60
3.4. EFEITO DA DOSE DE RADIAÇÃO GAMA NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E SENSORIAIS DE GEMA LÍQUIDA E MAIONESE	63
3.4.1. Obtenção da gema líquida	63
3.4.2. Preparação do experimento	63
3.4.3. Irradiação	64
3.4.4. Análises físico-químicas	65
3.4.5. Propriedades funcionais	65
3.4.6. Análise estatística	68
3.4.7. DSC	69
3.4.8. Análise Sensorial de gema líquida	69

3.4.9. Avaliação de maionese preparada com gema de ovo irradiada (IR) e pasteurizada termicamente (PT)	71
3.5. EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA ASSOCIADO AO EMPREGO DE ANTIOXIDANTE, NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DA FRAÇÃO LIPÍDICA DE GEMA LÍQUIDA.....	75
3.5.1. Delineamento estatístico.....	75
3.5.2. Preparação da gema.....	77
3.5.3. Preparo das gemas com o antioxidante	77
3.5.4. Análises físico-químicas.....	78
3.5.5. Análise estatística.....	80
3.5.6. Análise Sensorial de Odor e Cor.....	81
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
4.1. ESTUDO DA DOSE MÍNIMA DE RADIAÇÃO GAMA PARA DESTRUIÇÃO DE <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Staphylococcus aureus</i>	85
4.2. ESTIMATIVA DE VIDA ÚTIL DE GEMA DE OVO LÍQUIDA PASTEURIZADA TERMICAMENTE E IRRADIADA COM DIFERENTES DOSES.....	91
4.2.1. Descrição do desenvolvimento de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em gema líquida pasteurizada e irradiada.	92
4.3. EFEITO DA DOSE DE RADIAÇÃO GAMA NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E SENSORIAIS DE GEMA LÍQUIDA E MAIONESE	114
4.3.1. Solubilidade Protéica.....	115
4.3.2. Propriedades emulsificantes	116
4.3.3 Viscosidade.....	119
4.3.4. DSC	127
4.3.5. COR.....	129
4.3.6. Análise Sensorial da gema.....	135
4.3.7. Maionese elaborada com gema irradiada e gema pasteurizada termicamente	137
4.3.7.1. Estabilidade.....	137
4.3.7.2. Consistência	139
4.3.7.3. Análise Sensorial de maionese.....	140

4.4. EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA ASSOCIADA AO EMPREGO DE ANTIOXI- DANTE NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DA FRAÇÃO LIPÍDICA DE GEMA LÍQUIDA.....	142
4.4.1. Valor de TBA.....	143
4.4.2. Extinção específica a 232 nm (E_{232}).....	149
4.4.3. Composição de Ácidos Graxos Polinsaturados	153
4.4.4. ANÁLISE SENSORIAL	160
5. CONCLUSÃO.....	165
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167
7. APÊNDICE	185

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Composição das principais classes de proteínas e lipoproteínas no grânulo e no plasma, de gema de ovo.	7
FIGURA 2. Composição média da fração lipídica da gema.....	10
FIGURA 3. Reações que ocorrem durante a autooxidação de gordura	17
FIGURA 4. Fluxograma geral de ovo, gema e clara pasteurizada.....	41
FIGURA 5. Fluxograma de preparação do experimento.....	64
FIGURA 6. Modelo de ficha empregada para avaliar odor e cor de gema líquida irradiada e pasteurizada.....	71
FIGURA 7. Modelo de ficha utilizado na avaliação sensorial de maionese	74
FIGURA 8. Modelo de ficha empregada para treinamento e seleção de provadores para odor e cor de gema irradiada com e sem antioxidante.....	83
FIGURA 9. Modelo de ficha empregada para avaliação sensorial de odor e cor de gema irradiada com e sem antioxidante.....	84
FIGURA 10. Comparação entre as médias (m) do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente em diferentes tempos de armazenamento; descrição da variabilidade ($m \pm$ desvio padrão da média) entre lotes.....	93
FIGURA 11. Comparação entre as médias (m) do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em 8 lotes de gemas líquidas irradiadas com 2,5 kGy em diferentes tempos de armazenamento; descrição da variabilidade ($m \pm$ desvio padrão da média) entre lotes.....	97
FIGURA 12. Comparação entre as médias (m) do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em 8 lotes de gemas líquidas irradiadas a 3,5 kGy em diferentes tempos de	

armazenamento; descrição da variabilidade ($m \pm$ desvio padrão da média) entre lotes.....	99
FIGURA 13. Comparação entre as médias (m) do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em 8 lotes de gemas líquidas irradiadas com 4,5 kGy em diferentes tempos de armazenamento; descrição da variabilidade ($m \pm$ desvio padrão da média) entre lotes.....	101
FIGURA 14: Estimativa da vida de prateleira da amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente e irradiadas nas doses 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5kGy, valor médio estimado do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de Mesófilos, limite superior para o verdadeiro valor da média e limite superior para o seu verdadeiro valor, ao nível de 95% de probabilidade. ...	107
Figura 15: Estimativa do tempo de prateleira da amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente e irradiadas nas doses 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5kGy, valor médio estimado do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de Psicrotróficos, limite superior para o verdadeiro valor da média e limite superior para o seu verdadeiro valor, ao nível de 95% de probabilidade.	109
FIGURA 16. Estimativa do tempo de prateleira da amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente e irradiadas nas doses 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5 kGy, valor médio estimado do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de Bolores e Leveduras, limite superior para o verdadeiro valor da média e limite superior para o seu verdadeiro valor, ao nível de 95% de probabilidade.....	111
FIGURA 17. Relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação da gema líquida sem tratamento, pasteurizada termicamente e, irradiadas com 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5 kGy.....	123
FIGURA 18. Relação entre a viscosidade aparente e a taxa de deformação da gema líquida sem tratamento, pasteurizada termicamente e, irradiadas com 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5 kGy.....	125

FIGURA 19. Termograma de gema líquida pasteurizada termicamente (PT) e irradiada com diferentes doses.....	129
FIGURA 20. Diferença de cromaticidade de gema irradiada e pasteurizada termicamente em relação à GST.....	133
FIGURA 21. Valores de TBA de gema líquida em função de dose de radiação, antioxidante e tempo de armazenamento.....	147
FIGURA 22. Valores de E_{232} de gema de ovo líquida em função de dose de radiação, antioxidante e tempo de armazenamento,	151
Figura 23. Comparações múltiplas para a porcentagem de C22:6 na gema líquida sem tratamento e sob irradiações de 2,5kGy e 4,5kGy associadas a antioxidantes observados em dois tempos de armazenamento, em dois experimentos.	157
Figura 24. Cromatograma da composição de ácidos graxos de gema de ovo com tocoferol (300µg/g) e irradiada com dose de 3,5kGy (R2,T0).....	159
Figura 25 Cromatograma da composição de ácidos graxos de gema de ovo irradiada com dose de 3,5 kGy (R1,T0).....	159

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição centesimal aproximada de produtos de ovos (g/100g)....	6
TABELA 2. Composição em ácidos graxos da gordura da gema	11
TABELA 3. Tipos de microrganismos presentes	35
TABELA 4. Tipos de bactérias encontradas em ovos deteriorados.....	36
TABELA 5. Formulação de maionese.....	72
TABELA 6. Descrição dos tratamentos do fatorial 3X2X3.....	76
TABELA 7. Análises físico-químicas de gema líquida.	86
TABELA 8. Análise microbiológica de gema líquida sem tratamento	86
TABELA 9. Nível de inoculação com <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. aureus</i> em amostras de gema de ovo líquida.....	87
TABELA 10. Controle de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. aureus</i> em amostras de gema previamente inoculadas e irradiadas com dose de 1,5 kGy.	88
TABELA 11. Análises microbiológicas de gema líquida antes da irradiação.	91
TABELA 12. Análise físico-química de gema líquida sem tratamento.	91
TABELA 13. Modelos de regressão não-lineares selecionados para ajuste do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em uma amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente e irradiadas nas doses 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5kGy em diferentes tempos de armazenamento (t).....	103
TABELA 14. Estimativa da vida de prateleira máxima da amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente e irradiadas nas doses 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5 kGy, valor médio estimado (M) do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras, limites inferior da estimativa (LI_e) e superior da estimativa (LS_e), ao nível de 95% de probabilidade.	104

TABELA 15. Valores de proteína, umidade e pH de gema irradiada, pasteurizada termicamente e natural (gema sem tratamento -GST).	114
TABELA 16. Valores de solubilidade (SP), capacidade de emulsificação (CE), índice de atividade de emulsificação (IAE) e estabilidade de emulsão(EE) de gema de ovo irradiada, pasteurizada termicamente e natural (sem tratamento).	115
TABELA 17. Estimativa dos parâmetros K_H ; n_H e erro padrão assintótico em nível de probabilidade de 95% para o modelo de Ostwald-De-Walle	121
TABELA 18. Valores de cor "L", "a" , "b" e diferença de cromaticidade em relação à GST para os diferentes tratamentos e o resultado do teste SNK.....	130
TABELA 19. Média dos atributos odor e cor de análise sensorial e resultado de teste de Dunnett para gemas irradiadas e pasteurizada termicamente.....	135
TABELA 20. Consistência de maionese elaborada com diferentes gemas	139
TABELA 21. Médias obtidas nas avaliações sensoriais de maionese em dois períodos de estocagem.	141
TABELA 22. Valores de TBA das amostras de gema líquida irradiadas em função de dose de radiação, antioxidante e tempo de estocagem com resultados do teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.....	144
TABELA 23. Valores de extinção específica a 232nm de gema de ovo líquida em função de dose de radiação, antioxidante e tempo de estocagem com resultados do teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls..	150
TABELA 24. Porcentagem Relativa de Ácidos Graxos Polinsaturados de amostras de gema líquida em função de dose de radiação, antioxidante e tempo de armazenamento (média e desvio padrão de 2 determinações).....	154
TABELA 25. Teste de comparações de DUNNETT entre valores médios de cor para gemas irradiadas com e sem antioxidantes.	161
TABELA 26. Teste de comparações de DUNNETT entre valores médios de odor para gemas irradiadas com e sem antioxidantes.	162

LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

TABELA A1. Contagem de mesófilos totais, psicrotróficos e bolores e leveduras de 8 lotes de gema líquida pasteurizada termicamente (valores observados)	185
TABELA A2. Contagem de mesófilos totais, psicrotróficos e bolores e leveduras de 8 lotes de gema líquida Irradiada com 2,5 KGy (valores observados).....	186
TABELA A3: Contagem de mesófilos totais, psicrotróficos e bolores e leveduras de 8 lotes de gema líquida Irradiada com 3,5 KGy (valores observados).....	187
TABELA A4. Contagem de mesófilos totais, psicrotróficos e bolores e leveduras de 8 lotes de gema líquida Irradiada com 4,5 KGy (valores observados).....	188
TABELA A5. Média, desvio padrão da média, valores mínimo e máximo e, coeficiente de variação do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em uma amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente (PT) em diferentes tempos de armazenamento (dias).....	189
TABELA A6.. Média, desvio padrão da média, valores mínimo e máximo e, coeficiente de variação do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em uma amostra de 8 lotes de gemas líquidas irradiadas na dose 2,5 kGy em diferentes tempos de armazenamento (dias).....	190
TABELA A7. Média, desvio padrão da média, valores mínimo e máximo e, coeficiente de variação do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em uma amostra de 8 lotes de gemas líquidas na dose 3,5 kGy em diferentes tempos de armazenamento (dias)	191
TABELA A8. Média, desvio padrão da média, valores mínimo e máximo e, coeficiente de variação do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em uma amostra de 8 lotes de	

gemas líquidas irradiadas na dose 4,5kGy, em diferentes tempos de armazenamento (dias).....192

TABELA A9: Estimativa dos parâmetros, erro padrão assintótico e intervalo de confiança assintótico ao nível de probabilidade de 95%, de modelos de regressão ajustados ao logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em uma amostra de 8 lotes 193

RESUMO

O presente trabalho trata de questões associadas aos efeitos da irradiação gama, em doses de 1,5, 2,5, 3,5 e 4,5 kGy, em gema de ovo líquida. Foram avaliados a vida útil baseada em parâmetros microbiológicos e os possíveis efeitos da irradiação nas propriedades funcionais e sensoriais, bem como a indução a processos oxidativos da fração lipídica.

A irradiação em uma dose de 2,5 kGy destruiu *Staphylococcus aureus* (a um nível de contaminação de aproximadamente 500 CFU/g) e *Salmonella* Enteritidis (a um nível de contaminação de aproximadamente 800 CFU/g).

A irradiação gama em uma dose de 2,5 kGy garantiu uma vida útil para a gema de 8 dias (4°C), o dobro daquela encontrada para gema pasteurizada termicamente (PT) (64°C/3,5 min) (4 dias). A dose de 3,5 kGy aumentou a vida útil para 15 dias e a dose de 4,5 kGy para 17 dias.

As propriedades funcionais de gema líquida irradiada e gema PT foram muito semelhantes às da gema sem tratamento (GST). Gemas irradiadas com doses de 3,5 e 4,5 kGy apresentaram uma redução na capacidade de emulsificação. Ocorreu perda de cor proporcional à dose de radiação.

As gemas irradiadas apresentaram "off flavor" para todas as doses, no entanto, na maionese processada com essas gemas, não foi encontrada diferença para odor e sabor quando comparada com a maionese preparada com gema PT.

As maioneses apresentaram boa estabilidade. Uma firmeza significativamente maior foi verificada na maionese preparada com gema irradiada com dose de 2,5 kGy seguida pela de 3,5 kGy,

A oxidação da fração lipídica foi constatada pelos valores de TBA, extinção específica a 232 nm e perda do ácido graxo polinsaturado C22:6 (DHA); sendo os valores desses índices proporcionais à dose de radiação. A presença de TBHQ contribuiu significativamente para prevenir a oxidação dos lipídeos e pigmentos, enquanto que o tocoferol não apresentou nenhuma atividade

antioxidante. Tanto o TBHQ quanto o tocoferol não conseguiram evitar a formação de odores estranhos.

Em conclusão, pode-se afirmar que o processo de radiação gama em doses até 3,5 kGy pode ser empregado como um processo alternativo à pasteurização.

Palavras-chave: irradiação gama, gema de ovo, microbiologia de ovos, oxidação, vida útil, propriedades funcionais, antioxidante

SUMMARY

This research addresses questions related to the effects of gamma irradiation on liquid egg yolk at doses of 1.5, 2.5, 3.5 and 4.5 kGy. The shelf life based on microbiological parameters, possible irradiation effects on functional properties, sensory evaluation and induction of oxidative processes in the egg yolk lipid fraction have been evaluated.

Irradiation treatment at a dose of 2.5 kGy destroyed *Staphylococcus aureus* (at a contamination level of approximately 500CFU/g) and *Salmonella* Enteritidis (at a contamination level of approximately 800CFU/g).

Gamma irradiation at a dose of 2.5 kGy guaranteed a shelf life for the egg yolk of eight days (4°C), double that achieved by thermal pasteurisation of the egg yolk (PT) (64 °C/3,5min)(4 days). A dose of 3.5 kGy extended the shelf life to 15 days and 4.5 kGy to 17 days.

The functional properties of irradiated liquid egg yolk and pasteurised egg yolk (PT) were quite similar to those of the liquid raw egg yolk. Egg yolks irradiated at doses of 3.5 and 4.5 kGy showed reductions in the emulsifying capacity. Loss of colour was proportional to irradiation dose.

The irradiated egg yolks presented an off flavour at all the doses. However, the difference in terms of odour and flavour was not significant when comparing mayonnaise prepared with irradiated and pasteurised egg yolk.

All the processed mayonnaise presented good stability. A significantly greater firmness was achieved in the mayonnaise prepared with irradiated egg yolk at 2.5 kGy, followed by that at 3.5 kGy.

Lipid fraction oxidation was evaluated by the TBA values, specific extinction at 232 nm and loss of the polyunsaturated fatty acids C22:6 (DHA), whose values were proportional to the irradiation dose. TBHQ contributed significantly to prevent lipid and pigments oxidation, while tocoferol presented no antioxidant activity. Neither TBHQ nor tocoferol contributed to preventing the formation of off flavours.

In conclusion, the gamma irradiation process using dose levels of up to 3.5 kGy, could be an alternative process to thermal pasteurisation,

Key words: gamma irradiation, egg yolk, egg microbiology, oxidation, shelf life, antioxidants, functional properties

1. INTRODUÇÃO

Os ovos de galinha não fertilizados são produzidos em larga escala comercial, fazendo parte da dieta alimentar da maioria da população mundial, seja pelo consumo direto, seja por meio de inúmeros alimentos que o contém.

Além de seus atributos nutricionais, o ovo se destaca pelas propriedades funcionais, o que o faz ser utilizado na produção de inúmeros alimentos.

No princípio os ovos eram comercializados somente em casca, porém com o crescimento da indústria de processamento de alimentos em geral, os mesmos passaram a ser industrializados nas formas: líquido pasteurizado, congelado e desidratado. O processamento proporciona maior vida-de-prateleira associada a um produto homogêneo e mais seguro do ponto de vista microbiológico, oferecendo ainda vantagens no transporte e estocagem, pois o volume é reduzido quando comparado com o ovo em casca, além de permitir maior praticidade no manuseio e não gerar resíduos.

Atualmente é prática comum o uso de produtos de ovos como ingredientes na indústria alimentícia, principalmente em produtos como: maionese, molhos para salada, doces, sorvete, confeitaria, massas, produtos de panificação, dentre outros. Ovos industrializados passaram a ter uma crescente demanda tornando-se uma mercadoria importante inclusive no mercado internacional.

O Brasil ocupa, em termos mundiais, o nono lugar entre os principais países produtores de ovos. Em 1995, o Ministério da Agricultura divulgou que o país produzia 1.127 milhões de dúzias de ovos, o que representa aproximadamente 70 ovos per capita. Dados mais recentes divulgados pela Associação Paulista de Avicultura mostram que o consumo de ovos no Brasil passou para 82 unidades por habitante/ano. Ao se comparar com outros países o consumo de ovos no Brasil não é dos mais expressivos. Por exemplo, nos Estados Unidos está por volta de 236 ovos per capita/ano, Hong Kong e México 277 ovos per capita/ano (INCERTEZA... 1998).

Dados sobre a quantidade de ovos destinada à industrialização são escassos, mas estima-se que 5% do total produzido no país destina-se ao processamento industrial (ALLEONI, 1997).

Pela relevância de sua produção e consumo interno e pelas possibilidades de participar mais intensamente do comércio internacional, percebe-se que o Brasil tem um grande potencial de crescimento na industrialização de ovos. Dados publicados pela FAO mostram que em 1996 o Brasil exportou cerca de 1520 toneladas métricas de produtos de ovos.

Em países como Alemanha e Estados Unidos o consumo per capita de ovos "in natura" tem decrescido; em contrapartida, registra-se um crescimento de produtos de ovos industrializados (JUNGLE, 1993; ALLEN, 1993).

Na industrialização de produtos de ovos o aspecto microbiológico é a primeira preocupação. A ingestão de ovos cru ou subcozidos tem sido a causa primária da infecção de seres humanos por microrganismos patogênicos principalmente *Salmonella sp* (St. LOUIS et al 1988).

Atualmente, na grande maioria dos países, o processamento de produtos de ovos envolve invariavelmente a aplicação de calor (pasteurização e secagem).

Especialmente para produtos de ovos, o tratamento térmico é uma operação crítica, pois, a temperatura e o tempo necessários para garantir uma pasteurização podem causar danos irreversíveis às propriedades funcionais, principalmente devido a modificações nas proteínas. Portanto a pasteurização deveria garantir a segurança microbiológica e não provocar efeitos deletérios às propriedades funcionais (CUNNINGHAM, 1995).

Nessa circunstância, a radiação gama com níveis de doses para atender aos requisitos de pasteurização, pode constituir em processo indicado para produtos sensíveis ao calor, como os produtos de ovos.

Dentre os benefícios propiciados pela radiação gama, podem ser destacados: a manutenção da temperatura durante o processo e aplicação direta no produto em sua embalagem final. O tratamento por radiação ionizante é uma

tecnologia emergente em um número crescente de países e cada vez mais empregada para diferentes produtos alimentícios (FARKAS, 1998)

Não são encontradas com frequência informações sobre os efeitos da radiação gama nas propriedades sensoriais e funcionais de gema de ovo líquida. Alguns estudos indicaram que a irradiação de gema pode afetar adversamente a cor e o aroma, por outro lado, pode melhorar a sua capacidade de emulsificação. Quanto ao aspecto microbiológico, a irradiação pode se constituir em um processo mais eficiente que a pasteurização térmica, prolongando a vida útil da gema líquida (HUANG et al., 1997; SERRANO et al.1997; KATUSIN-RAZEM et al. 1989, MA et al. 1990; MA et al. 1993).

Por outro lado, a radiação ionizante pode induzir à formação de radicais livres e desencadear uma série de reações, que podem oxidar os carotenóides, pigmentos responsáveis pela cor da gema, e também a fração lipídica que é constituída por substâncias susceptíveis à oxidação (KATUZIN-RAZEM et al., 1992; KATUZIN-RAZEM et al., 1989; HUANG et al., 1997; LEBOVICS et al. 1992, LEBOVICS et al. 1994).

A oxidação desses componentes durante a irradiação pode ser prevenida pelo emprego de antioxidantes, preservando a fração lipídica, a cor e evitando a formação de sabor e odor desagradáveis.

O presente trabalho se propõe a alcançar os seguintes objetivos:

- Definir a dosagem mínima necessária para a destruição de microrganismos patogênicos como *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*.
- Estimar a vida de prateleira quanto ao aspecto microbiológico de gema de ovo líquida, submetida a diferentes doses de radiação e da gema de ovo líquida pasteurizada termicamente.
- Avaliar os efeitos das diferentes doses de radiação nas propriedades sensoriais de emulsificação de gema líquida e da maionese produzida a partir da gema irradiada.

- Verificar a ocorrência de oxidação na fração lipídica da gema líquida irradiada, com diferentes doses, associadas ao emprego de antioxidante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Inicialmente, é importante esclarecer que durante todo o trabalho a referência à gema deverá ser entendida como aquela proveniente de ovo de galinha.

2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE GEMA DE OVO

A estrutura do ovo consiste de gema (31%), clara (58%) e cutícula, casca e membrana (11%). A clara e a gema são as duas frações da parte comestível do ovo. São sistemas complexos, com diferentes composições químicas, textura, cor, viscosidade, sabor, odor e funcionalidade. Os nutrientes não se encontram igualmente distribuídos; a gema que representa cerca de um terço do ovo fornece em torno de três quartos do total de calorias do ovo. Toda, ou quase toda gordura, ferro, vitamina A, tiamina e cálcio e quase a metade das proteínas e riboflavina (LI-CHAN et al. 1995).

A gema do ovo apresenta em torno de 48% de água, sendo a matéria sólida constituída, principalmente, de lipídeos e proteínas, numa proporção de 2:1. Pode conter até 1% de carboidratos, dos quais, aproximadamente 30% encontram-se ligados às proteínas (glicoproteínas). O principal carboidrato livre é a glicose. O conteúdo de elementos inorgânicos é de cerca de 1%, sendo que os principais minerais são fósforo, cálcio e potássio (LI-CHAN et al. 1995). A composição centesimal média da gema, clara e ovo integral pode ser vista na TABELA 1.

TABELA 1. Composição centesimal aproximada de produtos de ovos (g/100g)

Componente	Ovo inteiro	Clara	Gema
Umidade	75,5	87,90	48,20
Proteína	12,8 - 13,4	9,7 - 10,6	15,7 - 16,6
Lipídeos Totais	10,5 - 11,8	0,03	31,8 - 35,5
Cinza	0,8 - 1,0	0,5 - 0,6	1,1
Carboidratos	0,3 - 1,0	0,4 - 0,9	0,2 - 1,0
Calorias	147- 160	40 - 48	377

Fonte: LI-CHAN et al., 1995

2.2. GEMA: PRINCIPAIS CONSTITUINTES

2.2.1. Proteínas

Por centrifugação da gema líquida a alta velocidade (20.000G por 12 horas) SCHMIDT et al. (1956) conseguiram a separação de duas frações, uma sedimentada formada por grânulos e a outra um fluído límpido sobrenadante que chamou de plasma. SAARI et al. (1964) separaram os grânulos da gema e encontraram uma composição de 34% de proteínas, 60% de lipídeos e 6% de cinza, em base seca.

BURLEY & COOL (1961) reportaram que os grânulos constituíam cerca de 19 a 23% dos sólidos totais da gema com um conteúdo de umidade de 44%. Em termos de proteínas são compostos de fosvitina (16%) as quais são fosfoproteínas livre de lipídeos, α e β lipovitelinas (70%) e lipoproteínas de baixa densidade (LBD) (12%), estas últimas são complexos lipídeo-proteína.

O plasma, maior porção da gema, apresenta um conteúdo de umidade de 49%. Em base seca, o plasma é constituído de 77 a 81% de lipídeos, 2,2% de cinzas e 18% de resíduos não lipídeos, os quais são principalmente proteínas (SAARI et al., 1964).

No plasma os lipídeos estão combinados com proteínas formando uma grande fração de lipoproteínas de baixa densidade (LBD) e uma segunda fração de livetinas, proteínas globulares livres de lipídeos. De acordo com McCULLY et al. (1962), as lipoproteínas de baixa densidade e as livetinas representam cerca de 66 e 10,6% respectivamente, do total de sólidos do plasma da gema.

A FIGURA 1 mostra um esquema da composição das principais classes de proteínas e lipoproteínas no grânulo e no plasma, de gema de ovo.

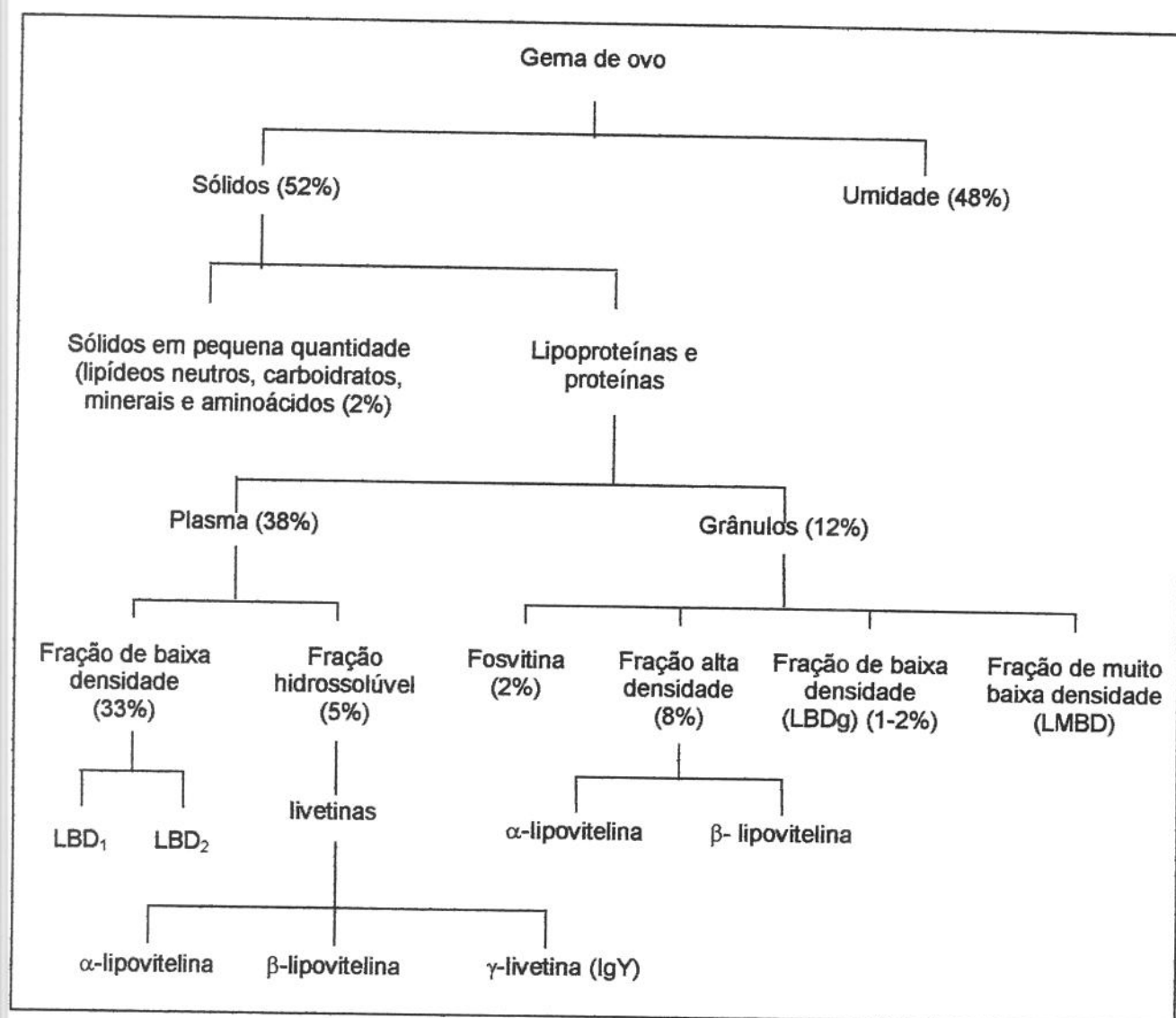


FIGURA 1. Composição das principais classes de proteínas e lipoproteínas no grânulo e no plasma, de gema de ovo.

Fonte: Li-CHAN et al. (1995).

- **Proteínas do Grânulo**

Fosfivitina: é uma fosfoglicoproteína livre de moléculas de lipídeos e contém cerca de 10% de fósforo e 12 a 13 % de nitrogênio.

ABE et al. (1982) fracionaram a fosvitina por filtração em coluna de gel Sephadex G 200 em duas frações α e β , e encontraram um conteúdo de fósforo de 2,97 e 9,2%, respectivamente.

A fosvitina é presumivelmente uma molécula alongada com dimensões de cerca de 14 por 280 Å (JOUBERT & COOK, 1958). No grânulo, a fosvitina pode formar complexos com lipovitulina (RADOMSKI & COOK, 1964; CHANG et al. 1977). CAUSERET et al. (1991) sugeriram a existência de pontes fosfocálcicas entre lipoproteínas de baixa densidade, lipovitelinas e fosvitina.

De acordo com SHANTZ & DAWSON (1974), um total de 18 diferentes proteínas com peso molecular entre 12.400 a 119.000 foram separadas por SDS-poliacrilamida gel eletroforese de uma fração de fosvitina.

Fração de alta densidade: BERNARD & COOK (1960) encontraram, por meio de eletroforese, duas frações de lipovitelinas que chamaram de α e β . Os pesos moleculares dos dímeros α e β lipovitelinas foram próximos de 400.000. A quantidade de lipídeos nessas proteínas está em torno de 20%, dos quais 40% são lipídeos neutros e 60% de fosfolipídeos (MARTIN et al., 1963). A fração de fosfolipídeos consiste de fosfatidilcolina (75%), fosfatidiletanolamina (18%) e esfingomielina e lisofosfolipídeos (7%).

Lipoproteína de baixa densidade: de acordo com GARLAND & POWRIE (1978) a fração de lipoproteína de baixa densidade dos grânulos (LBDg) contém cerca de 84% de lipídeos consistindo de cerca de 3,7% colesterol, 3% fosfolipídeos e 65% triglicerídeos. O total de lipídeos da LBDg foi similar àquele das LBD₁ e LBD₂ (do plasma) cujos valores estão em torno de 89 e 86%, respectivamente (SAARI et al. 1964)

- **Proteínas do plasma**

O plasma é composto de livetinas as quais são proteínas globulares livres de lipídeos e lipoproteínas de baixa densidade, representando cerca de 10,6 e 66%, respectivamente (McCULLY et al., 1962).

Livetinas: isolando livetinas, alguns pesquisadores encontraram 3 frações que chamaram de α , β e γ (SHEPARD & HOTTLE, 1949; MARTIN et al. 1957). De acordo com CHANG (1970) 15 bandas foram detectadas em eletroforese de disco de uma fração de α e β livetinas. Sob as mesmas condições de eletroforese somente uma banda foi formada a partir de uma fração de γ -livetina.

O ponto isoelétrico de livetinas está em torno de 4,8 a 5,0. O peso molecular de α , β e γ é de cerca de 80.000, 45.000 e 150.000, respectivamente (LI-CHANG et al., 1995).

Lipoproteínas de baixa densidade: são complexos formados por lipídeos neutros, fosfolipídeos e proteínas, porém não são estabilizados por ligações covalentes. A composição da LBD, segundo BURLEY (1975), é de 15% proteínas e 85% lipídeos. Estes estão representados por lipídeos neutros (60%) fosfolipídeos (20%) e colesterol e ésteres (4%). Por meio de ultrafiltração de solução de lipoproteína de baixa densidade (LBD), duas frações foram obtidas LBD₁ e LBD₂ e a composição das duas foi bastante similar (MARTIN et al., 1964).

O diâmetro das micelas de LBD varia de 170 a 600 Å, com média de 300 Å (KAMAT et al. 1972) A estrutura da LBD de gema de ovo de galinha foi incorporada na teoria geral de estrutura de LBD do sangue humano. De acordo com a LBD humana, os triacilgliceróis e ésteres de colesterol, ocupam o centro da partícula globular da lipoproteína e a superfície consiste de proteína, fosfolipídeos (FL) e colesterol (KAMAT et al., 1972).

CHANG et al. (1977) também sugeriram que as proteínas e fosfolipídeos da LBD estão agrupadas em pequenas partículas (45 Å) as quais estão adsorvidas na superfície de um núcleo de triacilgliceróis. Essas pequenas partículas podem, ser desprendidas do núcleo por tratamento com pepsina. A hipótese de que as proteínas distribuem-se sobre a superfície da micela de LBD foi reforçada por

SAARI et al. (1964) que demonstraram que a papaína pode hidrolisar suas frações protéicas.

De acordo com YAMAUCHI et al. (1976), que empregou eletroforese de gel SDS-poliacrilamida, 18 peptídeos foram separados de uma fração de Apo-LBD. Os dois principais componentes foram glicoproteínas com peso molecular de cerca de 71.000 e 135.000. O peso molecular de outros principais polipeptídeos foi de 16.000, 62.000 e 82.000.

A gema é portanto um sistema extremamente complexo, com uma mistura de compostos lipídico - protéicos, associados ou não, e suas propriedades diferem daquelas de seus componentes individuais. O sistema é estabilizado pelas estruturas moleculares e distribuição de forças intra e inter molecular. Observa-se que as lipoproteínas de baixa densidade são as substâncias presentes em maior quantidade na gema.

2.2.2. Lipídeos

O conteúdo de lipídeos de gema pode variar de 31 a 36 %. A variabilidade tem sido atribuída mais à linhagem da galinha do que à dieta.

A FIGURA 2 mostra uma composição média da fração lipídica da gema, de acordo com PRIVETT et. al. (1962) e RHODES & LEA (1957).

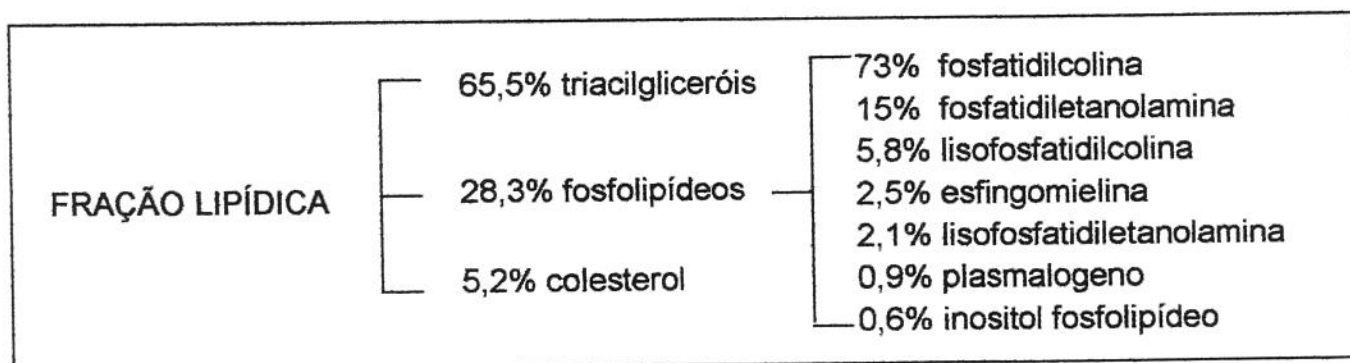


FIGURA 2. Composição média da fração lipídica da gema.

Um critério para avaliar o valor nutricional da fração lipídica está baseado no total de gordura e na sua composição em ácidos graxos saturados e

insaturados. Essa divisão é também interessante do ponto de vista tecnológico, pois esses ácidos graxos apresentam diferentes propriedades químicas e físicas. Uma composição média em ácidos graxos da gema do ovo pode ser vista na TABELA 2 (COOK & BRIGGS, 1990).

Os lipídeos da gema tem recebido atenção de diversos pesquisadores. Sua composição foi estudada, assim como fatores que podem modificar essa composição no sentido de incrementar suas qualidades nutricionais e funcionais. Pesquisas têm mostrado que o tipo e concentração da gordura na dieta da galinha é um importante fator modificador da composição da fração lipídica, uma vez que a galinha é monogástrica, a maioria da gordura da dieta é absorvida diretamente com mínima modificação (WATKINS, 1995).

TABELA 2. Composição em ácidos graxos da gordura da gema

Ácido graxo	g/100g de gema
Caprílico (8:0)	0,16
Cáprico (10:0)	0,47
Láurico (12:0)	0,15
Mirístico (14:0)	0,12
Palmítico (16:0)	7,70
Esteárico (18:0)	2,70
Araquídico (20:0)	0,12
Total saturados (AGS)	11,42
Palmitoléico (16:1)	1,24
Oléico (18:1)	13,40
Linoléico (ω -6) (18:2)	3,82
Linolênico (ω -3) (18:3)	0,08
Araquidônico (20:4)	0,30
Total insaturados (AGI)	18,87
Colesterol	1,52
Lecitina	7,20
Cefalina	1,42

O enriquecimento do conteúdo de ácido graxo ω -3 na gema através de dieta das aves, principalmente à base de óleo de peixe, tem sido sugerido por diversas décadas, mas atualmente o interesse nesse sentido foi renovado devido à interferência desses ácidos no metabolismo de lipoproteínas e biossíntese de eicosanóides repercutindo num efeito antitrombótico, diminuindo o risco de aterogênese (SIMOPOULOS, 1990; STADELMAN, 1989).

Outro interesse atual na fração lipídica da gema é quanto ao conteúdo de colesterol (em média 213mg/ovo). Pesquisas tem direcionado esforços para diminuir esse conteúdo (PARASKEVOUPOULOU et al., 1997).

2.2.3. Carotenóides

Os pigmentos responsáveis pela cor do ovo são compostos originários de plantas, chamados coletivamente de carotenóides. Os carotenóides estão compreendidos em 2 grandes grupos; os carotenos (hidrocarbonetos) e as xantofilas (hidrocarbonetos oxigenados). As xantofilas consistem de uma variedade de estruturas contendo grupos hidroxila, epoxi, aldeído ou cetona. Ésteres de ácidos graxos de carotenóides hidroxilados são também largamente encontrados na natureza.

Particularmente no ovo, os pigmentos responsáveis pela cor amarela são xantofilas, principalmente a luteína, a zeaxantina, a criptoxantina e uma reduzida quantidade de carotenos. O perfil de carotenóides de um alimento geralmente é complexo, indicando a presença de uma variedade de carotenóides. Diferentemente da composição de aroma, onde quantidades mínimas de um composto podem ser responsáveis por grandes mudanças no aroma final, na cor o que define a influência são os compostos presentes em grande quantidade (SCHAEFFER, 1988).

Diversos pesquisadores têm relatado que o tipo e quantidade de carotenóides na gema do ovo dependem da concentração na dieta da galinha, da absorção intestinal e biotransferência dos carotenóides para os ovários. A variedade de carotenóides na gema e a existência de formas livres e esterificadas

de hidroxicarotenóides dificultam a identificação e quantificação desses compostos (SCHAEFFER et al., 1988; OLLILAINEN et al., 1989).

As principais xantofilas da gema de ovos comerciais são: luteína, zeaxantina e criptoxantina. A luteína, um dihidroxicarotenóide, foi o principal pigmento, 62% do total de carotenóides, encontrado em gema de ovo de galinha alimentada com milho amarelo e farinha de alfafa. A zeaxantina foi o segundo maior com 12,9% do total de carotenóides (SMITH & PERDUE, 1966).

Em um grupo de galinhas alimentadas somente com milho amarelo, a quantidade determinada de caroteno, criptoxantina e zeaxantina, foi de 0,015, 0,19 e 1,79 mg por 100 g de gema (POWRIE & NAKAI, 1990). Muito poucos carotenos (próvitamina A) da ração da galinha são transferidos para a gema, uma vez que são preferencialmente convertidos para vitamina A (SCHAEFFER et al. 1988, HAMILTON & PARKHURST, 1990; BAILEY & CHEN, 1989).

OLLILAINEN et al. (1989) analisaram carotenóides em ovos comerciais por HPLC e encontraram 1575,8 µg/100g de gema de luteína (mais zeaxantina) e 28,9 µg/100g de gema de β-caroteno. Somente traços de α-caroteno, licopeno e criptoxantina foram detectados.

Todas as classes de carotenóides (carotenos, licopenos, xantofilas) são compostos lipofílicos, por isso são solúveis em óleo e solventes orgânicos. São moderadamente estáveis ao calor e sujeitos à perda de cor devido à oxidação.

Pela presença de um grande número de duplas ligações conjugadas os carotenóides são facilmente oxidados e os produtos resultantes de sua degradação ou da oxidação são muito complexos. Tais reações causam a perda de cor do carotenóide no alimento. A estabilidade de um determinado pigmento à oxidação vai depender muito do ambiente ou matriz a que está exposto e do tipo de processamento a que é submetido. Os carotenóides reagem com oxigênio "singlet", suprimindo-o e se oxidando em seguida, por isso pode-se dizer que esses compostos tem uma certa atividade antioxidante (von ELBE & SCHAWARTZ, 1996; MA et al., 1990)

A atividade enzimática, particularmente da lipoxigenase, acelera a degradação oxidativa de carotenóides. Isso ocorre por mecanismo indireto.

Primeiro a lipoxigenase catalisa a oxidação de ácidos graxos insaturados para produzir peróxidos e esses por sua vez reagem prontamente com carotenóides, causando a oxidação desses pigmentos e perda de cor. (vonELBE & SCHWARTZ, 1996). O tratamento térmico severo, a presença de luz, extrusão, tratamento com ácido e irradiação são processos que podem provocar a degradação de carotenóides.

A degradação de carotenóides devido à radiação- γ tem sido estudada por diversos pesquisadores. LUKTON & MACNNEY (1956) mostraram que o β -caroteno em solução foi mais sensível à radiação do que quando estão presentes nos tecidos de plantas. Os autores concluíram que a destruição é causada por uma reação secundária e depende da quantidade de radicais livres formados na solução. Em sistemas aquosos a degradação ocorre via reação com produtos radiolíticos da água, radicais hidroxilas, hidrogênio, e elétrons hidratado (TAKHUR & ARYA, 1993). Mesmo sem oxidar, o β -caroteno pode, por efeito da radiação ionizante, perder sua forma trans e com isso perde sua atividade pró vitamina A. O'NEIL & SCHWARTZ (1992) verificaram a ocorrência da isomerização de β -caroteno em batata doce irradiada, porém com 0,5 kGy, praticamente não provocou isomerização de trans- β -caroteno, sendo que 97% do β -caroteno permaneceu nessa forma.

Por meio de TLC e espectro de absorção de 300 a 500 nm, BANCHER et al. (1971) confirmou a presença de α , β e γ -caroteno, licopeno e luteína em óleo de palma. A análise quantitativa revelou um total de carotenos de 44,0 mg/ 100 de óleo, que após radiação- γ com doses de 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 e 11 kGy abaixou para 32,0; 20,6; 8,4; 4,46; 2,3; 0,114; 0,038 e zero mg/100 g de óleo respectivamente. Nenhuma luteína foi detectada após 8 kGy.

KATUSIN-RAZEM et al. (1992) conduziram um trabalho com ovo e gema em pó em que avaliaram mudanças oxidativas induzidas pela radiação- γ , baseados na formação de hidroperóxidos e oxidação de carotenóides. Os fatores estudados foram dose de radiação, taxa de dose (kGy/h) e presença ou ausência de oxigênio. A perda de carotenóides aumentou linearmente com o aumento da dose em amostras irradiadas sob vácuo, o que levou os autores a concluírem que

o oxigênio não é essencial para destruição de carotenóides submetidos à radiação. Isso mostra que esses compostos podem ser oxidados por radicais livres. A destruição de carotenóides recebeu maior influência da taxa de dose do que da dose de radiação, ocorrendo maiores perdas para uma mesma dose de radiação conduzida com baixas taxas de dose. Os autores observaram que tanto para a gema como para o ovo, não houve mudanças significativas na fração lipídica até uma dose de 2,5 kGy e atribuem esse fato a alguma proteção antioxidante presente tanto na gema como no ovo inteiro. Os primeiros candidatos são os carotenóides, principais antioxidantes lipossolúveis em ovos. Os autores sugerem também que os dois processos, formação de hidroperóxidos e oxidação de carotenóides, poderiam ser inibidos por um mesmo inibidor (antioxidantes).

2.3. ESTABILIDADE OXIDATIVA DA FRAÇÃO LIPÍDICA E ANTIOXIDANTES

Os problemas associados com óleos, na preservação dos alimentos, podem ser associados a 4 tipos de reações mais comuns que ocorrem com essa classe de compostos (SHERWIN et al., 1992):

- Reversão: resulta num tipo de degradação de odor e "flavor". Está associada a óleos com alto conteúdo de ácido linolênico e outros com mais de duas duplas ligações

- Hidrólise: Formação de ácido graxo livre e glicerol. Essa reação reversível é catalisada por ácidos, enzimas lipolíticas e temperaturas elevadas.

- Rancidez: autooxidação de ácidos graxos insaturados, resultando em uma mistura de compostos voláteis que conferem odores e sabores estranhos ao produto original;

- Polimerização: termo usualmente empregado para descrever a ligação cruzada entre dois átomos de carbono de cadeias de ácidos graxos insaturados. Polímeros são também formados por uma ligação de oxigênio entre duas cadeias de ácidos graxos nas insaturações. Ambos os tipos de polímeros podem conter estruturas cíclicas.

É importante reconhecer a diferença entre essas reações, para entender que tipo de antioxidantes são efetivos contra a rancidez oxidativa. Objetivando o uso de antioxidante para prevenir rancidez, o foco se torna a reação de autooxidação de óleos e gorduras.

Muitos alimentos ricos em óleos e gordura, aqueles com baixo conteúdo e até mesmo óleos essenciais estão sujeitos à deterioração oxidativa. Outras substâncias lipossolúveis susceptíveis à oxidação são mono e diacilgliceróis, esteróis, vitaminas lipossolúveis, fosfolipídeos, aromas e principalmente carotenóides devido à porção insaturada de sua molécula que é facilmente afetada pelo oxigênio (SCHULER, 1990).

A reação de oxidação de lipídeos foi elucidada na década de 40 como uma reação em cadeia de radical livre e foi denominada de autooxidação. Muitos cientistas concordam que a autooxidação ocorre via reação em cadeia envolvendo radical livre, ou espécie de oxigênio, tal como "singlet" com grupos CH_2 de metilenos alílicos. A exata origem desse radical livre, ainda não é totalmente conhecida. Sabe-se que a reação pode ser ativada por certos fatores tais como: temperatura, oxigênio "singlet", luz ultravioleta, presença de metais, compostos fotossensíveis ou radiação. Esses fatores são considerados iniciadores ou disparadores da reação de autooxidação (HAMILTON, 1989).

A autooxidação e o mecanismo de ação de antioxidantes tem sido revisado extensivamente pela literatura (STUCKEY, 1975; St. ANGELO, 1996; SIMIC & KAREL, 1980; FRANKEL, 1985; ALLEN & HAMILTON, 1989). Na FIGURA 3 pode ser vista a seqüência de reações da autooxidação de ácidos graxos.

Ácidos graxos de cadeia insaturada são o substrato dessa reação. No começo do processo de autooxidação, um hidrogênio é extraído do ácido graxo (grupo CH_2) na forma de radical e uma das duplas ligações desloca-se movendo o sítio do radical para outro carbono (reação a). Uma molécula de oxigênio dissolvida na matriz se liga a esse sítio gerando um radical peroxil (reação b). Este radical age como um forte iniciador ou catalisador da oxidação, pois ele abstrai um hidrogênio de outro doador provavelmente outro grupo metileno originando um hidroperóxido e outro radical livre, propagando a reação (reação c). O

hidroperóxido é muito instável, divide-se gerando dois radicais livres, cada um podendo iniciar outra reação em cadeia. Dessa forma a taxa de reação acelera propagando-se de maneira geométrica. A propagação pode tornar-se um processo descontrolado, a menos que seja interrompido pela ação de antioxidantes. Caso contrário, a reação termina quando ácidos graxos não estão mais disponíveis e peróxidos combinam entre si para formar produtos estáveis. Os hidroperóxidos se decompõem em aldeídos, cetonas, álcoois e ácidos, os quais produzem forte odor de ranço e causam efeito negativo na textura, "flavor" e gosto dos alimentos (STAUFFER, 1996).

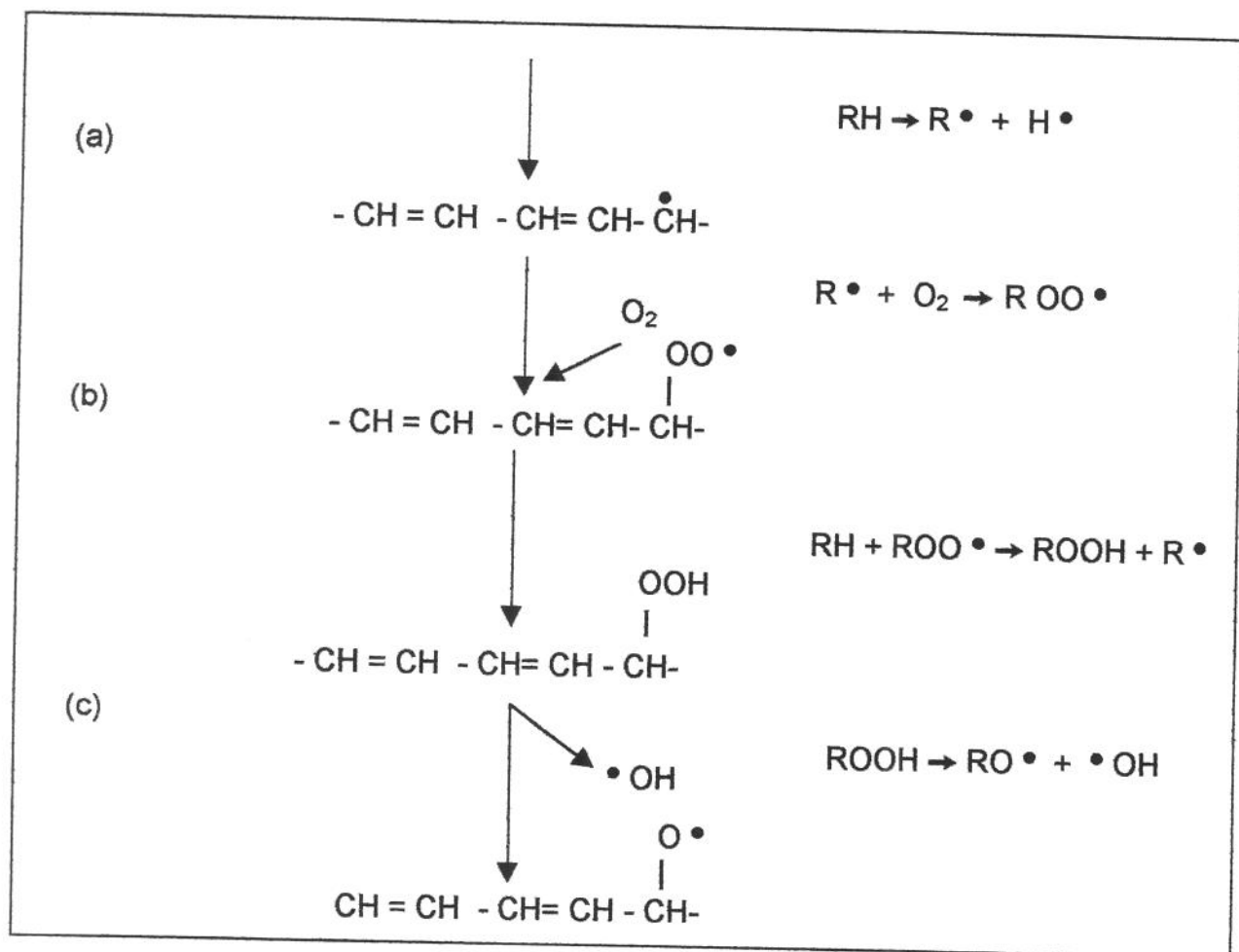
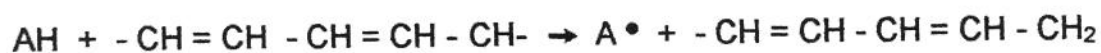


FIGURA 3. Reações que ocorrem durante a autooxidação de gordura

Portanto uma reação que elimine radicais livres prevenindo a propagação da peroxidação é a chave para a terminação desse mecanismo. Os antioxidantes são uma classe de compostos muito efetiva para essa finalidade. Acredita-se que os antioxidantes (AH) interrompam as reações em cadeia nos processos oxidativos, pela pronta doação de um átomo de hidrogênio para os radicais lipídicos ($R^\bullet$, $ROO^\bullet$, $RO^\bullet$) formando um ácido graxo estável e um radical livre do antioxidante (Equação 1), ou previnam o início da oxidação anulando outros radicais livres ativos no sistema. Vários estudos demonstram a efetividade de compostos fenólicos quanto a sua capacidade antioxidante. Enquanto o fenol sozinho não apresenta atividade antioxidante, a substituição de grupo alquil nas posições 2, 4 e 6 incrementa sua reatividade com o radical lipídico para formar radical fenoxil. Esse radical livre, pela sua estrutura eletrônica e sua estereoquímica permite o deslocamento do elétron não-pareado em volta do anel aromático de tal forma que o composto se apresenta estável incapaz de propagar a reação em cadeia. Entretanto, se os radicais livres continuam a formar e, eventualmente todo o antioxidante for consumido, a autooxidação se desenvolverá sem impedimentos (BOBBIO & BOBBIO, 1992; SIMIC et al., 1992).



Equação 1. Mecanismo de terminação da oxidação por meio de um antioxidante

De acordo com DZIEZAK (1986) os compostos capazes de atuar em reações oxidativas são geralmente classificados como:

▸ Antioxidantes: interrompem a reação em cadeia de radicais livres. Embora diversos compostos com função antioxidante sejam permitidos para uso em alimentos os mais utilizados são os compostos fenólicos representados por: butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), Galato de propila (PG) e terc-butil hidroquinona (TBHQ) além dos tocoferóis.

▸ Quelantes: seqüestram íons metálicos (especialmente aqueles com duas valências Cu, Fe etc.). Esses metais atuam como pró-oxidantes. Os agentes

quelantes agem como antioxidantes secundários reduzindo o potencial redox, estabilizando o íon metálico. São exemplos, o ácido cítrico e o EDTA, aminoácidos e outros.

▸ Agentes redutores: reagem prontamente com oxigênio em sistemas fechados, a remoção de oxigênio reduz a formação de radicais livres. L-ascorbil palmitato, ácido L-ascórbico, sulfitos, ácido eritórbico e seu sal de sódio.

▸ Decomposição de hidroperóxidos em produtos estáveis. Sabe-se que fosfolipídeos liberam prótons resultando em rápida decomposição de hidroperóxidos em produtos estáveis sem a formação de radicais livres (POKORNY et al., 1981). Outros compostos com similar mecanismo de ação incluem dilauril tiodipropionato e ácido tiodipropiônico.

A utilização conjunta de alguns antioxidantes pode ser benéfica provocando um efeito sinérgico. São exemplos o ácido cítrico com galato de propila, o ácido atua como um quelante dos metais, reduzindo a formação de complexos coloridos com os galatos (SHERWIN, 1978); os tocoferóis com ácido ascórbico ou seus ésteres, o tocoferol reage com o radical livre formando um radical tocoferil que reage com o ácido, regenerando-se para tocoferol novamente (NIKI, 1987; CORT, 1974, PACKER et al., 1979); o uso de BHA e o BHT juntos é uma prática comum e apresentam uma atividade maior do que a soma da atividade esperada dos dois individualmente.

2.4. ANTIOXIDANTES EM PRODUTOS DE OVOS

No processamento industrial de ovo, basicamente dois processos são empregados: a pasteurização térmica e a secagem, por meio de atomizadores. Produtos como gema, clara e ovo integral líquido, disponíveis comercialmente, são pasteurizados, conservados sob refrigeração (4 - 8°C) e apresentam vida útil de 5 a 7 dias. Esses mesmos produtos podem passar por processo de atomização produzindo gema, clara e ovo integral na forma de pó, os quais são conservados

por longos períodos (6 -12 meses) (Salto's Alimentos)¹

A radiação como processo para conservação de produtos de ovos pode contribuir para ampliar a vida útil principalmente dos produtos líquidos sob refrigeração. Porém, sabe-se que a radiação pode provocar a formação de radicais livres, que além de interferir na fração gordurosa, pode ainda produzir "off-flavor" no produto, devido a reações com outros compostos.

Uma maneira de consumir os radicais livres formados, seria a adição de antioxidantes de estrutura fenólica, que apresentam facilidade em doar hidrogênio para os radicais livres, neutralizando dessa forma sua reatividade.

Alguns pesquisadores têm investigado a influência dos antioxidantes nos produtos de ovos, porém esses estudos estão concentrados em produtos de ovo em pó (GUARDIOLA et al., 1995; GUARDIOLA et al., 1997; LI et al., 1996; LAI et al. 1996; WAHLE, 1993; LAI et al. 1995).

LAI et al. (1996) estudaram a influência de óxidos de nitrogênio (NO_x) considerados iniciadores de oxidação dos lipídeos insaturados incluindo carotenóides, associados ao conteúdo de tocoferol em ovo integral em pó. Monóxido e dióxido de nitrogênio são produzidos a partir do ar, resultado do seu aquecimento, por exposição direta à chama de gás. O tocoferol foi adicionado através da alimentação da galinha por enriquecimento da ração. Os autores concluíram que a suplementação com α -tocopherol melhora ou aumenta significativamente a estabilidade oxidativa de carotenóides e colesterol no ovo em pó.

A atividade do α -tocopherol foi também estudada por CHEN et al. (1998). Foram alimentadas galinhas com dietas suplementadas com α -tocopherol nas concentrações de 0; 7; 15; 30; 60 e 120 mg/ kg de ração, resultando em gemas com conteúdos de α -tocopherol de 25, 30, 35, 45, 50 e 75 $\mu\text{g/g}$ de gema. A estabilidade oxidativa da gema foi determinada pela medida de teor de oxigênio e teor de compostos voláteis do espaço livre da embalagem. O α -tocopherol teve um

¹ Comunicação pessoal feita pelo Engenheiro de Alimentos Júlio César Baldin, Diretor Industrial da Salto's Alimentos, empresa processadora de ovos, localizada no município de Salto (SP) (julho/1999)

efeito na estabilidade da gema como um antioxidante nas concentrações de 35, 45 e 50 $\mu\text{g/g}$ de gema e pró-oxidante a 75 $\mu\text{g/g}$ de gema. A adição de 60mg de α -tocoferol/ kg de ração resultou na melhor estabilidade de gema de ovo.

Os tocoferóis existem na natureza em quatro formas d- α -tocoferol, d- β -tocoferol, d- γ -tocoferol e d- δ -tocoferol. O α - tocoferol e vitamina E tornaram-se sinônimos; ao beta e gama são atribuídos 50 e 10% de atividade vitamínica respectivamente e zero para a forma delta (PAPAS, 1991).

O α - tocoferol é o mais potente antioxidante biológico, isto é, para tecidos vivos e apresenta baixa eficiência quando adicionado em produto alimentício. Ésteres de alfa-tocoferol tais como acetato e succinato, os quais são fontes comuns de vitamina E em suplementos nutricionais não atuam como antioxidantes em alimentos porque a atividade do grupo hidroxil está protegida (PAPAS, 1991).

Para a adição direta nos alimentos, não por via metabólica, as misturas de tocoferóis (β , γ e δ) são efetivos antioxidantes principalmente para banha, toucinho, gordura de frango e outras gorduras animais. Eles não apresentam a mesma efetividade para óleos vegetais (PAPAS, 1991).

Os tocoferóis são extraídos de óleos vegetais, sendo a principal fonte o destilado da desodorização de óleo de soja (DDOS). Embora disponível em várias composições, os mais efetivos são aqueles com alta concentração de γ e δ tocoferóis (geralmente 80% do total de tocoferóis). O restante é composto basicamente por alfa, pois o beta se encontra em pequenas quantidades. Produtos comerciais estão disponíveis tipicamente em duas potências, 50 e 70% de tocoferóis totais, diluídos em óleo vegetal (BUCK, 1990; SCHULER, 1990).

Uma mistura de tocoferóis é o antioxidante de escolha quando outros sintéticos não são desejáveis. Os níveis recomendados são de 100 - 300 $\mu\text{g/g}$, calculados sobre a porção de gordura do alimento. Níveis maiores que 500 $\mu\text{g/g}$ não são recomendados pois provocam efeito pró-oxidante (CILLARD et al. 1980).

Um planejamento fatorial foi montado para verificar a influência da temperatura, do ar de secagem, tipo de antioxidante, concentração de antioxidante, condições de embalagem e tempo de estocagem no ovo em pó.

Dentre as observações feitas, destacaram-se: a) os autores concluíram que a combinação de ascorbil palmitato com o α -tocoferol (concentração de 50/50 e 100/100 μ g/g) pareceu provocar um efeito prooxidante em termos de oxidação de ácidos graxos e colesterol; b) o galato de propila nas concentrações de 100 e 200 μ g/g pareceu ser ótimo para proteger ácidos graxos polinsaturados, colesterol e a perda de cor. Os antioxidantes parecem ser mais efetivos sob fortes condições oxidativas (GUARDIOLA et al.1997)

Em um experimento feito com gema de ovo em pó, os antioxidantes BHA (0,01%), ascorbil palmitato (0,023%) e mistura de tocoferóis (0,023%) foram adicionados à gema líquida antes da secagem. Após a secagem a gema foi estocada em condições aceleradas (60 °C por 28 dias). Os produtos de oxidação do colesterol (POC) foram analisados. Todos os antioxidantes mostraram efeito inibidor na formação do POC quando comparado com o controle (sem oxidante) e o tocoferól foi mais efetivo do que o palmitato de ascorbila (HUBER, et al., 1995).

2.5. PROPRIEDADES FUNCIONAIS

A propriedade funcional de um composto ou sistema está relacionado à sua capacidade de desenvolver ou agregar determinadas características a um produto alimentício.

O termo funcionalidade ou propriedades funcionais é muito aplicado às proteínas e refere-se principalmente a capacidades como: hidratação (ligação da água por pontes de hidrogênio), solubilidade, viscosidade (espessamento, imobilização), geleificação (formação de matriz protéica), emulsificação (formação e estabilização de emulsão), formação de espuma (filmes estáveis, com imobilização de gases), coesividade, adesividade (proteína como material aderente), elasticidade (ligações hidrofóbicas, ligação S-S) absorção de gordura (ligação de gordura livre), mudança de fase durante aquecimento (desnaturação) (HALÁS & LÁSZTITY, 1991).

É interessante ressaltar que as propriedades funcionais de proteínas dependem de mais de uma característica: a geleificação, a viscosidade e a

solubilidade dependem da interação proteína-água e proteína-proteína que por sua vez está relacionada com tamanho, forma e flexibilidade das moléculas. A emulsão e formação de espuma dependem da solubilidade, hidrofobicidade e tamanho da molécula as quais são definidas pela composição e distribuição de aminoácidos e conformação espacial (DAMODARAN, 1997; BERGENSTAHL & CLAEISSON, 1990; PHILLIPS et al. 1994)

Portanto, as propriedades funcionais dos compostos estão relacionadas às suas estruturas moleculares (química e conformacional) e insere-se nesse contexto como fator de grande influência, a natureza do meio, na qual está exposto o composto. Características do meio como força iônica, constante dielétrica, pH, temperatura, viscosidade e condições de processamento refletem em alterações nas propriedades funcionais (CHEFTEL et al., 1989; FANG & DALGLEISH, 1998; LI-CHAN, 1983).

É bastante complexo o comportamento funcional de uma proteína e está atrelado a uma série de fatores interrelacionados, os quais não estão devidamente esclarecidos. Na maioria das vezes o composto funcional está inserido em um sistema ou uma matriz alimentar, nesse caso a complexidade das inter-relações amplia-se e nem sempre o resultado obtido com a proteína isolada pode ser extrapolado para sistemas alimentares.

A gema de ovo é um exemplo de uma matriz alimentar freqüentemente empregada na fabricação de diversos alimentos, justamente por suas propriedades funcionais, capaz de conferir características específicas ao produto final.

Sua principal propriedade funcional é a emulsificação, garantida pela presença de quantidades substanciais de proteínas complexas e fosfolipídeos.

Estudos tem sido conduzido para entender a relação dos compostos da gema com a sua capacidade de emulsificação e alguns autores relatam que as lipoproteínas de baixa densidade (LBD) são os principais compostos que contribuem para a emulsificação (VINCENT et al., 1996; MIZUTANI & NAKAMURA, 1984; BURLEY & VADEHARA, 1989).

CHUNG & FERRIER (1991) avaliaram a propriedade de emulsificação da fração de proteínas solúveis da gema e concluíram que estas têm importante função nessa propriedade.

Os fosfolípidos (FLs) ligados aos polipeptídeos da micela de LBD também exercem papel na emulsificação. Mudanças estrutural e funcional nas LBD em função de modificações nos FLs por ação de fosfolipase A₂ foram examinadas por MINE (1997). Embora a modificação dos FLs nas LBDs não tenha afetado sua estrutura secundária nem sua propriedade imunológica, a emulsão preparada com LBD modificada apresentou considerável estabilidade ao calor. O autor sugere que a formação de um complexo LipoFLs com polipeptídeos da LBD seria o responsável pela estabilidade da emulsão frente ao calor.

PARASKEVOPOULOU et. al. (1997) avaliaram as propriedades funcionais de gema de ovo com reduzido teor de colesterol, preparada por extração supercrítica com CO₂. A gema obtida apresentou metade de seu teor inicial de lipídeos e cerca de 22 % do colesterol total inicial. Foi avaliada uma emulsão tipo maionese e a gema modificada apresentou um índice de consistência mais baixo do que a gema controle; a capacidade de formação de espuma e sua estabilidade foram consideravelmente maior na gema modificada em comparação com a gema controle, mas o bolo obtido com a gema modificada apresentou uma textura mais rígida, apontando diferença entre os bolos, pelos provadores.

Os autores sugerem que a retirada dos lipídeos neutros juntamente com colesterol modificou a estrutura das lipoproteínas, afetando a emulsificação adversamente, o que fortalece a hipótese do importante papel da LBD na emulsificação.

A gema é, pois, um sistema complexo e sensível, e as modificações impostas a esse sistema refletem, na maioria das vezes, em alterações nas suas propriedades funcionais, das quais, merece destaque as propriedades emulsificantes, e outras correlatas como solubilidade protéica e viscosidade.

2.5.1. Solubilidade protéica

Muitas das propriedades funcionais de proteínas, incluindo a habilidade de formar géis e estabilizar emulsões e espumas, dependem de sua solubilidade. Proteínas insolúveis têm uso muito limitado em alimentos.

Considerando que macromoléculas tais como proteínas não formam uma solução verdadeira, a solubilidade protéica pode ser definida como uma dispersão coloidal ou uma suspensão estável de partículas insolúveis (KILARA & SHERKASI, 1986; BORDERIAS & MONTERO, 1988).

A solubilidade é a manifestação de um equilíbrio termodinâmico de interações proteína-proteína e proteína-solvente. As principais interações que influenciam características da solubilidade de proteínas são de natureza hidrofóbica e iônica. Interações hidrofóbicas promovem ligações proteína-proteína que resultam em um decréscimo de solubilidade, enquanto interações iônicas promovem ligações proteína-água e resultam em um aumento da solubilidade (DAMODARAN, 1996). A composição em aminoácidos de uma proteína, particularmente, o número de resíduos ácidos (aspargil, glutamil) e básicos (histidil, arginil, lisil), os quais apresentam cargas, aumentam o número de interações eletrostáticas com a água, contribuindo para maior solubilidade das proteínas.

As variações de pH modificam a ionização e a carga líquida da proteína, alterando as forças de atração e repulsão entre as proteínas e associação com água. No ponto isoeletrico, em que a carga líquida da proteína é quase nula, as interações água-proteína são mínimas, e as interações proteína-proteína são máximas, levando à formação de agregados e precipitados protéicos, com mínima solubilidade (BODERIAS & MONTERO, 1988).

Os solutos, de um modo geral, produzem mudanças na solubilidade. Em baixas concentrações de sais a solubilidade pode aumentar (salting-in) devido às interações dos íons com as cargas das proteínas, reduzindo a atração eletrostática entre as cargas opostas de grupos vizinhos. Mas em altas concentrações de sais pode ocorrer precipitação das proteínas (salting-out)

devido a predominância das interações água-sal em detrimento das interações água-proteína (CHEFTEL, et al. 1989, DAMODARAN, 1996).

Diversos termos são empregados para se referir à solubilidade de proteína alimentar. Proteína solúvel em água (PSA), proteína dispersa em água (PDA), índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) e outros (KILARA & SHARKASI, 1986). Normalmente esta determinação envolve a dispersão da proteína em água, agitação sob condições controladas de pH, temperatura e força iônica, seguida de centrifugação. O nitrogênio na fração solúvel pode ser determinado pelo método de Kjeldahl ou métodos espectrofotométricos. O método de MORR et al. (1985) é o resultado de um estudo colaborativo para determinação desta propriedade, e considera a solubilidade e não a dispersibilidade da proteína, uma vez que a centrifugação é realizada a alta velocidade.

2.5.2. Viscosidade

De um modo geral a reologia pode ser definida como a ciência que descreve a taxa de deformação de um corpo sob a influência de forças externas. A viscosidade de um fluido revela sua resistência ao deslizamento quando submetido à ação de forças externas (DAMODARAM, 1996).

O conhecimento do comportamento reológico é de interesse como parâmetro de controle de qualidade, na compreensão de textura e nos projetos de engenharia, especialmente, nas operações de bombeamento, aquecimento, resfriamento, atomização, concentração, e outras (BARNES et al., 1989).

Basicamente os fluidos são classificados quanto ao seu comportamento reológico como Newtoniano e não Newtoniano. A grande maioria dos fluidos alimentícios apresenta comportamento não Newtoniano e para a caracterização deste tipo de fluido pode ser usada a viscosidade aparente (η_a) a uma taxa de deformação específica (BARNES et al. 1989). As soluções protéicas costumam apresentar comportamento não Newtoniano do tipo pseudoplástico, cuja característica é o decréscimo da viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação, ou seja, a tangente em cada ponto da curva de escoamento diminui

com o aumento da taxa de deformação.

Determinadas ocorrências com proteínas em solução vão refletir em uma alteração da viscosidade.

O diâmetro aparente das moléculas ou partículas dispersas é o fator que mais afeta o comportamento reológico dos fluídos. Este por sua vez depende de uma série de características, aquelas intrínsecas da molécula de proteína, como : massa, tamanho, volume, estrutura, assimetria molecular, cargas elétricas, facilidade de deformação, de fatores externos como pH, força iônica e temperatura, interação proteína-solvente, que afeta o entumescimento, a solubilidade e a esfera da hidratação hidrodinâmica e das interações proteína-proteína que afetam o tamanho das partículas agregadas.

A clivagem de ligações peptídicas reduz drasticamente a viscosidade e a capacidade de geleificação.

A gema de ovo líquida pasteurizada termicamente, apresentou comportamento ligeiramente pseudoplástico, aproximando-se muito do comportamento Newtoniano, à temperaturas de 5, 15, 25, 40, 60°C (OHATA, 2000).

2.5.3. Propriedade Emulsificante

Uma mistura íntima de dois líquidos imiscíveis é a clássica definição de emulsão. A mistura requer o fornecimento de energia para ocorrer a dispersão e, por isso, é termodinamicamente instável (FRIEBERG et al., 1990). Moléculas com caráter anfifílico, contendo grupos polares e não polares, que podem diminuir essa energia interfacial e estabilizar as partículas dispersas, são chamadas de agentes emulsificantes. As substâncias usadas como emulsificante são várias, as que ocorrem naturalmente como proteínas, fosfolípidos e esteróis, e outros sintéticos como ésteres de glicerol, propileno glicol, ésteres de ácidos graxos e outros (BRENNAN et al., 1990).

A gema de ovo é considerado um excelente agente emulsificante pois contém quantidades substanciais de proteínas (lipoproteínas, fosfoproteínas,

glicoproteínas, fosfolipoproteína), fosfolipídeos e colesterol. De fato, sua principal propriedade funcional é a emulsificação e o produto de maior expressão comercial que utiliza a gema como emulsificante, é a maionese.

As proteínas, como emulsificantes, necessitam primeiro se difundir e atingir a interface, em seguida desdobram-se direcionando seus grupos não polares para a fase lipídica, o que diminui a energia livre do sistema e faz com que o restante da proteína adsorva espontaneamente, expondo-se e difundindo-se em uma camada monomolecular, criando uma cobertura protetora em volta das gotículas da fase dispersa, prevenindo a coalescência das gotas (PHILLIPS, 1981).

Sugere-se que, quanto mais hidrofóbica a proteína, maior será sua concentração na interface, menor tensão superficial e mais estável a emulsão (FENNEMA, 1996).

Portanto, o emulsificante tem duas funções, reduzir a tensão interfacial entre os líquidos e estabilizar a emulsão prevenindo a separação das fases.

2.5.3.1. Fatores que afetam a formação de emulsão

A formação de uma emulsão sofre a influência de uma série de fatores, a começar pelas proteínas, as quais apresentam diferentes comportamentos quanto às propriedades emulsificantes. Isto se deve a fatores intrínsecos da molécula como hidrofobicidade, flexibilidade molecular, solubilidade, tamanho da molécula (LI-CHAN et al., 1984).

Fatores extrínsecos podem afetar a estrutura do emulsificante e ou sua propriedade hidrodinâmica, o que conseqüentemente pode alterar a capacidade e ou estabilidade da emulsão.

A irradiação como um fator extrínseco, poderia afetar a estrutura ou conformação de proteínas ou de fosfolipídeos. HUANG et al. (1997), irradiou gema de ovo com uma única dose 2,3 kGy e observou um aumento da capacidade de emulsificação. Os autores sugerem que esse efeito pode estar relacionado com mudanças estruturais das proteínas, porém o padrão eletroforético não apontou diferença entre as proteínas de gema irradiada e não irradiada.

Outros fatores de caráter extrínseco, relacionados com condição físico-química do meio, no qual a emulsão está sendo formada, como pH, força iônica, temperatura, presença de açúcares, surfactantes de baixo peso molecular e tipo de óleo, geralmente alteram o desempenho de proteínas na formação de emulsões. O pH por exemplo, pode alterar a solubilidade das proteínas, que é considerada uma condição primária para a formação de emulsões (HILL, 1996; KINSELLA, 1976).

Fatores, de ordem mecânica, têm grande influência nas características da emulsão, são eles: tipo e desenho do equipamento, intensidade do aporte energético, velocidade de adição de óleo. O método de formação da emulsão se relaciona diretamente com o tamanho do glóbulo de gordura formado e consequentemente com sua desestabilização. Misturadores de baixa velocidade produzem emulsões com larga faixa de tamanhos de glóbulos com menores diâmetros em torno de 20 μm . Os ultra turrax com velocidades entre 8000 a 24000 rpm produzem glóbulos de 5 a 10 μm de diâmetro. Homogeneizadores ultra-sônicos produzem glóbulos de 1 μm de diâmetro. Homogeneizadores a pistão também são largamente utilizados e produzem emulsões com glóbulos menores que o ultra-sônico (HILL, 1996).

TORNBERG (1980) constatou que as condições de formação de emulsão (equipamento/energia) foi um fator mais importante do que a proteína, na emulsão formada.

2.5.3.2. Tipos de desestabilização

Uma vez que a adição de energia é necessária para a formação de emulsão, então estas são sistemas termodinamicamente instáveis. A estrutura de uma emulsão pode mudar com o decorrer do tempo ocorrendo desestabilização, os seguintes fenômenos podem ocorrer:

CREMEAMENTO: é o movimento da fase dispersa devido a diferença de densidade entre as fases (óleo/água). Quando esse movimento ocorre a uma taxa baixa é chamado de cremeamento, em alta taxa denomina-se drenagem. Uma

indicação da velocidade de cremeamento pode ser obtida a partir da Lei de Stokes (HILL, 1996)

$$V = \frac{g \cdot \Delta \rho \cdot d^2}{18 \cdot \eta_0} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde:

v= velocidade de cremeamento

g = força gravitacional

$\Delta\rho$ = diferença de densidade entre as fases

d = diâmetro dos glóbulos de óleo

η_0 = viscosidade da fase contínua.

De acordo com a Equação 2 o cremeamento pode ser reduzido pelas seguintes ações:

- 1- Igualando as densidades das fase. O que é muito difícil atingir em emulsões alimentícias.
- 2- Incrementando a viscosidade do meio de dispersão. A adição de gomas e amidos pode aumentar a viscosidade de emulsões.
- 3- Redução do tamanho do glóbulo de óleo, este é um fator de forte influência pois trata-se de efeito exponencial.

Portanto, as condições de formação de emulsão (equipamento/energia) é um fator importante pois determina o tamanho dos glóbulos de gordura.

FLOCULAÇÃO: é uma agregação dos glóbulos de gordura que pode ser reversível. Os glóbulos se agregam quando a estabilização estérica é perdida ou modificada e as forças de repulsão eletrostática diminuem (HILL, 1996; FRIBERG et al., 1990).

COALESCÊNCIA: quando duas gotas colidem e vencem a barreira energética da camada interfacial e se unem em um único glóbulo perdendo suas identidades.

A quebra do filme interfacial é um processo lento geralmente precedido de floculação (HILL, 1996; FRIBERG et al., 1990).

2.5.3.3. Avaliação das propriedades emulsificantes

Propriedades emulsificantes são comumente discutidas em termos de capacidade de emulsificação (CE), estabilidade de emulsão (EE) e atividade emulsificante (AE). Vários métodos tem sido usado para medida desses índices.

A CE se refere à máxima quantidade de óleo que uma determinada proteína sob condições específicas consegue emulsionar. A primeira medida de CE foi conduzida por SWIFT et al. (1961). O método consiste da adição contínua de óleo a uma dispersão protéica mantida sob agitação, até que ocorra a quebra ou inversão da emulsão. Variações ocorrem no monitoramento desse momento, que pode ser percebida visualmente ou por alteração do ruído durante a agitação. O uso de corante lipossolúvel facilita a visualização no momento da inversão de fases.

Um método mais preciso para monitorar a quebra da emulsão, consiste na medida da resistência elétrica da emulsão, no momento em que se quebra a emulsão, os glóbulos de óleo de unem e passa a ser a fase contínua, a qual possui baixa condutividade elétrica portanto alta resistência elétrica. Nesse momento ocorre um brusco aumento da resistência detectado por um ohmímetro (LI-CHAN et al., 1984). Nesse ponto o volume de óleo é registrado e a CE é geralmente expressa em mL de óleo/ g de proteína.

O método turbidimétrico desenvolvido por PEARCE & KINSELLA (1978) é freqüentemente utilizado para estabelecer o Índice de Atividade de Emulsificação (IAE). A capacidade da proteína para estabilizar emulsões está relacionada com a área interfacial que pode ser coberta por essa proteína, o método baseia-se na teoria de que dispersões diluídas de partículas esféricas, a turbidez é diretamente proporcional à área interfacial da emulsão. O IAE foi definido como :

$$IAE = \frac{2.T.D}{\phi.C} \quad \text{(Equação 3)}$$

onde:

T (turbidez) = $(2,303 \cdot A) / l$

D = fator de diluição

l = distância percorrida pela luz na cubeta

ϕ = fração volumétrica do óleo

C = concentração da proteína na solução de gema

A = absorvância a 500 nm, IAE é expresso em m²/g de proteína.

A estabilidade é sem dúvida o teste que apresenta maior variabilidade de métodos para sua quantificação. Refere-se à capacidade de uma proteína de manter, sustentar a emulsão inalterada durante período de tempo à uma temperatura e força gravitacional fixas. EE é comumente medida em termos da separação de fases da emulsão em condições definidas. Métodos gravimétricos são freqüentemente usados nesta determinação. A separação das fases pode ocorrer naturalmente dentro de um período de tempo pré fixado e o peso ou altura da coluna separada é registrado (YAMAMOTO & ARAKI, 1997; CHUNG & FERRIER, 1992).

No caso de emulsões mais estáveis, em que a separação demoraria meses para ocorrer, a desestabilização pode ser acelerada por meio de centrifugação e ou temperaturas mais altas (70-90°C) (LIEU et al., 1978; MINE, 1997) porém a centrifugação não reproduz o mecanismo de desestabilização da emulsão sob condições normais.

A determinação de umidade ou gordura das fases separadas antes e após um determinado período de repouso (temperatura fixa) é utilizado como um índice de estabilidade (ACTON & SAFFLE, 1970; MIZUTANI & NAKAMURA, 1984).

Outros autores utilizaram a medida do diâmetro dos glóbulos de óleo da emulsão. A taxa de coalescência é calculada com base na modificação do tamanho dos glóbulos num determinado período de tempo, observada através da

medida do diâmetro (geralmente por microscópio) de um número entre 1000 e 1500 glóbulos (PARASKEVOPOULOU et al. 1997; PARASKEVOPOULOU & KIOSSEOGLOU, 1995; MIZUTANI & NAKAMURA, 1985, KIOSSEOGLOU & SHERMAN, 1983, MITA et al., 1974). Nesta técnica somente a desestabilização por coalescência é considerada.

A queda da turbidez em função do tempo também foi empregada para calcular um índice de estabilidade de emulsão (PEARCE & KINSELLA, 1978, KHAN et al., 1998; NAKAMURA, et al., 1998)

2.6. MICROBIOLOGIA DE OVOS

Os ovos são excelente exemplo de um produto que normalmente é bem protegido por seus parâmetros intrínsecos. Externamente os ovos frescos tem três estruturas, cada uma delas criando diferentes barreiras para a entrada de microrganismos, uma camada cerosa de queratina, a casca propriamente dita e uma membrana protéica interna.

A lisozima presente na clara lhe confere um papel bactericida, agindo sobre as bactérias Gram positivas. A clara também contém avidina a qual forma um complexo com a biotina, e a conalbumina que forma um complexo com ferro, tornando esses nutrientes indisponíveis para microrganismo. Em adição, a clara tem um pH alto (9,0-9,3). Por outro lado, o conteúdo de nutrientes e o pH natural (6,4-6,8) da gema fazem-na uma excelente fonte de crescimento para a maioria dos microrganismos (JAY, 1992).

No entanto, mesmo diante dessas condições, muitos surtos de infecção alimentar têm sido atribuídos ao ovo ou a alimentos que utilizam ovos em sua preparação além de não raramente deparar-se com ovos estragados ou deteriorados por microrganismos.

Desta forma conclui-se que o ovo não é um alimento estéril e sua casca não constitui uma barreira absoluta a entrada de microrganismos (BOARD & TRANTER, 1995). Um ovo, imediatamente após sua postura, raramente contém microrganismos internamente, mas existem espécies que podem ocasionalmente

penetrar no seu interior ainda em formação no ovário ou oviduto. No entanto, o mais comum é a contaminação no momento e após a postura (BOARD & TRANTER, 1995). A passagem do ovo pela cloaca, que é o orifício por onde também passam as fezes, é o primeiro ponto a oferecer risco de contaminação.

Após postura, os ovos, entram em contato com ambientes que podem estar altamente contaminados, sujidades do ninho, material fecal do trato intestinal da ave, poeira, ração e manipulação. A infecção dos ovos se estabelece com a penetração dos microrganismos na casca e nesse caso a qualidade da casca tem importância relevante (ELLIOT & HOBBS, 1980; GAST & BEARD, 1993).

Portanto, a partir da postura até seu uso existem muitas oportunidades para a casca adquirir microrganismos através das diversas superfícies com as quais teve contato.

De uma maneira geral, os níveis de contaminação da casca do ovo vão desde poucas centenas à dezenas de milhões de bactérias por casca. A flora bacteriana encontrada na casca do ovo é notavelmente heterogênea. Bactérias de dezesseis gêneros foram recuperadas da casca do ovo (TABELA 3) e a partir do conhecimento de seus habitats pode-se deduzir que, em ordem de importância, poeira, matéria em decomposição e fezes são as principais fontes de contaminação. Essas informações mostram que bactérias Gram-positivas, provavelmente, pela sua tolerância à condições secas dominam a flora da casca do ovo. Em contraste, as bactérias Gram-negativas são as principais contaminantes na deterioração de ovos (BOARD & TRANTER, 1995).

Ovos deteriorados normalmente contém uma mistura de bactérias Gram-negativas e ocasionalmente um pouco de microrganismos Gram-positivos em pequenas quantidades. De alguma forma no processo de deterioração do ovo são favorecidos microrganismos que tem requerimento nutricionais relativamente simples e habilidades para se desenvolver em baixas temperaturas. A TABELA 4 mostra os tipos de bactérias encontradas em ovos deteriorados.

Os fungos parecem ser menos importantes do que bactérias na deterioração de ovos. Os membros dos gêneros, *Penicillium*, *Hormodendron* *Mucor* e *Cladosporium* são os mais encontrados enquanto *Torula* é uma das

únicas leveduras encontradas com mais frequência (JAY, 1992)

TABELA 3. Tipos de microrganismos presentes na casca de ovos de galinhas

Gêneros	Frequência
<i>Streptococcus</i>	±
<i>Staphylococcus</i>	+
<i>Micrococcus</i>	++
<i>Sarcina</i>	±
<i>Arthrobacter</i>	+
<i>Bacillus</i>	+
<i>Pseudomonas</i>	+
<i>Acinetobacter</i>	+
<i>Alcaligenes</i>	+
<i>Flavobacterium</i>	+
<i>Cytophaga</i>	+
<i>Escherichia</i>	+
<i>Aerobacter</i>	+
<i>Aeromonas</i>	±
<i>Proteus</i>	±
<i>Serratia</i>	±

Obs.: ± ocasionalmente;

+ na maioria dos ovos, mas em pequenos números

++ sempre presente em grande número.

Fonte: BOARD & TRANTER (1995).

TABELA 4. Tipos de bactérias encontradas em ovos deteriorados.

Gêneros/Espécie	Frequência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	±
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	++
<i>Pseudomonas putida</i>	++
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	+
<i>Flavobacterium</i>	±
<i>Alcaligenes</i>	++
<i>Acinetobacter</i>	±
<i>Cloaca</i>	±
<i>Cytophaga</i>	±
<i>Aeromonas</i>	+
<i>Proteus</i>	++
<i>Escherichia</i>	++
<i>Hafnia</i>	+
<i>Citrobacter</i>	+
<i>Bacillus</i>	±
<i>Micrococcus</i>	±
<i>Serratia</i>	++
<i>Streptococcus</i>	±
<i>Arthrobacter</i>	±

Obs.: ± ocasionalmente

+ presente na maioria dos ovos em pequenos números

++ sempre presente em grande número

Fonte: BOARD & TRANTER (1995).

2.6.1. Salmonela em ovos

As Salmonelas são membros patogênicos da flora intestinal humana e de animais. São microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes móveis, normalmente Gram-negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos, crescem entre 5 e 45°C, atividade de água de 0,945 a 0,999. O pH ótimo de crescimento é próximo de 6,5, mas pH acima de 9,0 e abaixo de 4,0 já se torna bactericida (JAY, 1992).

O ciclo de infecção de *Salmonella sp* ocorre entre animais, homem e meio ambiente. Produtos de origem animal como carnes, ovos, e derivados, principalmente alimentos ricos em proteínas e carboidratos são os mais vulneráveis à contaminação por *Salmonella* (REED, 1993; HOUH et al., 1996).

A salmonelose é provocada pela ingestão de alimento contaminado. O período de incubação vai de 6 a 48 horas, com média entre 12 e 14 h. Podem causar febre entérica ou gastroenterites aguda, sendo a última, a forma mais comum. Os sintomas são náuseas, vômitos, dores abdominais, dores de cabeça, calafrios e diarreia. Esses sintomas são freqüentemente acompanhados de prostração, fraqueza, sonolência e leve febre. Os sintomas persistem por 2 a 4 dias (JAY, 1992).

Mesmo com todo o desenvolvimento tecnológico da indústria alimentícia e a adoção de boas práticas de fabricação, a incidência de salmonelose em humanos vem aumentando em várias partes do mundo. Os alimentos de origem animal continuam a ser os principais responsáveis pela transmissão, entre eles a carne de aves, ovos e derivados, recebem destaque ainda os alimentos prontos ricos em proteínas e carboidratos (REED, 1993).

Ovos e seus produtos têm sido um dos principais alimentos envolvidos em contaminação por *Salmonella* em todo o mundo (BEAN & GRIFFIN, 1990; GAST & BEARD, 1992).

São descritos mais de 2000 sorotipos de *Salmonella*, a identificação das numerosas variedades existentes é feita por meio de um elaborado sistema de classificação antigênica (JAY, 1992).

Dentre os sorotipos os mais comuns associados a casos de salmonelose humana destacam-se *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Virchow. Dentre esses a *Salmonella* Enteritidis tem sido o mais freqüente representado principalmente pelo fagotipo 4 (SPACKMAN, 1989).

De acordo com os registros do Center for Disease Control (CDC) dos Estados Unidos, surtos envolvendo *Salmonella* Enteritidis vem ocorrendo desde 1985. De 340 surtos registrados, foram determinados o veículo de transmissão de

151, sendo que o ovo foi relacionado como responsável em 121 deles (OPTIZ, 1992).

Na América do Sul, do Norte e Europa o número de infecções causadas por *Salmonella* Enteritidis (SE) tem crescido muito desde 1985. Em 1979 de acordo com dados da WHO (Word Health Organization) S. Enteritidis foi o sorotipo mais freqüentemente encontrado em 2 de 21 países avaliados. Em 1987 esse número aumentou para 9, dos quais 8 países foram europeus. A causa desse grande aumento é desconhecida. Dados epidemiológicos dos USA, Hungria, Espanha, França, Noruega e Grã Bretanha indicaram ovos, ou alimentos contendo ovos e frango como fontes de infecção (RODRIGUE et al.,1990).

No Brasil de 1994 a 1995 foram registrados 3430 casos de infecção alimentar causada por *Salmonella sp* (Folha de São Paulo, 1995).

Segundo o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, a *S. enteritidis* teve sua freqüência no estado de São Paulo aumentada consideravelmente passando de 2% dos casos de infecção alimentar em 1992, para 98,4 % em 1995 (IRINO et al., 1996).

A associação entre o consumo de ovos e surtos de *Salmonella* Enteritidis tem se tornado um problema internacional tanto na área econômica como em relação à saúde pública.

A grande freqüência de *Salmonella* em ovos foi demonstrada por EBEL e colaboradores (1993), que pesquisaram a incidência desse microrganismo em plantas processadoras de ovos. A investigação envolveu 20 plantas e as amostras foram coletadas de cada partida de ovo líquido antes de ser pasteurizada. Das 1002 amostras analisadas, 52% foram positivas para *Salmonella sp*, sendo 13% de *S. enteritidis*. Este estudo demonstrou a importância e a necessidade de preservar produtos de ovos através de processos de pasteurização ou outros que possam garantir salubridade a esses produtos.

Oliveira (2000) analisou ovos de pontos de vendas ao consumidor da região de Campinas, das 124 amostras analisadas 12 (9,6%) amostras de cascas e 4 (3,2%) das de gema apresentaram contaminação por *Salmonella* Enteritidis.(SE)

Diante do crescente aumento de surtos, e do envolvimento com SE, tem aumentado a procura por ovos e produtos de ovos pasteurizados, para a produção de outros alimentos.

2.7. PASTEURIZAÇÃO TÉRMICA DE PRODUTOS DE OVOS

Fundamentalmente um processo de pasteurização é aplicado a um produto para atender um objetivo prioritário de obter um alimento com sanidade e segurança para o consumo, além de estender sua vida útil. Neste sentido a pasteurização deve destruir microrganismos patogênicos e reduzir a carga de microrganismos deterioradores a níveis mais baixos possíveis (CUNNINGHAM, 1995).

Vários parâmetros devem ser considerados no estabelecimento de um processo de pasteurização, os parâmetros físicos, tempo e temperatura, são os mais óbvios e os que definem o processo. No entanto para a determinação desses parâmetros é importante conhecer as características físico-químicas do produto (composição e pH) e sua condição microbiológica (carga e tipo de flora microbiana contaminante). Emprega-se comumente o método da curva de destruição térmica para a definição do processo de pasteurização de um determinado produto (CUNNINGHAM, 1995).

Especialmente no caso de produtos de ovos, esse processo é bastante crítico, pois trata-se de produtos sensíveis ao calor. O calor afeta proteínas do ovo, desnaturando-as de forma irreversível. A grande consequência dessa mudança física, são os danos causados diretamente sobre as propriedades funcionais, prejudicando sua performance. Este é um fator muito importante uma vez que os produtos de ovos são empregados na fabricação de alimentos, mais pelas suas propriedades funcionais do que por seus atributos nutricionais.

Diante do exposto, os parâmetros tempo-temperatura para pasteurização de produtos de ovos devem ser criteriosamente definidos, e estabelecidos dentro de um limite mínimo necessário para atender as condições sanitárias desejadas para o produto. Dessa forma o processo trabalhará sempre numa temperatura

mínima. A margem de segurança entre o processo térmico adequado para destruir *Salmonella* e a dose de calor que pode danificar seriamente as propriedades funcionais de produtos de ovos, em alguns casos pode nem existir, e nesse caso atendendo-se os requisitos da pasteurização, perde-se na performance das propriedades funcionais.

O fluxograma da FIGURA 4 descreve as etapas principais da pasteurização de produtos de ovos.

Os ovos são recebidos em caixas, vão para uma seleção, em seguida são lavados com água clorada. Na 2ª seleção os ovos são examinados através de ovoscopia, retirando aqueles com defeitos menores como trincas, pintas internas, não perceptíveis na 1ª seleção. Imediatamente os ovos seguem para a máquina de quebra e separação.

Na etapa de mistura pode ser feita a reconstituição do ovo integral, assim como diferentes formulações conforme a necessidade específica da aplicação industrial.

O processo de pasteurização é diferenciado conforme os produtos, assim para clara, produto mais sensível que o ovo integral e gema, a temperatura está entre 57 e 59 °C e tempo de 2 a 4 min. Felizmente, pelas suas características, (composição química, pH) é possível atingir o objetivo do processo de pasteurização (destruição de patógenos e redução da carga microbiana) mesmo nessa temperatura mais baixa. Para a gema e ovo integral são mencionadas temperaturas na faixa de 61 a 68 °C por período de até 5 min, sendo recomendada pasteurização a 64-65 °C por 2,5 min (CUNNINGHAM, 1995).

As diferenças físico-químicas dos produtos de ovos refletem em uma larga faixa de condição recomendadas para pasteurização. O pH do produto é um fator muito importante. *Salmonella* é mais resistente a um pH de 5 ou 6. Esta é uma das razões para que a resistência térmica desse microrganismo seja maior na gema (pH=6,2) do que na clara (pH=9,1), outra razão é o teor de gordura que oferece uma certa proteção aos microrganismos (CUNNINGHAM, 1995).

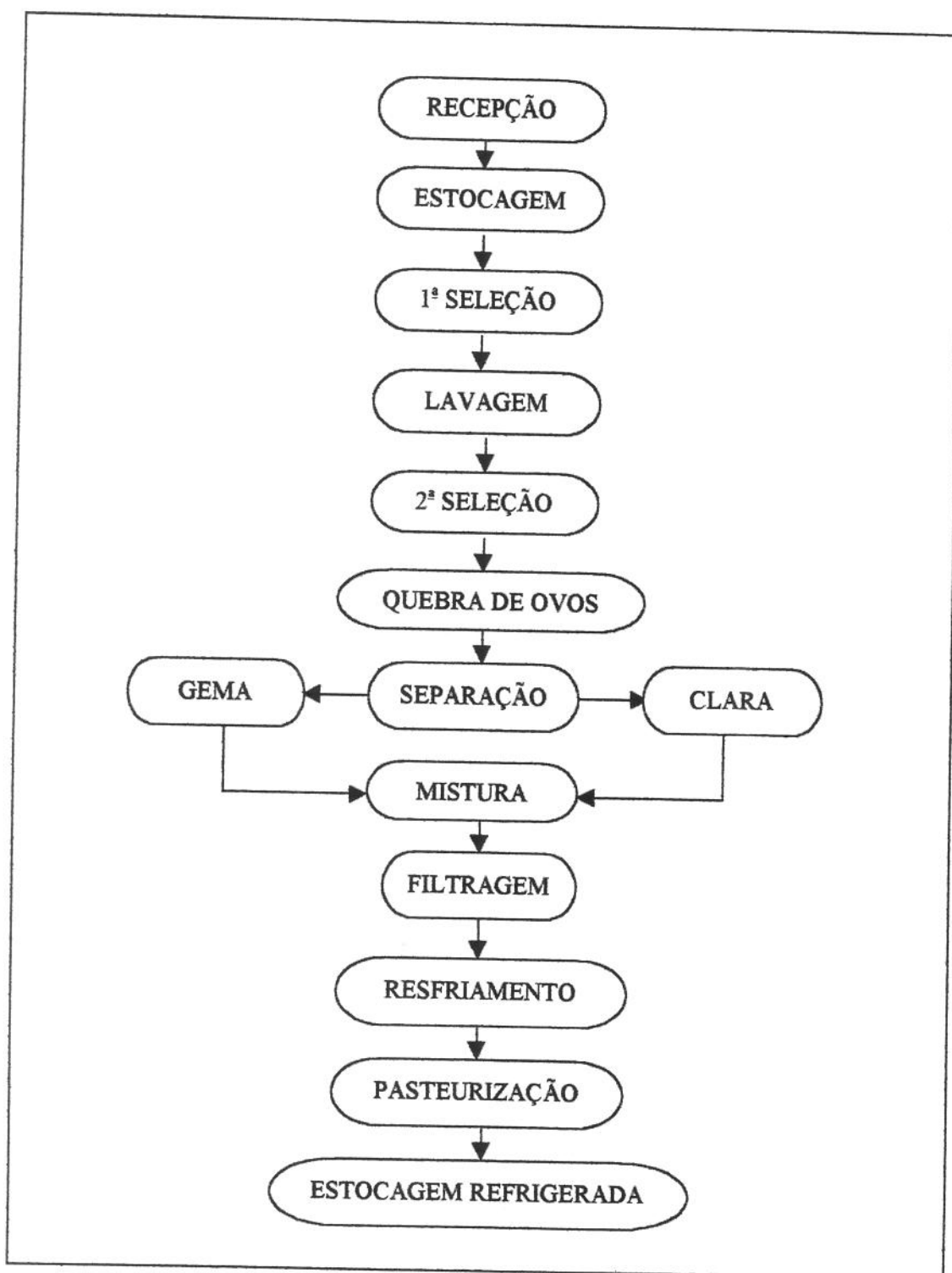


FIGURA 4. Fluxograma geral de ovo, gema e clara pasteurizada
(Fonte: Salto's Alimentos)

A diferença de conteúdo de sólidos, e a atividade de água são outras razões para as diferenças de resistência térmica. Dentre os diversos produtos de ovo, a gema adicionada de sal é o que oferece maior proteção aos microrganismos e portanto maior resistência térmica e maiores temperaturas são necessárias para pasteurização eficiente.

Tem sido reportado consistentemente que o aquecimento de clara na faixa de 54 a 60°C provoca danos da capacidade de formação de espuma, na estabilidade e tempo de batimento. O ovo integral pasteurizado nas temperaturas mencionadas anteriormente, aplicado em formulação de bolos, apresentou como resultado volumes de 4 a 8% menores. Quanto a gema os efeitos do tratamento térmico são observados na capacidade e estabilidade de emulsão tipo maionese e molho para saladas (KOHL, 1971; MATIC et al., 1990; WONG et al., 1996).

Pesquisadores observaram que os principais gêneros encontrados em produtos de ovos pasteurizados foram *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Proteus*, *Escherichia*, *Flavobacterium* e cocos Gram-positivos, reportaram uma contagem menor que 500 UFC/g. Nenhum *Staphylococcus* coagulase-positivo foi encontrado (SHAFI et al., 1970)

YORK & DAWSON (1973) reportaram que quando amostras comerciais de ovo líquido pasteurizado foram estocadas a 3°C a contagem total em placas e odor foram aceitáveis até 12 dias e por 5 dias a 9°C. Nenhuma *E. coli*, *Salmonella*, *Streptococci* ou *Staphylococci* foram encontrados.

2.8. IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS

A irradiação como processo para conservação de alimentos tem sido muito estudado, e o emprego dessa energia na conservação de alimentos tem passado da fase experimental à escala comercial em alguns países.

A unidade de dose de radiação gama (quantidade de energia absorvida por unidade de massa) utilizada atualmente é o Gray (Gy), e 1 Gray = 1 joule/ kg, cuja equivalência com o rad (unidade usada anteriormente) é: 100 rad = 1 Gy.

As radiações ionizantes são assim chamadas porque a energia emitida é suficiente para desalojar os elétrons dos átomos e moléculas, e assim convertê-los em partículas carregadas eletricamente. Radiações ionizantes provenientes de raios gama, raios-X e procedentes de aceleradores de elétrons são utilizadas industrialmente no tratamento de diversos tipos de materiais (JAY, 1996).

Os raios gama, de alta energia, e os raios-X, são semelhantes na sua natureza ondulatória às ondas de rádio, às microondas, aos raios ultravioletas e aos raios de luz visível. Os raios-X têm energias variáveis, são produzidos por máquinas e normalmente com larga faixa de energia de fótons. Já os raios gama, com energia específica, são produzidos por desintegração radioativa de certos elementos chamados radionuclídeos (JAY, 1992).

Só poderão ser utilizadas nos alimentos as radiações ionizantes, cuja energia seja inferior ao limiar das reações nucleares, o que poderia induzir radioatividade no material irradiado. Por essa razão somente quatro fontes são permitidas: ^{60}Co , ^{137}Cs , Raio-X com fótons de energia não superiores a 5 Mev (Mega elétron volt) e feixes de elétrons acelerados com energia máxima de 10 Mev. Todas estas fontes produzem radiação com níveis de energia abaixo da necessária para induzir radioatividade, mesmo que estes alimentos fossem expostos a doses muito elevadas, o nível de radioatividade induzida seria cerca de 200.000 vezes menor que o nível de radioatividade natural existente nos alimentos (WHO, 1994). Abaixo desses máximos de energia permitidos, radioatividade induzida nunca foi observada em alimentos tratados até mesmo com doses de até 50 kGy (quiloGray)(DIEHL, 1996). O nível de energia produzido pelo ^{60}Co e ^{137}Cs (DIEHL, 1996). não é suficientemente alto para causar radioatividade. No processo de radiação o produto nunca entra em contato com a fonte de radiação (WHO, 1994).

Para obter cobalto-60, "pellets" de cobalto-59 altamente refinado são convertidos em fonte gama radioativa em um reator nuclear via ativação de neutron. Os "pellets" são colocados em capsulas de aço na forma de um lápis. Com essa configuração cerca de 95% da energia emitida está disponível para uso

As vantagens de cobalto-60 como fonte de radiação são: alto poder de

penetração e boa uniformidade de dose, estão comercialmente disponíveis e com baixo risco ambiental (cobalto-60 decai para formar níquel não radioativo). Como desvantagem apresenta meia-vida de 5,3 anos e por isso 12% da fonte deve ser repostada anualmente para manter a potência original (JARRET, 1982).

Em contraste aos isótopos como fonte de radiação gama, as irradiações de feixe de elétrons acelerados e raios-X são produzidas eletricamente, resultando em considerável consumo de energia. A principal vantagem é de que são máquinas que se ligam e desligam conforme a necessidade, não precisam de reposição como cobalto-60, mas seu poder de penetração é muito pequeno. A principal diferença entre elétrons acelerados (proveniente de aceleradores lineares de elétrons - linacs) e Raio-X, é que este último tem maior poder de penetração (WHO, 1994).

Para avaliar a salubridade desse método de preservação, alimentos irradiados tem sido investigados já há algumas décadas, sob o ponto de vista químico, toxicidade, mudanças na flora bacteriana e qualidade nutricional. De 1970 a 1982 esses estudos foram coordenados por um projeto internacional (IFIP) com sede em Karlsruhe. Uma junta de técnicos especialistas da World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO) das Nações Unidas e International Atomic Energy Agency (IAEA), concluiu a partir desses dados, que a radiação de qualquer alimento submetido a uma dose global de 10 kGy não apresenta riscos toxicológicos, consequentemente testes toxicológicos de alimentos tratados dessa forma não são mais necessários (MAYER-MIEBACH, 1993). Quanto à qualidade nutricional e microbiológica o comitê considera que nenhum problema especial ocorre, no entanto, enfatiza que deve ser dada atenção para alguma mudança significativa em relação a um alimento em particular e seu papel na dieta. Esse julgamento foi a razão do interesse de se estabelecerem os padrões do Codex Alimentarius para segurança, medidas de controle e documentação de alimentos irradiados. Seguindo esse Codex Alimentarius, alimentos irradiados foram legalmente permitidos em diversos países (MAYER-MIEBACH, 1993).

No Brasil, a legislação de alimentos irradiados foi recentemente revisada e atualizada pela Resolução RDC n. 21 de 26 de janeiro de 2001 da Diretoria

Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, publicada no D.O.U. de 29 de janeiro de 2001. Trata-se de um "Regulamento técnico para irradiação de alimentos". Segundo a Resolução RDC n. 21 fica liberada a irradiação de qualquer tipo de alimento observadas as seguintes condições: a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida; a dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e ou atributos sensoriais do alimento. As fontes de irradiação permitidas são aquelas autorizadas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) quais sejam: Cobalto 60 e Césio 137, Raios X gerados por máquinas que trabalham com energia até 5 MeV e elétrons acelerados gerados por máquinas que trabalham com energias de até 10 MeV.

Alguns países permitem a radiação de ovos ou produtos de ovos; na Croácia para produtos de ovos congelados e em pó até 3 kGy (quilo Gray), na França para produtos de ovos até 4 kGy, no México para ovo desidratados até 5 kGy, na África do Sul para produtos de ovos até 10 kGy., na Iugoslávia para ovo em pó até 10 kGy (IAEA, 1998).

2.8.1. Aspectos químicos e nutricionais

Os efeitos químicos e biológicos da radiação são resultados de colisão de elétrons que produzem a ionização.

A irradiação não é o único processo capaz de produzir mudanças químicas e nutricionais nos alimentos, considerando a dose limite de 10 kGy, as mudanças nos compostos dos alimentos são pequenas e semelhantes ao resultado de outros processos de conservação como cozimento, secagem, extrusão e outros (DIEHL, 1996).

As reações ocorrem principalmente por ataques de radicais livres. A irradiação introduz energia no sistema e afeta a eletrosfera do átomo, formando radicais livres a partir dos compostos do meio. A água, principal componente dos alimentos (com poucas exceções) forma alguns produtos radiolíticos quando submetida à radiação gama, como radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$), elétrons hidratados

(e^-H_2O), átomos de hidrogênio ($\bullet H$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e prótons hidratados (H_3O^+), os quais podem reagir entre si e com os compostos dos alimentos, dando início a uma série de reações (SIMIC, 1983).

Não cabe aqui discutir em detalhes, as reações que podem ocorrer com as centenas de componentes de um alimento, nesse sentido, uma extensa revisão foi feita por DIEHL, (1996) e SIMIC (1983). Os autores concluem que a natureza e a extensão dos efeitos da radiação ionizante nos nutrientes depende da composição dos alimentos (efeitos protetores), dose de radiação e fatores modificadores como, pH, temperatura (congelamento) e ausência ou presença de oxigênio. Por isso os efeitos da irradiação devem ser estudados para cada matriz particularmente e com condições de irradiação definidas.

Os efeitos nutricionais são dependentes dessas reações químicas que podem provocar alguma mudança na composição dos nutrientes.

READ et al. (1961) por meio de ensaios biológicos com animais, concluíram que a irradiação a uma dose de 56 kGy não teve efeito significativo na disponibilidade biológica dos macronutrientes.

Em estudo conduzido com voluntários humanos, alimentados com produtos irradiados com 28 kGy, não foi notado efeito na energia metabolizável, no balanço de nitrogênio ou coeficientes de digestibilidade (DIEHL, 1996).

Sobre perdas de vitaminas, a literatura parece ser contraditória. Alguns trabalhos superestimam as perdas porque baseiam em resultados obtidos com soluções puras de vitaminas em que a perda é muito maior do que no alimento irradiado com a mesma dose. Por exemplo, vitamina B₁ em solução aquosa (0,25 mg/100mL) apresentou 50 % de perda após radiação com a 0,5 kGy, enquanto ovo em pó (0,39 mg de vit. B₁/100 g) irradiado com a mesma dose causou uma perda de vitamina B₁ de apenas 5%. Isso é devido a ação protetora mútua entre os constituintes do alimento (DIEHL, 1996). Nem todas as vitaminas apresentam a mesma sensibilidade à radiação. De uma forma geral, as mais sensíveis são Vitamina E, vitamina A, Tiamina, ácido ascórbico piridoxina e riboflavina.

2.8.2. Aspectos microbiológicos

A maioria das aplicações de irradiação em alimentos tem por objetivo destruição de microrganismos patogênicos e aqueles deterioradores de alimentos. Os tratamentos com irradiação que objetivam a inativação de microrganismos foram categorizados em 3 tipos por um grupo internacional de microbiologistas, no ano de 1964 (GORESLINE, 1964). Os pesquisadores sugeriram os seguintes termos :

Radapertização: é o tratamento de um alimento com doses de radiação ionizantes capazes de conferir uma qualidade microbiológica equivalente a uma "esterilização comercial". Nenhum microrganismo deteriorador ou patogênico pode ser detectável por métodos microbiológicos reconhecidos. O nível de dose usualmente requerida para esse objetivo é de 25 a 45 kGy.

Radicação: aplicação de doses de radiação ionizante suficiente para reduzir o número de células vegetativas viáveis de bactérias patogênicas a níveis não detectáveis quando o alimento é examinado por qualquer método microbiológico reconhecido. A dose requerida se encontra na faixa de 2 a 8 kGy.

Radurização: aplicação de doses de radiação ionizante suficiente para melhorar a qualidade do alimento diminuindo o número de células viáveis de microrganismos deterioradores. Neste caso o nível de dose fica entre 0,75 e 2,5 kGy.

Muitas hipóteses de como a radiação afeta os microrganismos foram postuladas, mas hoje é universalmente aceito que o ácido desoxiribonucleico (DNA) no cromossoma representa o alvo mais crítico da radiação ionizante. Possivelmente, efeitos na membrana citoplasmática podem ter um papel adicional em algumas circunstâncias. Quando a radiação ionizante é absorvida pelo material biológico a molécula de ácido nucleico pode ser ionizada ou excitada iniciando uma cadeia de eventos que provoca mudanças biológicas, levando a célula à morte, se as mudanças forem suficientemente sérias, este é um efeito direto da radiação. Paralelamente a radiação pode interagir com outros átomos ou moléculas das células, particularmente água, para produzir radicais livres, os quais podem provocar reações com o DNA, danificando-o, este é o efeito indireto da

radiação. Este mecanismo é importante para inativar células vegetativas, cujo citoplasma contém cerca de 80% de água (DIEHL, 1996).

Fatores como tamanho e arranjo da molécula de DNA influenciam a sensibilidade do microrganismo à radiação. O DNA na célula está associado com peptídeos básicos, nucleoproteínas, RNA, lipídeos, lipoproteínas e cátions metálicos. Nas diferentes espécies de microrganismos essas substâncias podem permitir diferentes efeitos da irradiação. Outro fator importante que determina sensibilidade à radiação é a capacidade dos diferentes gêneros e espécies de reparar os danos ao DNA. Desde a origem da vida todos os organismos tem sido expostos à radiação ionizante, e como uma defesa a esse ataque, mecanismos enzimáticos de reparação do material genético tem sido aperfeiçoado em vários graus no curso da evolução. A detecção e caracterização desses processos de reparação do DNA tem sido objeto de estudo da biologia molecular (DIEHL, 1996).

Com crescente dose de radiação, o número de microrganismos sobreviventes decresce exponencialmente (da mesma forma quando se incrementa a temperatura ou o tempo num tratamento térmico). Diferentes espécies e diferentes linhagens de uma mesma espécie requerem diferentes doses de radiação para atingir o mesmo grau de inativação. Uma medida comumente utilizada para avaliar sensibilidade à radiação é a dose equivalente a D_{10} , isto é dose necessária para eliminar 90% da população inicial (FARKAS (1998).

FARKAS (1998) compilou uma lista de valores de D_{10} para bactérias patogênicas não esporuladas em alimentos com alto conteúdo de água, e observou que *Campilobacter*, *Yersinia* e *Vibrio spp* apresentaram a menor resistência à radiação, seguida pela *E. coli*. Sorotipos de *Salmonella* apresentaram variabilidade na sensibilidade à radiação, com D_{10} variando de 0,3 a 0,8 kGy. Para *S. aureus* os valores variaram de 0,3 a 0,6 kGy.

A especificação do meio é importante porque o valor D_{10} pode mudar consideravelmente em diferentes meios. Matrizes secas oferecem melhor proteção ao microrganismo do que meios aquosos. O efeito da água na sensibilidade de microrganismo à radiação também está relacionada com a

atividade de água (A_w). Em ovo em pó, o valor D_{10} de 1,3 kGy abaixou para aproximadamente 1 kGy quando a A_w subiu de 0,5 para 0,8. O valor D_{10} em meios congelados também é usualmente maior do que aquele exigido para o mesmo material à temperatura ambiente (DIEHL, 1996).

A composição do meio, atividade de água e temperatura são fatores que influenciam a sensibilidade do microrganismo à radiação, isso mostra que os valores D_{10} mencionados na literatura devem ser usados criteriosamente (WHO, 1994; THAYER et al., 1995; THAYER, 1995).

Entre os microrganismos existem diferenças de sensibilidade à radiação tanto entre os gêneros, como entre cepas de uma mesma espécie. A faixa da radiorresistência microbiana é ampla, embora não tanto quanto a variação que ocorre na termorresistência.

As bactérias Gram-negativas, tanto as deteriorantes como as patogênicas, são geralmente mais sensíveis do que as células vegetativas das bactérias Gram-positivas. Os esporos de *Bacillus* e *Clostridium* são mais resistentes do que os anteriores (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Entre as mais sensíveis à radiação podem ser citadas as *pseudomonas flavobactérias*.

Entre as formas vegetativas, existem algumas espécies altamente radiorresistentes como o *Deinococcus radiodurans*, *D. radiophilus*, *D. proteolyticus* (todos coccus Gram-positivo), *Deinobacter grandis* (bacilo Gram-negativo), *Acinetobacter radioresistens* (cocobacilo Gram-negativos), *Rubrobacter radiotolerans* (bacilo Gram-positivo). O mecanismo de resistência dessas bactérias ainda não está esclarecido. Supõe-se que a presença de envelope celular mais complexo possa ser um fator. Além disso, todos apresentam pigmentos e contêm vários carotenóides que sugerem alguma relação com a alta radiorresistência. Outro fator parece estar relacionado à presença de um eficiente mecanismo de reparo de seus ácidos nucleicos (DIEHL, 1996; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Em relação aos fungos, as leveduras são mais resistentes que os bolores, apresentam resistência semelhante às bactérias Gram-positivas (JAY, 1992).

O que faz um organismo mais sensível ou resistente que outro, é assunto de interesse biológico fundamental. Um melhor entendimento dos mecanismos de

resistência pode levar a caminhos para aumentar a sensibilidade à radiação e consequentemente a dose necessária para destruição do microrganismo poderia ser reduzida.

Os microrganismos sobreviventes a um tratamento de irradiação a baixas e médias doses são mais sensíveis ao "stress" ambiental, ou um processamento subsequente, do que a microflora de um produto não irradiado (FARKAS, 1998). Por isso uma alternativa para empregar menores doses de radiação tem sido o emprego de processos combinados, principalmente o emprego de tratamentos térmicos mais brandos.

Em estudo conduzido para inativar *Salmonella* em ovo líquido, SCHAFFNER e colaboradores (1989) avaliaram a termorradiação, empregando temperaturas de 50 e 60 °C e doses variando de 0,1 a 0,4 kGy, e concluíram que a termorradiação (60°C) foi mais eficiente em diminuir contagem de *Salmonella* do que a irradiação ou o calor sozinhos. A uma temperatura de 50°C não houve diferença significativa entre a termorradiação e a radiação sozinha.

SERRANO et al. (1997) também verificaram que a temperatura de 50 °C empregada num processo de termorradiação, para destruição de *Salmonella*, não apresentou efeito positivo. Inocularam ovo líquido com $2,4 \cdot 10^6$ UFC/mL de *Salmonella*, aqueceram por 0, 20, 40 e 60 min a 50°C, seguido de irradiação a 0, 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 kGy. Os resultados indicaram que a aplicação de calor nessas condições, antes da irradiação, não contribuiu para diminuir o valor de D_{10} (dose de radiação). Eles encontraram que 0,5 kGy foi suficiente para eliminar *Salmonella* da superfície da casca e 1,5 kGy para reduzir a contagem de *Salmonella* de aproximadamente $4 \cdot \log_{10}$ em ovo líquido.

2.9. IRRADIAÇÃO DE PRODUTOS DE OVOS

microbiológica de produtos de ovos, porém a limitação dessa A radiação tem se mostrado uma técnica eficiente para descontaminação técnica está nos possíveis efeitos químicos, físicos e organolépticos. Pesquisadores têm procurado encontrar melhores condições de irradiação, ou seja, aquelas em que, atendidos

os requisitos microbiológicos, os efeitos paralelos sejam mínimos.

NARVAIZ et al. (1992) irradiaram ovo em pó com doses de 2,5 a 10 kGy objetivando eliminar *Salmonella* e estabilizar a carga microbiana. Resultados microbiológicos mostraram que 2,0 kGy foram suficientes para atender o objetivo. Paralelamente determinações físico-químicas conduzidas indicaram que não ocorreram mudanças significativas nos parâmetros estudados em uma dose de 2,5 kGy. Doses mais altas (5 e 10 kGy) aumentaram os graus de rancidez, perda de cor e hidrólise de proteína. Análise sensorial de ovo em pó e bolo preparado com esse ovo apresentou resultados concordantes com os parâmetros físico-químicos.

KATUSIN-RAZEM et al. (1992) procuraram encontrar condições de irradiação minimizando esses efeitos. Avaliaram o grau de oxidação (formação de peróxidos) e perda de cor em função da taxa de dose, dose e presença de oxigênio. Observaram que a presença de oxigênio não é essencial para a destruição de carotenóides pela irradiação pois seu conteúdo diminuiu com o aumento da dose mesmo nos tratamentos sob vácuo. A formação de peróxido na ausência de ar foi limitada pelo oxigênio disponível. A extensão das mudanças nos dois parâmetros analisados foi inversamente proporcional à taxa de dose, isto é, maiores taxas de dose produziram menor degradação a uma mesma dose. O autor sugere que a dose de 2,5 kGy suficiente para inativar *Salmonella*, é indicada para tratamento desses produtos, pois previne maiores mudanças.

Outros estudos foram conduzidos com produtos de ovos em pó submetidos à radiação avaliando propriedades funcional e sensorial, oxidação da fração lipídica, com alguma ênfase na oxidação de colesterol, como função das condições de irradiação e estocagem (LEBOVICS & GAÁL, 1994; CLARK et al., 1992; KATUSIN-RAZEM, et al., 1989).

Mudando a natureza da matriz de ovo em pó para ovo líquido, MA et al. (1990) irradiaram ovo integral em casca, com doses de 1,0; 2,4 e 3,0 kGy, e puderam observar grandes mudanças. Perda de cor e do índice "Haugh" (refere-se à qualidade da clara, relaciona o peso do ovo com a espessura da clara exposta sobre uma superfície plana). A análise sensorial apontou diferença significativa (P

$\leq 0,01$) entre os ovos controle e irradiados. A irradiação causou um decréscimo na viscosidade aparente de clara e ovo integral, mas aumentou a da gema. Ela aumentou a atividade de emulsificação, a capacidade de formação de espuma e sua estabilidade. Bolos preparados com ovos irradiados apresentaram maior volume. Para a clara, a técnica de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) não apresentou diferença na temperatura e entalpia de desnaturação de proteínas, enquanto que eletroforese em gel indicou pequena modificação nas bandas formadas.

WONG et al. (1996) compararam clara líquida pasteurizada termicamente com clara irradiada por acelerador de elétrons à dose de 2,3 a 3 kGy. Os autores observaram, que nessa dose, foi possível eliminar *Salmonella* e que o desempenho funcional da clara irradiada foi melhor do que a clara pasteurizada termicamente, sugerindo que a radiação de clara líquida pode ser um processo alternativo que substitui com vantagens a pasteurização térmica.

Outros autores avaliaram condições para minimizar os efeitos da radiação em produtos de ovos, por meio de associação com congelamento (MA et al., 1993) e com tratamento térmico (LABUZA et al., 1968).

Pouca informação se tem sobre irradiação de gema líquida, e este parece ser um processo alternativo com potencial para aumentar a vida útil desse produto quanto ao aspecto microbiológico. Alguns resultados de trabalhos já citados indicam uma melhora da capacidade de emulsificação de gema após irradiação, este é um ponto interessante, que deve ser melhor investigado pois existe larga aplicação de gema como agente emulsificante na manufatura de diversos produtos alimentícios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Este trabalho compõe 3 partes distintas, quais sejam:

- 1) ensaio microbiológico, composto por 2 itens:
 - a) estudo da dose mínima de radiação gama para destruição de *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus*;
 - b) estimativa da vida de prateleira de gema líquida em função da dose de radiação gama;
- 2) estudo do efeito da dose de radiação gama nas propriedades funcionais e sensoriais de gema líquida e maionese;
- 3) estudo do efeito da radiação gama associada ao emprego de antioxidante, na oxidação da fração lipídica de gema líquida.

3.2. IRRADIAÇÃO DA GEMA LÍQUIDA

A irradiação da gema líquida foi uma operação comum a todos os experimentos conduzidos neste trabalho. Foi efetuada no Departamento de Aplicações Técnicas Nucleares do IPEN-CNEN/SP em um irradiador com fonte de cobalto-60 tipo Gammacell 220, Atomic Energy of Canada Ltd. com atividade de 9.120,889 Ci. (janeiro/2000)

Durante os experimentos foram empregadas doses de 1,5 ; 2,5 ; 3,5 e 4,5 kGy a uma taxa de dose de 6,41 a 5,92 kGy/h. A irradiação foi monitorada por dosímetros do tipo amber 3042 Batch H (para doses de 1,5 e 2,5 kGy), e outro do tipo Gammachrome YR Batch 6 pmma (para doses de 3,5 e 4,5kGy), ambos da Harwell.

3.3. ENSAIO MICROBIOLÓGICO

3.3.1. Obtenção da gema líquida

Toda gema de ovo utilizada no trabalho foi fornecida por uma indústria processadora de ovos da região. Na indústria, os ovos são processados com um tempo máximo de dois dias de postura. Os ovos são recebidos acondicionados em caixas (cestainer), entram na linha de processamento passando, primeiramente, por uma lavagem (asepsia da casca), em seguida pela ovoscopia onde são separados e retirados os ovos em condições inadequadas para a industrialização, como aqueles com casca trincada ou quebrada e outros defeitos. Em seguida, os ovos selecionados vão para as etapas de quebra e separação, homogeneização, resfriamento (tanque pulmão), pasteurização (64°C/3,5 min), resfriamento, embalagem e, finalmente, são destinados à estocagem refrigerada.

No presente trabalho foi utilizada a gema pasteurizada, conforme descrito acima, e a gema não pasteurizada, foi obtida após as etapas de homogeneização e resfriamento. As amostras de gema pasteurizada e não pasteurizada foram retiradas durante o processamento na indústria, e acondicionadas em sacos plásticos estéreis. Estes foram selados e mantidos em caixa de isopor com gelo moído durante o transporte até o laboratório, onde foram preparadas em capela de fluxo laminar as unidades experimentais - saquinhos de polietileno com 100g de gema selados termicamente - destinados à irradiação.

3.3.2. Estudo da dose mínima de radiação gama para destruição de *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus*

As unidades experimentais, ou seja, saquinhos de polietileno com 100g de gema foram inoculados individualmente com *Salmonella Enteritidis* (isolada de ovo pelo Laboratório de Higiene da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e sorotipado pelo Instituto Adolfo Lutz) e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

O nível estabelecido para a contaminação das amostras foi baseado em relatos de literatura (SERRANO et al., 1997; GAST & BEARD, 1992a; OLIVEIRA,

2000). Procurou-se situar o trabalho em um nível de contaminação compatível com a realidade. Para tanto, utilizou-se uma carga de inóculo na faixa de 2 a 8.10^2 UFC/g de gema.

A definição da dose mínima de radiação empregada no presente estudo foi baseada em dados da literatura (NARVAIZ et al. 1992; SERRANO et al. 1997; MATIC et al. 1990; THAYER & BOYD, 1992). Foram empregadas as doses de 1,5 e 2,5 kGy.

3.3.2.1. Preparação do inóculo

As culturas de *S. Enteritidis* e *S. aureus* foram ativadas mediante duas transferências consecutivas para tubos com caldo TSB (Tryptone Soya Broth) e BHI (Brain Heart Infusion), respectivamente, e incubadas a 35°C/24 h. Após esse período foram preparadas diluições seriadas (1:10). A cultura de *S. Enteritidis* foi diluída em tubos com 9 mL de água peptonada (0,1%) salina (0,85%) estéril e *S. aureus* em água peptonada salina com 1% de tween 80.

As diluições foram semeadas para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em 1 ml, utilizando para *S. Enteritidis*, o meio TSA (Tryptone Soya Agar) e o BHI ágar (Brain Heart Infusion) para *S. aureus*. As placas foram incubadas a 35°C/48 h. Após esse período de incubação procedeu-se à contagem das placas em contador de colônias com lupa.

Para inoculação das unidades experimentais, saquinhos com 100 g de gema, o mesmo método foi repetido em igual condição, porém, com o conhecimento prévio da diluição a ser utilizada. Em seguida as diluições seriadas foram semeadas em placas para contagem das UFC, inoculadas em cada unidade experimental.

3.3.2.2. Inoculação

Foram preparados 9 lotes de gema, cada um composto por 5 saquinhos com 100g de gema cada. Os saquinhos foram inoculados individualmente, adicionando-se 1 mL de cada inóculo (*S. Enteritidis* e *S. aureus*). Em seguida, os saquinhos foram selados por soldagem térmica e colocados sob

refrigeração (caixa de isopor com gelo moído) para o transporte até o local da irradiação.

3.3.2.3. Irradiação

Cada conjunto (R) contendo 5 saquinhos foi irradiado separadamente, conforme mostra o esquema a seguir (cada retângulo representa a irradiação de um conjunto), o que estabelece 9 repetições genuínas para cada dosagem utilizada no processo de irradiação.

Repetições (Ri) referentes à dosagem de 1,5 kGy

R1	R2	R3
1 2 3 4 5	6 7 8 9 10	11 12 13 14 15
R4	R5	R6
16 17 18 19 20	21 22 23 24 25	26 27 28 29 30
R7	R8	R9
31 32 33 34 35	36 37 38 39 40	41 42 43 44 45

Repetições que receberam dose de 2,5 kGy

R1	R2	R3
46 47 48 49 50	51 52 53 54 55	56 57 58 59 60
R4	R5	R6
61 62 63 64 65	66 67 68 69 70	71 72 73 74 75
R7	R8	R9
76 77 78 79 80	81 82 83 84 85	86 87 88 89 90

Após irradiação as amostras foram armazenadas em incubadora tipo B.O.D. a uma temperatura de $4,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Os experimentos com dose de 1,5 e 2,5 kGy foram conduzidos separadamente, primeiro o tratamento com dose de 1,5 kGy, e em seguida conduziu-se o tratamento com dose de 2,5 kGy.

De cada grupo de 5 saquinhos foi selecionado um saquinho para análise de *Salmonella* e outro para análise de *S. aureus*.

As seguintes análises foram efetuadas:

- **Gema sem tratamento:**

Detecção de *Salmonella*;

NMP para *Staphylococcus aureus*;

NMP para *Coliformes fecais*;

Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos.

- **Gemas irradiadas:**

Detecção de *Salmonella*;

NMP para *Staphylococcus aureus*.

3.3.3. Estimativa da vida de prateleira de gema líquida em função da dose de radiação gama

A partir da dose mínima suficiente para destruição dos patogênicos, encontrada no experimento anterior, definiram-se as doses a serem aplicadas neste experimento.

Os tratamentos avaliados foram os seguintes:

Gema pasteurizada termicamente 64°C por 3,5 min. (PT)

Gema irradiada com dose de 2,5 kGy (Ir2,5)

Gema irradiada com dose de 3,5 kGy (Ir3,5)

Gema irradiada com dose de 4,5 kGy (Ir4,5)

3.3.3.1. Preparação dos tratamentos

De um mesmo lote de gema da fábrica foram retiradas amostras de gema pasteurizada e gema não pasteurizada (homogeneizada, resfriada). As gemas foram coletadas em sacos plásticos estéreis, estes foram fechados e mantidos em caixa de isopor com gelo picado para transporte até o laboratório para preparo das unidades experimentais.

Em ambiente asséptico, capela de fluxo laminar, previamente descontaminada com luz ultravioleta, as gemas foram manipuladas para o preparo do experimento.

A gema pasteurizada foi colocada em vidro de rosca com vedação hermética, previamente esterilizado a $121^{\circ}\text{C}/15$ min. Foram preparados 8 vidros com 300 g de gema cada um, e em seguida foram armazenados em estufa B.O.D. a $4,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

A gema não pasteurizada foi acondicionada em sacos plásticos estéreis, selados por soldagem térmica. Para cada uma das doses a serem estudadas, 16 sacos foram preparados, contendo cada um 160 g de gema. Estes sacos foram acondicionados em caixas de isopor com gelo picado e transportados até o local da irradiação.

Devido ao espaço reduzido no interior da Gammacell (irradiador) não foi possível irradiar todos os 16 saquinhos de cada dose de uma única vez; dessa forma, para cada dose foram efetuadas 2 irradiações, com 8 saquinhos em cada uma.

Ao retornar ao laboratório, essas gemas já irradiadas foram transferidas, em ambiente asséptico (capela de fluxo laminar), para vidros com rosca hermética, esterilizados previamente a $121^{\circ}\text{C}/15$ min. Foram preparados 8 vidros com 300 g para cada dose de radiação, utilizando o conteúdo de dois saquinhos para cada vidro, os quais, em seguida, foram armazenados em estufa tipo B.O.D. a $4,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Foram preparadas, a partir de um único lote de gema da fábrica, as gemas pasteurizadas termicamente (PT) e gemas irradiadas com dose de 2,5 kGy (Ir2,5).

Ao final desse experimento um novo lote foi coletado junto à indústria e preparadas as amostras para as doses de 3,5 (Ir3,5) e 4,5 kGy (Ir4,5).

A evolução da carga microbiana durante o armazenamento das gemas à temperatura de refrigeração foi acompanhada através das seguintes análises:

- Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos
- Contagem total de bolores e leveduras
- Contagem de microrganismos psicrotróficos totais

Os tratamentos foram analisados logo após o processamento e em intervalos de 2 dias (gema pasteurizada termicamente) e 3 dias (gemas irradiadas). O período de armazenamento foi interrompido e os lotes descartados quando as contagens totais atingiram valores de 10^6 - 10^7 UFC/g, ou até um máximo de 21 dias.

3.3.3.2. Metodologia estatística

Para os resultados de cada tratamento foi aplicada uma estatística descritiva do $\log_{10}$ da contagem total de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras na forma tabular e gráfica.

Para estimar o tempo de vida útil, foram ajustados modelos não lineares que representam o crescimento dos microrganismos com o tempo.

Tendo em vista que os microrganismos apresentam crescimento não linear, foi proposto o seguinte modelo:

$$Y_{ti} = Y_0 + \alpha e^{-\beta \exp(-Kt)} \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde, Y_{ti} é o log da contagem total de microrganismo no lote i ($i= 1,2, \dots, 8$) em t tempos de armazenamento; Y_0 é o $\log_{10}$ da contagem total média no tempo inicial; α é um parâmetro estimado em função do $\log_{10}$ da contagem total máxima

média de microrganismos no tempo de vida útil máximo (dentro do intervalo estudado). β é um parâmetro associado a taxa de crescimento do microrganismo e K uma constante associada a forma em "S" da curva.

Os parâmetros do modelo são estimados pelo método de Newton-Rapson (SEBER & WILD, 1989) através do procedimento PROC NLIN (SAS, 1986). Uma vez estimado o modelo é possível calcular os tempos médios de vida útil para cada tratamento, e os limites de confiança assintóticos inferior (LI) e superior (LS) para o verdadeiro valor do $\log_{10}$ da contagem total de microrganismos.

O tempo de vida útil máximo estimado para cada tratamento, em função de cada grupo de microrganismo, será aquele em que $LS = 6$.

3.3.4. Análises físico-químicas

Para caracterização da matéria prima foram realizadas análises de proteína e cinza, segundo os métodos descritos nas seções 24.027 e 24.009 da AOCS (1984), para umidade utilizou-se areia tratada e calcinada com secagem em estufa a 105°C por 24 h, o teor de gordura foi determinado pelo método de BLIGH & DYER (1959), o pH foi medido por potenciômetro previamente calibrado.

3.3.5. Análises microbiológicas

Os métodos empregados foram aqueles descritos pela Associação Americana de Saúde Pública "American Public Health Association - APHA", *Salmonella* capítulo 25, *S. aureus* capítulo 33, Coliformes fecais capítulo 24, Psicrotróficos capítulo 9, Mesófilos capítulo 4 e Bolores e Leveduras capítulo 16 (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

Detecção de Salmonela: todo o conteúdo do saquinho, ou seja, 100 g de gema foi diluído em 900 mL de caldo de pré-enriquecimento, água tamponada peptonada a 1% (BPW) e incubado a 37°C/18-24h. Seguido de enriquecimento seletivo em caldo TT(Caldo tetrationato) e caldo SC (Selenito Cistina) os quais foram incubados a 43°C e 37°C por 18-24 h, respectivamente. O isolamento foi

realizado em ágar seletivos, XLD (ágar Xilose, Lisina Desoxicolato de Sódio), BS (Bacto Bismuth Sulfite Agar) e HE (Bacto Hektoen Enteric Agar) e incubadas por 18-24 h em estufa bacteriológica a 37°C.

Triagem das colônias suspeitas: as colônias que apresentaram reações indicativas de *Salmonella* em ágar seletivo foram selecionadas e passadas, com o auxílio de alça em forma de agulha, para tubos de triagem contendo o meio TSI (ágar triplice, açúcar e ferro) e LIA (ágar lisina ferro). A inoculação foi feita através de picada central e estriamento sobre a superfície inclinada. Os tubos foram incubados a 37°C por 18-24 h. Após este período os tubos que apresentaram reações indicativas de *Salmonella* foram selecionados para caracterização bioquímica.

Para a caracterização bioquímica de *Salmonella* sp. foram empregadas as provas de Indol, malonato, citrato, descarboxilação de lisina e ornitina, fermentação de Dulcitol, lactose e sacarose, teste de vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) com sementeira a partir do crescimento nos tubos de LIA e TSI.

Contagem de *S. aureus*: pela técnica do número mais provável (NMP), 25 g de gema diluída em 225 mL de solução salina peptonada com 1% de Tween (diluição 10^{-1}) e a partir desta foram feitas diluições decimais 10^{-2} e 10^{-3} . Um mL de cada diluição foi adicionado em 3 grupos distintos de 3 tubos contendo caldo TSB (com 10% de NaCl e 1% de piruvato); em um quarto grupo de três tubos foi adicionado um grama de gema (não diluída) em 20 mL de caldo, sendo os tubos incubados a 35°C por 48hs. Os que apresentaram resultado positivo, foram semeados em duplicata, na superfície de placa de Petri, contendo o meio de Baird-Parker adicionado de solução de gema de ovo e telurito de potássio. As placas foram incubadas a 37°C/48 h.

Após período de incubação procedeu-se a leitura, considerando-se como típicas todas as colônias negras, pequenas e que apresentaram halo ao seu redor. As colônias típicas foram separadas para confirmação de presença de *S. aureus*. Os seguintes testes bioquímicos foram realizados nos isolados suspeitos com cultura de 24 h:

- **Observação de morfologia:** pelo método de Gram.
- **Catalase:** Após incubação a 30°C/24hs de colônias semeadas em ágar extrato de levedura, a prova de catalase foi feita pela adição de algumas gotas de água oxigenada 3%.
- **Coagulase:** alíquotas de tubos com caldo BHI, foram transferida para tubos contendo plasma de coelho . Os tubos foram colocados em banho maria 35°C por 6 h. Na leitura foram considerados coagulase positiva os tubos que apresentavam coágulo evidente, classificados como 2+ ou acima.
- **Fermentação de glicose e manitol:** tubos de ensaio contendo ágar de Hugh-Leifson acrescido de glicose ou manitol foram inoculados (picada com agulha de platina até a metade do ágar) a partir do cultivo em BHI. Após inoculação, os tubos com manitol (processo fermentativo) foram selados com nujol esterilizado (incubados a 37°C por 96 h).
- **Termonuclease:** A cultura fervida em banho maria por 15 min, foi inoculada em orifício previamente preparado na lâmina de ágar azul de toluidina DNA. Cepa padrão foi utilizada para comparação. As lâminas foram incubadas a 37°C por 14 horas. Observou-se a formação de halo róseo estendendo-se por cerca de 1mm ao redor das perfurações inoculadas (positivo).

Coliformes fecais: as mesmas diluições utilizadas para *S. aureus* foram inoculadas em caldo lauril sulfato de sódio em quatro séries de 3 tubos. Dos tubos suspeitos foram transferidas alçadas para caldo E.C. com tubo de Durhan invertido. Os tubos permaneceram em banho maria a 44,5°C por 48 h, quando se procedeu à leitura do resultado, considerados positivos aqueles com produção de gás. Através da tabela de Hoskins procedeu-se a determinação do número mais provável de Coliformes fecais.

Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e aeróbios facultativos: a partir de 25 g de gema diluída em 225 mL de água peptonada com 1% de Tween (diluição 10⁻¹) foram feitas diluições decimais seriadas. De cada diluição, foi feito semeadura em duplicata em profundidade ("pour plate"). Foi

utilizado ágar padrão (Plate Count Agar- PCA) . As placas foram incubadas a 35°C por 48 h.

Contagem total de bolores e leveduras : foi empregado o ágar batata glicose com adição de antibiótico (cloranfenicol). O meio foi esterilizado, e vertido em placas de petri para posterior inoculação por superfície. As placas (em duplicata para cada diluição) foram incubadas a 23°C por 3 a 5 dias, quando se procedeu à contagem das colônias.

Contagem de microrganismos psicrotróficos totais: foi empregado o ágar para contagem padrão (Plate Count Agar- PCA); o meio foi esterilizado, e vertido em placas de petri para posterior inoculação por superfície. As placas (em duplicata para cada diluição) foram incubadas a 7°C por 10 dias, quando se procedeu à contagem das colônias .

3.4. EFEITO DA DOSE DE RADIAÇÃO GAMA NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E SENSORIAIS DE GEMA LÍQUIDA E MAIONESE

3.4.1. Obtenção da gema líquida

As amostras de gema pasteurizada foram coletadas na indústria após pasteurização em três momentos distintos, obtendo-se assim uma triplicata representativa do processo de pasteurização comercial.

Desse mesmo lote de fabricação, foi coletada amostra de gema líquida peneirada, homogeneizada e resfriada, porém não pasteurizada (para serem tratadas com irradiação).

As amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno, fechados, colocados em caixa de isopor com gelo moído e transportadas para o laboratório da FEA-UNICAMP.

3.4.2. Preparação do experimento

No laboratório, a amostra de gema não pasteurizada foi dividida em 3 lotes, cada lote dividido em quatro porções, cada porção destinada a uma dose de radiação estabelecida previamente para o trabalho de 0; 2,5; 3,5 e 4,5 kGy.

No esquema representado na FIGURA 5 pode ser visualizada a forma de preparação do experimento.

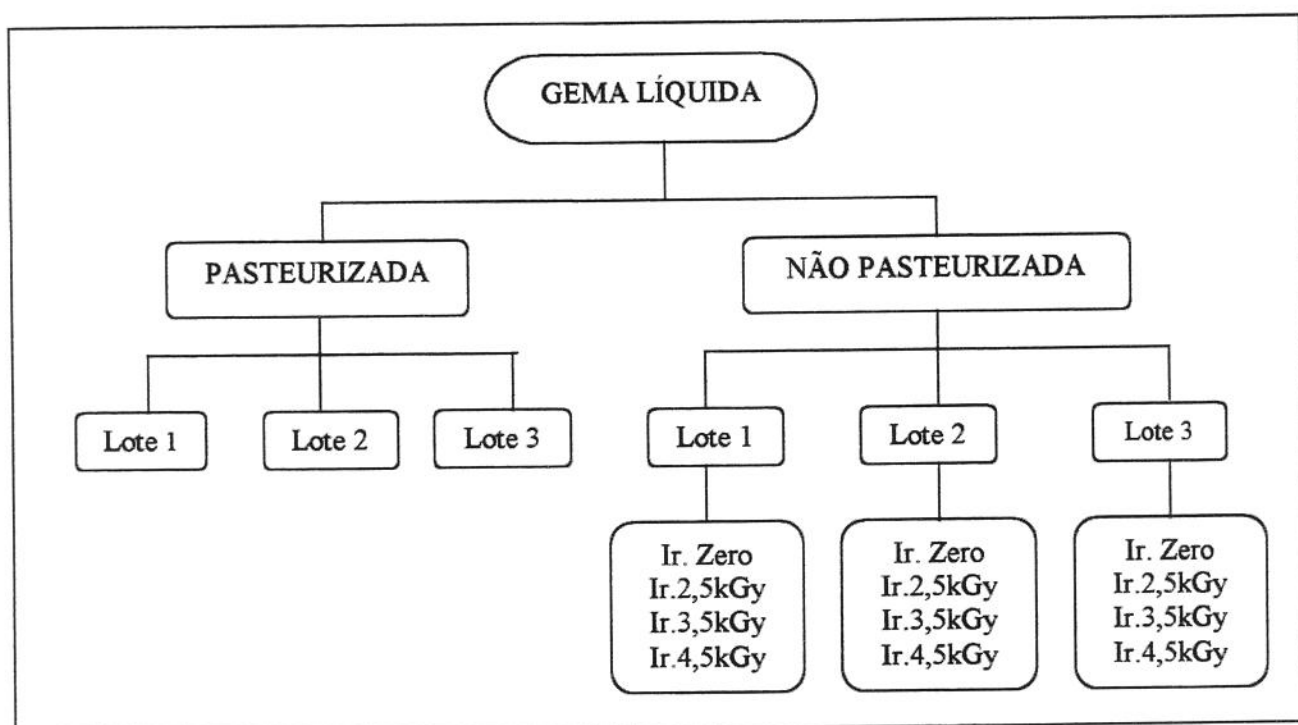


FIGURA 5. Fluxograma de preparação do experimento.

3.4.3. Irradiação

As unidades experimentais (sacos de polietileno com 150 g de gema líquida) representativas de cada dose, de cada lote, foram irradiadas separadamente, perfazendo um total de 9 irradiações distintas. Este procedimento foi adotado com a finalidade de obter três repetições genuínas do processo de irradiação.

As unidades experimentais devidamente identificadas foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo moído e transportadas até o local da irradiação.

As amostras da gema pasteurizada termicamente foram mantidas juntas para que sofressem as mesmas condições de transporte (agitação) e temperatura das gemas irradiadas.

3.4.4. Análises físico-químicas

As gemas líquidas irradiadas com doses de 0, 2,5; 3,5 e 4,5 kGy e gema pasteurizada termicamente foram analisadas quanto a :

pH: Medida direta em potenciômetro previamente calibrado;

Proteínas: segundo método microKjeldhal 24027 da AOAC (1984) utilizando o fator 6,25;

Cinza: segundo o método da AOAC (1984);

Gordura: pelo método BLIGH & DYER (1959);

Umidade: utilizou-se areia tratada e calcinada com secagem em estufa a 105°C por 24 h e

Cor: cor da gema foi determinada por meio de equipamento, Color Quest II da Hunter Lab. Foi empregado o sistema CIELAB L*, a*, b*, com iluminante D65, ângulo do observador 10 °. A gema foi colocada em cubeta de 10 mm de espessura por 50 mm. A leitura foi feita em RSIN, sem considerar o brilho.

3.4.5. Propriedades funcionais

Capacidade de emulsificação (CE): Foi determinada de acordo com o método descrito por LI-CHAN et al. (1984). Foi preparada solução de gema de forma a conter 1% de proteína. A solução foi dispersa por meio de agitador magnético durante 2 min. Uma alíquota de 15 mL dessa solução foi colocada num frasco imerso em banho de gelo. Iniciou-se a agitação a 4900 rpm com contínua adição de óleo de milho (10mL/min) por meio de bureta, até a quebra da emulsão indicada pela inversão das fases. Para uma identificação precisa do momento da inversão das fases e imediato corte do óleo, foi acoplado um multímetro com um dos sensores preso à base da haste do agitador e outro dentro da emulsão. No momento da quebra da emulsão ocorreu um súbito aumento do valor da resistência, tendendo a infinito. Nesse momento o volume de óleo foi anotado e a capacidade de emulsificação foi calculada pela quantidade de óleo adicionada em

mL até atingir o ponto de quebra, por grama de proteína.

Estabilidade da emulsão (EE): seguiu-se a metodologia descrita por ACTON & SAFLE (1970) com modificação da temperatura e do tempo de repouso. Em béquer de vidro de 140 mL foram preparadas emulsões com 50 mL de dispersão de gema de forma a conter 1% de proteína e 50 mL de óleo de milho, homogeneizadas a 13500 rpm por 2 min com homogeneizador Janke & Kunkel IKA-WERK, modelo T25 Basic com haste dispersora SN18G.

Duas alíquotas de 5 mL foram retiradas para determinação de umidade. Alíquotas de 10 mL foram retiradas e transferidas para tubos de 17x120 mm e mantidas em repouso por 24 h à temperatura de 25°C. Após esse período foi introduzida uma pipeta até o fundo do tubo e retirou-se um volume de 5 mL para determinação de umidade. A estabilidade da emulsão (EE) foi calculada pela Equação 5:

$$EE = \frac{100 - U^{24h}}{100 - U_{\text{inicial}}} \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde:

U^{24h} = porcentagem da umidade da emulsão após 24 h de repouso

U_{inicial} = porcentagem da umidade da emulsão imediatamente após preparo

Índice de atividade emulsificante: determinado segundo método descrito por PEARCE & KINSELLA (1978). A emulsão foi preparada com 45mL de solução de gema, de forma a conter 2% de proteína, e 15 mL de óleo de milho, agitada a 13500 rpm por 1:30 min em homogeneizador Janke & Kunkel IKA-werk, modelo T25 basic com haste dispersora SN18G. Um alíquota (0,5mL) dessa emulsão foi primeiramente diluída em 25g de uma solução de 0,1% de sódio dodecil sulfato (SDS). Dessa primeira diluição, uma nova alíquota de 0,5 mL foi novamente diluída em outro tubo com 25 g de solução 0,1% SDS estabelecendo-se uma diluição final de 1/2500. A absorbância da solução final foi lida em

espectrofotômetro a 500 nm e o índice de atividade emulsificante foi calculado por meio da seguinte equação:

$$IAE = \frac{2.T.D}{\phi.C.10000} \quad \text{(Equação 6)}$$

onde:

T (turbidez) = $(2,303 \cdot A) / l$

D = fator de diluição

l = distância percorrida pela luz na cubeta (1 cm)

ϕ = fração volumétrica do óleo (0,25)

C = concentração da proteína na solução de gema

10000 = fator de correção para metros quadrados

Solubilidade Protéica (SP) em pH 7,0: para determinação do índice de solubilidade, seguiu-se o método descrito por MORR et al. (1985). Uma solução de aproximadamente 1% de proteína foi preparada a partir de 3 g de gema diluída em NaCl 0,1M. O pH foi ajustado 7,0 (com NaOH 0,1N), a dispersão foi mantida sob agitação por 60 min. Durante o período de dispersão o pH foi monitorado. A dispersão foi então transferida para balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com NaCl 0,1M. Em seguida a solução foi centrifugada por 30 min a 20000xG a 4°C. O sobrenadante foi filtrado através de papel de filtro Whatman n.1. O teor de proteína do sobrenadante foi analisado por microKjeldahl e o índice de solubilidade protéica em pH 7,0 foi calculado pela Equação 7:

$$SP(\%) = \frac{\text{concentração de proteína sobrenadante (mg/ml)} \times 50 \times 100}{\text{Peso amostra (mg)} \times \frac{\text{conteúdo de proteína da amostra}}{100}}$$

(Equação 7)

3.4.6. Análise estatística

Os dados observados nas análises de cor, solubilidade protéica, estabilidade de emulsão, capacidade de emulsificação e índice de atividade emulsificante foram analisados por meio de análise de variância, que verificou a diferença entre tratamentos. Para avaliar as diferenças entre as médias dos tratamentos foi aplicado o teste de Student-Newman-Keuls² (SNK) em nível de 5% de significância.

Viscosidade: as medidas reológicas das amostras foram realizadas em escoamento em estado estacionário através de um reômetro Brookfield modelo DV III da Brookfield Engineering labs. Inc., isto é, um reômetro rotacional de cilindros concêntricos, que mede o torque necessário para rotacionar uma haste metálica cilíndrica ("spindle"), a qual se encontra imersa no fluido. A haste cilíndrica é acionada por um motor síncrono através de uma mola calibrada que imprime uma taxa de cisalhamento específica. A resistência ao fluxo, viscosidade, é indicada pela deflexão da mola que é proporcional à velocidade de rotação da haste cilíndrica, tamanho e forma geométrica.

Para análise da gema foi utilizada a haste ("spindle") SC4-18 do Sistema LVT com o adaptador de amostra correspondente (small sample adapter).

A temperatura foi controlada durante as medidas por um banho termostatzado e mantida a 25°C. Empregou-se taxas de deformação de 20 a 230 s⁻¹ em duas varreduras. A primeira delas com taxa de deformação decrescente e a segunda crescente.

Os experimentos foram realizados em duplicata, para cada um dos três lotes de cada tratamento, sendo utilizada nova amostra (8g) para cada repetição.

² Esse teste leva em consideração o número de tratamentos no experimento. É um teste de amplitudes múltiplas que julga a significância de um conjunto de diferenças, permite decisões para as quais diferenças são significantes e para as quais não são; é um procedimento que testa amplitudes e a taxa do erro experimental é aplicada em cada estágio para testar a diferença entre o mesmo número de médias de tratamentos. O teste de Tukey pode não controlar o erro do tipo I, ou seja, apresentar falsamente diferenças significativas que não verdadeiramente ocorra por apresentar apenas uma amplitude mínima significativa, para o mesmo número de tratamentos (STEEL & TORRIE, 1960)

Para o processamento dos dados, ou ajuste do modelo, foi utilizado o SAS, e os gráficos construídos através do programa Excel. Para o ajuste das curvas referentes ao comportamento reológico das gemas foi utilizado o modelo de Ostwald-De-Walle, e os parâmetros K e n foram estimados pelo método da secante ou DUD (RASTON & JENNRICH, 1978) para minimização não linear da soma de quadrados do erro, com a utilização do PROC NLIN (SAS, 1986). A adequação do modelo foi baseada na análise de resíduos (diferença entre viscosidade aparente (η_a) observada e estimada, em cada taxa de deformação) (DRAPER, 1980).

Modelo de Ostwald-De-Walle

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad \text{(Equação 8)}$$

3.4.7. DSC

Os ensaios calorimétricos foram realizados em um calorímetro diferencial de varredura Thermal Analyst 4000 da TA Instruments, modelo DSC 2910-Differential Scanning Calorimeter, computadorizado, pertencente ao Laboratório de Análise Térmica (IQ/UNICAMP). As análises calorimétricas foram efetuadas nas seguintes condições: gema líquida foram seladas hermeticamente em capsula (panela de alumínio), e esta estabilizada a temperatura de 20^o C quando se dava início à varredura a uma taxa de 5^o C/min, até uma temperatura de 120^o C. Como referência foi empregada uma cápsula vazia. O aparelho foi calibrado com Índio e a partir dos dados foram construídos termogramas para cada tratamento utilizando o software ORIGIN versão 4.1

3.4.8. Análise Sensorial de gema líquida

Foi empregado Teste de Diferença do Controle para avaliação dos atributos cor e odor de gemas irradiadas com dose de 2,5; 3,5, 4,5 kGy e pasteurizada termicamente (PT) (MEILGAARD et al. 1991).

Para avaliar as amostras foi adotado o modelo de blocos completos casualizados (COCHRAN & COX, 1993). Os provadores receberam em uma bandeja, uma amostra padrão (PT) identificada com a letra P e outras 4 amostras codificadas (3 referentes aos tratamentos de gemas irradiadas e uma igual ao padrão (PT)). Avaliaram o grau de diferença entre cada amostra codificada e o padrão, usando uma escala estruturada de 9 pontos. O mesmo procedimento foi conduzido para o atributo cor, apresentando um outro conjunto de amostras idêntico ao do odor, porém com códigos diferentes.

O modelo das fichas utilizadas para o teste pode ser visto na FIGURA 6.

Os resultados foram tabelados e analisados estatisticamente por meio de análise de variância, seguida do teste de Dunnett para avaliar diferença significativa entre as médias dos tratamentos e a do controle ($p=95\%$) (O'MAHONY, 1986; AMERINE & ROESSLER, 1976). O programa utilizado para análise dos dados foi o SAS.

Nome: _____		Data: _____	
Você está recebendo uma amostra padrão (P) e 4 amostras codificadas. Cheire a amostra padrão e em seguida cheire cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere em termos de odor da amostra padrão.			
0 1 2 3 4 5 6 7 8	nenhum odor estranho excessivo odor estranho	amostra _____ _____ _____ _____	nota _____ _____ _____ _____

Nome: _____		Data: _____	
Você está recebendo uma amostra padrão (P) e 4 amostras codificadas. Observe a amostra padrão e em seguida observe cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere em termos de cor da amostra padrão.			
0 1 2 3 4 5 6 7 8	nenhuma diferença extremamente diferente	amostra _____ _____ _____ _____	nota _____ _____ _____ _____

FIGURA 6. Modelo de ficha empregada para avaliar odor e cor de gema líquida Irradiada e pasteurizada.

3.4.9. Avaliação de maionese preparada com gema de ovo irradiada (IR) e pasteurizada termicamente (PT)

A partir de gema irradiada com dose de 2,5; 3,5 e 4,5 kGy e gema pasteurizada termicamente, foram preparadas maioneses em planta piloto da Refinações de Milho Brasil, utilizando tanque de inox com batedor de hélice para mistura dos ingredientes e formação da emulsão. Em seguida as emulsões foram conduzidas para uma etapa de refinação, através de uma única passagem por

moinho coloidal, envasada em vidros de 500 g e armazenada à temperatura ambiente.

As maioneses foram preparadas de acordo com a formulação descrita na TABELA 5.

TABELA 5. Formulação de maionese

Ingrediente	%
Gema	3,5
Clara	3,5
Sal	2,0
Açúcar	1,5
Vinagre (8% ác. Acético)	3,5
Óleo	75
Suco de limão (concentrado 350 GPL)	0,05
EDTA	0,01
Água	10,94

As seguintes determinações foram conduzidas com a finalidade de avaliar os possíveis efeitos da radiação em comparação com a gema pasteurizada termicamente:

- **Consistência:** determinada por meio de texturômetro TA-XT2, medindo-se a força de compressão.

Condições da análise: Calibração do probe 50 mm, Pre test speed = 1,0 mm/s, Test speed = 1,0 mm/s, Post test speed = 10 mm/s, distance = 12,0 mm; Type = auto, Force = 10. Sete repetições de cada tratamento foram efetuadas em copinhos de plástico rígido, com altura e diâmetro de 50 mm, cheios com maionese até a superfície. Temperatura de análise 7°C. A análise de variância foi feita a partir das 7 medidas efetuadas para cada tratamento, seguida de teste SNK para verificar diferença entre as médias.

- **Estabilidade:** duas metodologias foram empregadas para avaliação da estabilidade das maioneses preparadas com gemas irradiadas e pasteurizadas termicamente:

a) determinada por meio de Freezing Test: para cada tratamento de gema, 8 vidros de maionese foram armazenados em estufa de B.O.D. a 9°C negativos. As maioneses foram examinadas quanto à separação de óleo, em intervalos de 24, 48 e 72 h (manual de análises da Refinações de Milho Brasil).

b) de acordo com LIEU et al. (1978), 12 g de maionese foram colocadas em tubos de centrífuga e estocados a 4, 25 e 42°C por 5 dias, em seguida foram centrifugados a 3300G por 20 min a 20°C, foi observada a separação de óleo e água.

- **Avaliação sensorial:** utilizou-se método de diferença do controle. Avaliou-se o grau de diferença entre cada amostra codificada e o padrão, usando uma escala estruturada de 9 pontos. Considerou-se os atributos: cor, odor e sabor. Foram solicitados comentários sobre as amostras. A ficha modelo utilizada nas análises pode ser vista na FIGURA 7.

Os testes foram aplicados a 50 consumidores de maionese em dois períodos de avaliação, 5 e 95 dias após processamento, no Laboratório de Análise Sensorial do CTC - Centro de Tecnologia de Carnes do ITAL.

Os atributos foram avaliados sob luz fluorescente, em cabinas individualizadas e computadorizadas, utilizando o programa para análise sensorial Compusense versão 4.2.

Preparo e apresentação das amostras:

- O atributo cor, foi avaliado em uma sessão independente com os mesmos consumidores de cada período. As amostras foram apresentadas em frascos de vidro transparente cheios (530 mL), estando o produto à temperatura ambiente, tampados com tampas plásticas recoberta com papel alumínio. Cada frasco foi etiquetado com código de numeração diferente e de 3 dígitos.
- Para os demais atributos, as amostras foram mantidas em geladeira (8°C) por 24 horas, e então servidas em copos plásticos de 50 mL descartáveis,

tampados com papel alumínio, na quantidade de 14g e mantidas em média à 16 °C.

LABORATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL- CTC – ITAL	
AVALIAÇÃO DA COR DE MAIONESE	
DATA_____ IDADE_____ NOME_____ FICHA N°__	
Você está recebendo uma amostra padrão de maionese e outras quatro amostras de maionese codificadas. Observe a cor da amostra padrão e em seguida observe a cor das amostras codificadas e avalie pela escala abaixo o quanto cada amostra codificada difere em relação à cor da amostra padrão.	
0= nenhuma diferença	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8= extremamente diferente	
Amostra	Grau de diferença
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

FIGURA 7. Modelo de ficha utilizado na avaliação sensorial de maionese

Uma amostra controle contendo a formulação padrão e outras quatro amostras, contendo a formulação padrão e as demais formulações irradiadas foram servidas a cada consumidor, de forma balanceada, evitando-se o efeito "carry-over" (MEILLGARD et al., 1987).

As amostras também foram codificadas com números de 3 dígitos. Foram entregues a cada consumidor facas plásticas descartáveis e 1 e 1/2 fatia de pão de forma sem casca, cortado em quadrados iguais e água à temperatura ambiente, para a avaliação de sabor.

Foi informado aos consumidores que produtos conservados por pasteurização térmica e por radiação gama estavam em teste.

Os consumidores foram instruídos:

- quanto ao método de comparação múltipla;
- a avaliar primeiro o odor, e depois o sabor utilizando o pão e tomando água entre as amostras.
- As respostas obtidas foram normalizadas e analisadas por análise de variância e a comparação das médias da formulação padrão (controle) com as demais foi feita pelo teste de Dunnett (O'MAHONY, 1986).

3.5. EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA ASSOCIADO AO EMPREGO DE ANTIOXIDANTE, NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DA FRAÇÃO LIPÍDICA DE GEMA LÍQUIDA

3.5.1. Delineamento estatístico

Para este estudo foi proposto um desenho experimental que se baseia em um fatorial 2x3x2 (COCHRAN & COX, 1993), cujos fatores foram:

- radiação: doses de 3,5 e 4,5 kGy.
- Antioxidante: Os antioxidantes estudados foram : Terc-Butilhidroquinona (TBHQ) (padrão SIGMA) na concentração de 200 µg/g e COVI-OX-70 da Henkel (antioxidante comercial composto de mistura de 70% de

tocoferóis com predominância de γ -tocoferol), na concentração de 300 $\mu\text{g/g}$.

- Tempo: Os tratamentos foram avaliados em dois tempos diferentes, logo após a irradiação (t_1) e 20 dias após a irradiação (t_{20}). Nesses tempos foi avaliado também a gema sem tratamento (GST), isto é, sem adição de antioxidante e sem aplicação de radiação.

Portanto, combinando os níveis dos fatores obteve-se um total de 12 tratamentos, os quais foram feitos em duas repetições (E1 e E2), perfazendo um total de 24 experimentos, e mais 4 amostras com as gemas sem tratamento (E1 e E2 nos tempos t_1 e t_{20}). As unidades experimentais foram preparadas em saquinhos de polietileno com 150 g de gema líquida.

O desenho experimental pode ser visto na TABELA 6.

As unidades experimentais foram atribuídas aleatoriamente para os tempos t_1 e t_{20} .

TABELA 6. Descrição dos tratamentos do fatorial 3X2X3

Antioxidante	Dose de radiação (kGy)	Tempo (dias)
Zero	3,5	1
Tocoferóis 300 $\mu\text{g/g}$	3,5	1
TBHQ 200 $\mu\text{g/g}$	3,5	1
Zero	4,5	1
Tocoferóis 300 $\mu\text{g/g}$	4,5	1
TBHQ 200 $\mu\text{g/g}$	4,5	1
Zero	3,5	20
Tocoferóis 300 $\mu\text{g/g}$	3,5	20
TBHQ 200 $\mu\text{g/g}$	3,5	20
Zero	4,5	20
Tocoferóis 300 $\mu\text{g/g}$	4,5	20
TBHQ 200 $\mu\text{g/g}$	4,5	20

3.5.2. Preparação da gema

A gema utilizada para este estudo foi obtida a partir de ovos identificados como tipo “saúde” fornecidos pela granja ITO.

Os ovos receberam uma higienização prévia na granja, e no laboratório permaneceram imersos em álcool 70% durante 15 min. Em seguida foram retirados e expostos à secagem natural dentro de capela de fluxo laminar (ambiente asséptico). Neste mesmo ambiente foi feita a quebra dos ovos e a separação da gema.

Utilizando materiais previamente esterilizados, as gemas foram homogeneizadas e passadas através de peneira para retirada da membrana vitelina e chalaça. Essa forma de preparação da gema, prevenindo contaminação da casca, ambiente e mãos, foi necessária para que a gema sem nenhum tratamento pudesse ser conservada a 4,5°C durante o período de armazenamento previsto. Foi necessário garantir boas condições microbiológicas da gema, devido a análise sensorial com tempo de 20 dias, de outra forma a gema entraria em processo deteriorativo com formação de odores pútridos em poucos dias.

3.5.3. Preparo das gemas com o antioxidante

A gema obtida foi dividida em 3 porções, uma para adição de TBHQ, outra de tocoferol e a terceira sem nenhum antioxidante.

Os antioxidantes foram adicionados na gema, baseando-se no conteúdo de gordura. Eles foram diluídos em propilenoglicol, em concentração tal que permitisse a adição de 0,5 mL dessa solução para cada 200 g de gema. A composição em tocoferóis foi determinada no COVI-OX70 para cálculo da quantidade de antioxidante necessária para a concentração de tocoferóis desejada. O antioxidante foi disperso na gema por meio de um agitador FISATOM a uma rotação de 600rpm por 10 min.

As amostras foram colocadas em sacos de polietileno, (150g) devidamente identificadas e acondicionadas em caixa de isopor com gelo para transporte até o local da irradiação.

3.5.4. Análises físico-químicas

Lipídeos totais: A extração e determinação de lipídeos totais da gema foi conduzida pelo método de Bligh & Dyer (1959).

Cor: cor da gema foi determinada por meio de equipamento, Color Quest II da Hunter Lab. Foi empregado o sistema CIELAB L^* , a^* , b^* , com iluminante D65, ângulo do observador 10° . A gema foi colocada em cubeta de 10 mm de espessura por 50 mm. A leitura foi feita em RSIN, sem considerar o brilho.

Composição em Ácidos Graxos: Por meio de cromatografia gasosa fez-se a determinação de ácidos graxos determinando a porcentagem relativa dos ácidos graxos polinsaturados. A análise foi feita por cromatografia gasosa segundo método Ce 1c-89 da AOCS (1996).

Preparação da amostra para injeção no cromatógrafo na forma de ésteres metílicos de ácidos graxos (ABRIL, 1999).

Adicionou-se 2 mL de metanol acidificado com ácido sulfúrico 4%. Em 45 mg de gema liofilizada em tubo com rosca. Agitou-se em vortex até obter mistura homogênea. Os tubos foram fechados com atmosfera de nitrogênio, imediatamente agitados por mais 15s no vortex. Os tubos fechados foram colocados em bloco de aquecimento (110°C), onde permaneceram por 1 hora, agitando-se a cada 20 min. Após esse tempo os tubos foram removidos do bloco e resfriados à temperatura ambiente. Adicionou-se 1mL de água destilada e em seguida 1mL de hexano, agitou-se o tubo no vortex por 20s e em seguida foram centrifugados. A camada superior do tubo de centrífuga foi recolhida para análise no cromatógrafo.

Condições de análise:

- Coluna capilar sílica fundida SP-2340 60 m x 0,25 mm de diâmetro interno (supelco # 2-4023);
- Temperatura da coluna 192°C 20 min.; 192°C a 210°C ($1^\circ\text{C}/\text{min}$); 210°C por 22 min;

- Detetor de Ionização de Chama com temperatura de 245 °C;
- Temperatura do injetor: 245 °C;
- Gás de arraste (He) 1,2 l/min , split 1:25.

A identificação dos ácidos graxos foi feita comparando-se os tempos de retenção dos componentes da amostra com os de padrões de ésteres de ácidos graxos (GLC-87 da NU Check-Prep Inc.). A quantificação de cada componente foi obtida pela área do pico e dada como porcentagem da área total (somatória da área de cada pico).

A porcentagem de ácido graxo foi observada em duas repetições para cada tratamento.

Valor de TBA - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. A determinação de TBA foi realizada de acordo com TARLADGIS et al. (1960), através das seguintes etapas:

Em equipamento apropriado, foi conduzida a destilação da amostra em balão de fundo chato com 10g de gema, 96,5mL de água destilada, 2,5mL de ácido clorídrico 4N, 1mL de BHA (antioxidante), 2-4 gotas de antiespumante e pérolas de vidro para evitar turbulências durante a destilação.

Foram recolhidos 50mL de destilado em proveta e transferidos para tubo. Do destilado homogeneizado foram transferidos 3mL para tubo com rosca adicionando-se 3mL de ácido tiobarbitúrico 0,02 M em ácido acético. O conteúdo foi misturado e o tubo imergido em banho de água em ebulição por 35 min.

Foi preparado um branco com 3 mL de água e 3 mL de TBA e tratado como as amostras.

Após aquecimento e resfriamento a absorbância das amostras foi lida contra um branco a 532 nm. Utilizou-se espectrofotômetro Beckman modelo Du 70 e cubetas de 1 cm de passo ótico.

Para a elaboração da curva padrão utilizou-se o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) (na matriz gema), cuja hidrólise ácida gera malonaldeído na proporção de 1 mol : 1 mol . Os resultados são expressos em termos de valor de TBA (mg de malonaldeído/1000g de amostra).

A partir da equação da curva padrão encontra-se a quantidade de

malonaldeído, e através da seguinte relação o valor de TBA:

TBA foi determinado em triplicatas para cada tratamento.

$$\text{TBA} = \text{mg de mal}/1000\text{g de gema} = \frac{\mu\text{g de malonaldeído/ml} \times 50 \times 1000}{\text{Peso da amostra}} \quad (\text{Equação 9})$$

Extinção específica em 232 nm : Com a oxidação, os ácidos linoléico e linolênico mudam as posições das duplas ligações e formam dienos conjugados com absorção no UV (232 nm) e dicetonas, trienos conjugados com absorção no UV (268, 278nm). O método utilizado foi Ch5-91 indicado pela AOCS (1996).

A gordura foi extraída da gema pelo método de Bligh & Dyer, diluída em ciclohexano e feita leitura em espectrofotômetro Beckman modelo DU70, em cubetas de 1 cm de caminho ótico. A diluição foi feita de forma a se obter resultados de absorbância dentro da faixa de 0,1 a 0,8. O espectrofotômetro foi calibrado com ciclohexano. A extinção específica é dada pela seguinte relação:

$$\text{Extinção específica a 232 nm} = E_{232} = \frac{A_{\lambda}}{C \times l} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde:

A_{λ} é a absorbância medida no comprimento de onda λ

C é a concentração da solução de gordura e hexano, em g/100 mL

l é a distância percorrida pela luz na cubeta (cm)

3.5.5. Análise estatística

Os efeitos de tratamentos foram analisados através do delineamento fatorial (níveis de antioxidantes x níveis de irradiações) no tempo 1 e 20 dias de processamento, por meio de análise de variância. Os níveis de radiação foram: sem radiação, 3,5 e 4,5 kGy, e os níveis de antioxidante foram: sem antioxidante, com TBHQ (TB), com tocoferol (TC). Salienta-se que o tratamento natural, ou

gema sem tratamento (GST) é o cruzamento do níveis sem radiação e sem antioxidante. Encontrando-se efeito entre os tratamentos, então aplica-se o teste SNK para verificar diferenças entre as médias dos tratamentos.

3.5.6. Análise Sensorial de Odor e Cor

Seleção e treinamento dos provadores

A metodologia empregada para a seleção de provadores está baseada em DAMASIO & COSTELL (1991).

Inicialmente foi realizada uma reunião com os candidatos, com a finalidade de esclarecer o tipo de análise que seria conduzido, bem como os atributos a serem avaliados.

O produto a ser analisado foi apresentado aos provadores com amostras representativas dos extremos dos tratamentos e intermediárias. Inicialmente os provadores foram questionados sobre o odor, se podiam identificar presença de odores estranhos, isto é, odores não característicos de gema e se esse odor poderia ser reconhecido como odor de ranço. A partir dessa definição foram preparadas as fichas para avaliação sensorial das amostras quanto ao atributo odor .

Foram realizadas avaliações de quatro amostras com três repetições por provador. As amostras utilizadas para esses testes eram representativas dos tratamentos: radiação zero (gema natural), com doses de 3,5; 4,5 e 10,0 kGy .

A técnica sensorial empregada para essas avaliações foi o teste de diferença do controle, utilizando uma escala estruturada de 9 pontos, com os extremos definidos como nenhum odor estranho e excessivo odor estranho, para o atributo odor, e igual ao padrão e muito mais claro que o padrão, para o atributo cor, apresentando a gema natural (radiação zero e sem antioxidante) como padrão.

O modelo das fichas empregadas pode ser visto na FIGURA 8.

A partir do resultado das 3 repetições foram feitas as análises de variância de 2 fatores (amostras e repetição), para cada atributo e cada provador.

Para avaliar o poder discriminativo aceitou-se aqueles provadores que apresentaram os maiores valores significativos de F amostra a $p \leq 0,05$ e para o poder de repetição aqueles que apresentaram um valor de F repetição não significativo ($p \leq 0,05$).

Um último critério na seleção dos provadores foi utilizado, ou seja, a concordância entre os provadores e a ordem das médias das amostras. Para isso foi preparada uma representação gráfica das médias de cada amostra por provador. Aqueles que apresentaram comportamento discrepante do grupo não foram selecionados.

Por meio do teste de diferença do controle foram avaliadas as amostras referentes aos tratamentos descritos na TABELA 6, quanto aos atributos cor e odor. Os tratamentos foram analisados em dois períodos de tempo; logo após a irradiação (t_1), e 20 dias após a irradiação (t_2). Foram analisadas replicatas do experimento.

Teste realizado

Para avaliar as amostras foi adotado o modelo de blocos completos (COCHRAN & COX, 1993). Os provadores recebiam em uma bandeja, uma amostra padrão identificada com a letra P e outras 7 amostras codificadas (6 referentes aos tratamentos e uma igual ao padrão) e comparando-as com o padrão avaliaram o grau de diferença entre cada amostra codificada e o padrão, usando uma escala estruturada de 9 pontos. O mesmo procedimento foi conduzido para o atributo cor, apresentando um outro conjunto de amostras idêntico ao do odor, porém com códigos diferentes.

O modelo das fichas utilizadas para o teste, pode ser visto na FIGURA 9.

Os resultados foram tabelados e analisados estatisticamente por meio de análise de variância seguido do teste de Dunnett para avaliar diferença significativa entre as médias dos tratamentos e a do controle ($p=95\%$). O programa utilizado para análise dos dados foi o SAS.

Nome:		Data:	
Você está recebendo uma amostra padrão (P) e 4 amostras codificadas. Cheire a amostra padrão e em seguida cheire cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere em termos de odor da amostra padrão.			
0 nenhum odor estranho	amostra		nota
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8 excessivo odor estranho			

Nome:		Data:	
Você está recebendo uma amostra padrão (p) e 4 amostras codificada. Observe a amostra padrão e em seguida observe cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere em termos de cor da amostra padrão.			
0 igual ao padrão	amostra		nota
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8 muito mais claro que o padrão			

FIGURA 8. Modelo de ficha empregada para treinamento e seleção de provadores para odor e cor de gema irradiada com e sem antioxidante.

Nome:		Data:	
Você está recebendo uma amostra padrão (P) e 7 amostras codificadas. Cheire a amostra padrão e em seguida cheire cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere em termos de odor da amostra padrão.			
0 nenhum odor estranho 1 2 3 4 5 6 7 8 excessivo odor estranho	amostra	nota	
	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	

Nome:		Data:	
Você está recebendo uma amostra padrão (p) e 7 amostras codificadas. Observe a amostra padrão e em seguida observe cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere em termos de cor da amostra padrão.			
0 igual ao padrão 1 2 3 4 5 6 7 8 muito mais claro que o padrão	amostra	nota	
	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	

FIGURA 9. Modelo de ficha empregada para avaliação sensorial de odor e cor de gema irradiada com e sem antioxidante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO DA DOSE MÍNIMA DE RADIAÇÃO GAMA PARA DESTRUIÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*

A definição da dose mínima empregada no presente estudo, foi baseada em dados da literatura. NARVAIZ e colaboradores (1992) encontraram que 2,0 kGy foi uma dose suficiente para destruir *Salmonella* e reduzir a carga microbiana em ovos em pó. SERRANO et al. (1997) concluíram que uma dose mínima de 0,5 kGy foi suficiente para eliminar *Salmonella* Enteritidis da superfície da casca de ovos e a dose de 1,5 kGy foi suficiente para eliminar do ovo líquido. MATIC et al. (1990) inocularam artificialmente ovo em pó com três linhagens de *Salmonella* e encontraram a dose de 0,8 kGy para o valor de D_{10} , concluindo que uma dose de 2,4 kGy seria suficiente para um fator de redução de *Salmonella* de 10^3 .

Os estudos com *Staphylococcus aureus* e radiação são mais freqüentes em carne de frango. THAYER e BOYD (1992) empregaram a radiação gama para destruição de *S. aureus* em carne de frango mecanicamente desossada. Amostras foram inoculadas com *S. aureus* e tratadas com radiação sob vácuo a 0°C, depois mantidas a 35°C por 20 h. Células viáveis foram encontradas em amostras irradiadas com 0,75 kGy mas nenhuma foi encontrada a 1,5 kGy, antes ou após a estocagem.

Com base nesses relatos, decidiu-se conduzir experimentos com dose mínima de 1,5 kGy e 2,5 kGy.

Foi feita caracterização físico-química das amostras de gema utilizadas nos experimentos com doses de 1,5 e 2,5 kGy. Os resultados dessas análises estão apresentados na TABELA 7.

Os resultados obtidos para as duas amostras estão muito próximos, o que é coerente, pois trata-se de gemas proveniente de uma mesma empresa que, por sua vez recebem ovos sempre das mesmas granjas, as quais mantêm as galinhas sob condições de tratamento muito semelhantes.

TABELA 7. Análises físico-químicas de gema líquida.

Análise/ dose de radiação	1 *	2 **
pH	6,60	6,58
Umidade (%)	53.39	53,80
Proteína (%)	15.05	14.88
Gordura (%)	30.56	30.43
Cinzas (%)	0.85	0.87

* Gema sem tratamento utilizada no experimento empregando dose de 1,5 kGy

** Gema sem tratamento utilizada no experimento empregando dose de 2,5 kGy

A separação mecânica da gema e clara, na indústria, não ocorre de forma perfeita, isto é, uma porção da clara é arrastada junto com a gema no momento da separação, por isso as gemas líquidas comerciais apresentam um valor de umidade maior, e conseqüentemente, um menor conteúdo de sólidos totais, quando comparada com valores encontrados na literatura. LI-CHAN et al. (1995) citam valores de 52% de sólidos totais para gema de ovo.

As amostras de gema obtidas junto à indústria para os experimentos com doses de 1,5 e 2,5 kGy foram previamente analisadas para caracterização da condição microbiológica. Os resultados podem ser vistos na TABELA 8.

TABELA 8. Análise microbiológica de gema líquida sem tratamento

Análise/ dose de radiação	1 *	2 **
<i>Salmonella</i> (ausência em 25g)	Presença	Presença
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,4NMP/g	Ausência
<i>Coliformes fecais</i>	<3 NMP/ g	0,7 NMP/ g
Contagem total de mesófilos	4,1.10 ⁵ UFC/g	6,8 x 10 ⁵ UFC/g

* Gema sem tratamento utilizada no experimento empregando dose de 1,5 kGy

** Gema sem tratamento utilizada no experimento empregando dose de 2,5 kGy

Procurando situar o trabalho dentro de um nível de contaminação compatível com a realidade, estabeleceu-se uma carga de inóculo na faixa de 2 a 8.10^2 UFC/g de gema. O nível estabelecido para a contaminação das amostras foi baseado em relatos de literatura.

Segundo SERRANO et al. (1997) a contagem de ovos contaminados naturalmente com *Salmonella* Enteritidis é muito baixa da ordem de 10^2 UFC/mL. GAST & BEARD (1992) relataram que de 132 ovos postos por galinhas infectadas, quatro apresentaram *Salmonella* Enteritidis ao redor de 5 UFC/mL. Em ovos artificialmente contaminados com $6,8.10^8$ UFC/mL de *Salmonella* Enteritidis foram detectadas contagens da ordem de 10^3 colônias na casca, após 1, 2, 3 e 7 dias. Na gema a contagem foi de 10 colônias após 2 dias e 10^2 colônias após 3 e 7 dias. Apesar da alta carga contaminante inicial, a *Salmonella* Enteritidis permaneceu em contagens bem mais baixas no ovo. (OLIVEIRA, 2000).

O nível de contaminação com *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* de gemas utilizadas para testar as doses de 1,5 e 2,5 kGy foi confirmado por meio da contagem do inóculo em placas, os resultados obtidos estão expressos na TABELA 9.

TABELA 9. Nível de inoculação com *Salmonella* Enteritidis e *S. aureus* em amostras de gema de ovo líquida.

Microrganismo	1 *	2 **
<i>Salmonella</i> Enteritidis	$5,3 \times 10^2$ UFC/g de gema	$7,5 \times 10^2$ UFC/g de gema
<i>Staphylococcus aureus</i>	$4,1 \times 10^2$ UFC/g de gema	$8,8 \times 10^2$ UFC/g de gema

* Gema sem tratamento utilizada no experimento empregando dose de 1,5 kGy

** Gema sem tratamento utilizada no experimento empregando dose de 2,5 kGy

Em uma primeira etapa foi conduzido o experimento com a dose de 1,5 kGy. Após a irradiação das unidades experimentais devidamente identificadas, foi sorteado um saquinho de cada repetição (R1 a R9) para análise de *Salmonella* e outro para análise de *Staphylococcus aureus*. Foi verificada presença (+) ou

ausência (-) desses microrganismos nas amostras e os resultados encontram-se expresso na TABELA 10.

TABELA 10. Controle de *Salmonella* Enteritidis e *S. aureus* em amostras de gema previamente inoculadas e irradiadas com dose de 1,5 kGy.

Microrganismo	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
<i>Salmonella</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(-) ausência	(+) presença								

Pela TABELA 10 verifica-se uma grande incidência de respostas negativas para *S. aureus*, sendo que das 9 amostras nenhuma acusou presença (0/9), indicando que a dose de 1,5 kGy seja suficiente para destruir *S. Aureus* em gema de ovo líquida ao nível de contaminação de $4,1 \cdot 10^2$ UFC/g.

Por outro lado essa mesma dose não foi suficiente para eliminar *S. Enteritidis* ao nível de contaminação de $5,3 \cdot 10^2$ UFC/g, uma vez que das 9 amostras analisadas, 5 acusaram presença de *S. Enteritidis*(5/9) representando 55,5% do total da amostras.

Sob as mesmas condições de radiação, pôde-se observar que *S. Enteritidis*, foi mais resistente à radiação do que *S. aureus*, exigindo doses mais elevadas de radiação para sua destruição em gema de ovo líquida.

Resultados obtidos por MONK et al. (1994) e CLAVERO et al. (1994), indicam a mesma tendência. Os experimentos foram conduzidos com carne bovina contendo alto e baixo teor de gorduras e a irradiação efetuada a 4°C na presença de ar. CLAVERO et al. (1994) encontraram valores de D_{10} para *Salmonella* sp. de 0,618-0,661 kGy e 0,621-0,624 kGy, respectivamente, enquanto MONK et al. 1994, encontraram valores de D_{10} para *S. aureus* de 0,442-0,448 kGy e 0,437-0,453 kGy, respectivamente, demonstrando que *S. aureus* pode ser destruído com doses menores que aquelas requeridas para *Salmonella* sp.

O mesmo comportamento foi observado por THAYER et al. (1997) quando inocularam carnes exóticas com uma mistura de *Salmonella* (*S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. newport*, *S. senftenberg*, *S. typhimurium*) e *S. aureus* (ATCC 13565, ATCC 2593 e B124). Um mínimo de 5 doses foram usadas para estabelecer valores D_{10} , que para *Salmonella* foi de $0,53 \pm 0,02$ kGy e $0,37 \pm 0,01$ kGy para *S. aureus*, demonstrando, que *Salmonelas* são mais resistentes à radiação que *S. aureus*. Este resultado concorda com o do presente trabalho, apesar de terem sido conduzidos em diferentes produtos (gema e carnes)

Dessa forma a aplicação de uma dose para destruir *Salmonella* é também suficiente para garantir a destruição de *S. aureus*.

Uma vez que a dose de 1,5 kGy não foi suficiente para destruição de *Salmonella* conduziu-se em uma segunda etapa o experimento com dose de 2,5 kGy.

As nove amostras analisadas apresentaram 100% de resultados negativos, isto é, nenhuma presença de *Salmonella* (0/9) ou *S. aureus* (0/9) foi detectada.

Pelos resultados obtidos, a dose de 2,5 kGy parece ser suficiente para destruir *Salmonella* Enteritidis e *S. aureus* ao nível de contaminação de $7,5 \cdot 10^2$ e $8,8 \cdot 10^2$ UFC/g respectivamente, e existe uma dose mínima maior que 1,5 e menor ou igual a 2,5 kGy capaz de destruir *Salmonella* de um fator de 10^2 UFC/g

Três argumentos sustentam esse resultado, quais sejam:

- Foram realizadas 9 repetições genuínas do processo de irradiação com gemas artificialmente inoculadas;
- Uma amostra, retirada aleatoriamente de cada repetição, foi analisada para presença de *Salmonella*, e outra para presença de *S. aureus*, todas apresentaram resultados negativos (ausência do microrganismo);
- Para detecção de *Salmonella* todo o conteúdo de gema do saquinho (100g) foi utilizado na análise e não apenas 25g como sugere a metodologia.

FARKAS (1998) em uma revisão sobre radiação em alimentos, cita que a dose mínima de radiação suficiente para destruição de *Salmonella* e *S. aureus*

encontra-se na faixa de 2 a 7 kGy, dependendo das condições de radiação e do substrato em que foram conduzidos os experimentos.

A eficiência de uma determinada dose de radiação sobre microrganismos depende de fatores como: número de microrganismos presentes, composição do alimento, estado físico do alimento, presença ou ausência de oxigênio, condição do microrganismo e a radiorresistência dos microrganismos presentes. Entre os microrganismos existem diferenças entre os gêneros e mesmo entre cepas de uma mesma espécie. A faixa de radiorresistência microbiana é ampla, embora não tanto quanto a variação que ocorre na termorresistência (FRANCO & LANDGRAF, 1996), por esses motivos a comparação de resultados deve ser feita com muito critério, observando rigorosamente as variáveis de cada estudo,

SERRANO et al. (1997) encontrou que uma dose de 1,5 kGy foi suficiente para reduzir *Salmonella* de ovo integral líquido de um fator de $4 \cdot \log_{10}$. A gema por apresentar composição diferente do ovo, (contém mais proteínas e gordura), pode requerer dose maior de radiação para eliminação de *Salmonella*.

Outros pesquisadores têm buscado encontrar a dose necessária para destruição de patógenos, em geral são estudos conduzidos com altos níveis de contaminação com o objetivo de encontrar valores de D_{10} (dose necessária para redução de 90% da população de microrganismos).

A dose de 2,5 kGy encontrada está próxima daquela relatada por MATIC et al. (1990), os quais irradiaram ovo em pó artificialmente inoculado com três linhagens de *Salmonella*, *S. lille*, *S. enteritidis* e *S. typhymurium*. A resistência dessas linhagens à radiação foi investigada. Os autores encontraram um valor de D_{10} de 0,8 kGy e concluíram que uma dose de radiação de 2,4 kGy alcançou um fator de redução de 10^3 .

4.2. ESTIMATIVA DE VIDA ÚTIL DE GEMA DE OVO LÍQUIDA PASTEURIZADA TERMICAMENTE E IRRADIADA COM DIFERENTES DOSES

O experimento foi conduzido em duas etapas, na primeira foram analisadas as gemas pasteurizada termicamente e irradiada com 2,5 kGy (EI), em uma segunda etapa foram analisadas as gemas irradiadas com doses de 3,5 e 4,5 kGy (EII)

As gemas GI e GII utilizadas para o preparo dos experimentos EI e EII foram analisadas quanto à mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras, para conhecimento da carga microbiana inicial das amostras, antes da pasteurização e radiação. Os resultados dessas análises encontram-se na TABELA 11.

As amostras de gema apresentaram diferença de contagem da ordem de $1.\log_{10}$, porém são diferenças dentro de uma faixa de variação aceitável para os experimentos.

TABELA 11. Análises microbiológicas de gema líquida antes da radiação.

Análises	Gema I (EI)	Gema II (EII)
Mesófilos	$1,75.10^4$ UFC/g	$2,42. 10^5$ UFC/g
Psicrotróficos	$5,2 .10^3$ UFC/g	$1,20.10^4$ UFC/g
Bolores e Leveduras	$8,0 .10^4$ UFC/g	$1,16.10^5$ UFC/g

Os resultados das análises físico-químicas para as gemas I e II se encontram na TABELA 12.

TABELA 12. Análise físico-química de gema líquida sem tratamento.

Análises	Gema I (EI)	Gema II (EII)
pH	6,62	6.58
Umidade(%)	54,20	53.90
Proteína	14,75	15.12
Gordura	29,50	29.80
Cinzas	0,81	0.92

4.2.1. Descrição do desenvolvimento de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em gema líquida pasteurizada e irradiada.

O emprego da irradiação em produtos de ovos tem despertado muito interesse, pois trata-se de processo eficiente do ponto de vista microbiológico. No entanto, a grande maioria dos estudos, enfoca os microrganismos patogênicos, deixando à margem o estudo de vida de prateleira de produtos de ovos irradiados. Os produtos de ovos, líquido e pasteurizado, propiciam uma vida útil relativamente curta, de 5 a 7 dias (dados fornecidos pelas indústrias processadoras de ovos⁴) e para gema líquida irradiada não se tem essa informação.

Nesse sentido, o desenvolvimento da carga microbiana de gemas submetidas à pasteurização térmica e radiação gama (doses de 2,5; 3,5; 4,5 kGy) durante o período de estocagem a $4,5 \pm 0,5$ °C, foi acompanhado por análises microbiológicas. Os resultados obtidos foram tabelados e se encontram no apêndice (TABELAS A-1, A-2, A-3, A-4)

O período de estocagem variou para os diferentes tratamentos em função do crescimento dos microrganismos. A estocagem foi interrompida e os lotes descartados quando as contagens totais atingiram valores de 10^6 - 10^7 UFC/g, ou até um máximo de 21 dias.

As FIGURAS 10, 11, 12 e 13 ilustram o crescimento de cada microrganismo em função do tempo de armazenamento, para cada um dos tratamentos; gema pasteurizada termicamente (PT), gema irradiada com 2,5; 3,5 e 4,5 kGy respectivamente.

Para gema pasteurizada termicamente (FIGURA 10) o crescimento dos microrganismos mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras, foi semelhante, desenvolvendo-se rapidamente após a pasteurização. Os psicrotróficos atingiram contagem mais alta para um mesmo período de tempo do que os outros

⁴ Salto's Alimentos, Sohovos, Granjas ITO

microrganismos, indicando que os psicrotróficos (7°C/10 dias) seriam os microrganismos limitantes da vida útil da gema líquida pasteurizada.

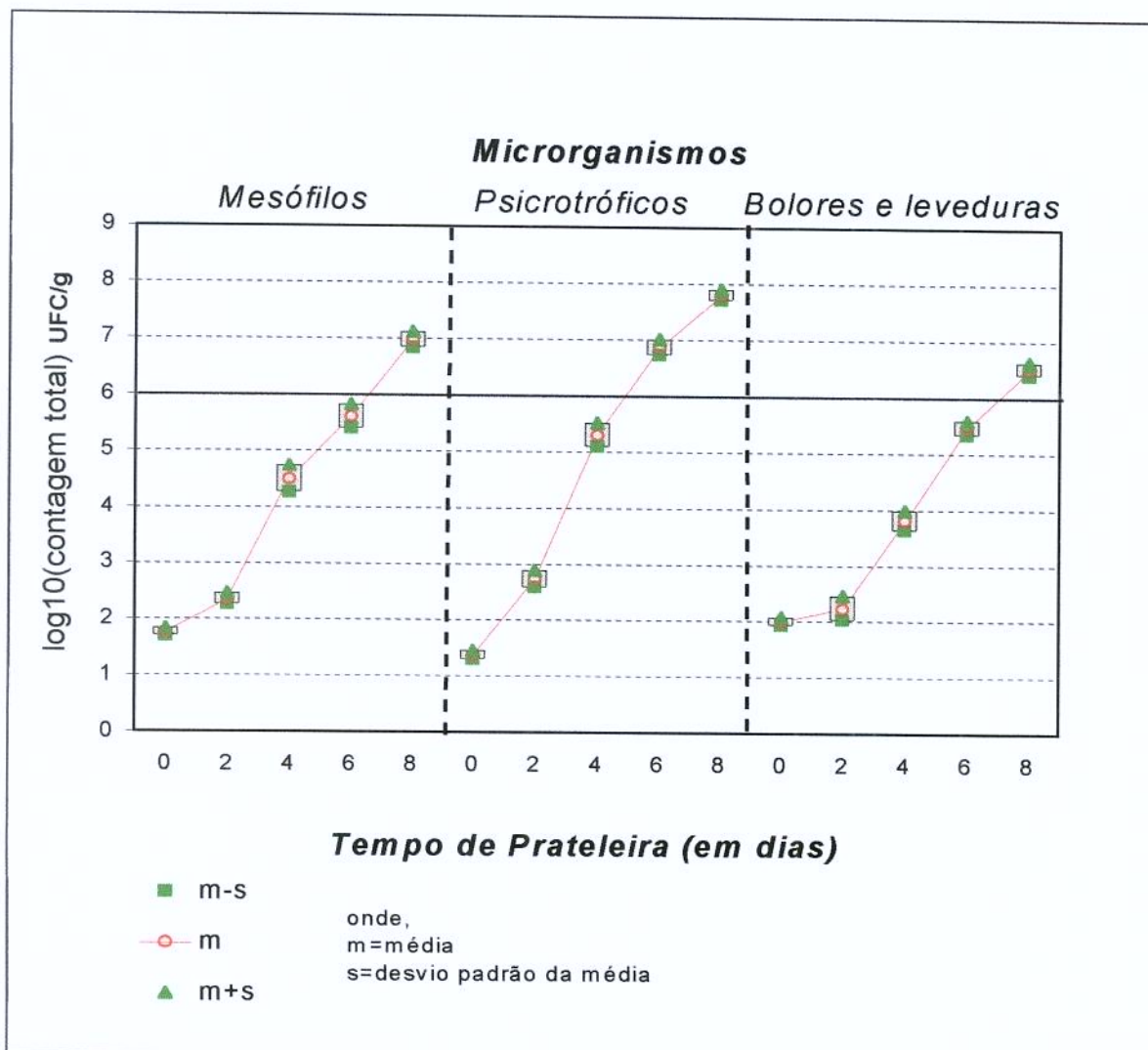


FIGURA 10. Comparação entre as médias (m) do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e Leveduras em 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente em diferentes tempos de armazenamento; descrição da variabilidade ($m \pm$ desvio padrão da média) entre lotes.

Quanto à dependência de temperatura para crescimento, os microrganismos foram divididos em 3 grupos, os termófilos, mesófilos e psicrofílos, com os psicrotróficos formando um subgrupo dos mesófilos. Os microrganismos psicrotróficos, dentre outras características, são bactérias, bolores

e leveduras que crescem lentamente a temperaturas de refrigeração (abaixo de 7°C), mas crescem muito bem a temperatura acima de refrigeração, isto é, 25 a 30°C, com temperatura máxima de crescimento entre 30 e 35°C. Os mesófilos crescem bem entre 25 e 40 °C com temperatura ótima de crescimento entre 30 e 40 °C e mínima entre 5 e 25°C. Os psicrotróficos multiplicam-se bem em alimentos refrigerados, sendo os principais agentes de deterioração de carnes, pescados, ovos, frangos e outros. Dentre outros, são representantes dessa classe de microrganismos os gêneros; *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*. Para gema líquida pasteurizada ou irradiada, esses microrganismos são de importância, pois trata-se de produto mantido sob refrigeração. (JAY, 1992; FRANCO & LANDGRAF, 1996; COUSIN, 1992).

Pelas FIGURAS 11, 12 e 13 referentes ao processo de irradiação (diferentes doses) verifica-se que os microrganismos mesófilos (35°C/48 h) sofreram grande efeito da radiação, mantendo contagens em níveis bem baixos durante o período de tempo avaliado para cada dose, enquanto que os psicrotróficos (7°C/10 dias), bolores e leveduras (23°C/3 a 5 dias) atingiram contagens mais altas no mesmo período.

Observa-se um efeito da dose, principalmente na fase de latência, quanto maior a dose de radiação, mais prolongada essa fase, e portanto maior o tempo de vida útil do produto. Uma dose mais alta pode destruir um maior número de células além de causar injúrias mais sérias exigindo, provavelmente, um tempo maior (fase de latência) para sua recuperação.

Células microbianas submetidas a tratamentos subletais revelam uma série de alterações características do fenômeno da injúria, como um aumento da sensibilidade, perda de componentes celulares, danos à membrana celular aumento da fase lag, incapacidade de multiplicação e outros (LEITÃO, 1988).

Para todos os tratamentos, os microrganismos psicrotróficos (7°C/10 dias) foram os que se multiplicaram mais rapidamente, atingindo contagens indicadoras de deterioração, antes dos outros microrganismos (mesófilos e bolores e leveduras), indicando ser, os psicrotróficos, os microrganismos críticos na deterioração microbiológica de gema líquida pasteurizada ou irradiada.

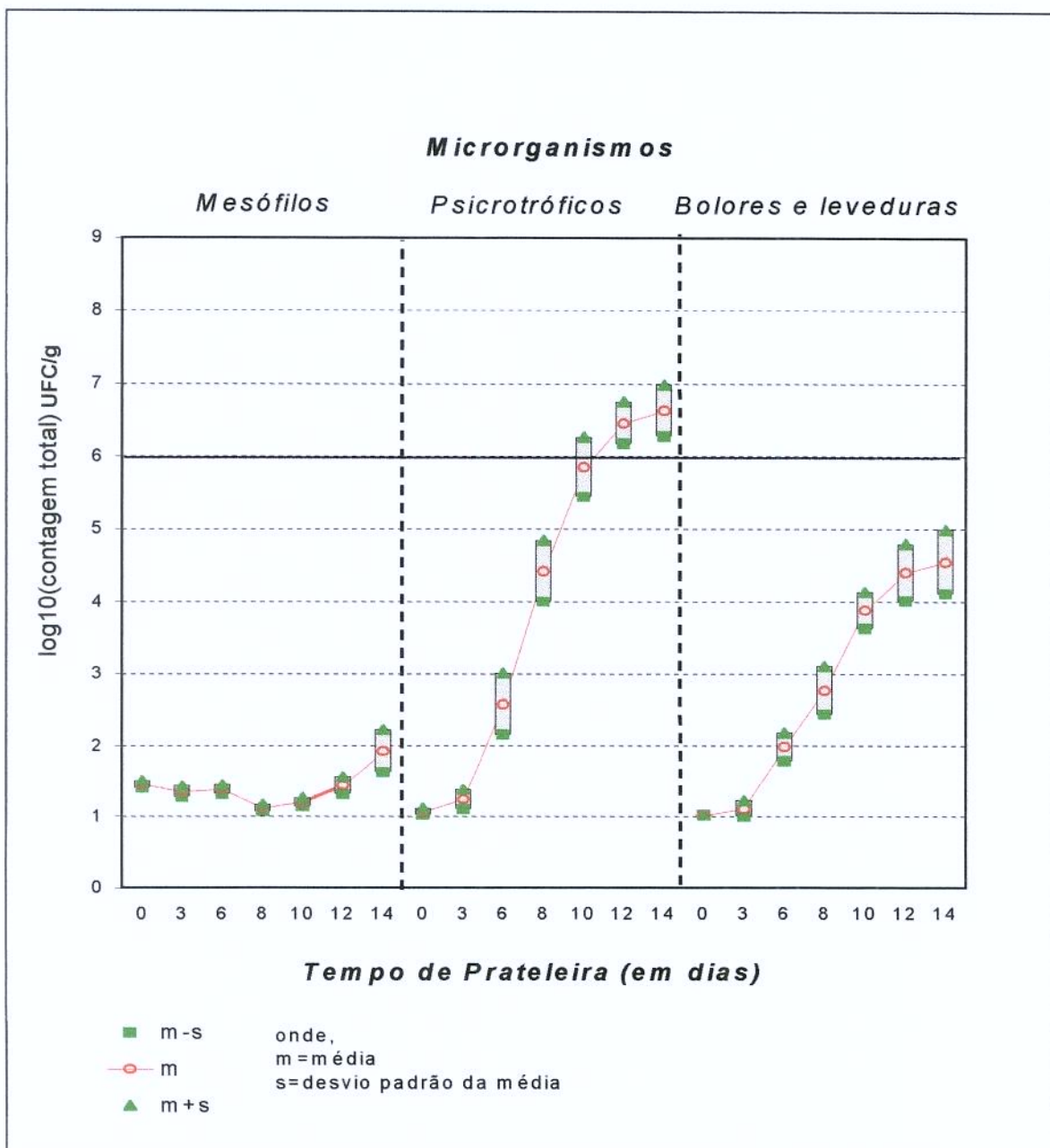


FIGURA 11. Comparação entre as médias (m) do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em 8 lotes de gemas líquidas irradiadas com 2,5 kGy em diferentes tempos de armazenamento; descrição da variabilidade ($m \pm$ desvio padrão da média) entre lotes.

Pelo acompanhamento, em curtos intervalos de tempo, do desenvolvimento de microrganismos, é possível ajustar modelos que representem sua cinética de crescimento e estimar a vida útil desses produtos.

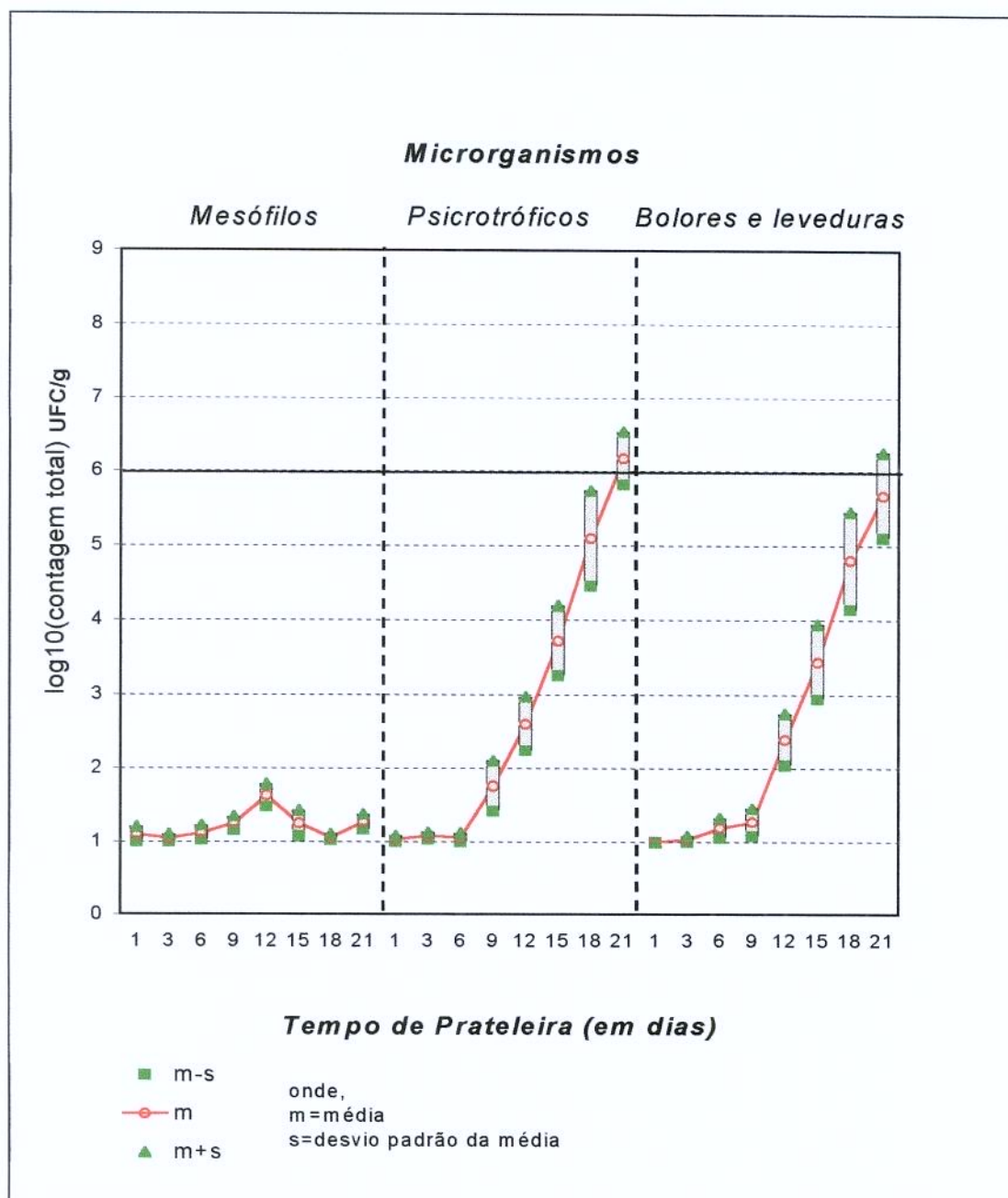


FIGURA 12. Comparação entre as médias (m) do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em 8 lotes de gemas líquidas irradiadas a 3,5 kGy em diferentes tempos de armazenamento; descrição da variabilidade ($m \pm$ desvio padrão da média) entre lotes

Dessa forma, para que a estimativa da vida útil tenha garantias estatísticas dentro dos valores amostrais observados, modelos de crescimento de microrganismos foram ajustados, os quais são apresentados na TABELA 13

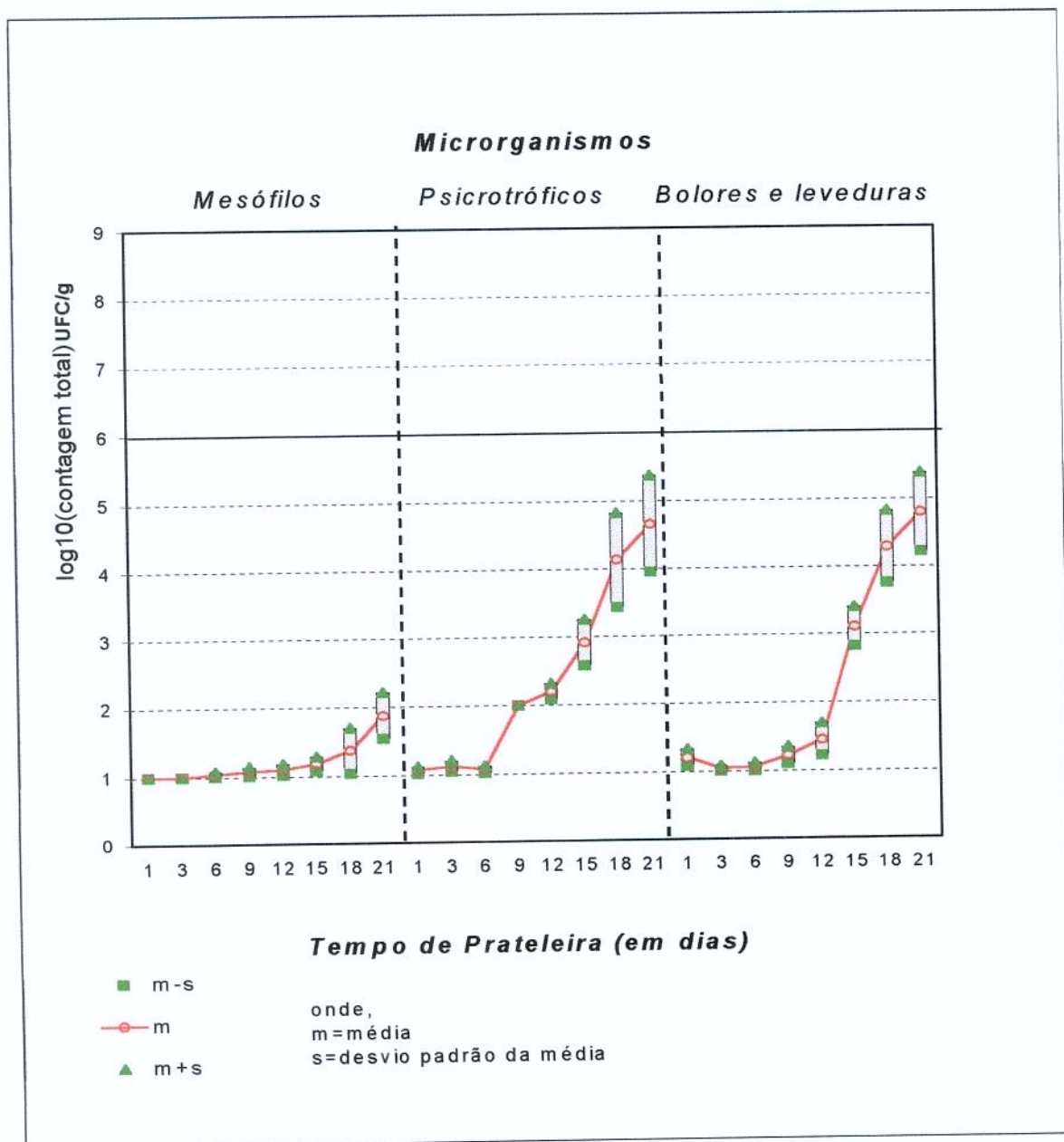


FIGURA 13. Comparação entre as médias (m) do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em 8 lotes de gemas líquidas irradiadas com 4,5 kGy em diferentes tempos de armazenamento; descrição da variabilidade ($m \pm$ desvio padrão da média) entre lotes.

Não foram estimados modelos para os microrganismos mesófilos, em gemas irradiadas, uma vez que seu crescimento não teve importância significativa diante do crescimento dos outros microrganismos deterioradores.

TABELA 13. Modelos de regressão não-lineares selecionados para ajuste do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em uma amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente e irradiadas nas doses 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5kGy em diferentes tempos de armazenamento (t).

TRATAMENTO	MICROORGANISMOS	MODELOS
Pasteurização térmica	Mesófilos	$Y=1,76+ \alpha e^{-\beta \exp (-k t)}$, $k=2/5$
	Psicrotróficos	$Y=1,00+ \alpha e^{-\beta \exp (-k t)}$, $k=1/2$
	Bolores e Leveduras	$Y=2,00 + \alpha e^{-\beta \exp (-k t)}$, $k=2/5$
2,5 kGy	Mesófilos	Não houve ajuste de modelo
	Psicrotróficos	$Y=1,00+ \alpha e^{-\beta \exp (-k t)}$, $k=2/5$
	Bolores e Leveduras	$Y=1,00+ \alpha e^{-\beta \exp (-k t)}$, $k=2/5$
3,5 kGy	Mesófilos	Não houve ajuste de modelo
	Psicrotróficos	$Y=1,00+ \alpha e^{-\beta \exp (-k t)}$, $k=1/5$
	Bolores e Leveduras	$Y=1,00+ \alpha e^{-\beta \exp (-k t)}$, $k=1/5$
4,5kGy	Mesófilos	Não houve ajuste de modelo
	Psicrotróficos	$Y=1,00+ \alpha e^{-\beta \exp (-k t)}$, $k=1/5$
	Bolores e Leveduras	$Y=1,00+ \alpha e^{-\beta \exp (-k t)}$, $k=2/5$

Na TABELA A-9 (Apêndice A) são apresentados as estimativas dos parâmetros, seus erros padrões assintóticos e intervalos de confiança assintóticos, ao nível de probabilidade de 95% dos modelos de regressão ajustados.

Os gráficos representados nas FIGURAS 14, 15 e 16 mostram a aplicação dos modelos de crescimento dos microrganismos mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras respectivamente, para os diferentes tratamentos, e a estimativa de vida útil referente a cada microrganismo, calculado como máximo tempo em que $LS(\text{verdadeiro valor}) = 6$ (limite superior).

Finalmente, na TABELA 14 são apresentadas as estimativas do tempo de prateleira da gema sob diferentes tratamentos, os limites superior (LS_e) e inferior (LI_e) assintóticos da estimativa ao nível de 95% de probabilidade.

TABELA 14. Estimativa da vida de prateleira máxima da amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente e irradiadas nas doses 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5 kGy, valor médio estimado (M) do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras, limites inferior da estimativa (LI_e) e superior da estimativa (LS_e), ao nível de 95% de probabilidade.

TRATAMENTO	MICROORGANISMO	Vida máxima de prateleira (em dias)	Estimativa do $\log_{10}$ da contagem total			
			M	LI_e	LS_e	d_m
PT	Mesófilos	4,9	4,99	4,77	5,21	0,22
	Psicrotróficos	3,9	5,17	4,96	5,37	0,21
	Bolores e Leveduras	5,65	5,14	4,94	5,34	0,20
Ir2,5 kGy	Mesófilos	>14	-	-	-	-
	Psicrotróficos	7,7	4,18	3,75	4,60	0,43
	Bolores e Leveduras	12,4	4,40	4,04	4,77	0,37
Ir3,5 kGy	Mesófilos	>21	-	-	-	-
	Psicrotróficos	15,2	4,02	3,62	4,42	0,40
	Bolores e Leveduras	15,7	3,88	3,45	4,32	0,44
Ir4,5 kGy	Mesófilos	>21	-	-	-	-
	Psicrotróficos	17,5	3,90	3,51	4,29	0,39
	Bolores e Leveduras	17,8	4,24	3,83	4,66	0,42

d_m = semi-amplitude do intervalo de confiança para o verdadeiro valor da estimativa da média do $\log_{10}$ da contagem total.

Os mesófilos (FIGURA 14) foram muito afetados pela radiação apresentando crescimento reduzido quando comparado à gema pasteurizada. Os psicrotróficos (FIGURA 15) foram os que apresentaram desenvolvimento mais acelerado, indicando uma maior resistência desses microrganismos à radiação.

Observa-se que os psicrotróficos seguidos dos bolores e leveduras (FIGURA 16) são os microrganismos críticos para gema líquida irradiada, os quais determinam a vida útil desse produto.

Conforme relatos de literatura, os microrganismos apresentam diferentes sensibilidade à irradiação, porém há uma concordância quanto ao conceito de que as bactérias Gram-negativas, tanto as deteriorantes como as patogênicas, são geralmente mais sensíveis à irradiação do que as células vegetativas das bactérias Gram-positivas. (FRANCO & LANDGRAF, 1996; DIEHL, 1996; JAY, 1992).

As bactérias Gram-negativas são as principais contaminantes na deterioração de ovos, sendo os gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Serratia*, *Scherichia*, *Xantomonas*, *Aeromonas*, *Hafnia* e *Citrobacter* os mais comumente encontrados. As bactérias Gram-positivas em ovos são encontradas com menor frequência, e são geralmente representadas pelos gêneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* e *Streptococcus* (BOARD & TRANTER, 1995).

Diferentes gêneros de microrganismos podem estar presente na contagem de psicrotróficos, que são largamente distribuídos na natureza. São um grupo numeroso de microrganismos e incluem bactérias na forma de bastonetes, cocus e víbrios, formas esporulada e não esporulada, Gram-negativas e Gram-positivas, aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios. Predominam nesse grupo as bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Alteromonas* e outras. Dentre os Gram-positivos podem ser citadas *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* e outros. Já na contagem dos mesófilos predominam entre as Gram-negativas, bactérias das famílias *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*, diferindo portanto do grupo psicrotrófico (COUSIN et al. 1992).

Considerando as figuras 14 e 15, a contagem de mesófilos (35°C/48h) não

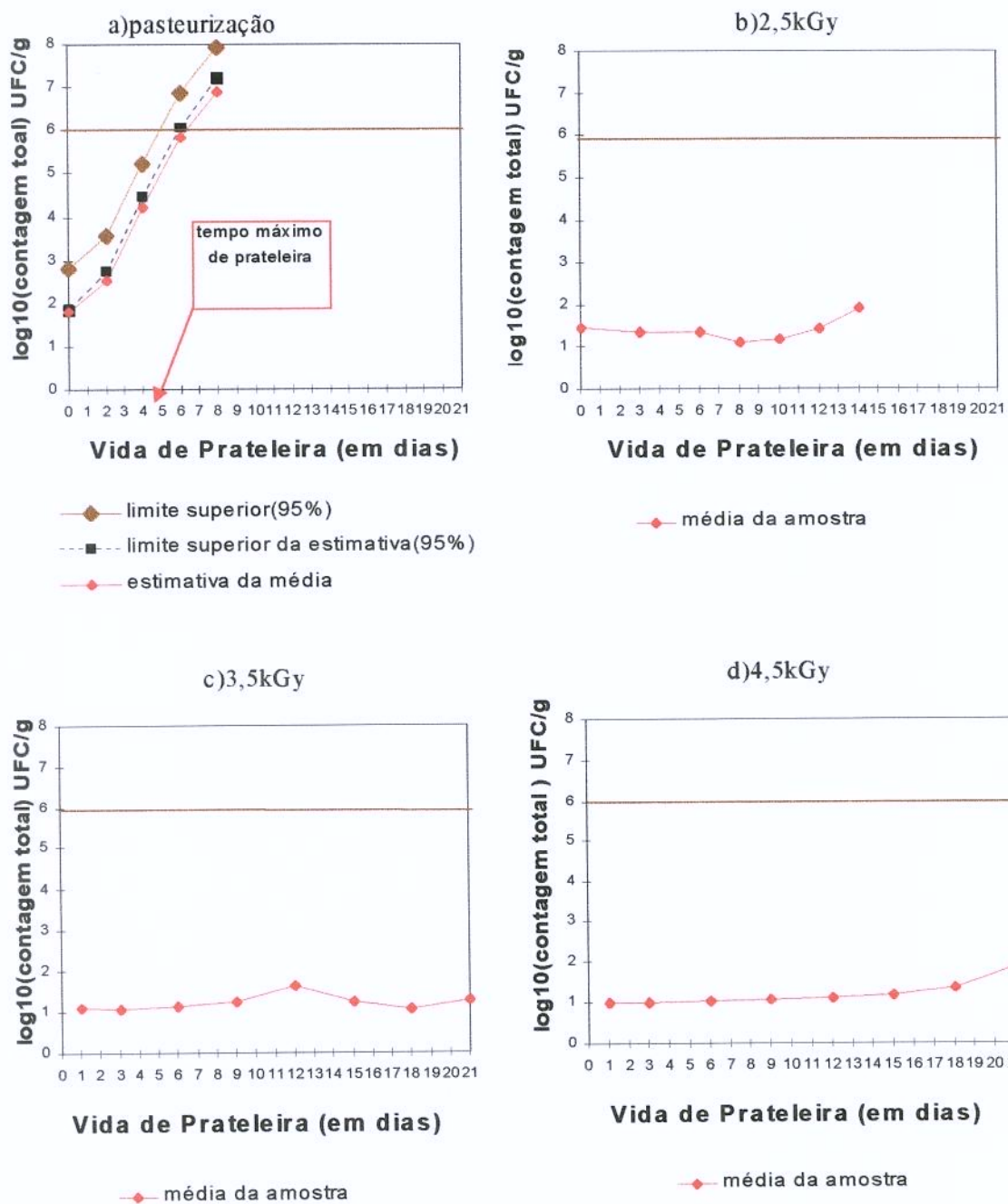


FIGURA 14: Estimativa da vida de prateleira da amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente e irradiadas nas doses 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5kGy, valor médio estimado do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de Mesófilos, limite superior para o verdadeiro valor da média e limite superior para o seu verdadeiro valor, ao nível de 95% de probabilidade.

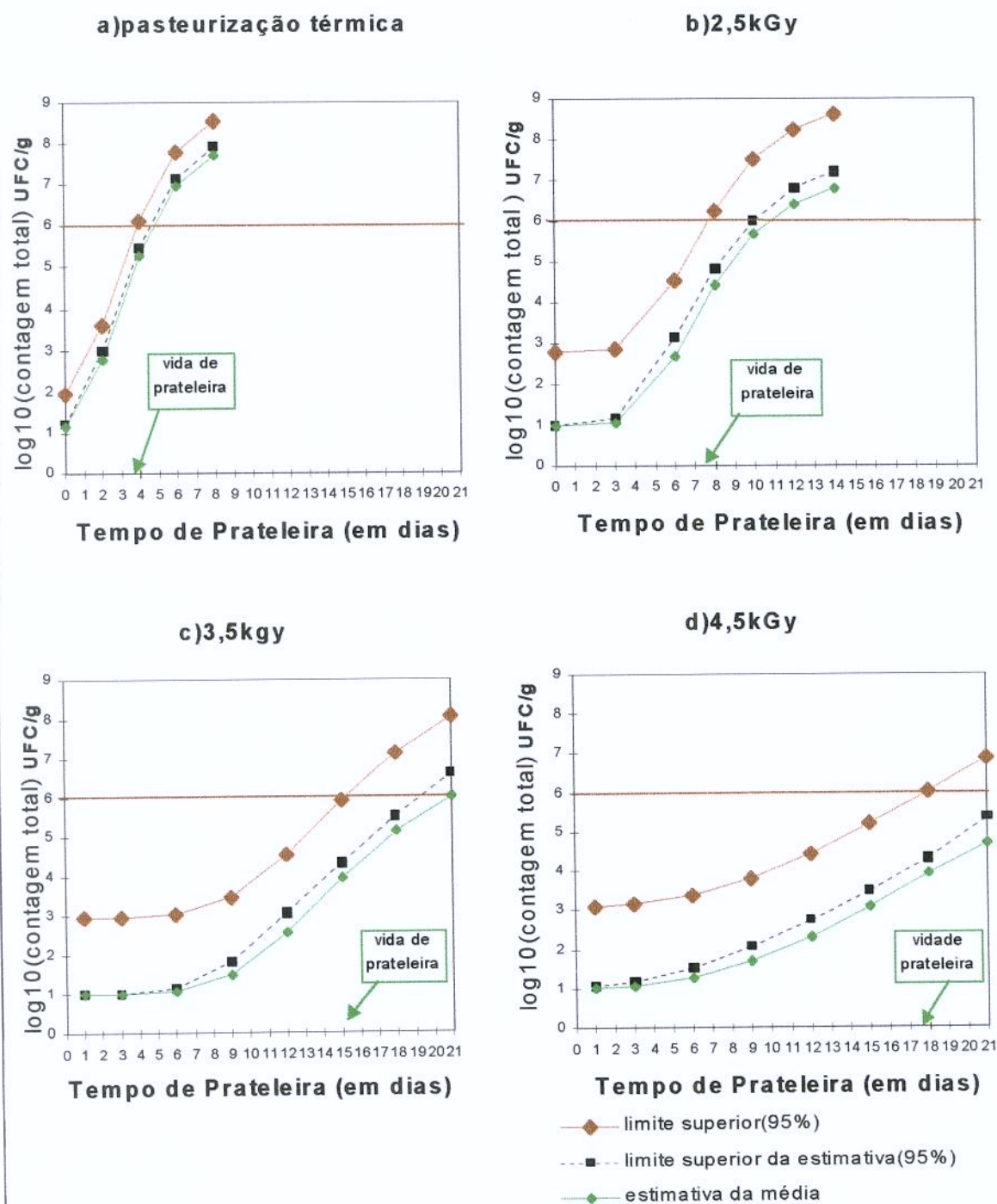


Figura 15: Estimativa do tempo de prateleira da amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente e irradiadas nas doses 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5kGy, valor médio estimado do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de Psicotróficos, limite superior para o verdadeiro valor da média e limite superior para o seu verdadeiro valor, ao nível de 95% de probabilidade.

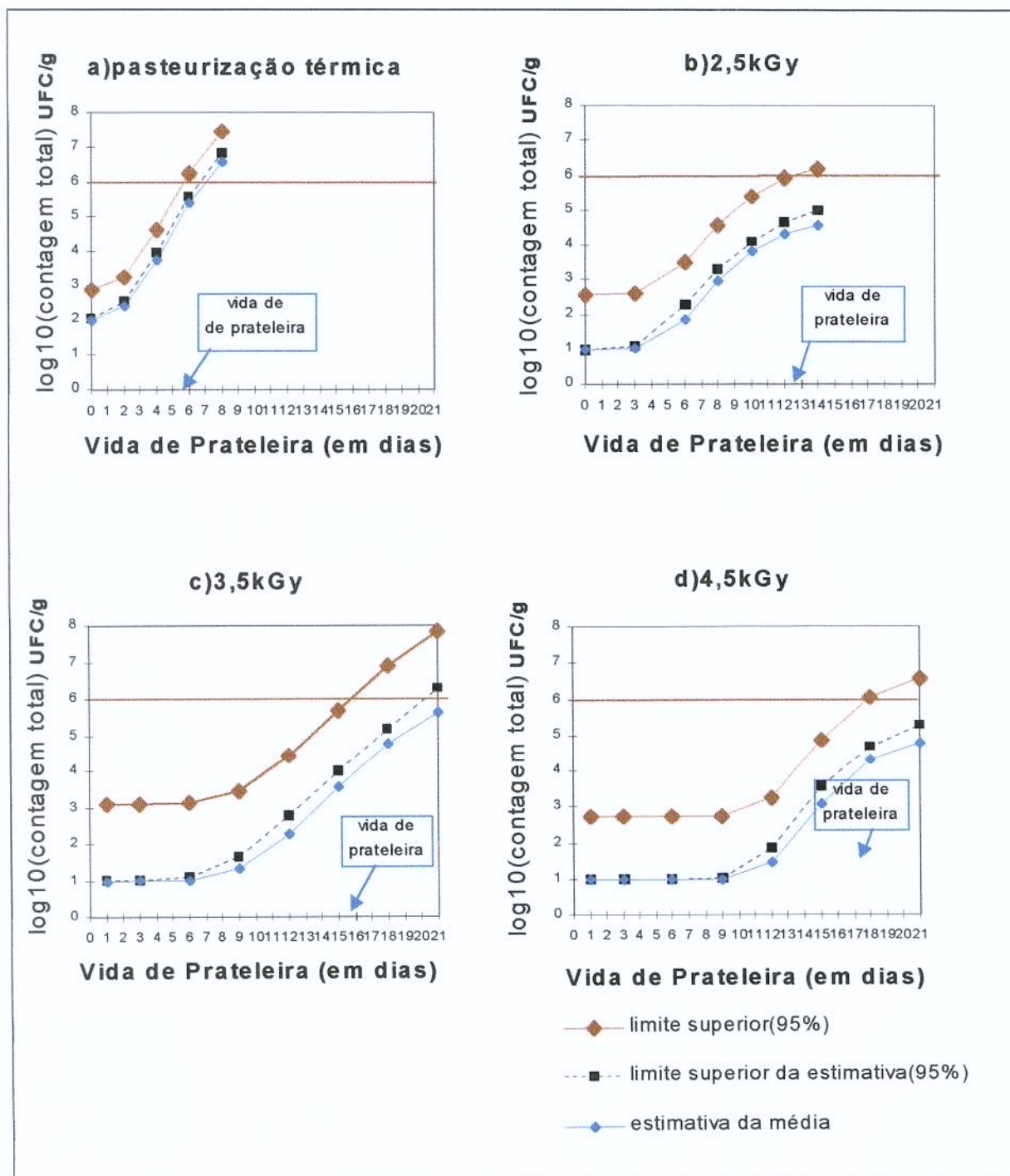


FIGURA 16. Estimativa do tempo de prateleira da amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente e irradiadas nas doses 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5 kGy, valor médio estimado do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de Bolores e Leveduras, limite superior para o verdadeiro valor da média e limite superior para o seu verdadeiro valor, ao nível de 95% de probabilidade.

seria, portanto, uma análise representativa da condição microbiológica de gemas líquidas irradiadas. Enquanto a contagem de psicrotróficos atinge valores próximos de 10^6 , os mesófilos se encontram na faixa de 10 a 100 UFC/g. Para a gema pasteurizada o grupo limitante também é dos psicrotróficos, seguido de perto pelos mesófilos e bolores e leveduras.

Considerando os tempos máximos de vida de prateleira apresentados na TABELA 14 verifica-se que o processo de irradiação foi mais eficiente para conservação da gema líquida. Enquanto a pasteurização garante vida útil de 4 dias, a radiação à dose de 2,5 kGy duplica esse tempo, com uma estimativa de 8 dias de vida útil.

Houve um aumento da vida útil de gema líquida irradiada com aumento da dose de radiação, embora esse aumento não tenha sido linearmente proporcional à dose. Enquanto a dose de 3,5 kGy estende o tempo de vida útil para 15 dias, praticamente o dobro daquele alcançado pela dose de 2,5 kGy, um aumento para dose de 4,5 kGy agregou somente 2 dias ao tempo de vida útil atingido pela gema irradiada com dose de 3,5 kGy.

Isso mostra que a irradiação com doses de 2,5 e 3,5 kGy afeta a maioria das espécies presentes, restando um número reduzido de microrganismos mais resistentes à irradiação, cuja dose de 4,5 kGy parece não atingi-los de forma eficiente.

A resposta da célula microbiana à radiação ionizante está relacionada à natureza e à quantidade do dano direto produzido em seu alvo vital, ao número, natureza e longevidade dos radicais químicos induzidos pela radiação e à habilidade inerente à célula em alterar ou reparar o dano e influência dos meios extra ou intra celular (FRANCO & LANDGRAF; 1996, DIEHL, 1996).

Quanto ao aspecto microbiológico a irradiação se mostrou um processo vantajoso em relação à pasteurização térmica para gema de ovo líquida, atingindo, com o emprego da dose de 2,5 kGy um aumento de 100% da vida útil. Por outro lado, gema tratada com radiação gama, pode induzir mudanças físico-químicas e organolépticas, sendo indicado a verificação dos possíveis efeitos das doses de radiação sobre suas propriedades funcionais e sensoriais

4.3. EFEITO DA DOSE DE RADIAÇÃO GAMA NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E SENSORIAIS DE GEMA LÍQUIDA E MAIONESE

Os tratamentos avaliados neste estudo foram:

- gema pasteurizada termicamente a 64°C por 3,5 min. (PT)
- gema irradiada com 2,5 kGy (Ir2,5)
- gema irradiada com 3,5 kGy (Ir3,5)
- gema irradiada com 4,5 kGy (Ir4,5)

A gema natural, isto é, sem tratamento (GST) também foi analisada como controle ou referência.

Os valores de proteína, pH e umidade dos tratamentos avaliados estão apresentados na TABELA 15. Os resultados representam a média de 3 lotes por tratamento. As análises foram feitas em duplicata e proteína em triplicata.

TABELA 15. Valores de proteína, umidade e pH de gema irradiada, pasteurizada termicamente e natural (gema sem tratamento -GST).

Tratamento	Proteína (%)	Umidade (%)	pH
GST	15,90 ± 0,09	55,40 ± 0,80	6,59 ± 0,03
PT	15,62 ± 0,14	56,01 ± 0,17	6,59 ± 0,04
Ir2,5	15,81 ± 0,02	55,63 ± 0,14	6,66 ± 0,03
Ir3,5	15,87 ± 0,08	55,67 ± 0,15	6,61 ± 0,01
Ir4,5	15,91 ± 0,07	55,73 ± 0,08	6,60 ± 0,02

Os valores encontrados para proteína, estão de acordo com aqueles citados por Li- CHAN et al. (1995). No entanto os valores de pH e umidade são maiores do que aqueles encontrados em literatura. Porém trata-se de gema comercialmente separada, que geralmente contém cerca de 20 % de clara. Essa

quantidade de clara incorporada à gema dilui os sólidos totais da gema, consequentemente aumentando sua umidade. COTTERILL & McBEE, (1995) citam valores de 43 a 48% de sólidos totais na gema comercialmente separadas. Quanto ao pH este tende a aumentar devido o pH básico da clara, que varia de 8,1 a 9,3. MA et al. (1993), não encontraram alteração no valor de pH de gema congelada irradiada com doses de 1,0, 2,5 e 4,0 kGy e gema pasteurizada por calor. Os valores de pH encontrados foram de 6,49 a 6,68.

As propriedades funcionais foram avaliadas tomando a gema sem tratamento (GST) como referência para avaliar possíveis alterações causadas pela pasteurização térmica ou pela irradiação.

4.3.1. Solubilidade Protéica

Os valores de solubilidade a pH 7,0 (SP), Capacidade de Emulsificação (CE), Índice de atividade de Emulsificação (IAE), Estabilidade de Emulsão (EE) e os resultados do teste de comparação múltipla de médias SNK são apresentados na TABELA 16.

TABELA 16. Valores de solubilidade (SP), capacidade de emulsificação (CE), índice de atividade de emulsificação (IAE) e estabilidade de emulsão (EE) de gema de ovo irradiada, pasteurizada termicamente e gema sem tratamento (GST).

Tratamento	SP (pH 7,0)	CE (mL de óleo/g de proteína)	IAE (m ² /g)	EE (%)
GST	60,34 ± 0,92 ^a	743,4 ± 5,8 ^a	59,23 ± 0,88 ^a	73,43 ± 1,06 ^b
PT	60,54 ± 1,70 ^a	750,0 ± 7,7 ^a	56,30 ± 1,55 ^b	76,25 ± 0,97 ^a
Ir2,5	62,51 ± 0,84 ^b	744,4 ± 3,7 ^a	53,87 ± 2,08 ^c	73,21 ± 0,22 ^b
Ir3,5	60,09 ± 1,32 ^a	703,1 ± 8,2 ^b	52,41 ± 1,43 ^d	72,93 ± 0,13 ^b
Ir4,5	60,86 ± 1,60 ^a	664,0 ± 3,3 ^c	52,09 ± 1,84 ^d	74,85 ± 3,15 ^b

a b c d : médias com as mesmas letras não apresentam diferença significativa ao nível de 95% de probabilidade.

Pelos resultados obtidos, a gema PT, Ir3,5 e Ir4,5 não apresentaram diferença significativa em relação à GST para valores de SP, no entanto a gema irradiada a 2,5 kGy apresentou um valor ligeiramente superior (estatisticamente significativo) ao da GST .

A solubilidade é a manifestação de um equilíbrio termodinâmico de interações proteína-proteína e proteína-solvente. As principais interações que influenciam a solubilidade de proteínas são de natureza hidrofóbica e iônica. Interações hidrofóbicas promovem ligações proteína-proteína que resultam em um decréscimo da solubilidade enquanto interações iônicas promovem ligações proteína-água e resultam em aumento da solubilidade das proteínas (DAMODARAM, 1996) .

É possível que no nível de energia de uma dose de radiação de 2,5 kGy tenha ocorrido mudança na conformação da estrutura das proteínas, favorecendo um ligeiro aumento da solubilidade. Algumas das propriedades funcionais da proteína, como a habilidade em formar e estabilizar emulsões depende de sua solubilidade, muito embora, uma diferença de 2% na solubilidade entre Ir2,5 e GST, sob o ponto de vista funcional não devem representar diferenças no desempenho da propriedade emulsificante, considerando ainda que os valores de solubilidade se encontram na faixa de 60%.

HUANG et al. (1997) avaliaram a solubilidade de proteínas de gema congelada e irradiada (2,3-3,0 kGy) as quais apresentaram uma pequena perda de solubilidade em relação à gema não processada, os valores foram de 5,09% e 5,69% respectivamente. Os resultados foram baixos devido à agregação ou gelatinização das proteínas induzida pelo congelamento.

4.3.2. Propriedades emulsificantes

Os resultados de CE e IAE refletem uma mesma tendência, os valores diminuem partindo-se da GST para PT e Irradiadas em ordem crescente de dose, indicando que a radiação e a pasteurização (no caso de IAE) tiveram um efeito sobre essas propriedades. CE apresentou perda parcial significativa para os

tratamentos Ir3,5 e Ir4,5 kGy enquanto que os tratamentos PT e Ir 2,5 não diferiram significativamente da GST, indicando que somente a radiação com dose igual ou superior a 3,5 kGy afetou essa propriedade. O IAE apontou uma diferença significativa entre a GST e os demais tratamentos, e uma perda maior imputada aos tratamentos com irradiação.

As propriedades de superfície estão relacionadas com a habilidade das proteínas de diminuir as tensões entre a fase hidrofílica e hidrofóbica de um alimento.

Em relação à natureza protéica podemos dizer que dois fatores importantes determinam o comportamento interfacial da proteína, sua composição e distribuição de aminoácidos e a conformação estrutural espacial. O segundo fator ganha maior importância por ser suscetível a mudanças do ponto de vista tecnológico.

O processo de determinação do ponto de inversão para a capacidade emulsificante envolve a criação contínua de área interfacial, em velocidade tal que o sistema nunca está em equilíbrio. O volume de óleo no ponto de inversão para um dado conjunto de condições dependerá da habilidade da proteína formar rapidamente uma camada interfacial e prevenir a coalescência das gotículas formadas, ou seja, principalmente da velocidade de adsorção e da quantidade de proteínas na fase aquosa. (DAGORN-SCAVINER et al., 1987)

O IAE fornece informação sobre a habilidade da proteína dispersar na fase oleosa e proporcionar cobertura suficiente na área interfacial para evitar imediata coalescência. Assim, uma grande área interfacial implica em gotícula de pequeno diâmetro o que provavelmente está associado à alta estabilidade da emulsão. A emulsão é bloqueada no estágio inicial pela adição do dodecil sulfato de sódio (SDS), não havendo tempo para penetração e rearranjo na interface (PEARCE & KINSELA, 1978).

Como não existe diferença na composição centesimal aminoacídica e nem na concentração de proteínas, pois trata-se de uma única matriz (gema) avaliada numa mesma concentração, as variações na CE e IAE poderiam ser atribuídas às alterações na conformação estrutural espacial provocando mudanças nas

características lipofílicas e hidrofílicas, que conseqüentemente interferem no comportamento interfacial da proteína.

VOUTISINAS et al. (1983) relataram que a capacidade emulsificante está mais relacionada com a hidrofobicidade da superfície das moléculas, do que com a solubilidade, sendo que proteínas mais hidrofóbicas causam maior decréscimo na tensão interfacial, melhorando as propriedades emulsificantes.

Existem evidências de que a hidrofobicidade mostra boa correlação com tensão superficial, tensão interfacial e atividade emulsificante. Um aumento da hidrofobicidade em decorrência da exposição de grupos hidrofóbicos do interior da molécula de proteína, favorece a adsorção na interface, formando um filme coeso interfacial. A hidrofobicidade pode variar em decorrência da exposição de um maior número de resíduos hidrofóbicos da molécula, devido a uma alteração na sua estrutura secundária e terciária, causada por algum tipo de tratamento.(KATO et al., 1983). Outro fator importante é que as propriedades emulsificantes dependem do balanço existente entre os grupos hidrofílicos e lipofílicos da molécula de proteína, isto é, do seu valor de HBL. Segundo AOKI et al. (1981) um leve deslocamento do balanço para um valor mais hidrofóbico pode melhorar sensivelmente as propriedades emulsificantes, entretanto uma exposição excessiva causa uma diminuição nas propriedades de emulsificação.

Os processos de pasteurização térmica e radiação poderiam ter causado modificações conformacionais nas moléculas de proteínas, desfavorecendo o equilíbrio HBL, e diminuindo o IAE em relação à GST.

O índice de EE apresentou valores estatisticamente semelhantes para os tratamentos irradiados e GST, indicando que a radiação não afetou essa propriedade, na gema PT ocorreu um acréscimo desse índice estatisticamente significativo, em relação à GST.

O comportamento de estabilidade de emulsão, encontrado para a gema nos diferentes tratamentos, reflete um resultado muito pontual, isto é somente para essas condições de análise. Na verdade o índice EE é dependente de uma série de fatores em menor ou maior grau. CHUNG e FERRIER (1991) estudando os fatores que afetam as propriedades emulsificantes de fosvitina, encontraram que

a velocidade de batimento foi o fator de maior influência nesse índice, enquanto a concentração de proteína foi o de menor. A fração de óleo, pH e presença de sal foram outros fatores que tiveram efeito sobre EE.

4.3.3 Viscosidade

A viscosidade está relacionada às propriedades mecânicas dos materiais, que vão determinar o tipo de escoamento, quando solicitado por forças externas. É uma medida da deformação de camadas de um fluido, movendo-se laminarmente, quando submetido à ação de uma força aplicada tangencialmente (tensão de cisalhamento). A viscosidade é estudada pela relação entre a tensão de cisalhamento e taxa de deformação. (RAO, 1986)

Para efeito de comparação, por meio de um reômetro, foi medida a viscosidade em diferentes taxas de deformação, de amostras de gemas irradiadas, pasteurizada termicamente e sem tratamento. A partir do valor médio de duplicatas de 3 lotes para cada tratamento, foram construídas curvas de viscosidade em função de taxa de deformação, as quais podem ser vista na FIGURA 18

Observa-se que a viscosidade não se apresentou constante para as diferentes taxas de deformação, indicando o comportamento de fluido não newtoniano, e neste caso a viscosidade é denominada de viscosidade aparente (η_a). Para fluidos não newtonianos (pseudoplásticos e dilatantes) é bastante utilizado o modelo de Ostwald-De-waele, também conhecido pela Lei-da-Potência a 2 parâmetros, para descrever o comportamento desses fluidos.

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad \text{(Equação 11)}$$

onde:

$\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação(1/s)

τ é a tensão de cisalhamento

K é o índice de consistência

n é o índice de comportamento do fluido

Considerando a viscosidade aparente expressa por:

$$\eta_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{(Equação 12)}$$

e substituindo a Equação 11 em 12, a viscosidade aparente é expressa por:

$$\eta_a = K \dot{\gamma}^{n-1} \quad \text{(Equação 13)}$$

Pela Equação 13 observa-se que, para valores de $n < 1$ a viscosidade aparente (η_a) decresce com o aumento do gradiente de velocidade, caracterizando o fluido pseudoplástico, enquanto que no caso inverso, $n > 1$, é descrito o comportamento dos fluidos dilatantes.

O modelo de Ostwald-De-Waele foi ajustado aos dados, e os parâmetros K e n foram estimados pelo método da secante ou DUD (RASTON & JENNRICH, 1978) para minimização não linear da soma de quadrados do erro com a utilização do PROC NLIN (SAS, 1986). A adequação do modelo foi baseada na análise de resíduos (diferença entre viscosidade aparente (η_a) observada e estimada, em cada taxa de deformação) (DRAPER, 1980).

As estimativas dos parâmetros K e n do modelo de Ostwald-De-Waele para as gemas sob diferentes tratamentos se encontram na TABELA 17.

Observa-se que os parâmetros n, para todos os tratamentos são menores, porém próximos de 1, confirmando um fluido ligeiramente pseudoplástico. Isso pode ser observado também na FIGURA 17, onde a relação de tensão de cisalhamento e taxa de deformação é representada praticamente por uma reta, (característica de fluido newtoniano). O parâmetro K, índice de consistência aumenta para todos os tratamentos irradiados em relação à GST, para a gema PT esse aumento é bem mais pronunciado.

TABELA 17. Estimativa dos parâmetros K_H ; n_H e erro padrão assintótico em nível de probabilidade de 95% para o modelo de Ostwald-De-Walle

Tratamento	Parâmetros	Estimativa	Erro padrão assintótico
PT	K_H	300,31	7,88
	n_H	0,89	0,01
GST	K_H	121,39	8,95
	n_H	0,93	0,02
Ir2,5 kGy	K_H	143,86	2,89
	n_H	0,92	0,00
Ir3,5kGy	K_H	144,95	6,32
	n_H	0,92	0,01
Ir4,5kGy	K_H	160,15	10,86
	n_H	0,91	0,02

A viscosidade aparente das gemas tratadas com radiação aumentou ligeiramente com a dose de radiação em relação à GST. Para uma taxa de deformação de 200 s^{-1} , apresentou valores aproximados de 94, 96, 99 e 84cP para os tratamentos 2,5 kGy, 3,5 KGy , 4,5 kGy e GST respectivamente (FIGURA 18). A gema PT apresentou um valor de viscosidade aparente de 168 cP, duas vezes maior que GST, indicando que a pasteurização térmica induziu uma modificação nas estruturas (partículas) do fluido bem maior do que a radiação.

Em um estudo de reologia de produtos de ovos, utilizando um reômetro Carrimed (cilindros concêntricos) CSL, OHATA (2000) relatou valores de 170 cP para gema pasteurizada a uma taxa de deformação de 200 s^{-1} , e o comportamento do fluido foi ligeiramente pseudoplástico. Esse resultado está de acordo com os do presente trabalho.

LEPKI (1998) estudou efeito de radiação na viscosidade de produtos de ovos. Utilizou um reômetro Brookfield D III, spindle SC4-31 e mediu a viscosidade aparente à uma tensão de cisalhamento de $12,5 \text{ dinas/cm}^2$. Obserbou um aumento da viscodidade de gema com o aumento da dose. Para uma temperatura

de 25°C o aumento da viscosidade da gema tratada com 4 kGy foi de 26,7 % em relação à gema sem irradiação.

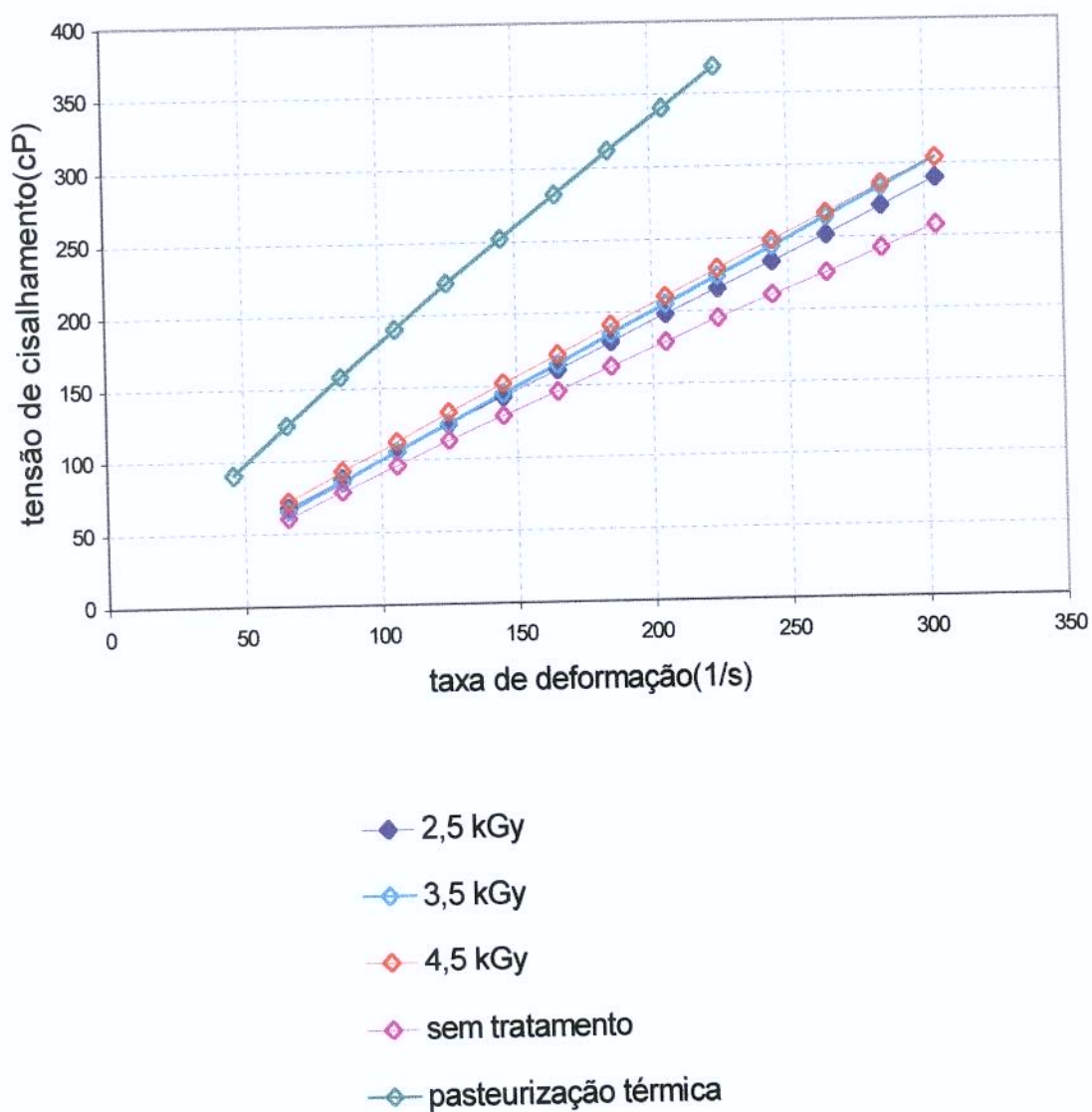


FIGURA 17. Relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação da gema líquida sem tratamento, pasteurizada termicamente e, irradiadas com 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5 kGy.

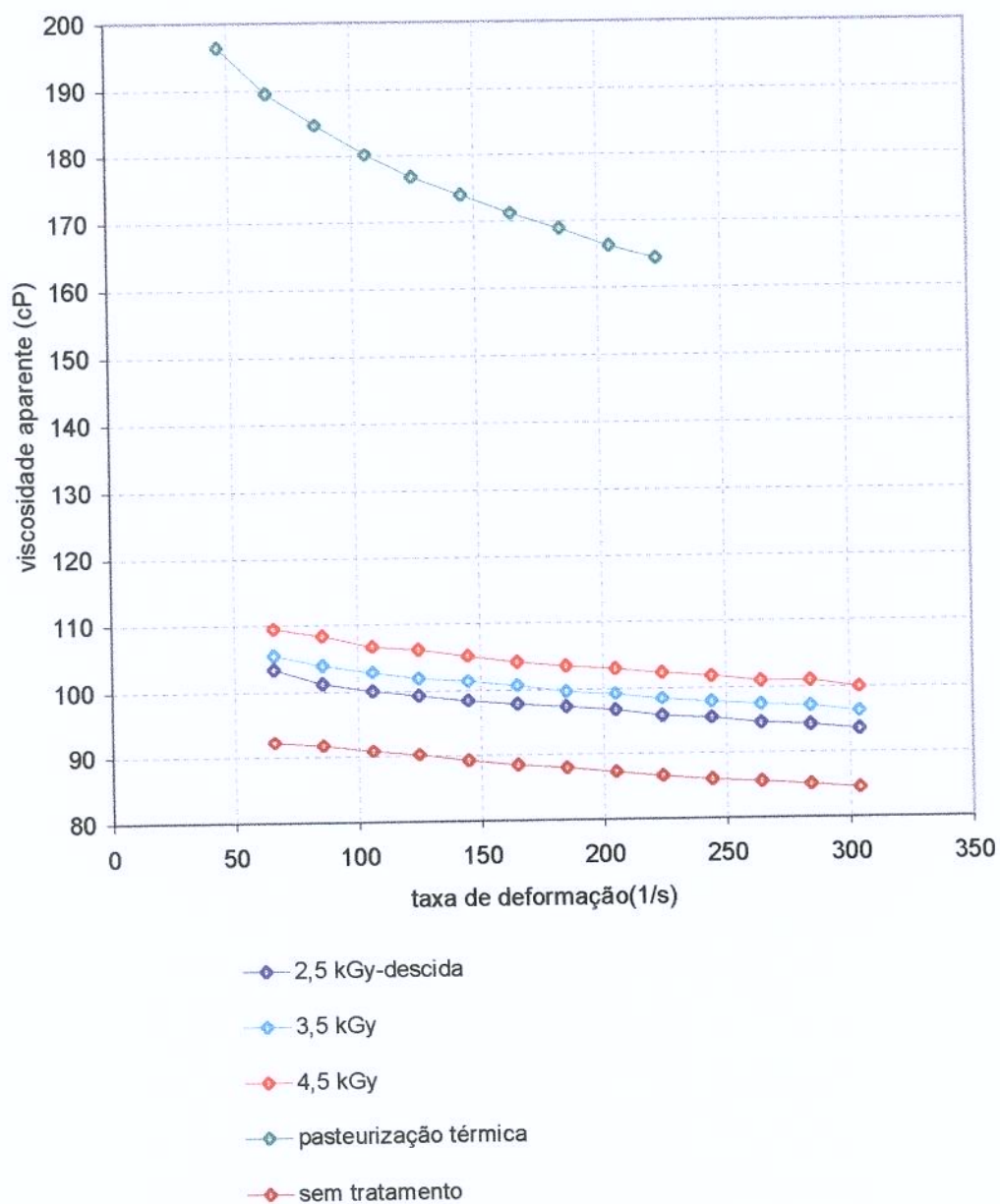


FIGURA 18. Relação entre a viscosidade aparente e a taxa de deformação da gema líquida sem tratamento, pasteurizada termicamente e, irradiadas com 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5 kGy.

Possivelmente ocorreram alterações nas estruturas conformacionais das proteínas, modificando sua forma, sua flexibilidade e hidrofobicidade, favorecendo a formação de agregados, e um aumento da viscosidade. Por outro lado a solubilidade protéica não sofreu alteração em relação à GST. É possível que os grânulos (insolúveis) tenham sofrido modificações, provocando uma certa ruptura, e conseqüentemente a liberação de proteínas, contribuindo para aumentar a solubilidade protéica, e assim manter um mesmo nível de solubilidade. ANTON et al. (2000) observaram um grande incremento na solubilidade protéica de uma solução de grânulos rompidos (94%) em comparação com solução controle de grânulos nativos (24%). Um aumento da viscosidade aparente de solução de grânulos nativos de gema de ovo, sem mudar a solubilidade protéica, quando submetidos a aquecimento, também foi observado. Os autores sugeriram que as proteínas solúveis foram parcialmente desnaturadas, expondo seus sítios hidrofóbicos e causando agregações com grânulos nativos através de interações hidrofóbicas.

O sistema gema é muito complexo, e seus mecanismos de desnaturação ou agregação de proteínas são ainda desconhecidos, porém a partir dos resultados de viscosidade percebe-se uma intensa modificação provocada pela pasteurização térmica, enquanto as amostras tratadas por radiação tiveram uma ligeira variação com a dose de radiação.

4.3.4. DSC

A técnica de calorimetria diferencial de varredura é geralmente empregada para monitorar comportamento térmico de proteína, onde são registrados os processos térmicos que ocorrem com as moléculas, durante uma varredura de temperatura.

As curvas, ou termogramas obtidos para as gemas sob os diferentes tratamentos se encontram na FIGURA 19. Observa-se que o pico de temperatura de desnaturação (T_d) para as gemas representativas dos 5 tratamentos apresentou uma pequena variação que pode ser considerada desprezível. Tratando-se de uma matriz complexa, composta de diferentes proteínas, a T_d

representa apenas uma temperatura média, os picos formados são relativamente largos, refletindo vários tipos de proteínas presentes na matriz, iniciando os processos em torno de 60 a 66°C e finalizando em 93°C aproximadamente. Para todos os tratamentos a T_d ficou em torno de 82°C. Valores de T_d de 84 e 85°C foram encontrados para gema irradiada (2,5kGy) e gema não processada respectivamente (HUANG et al. 1997). Para fosvitina a T_d ficou em torno de 80°C (CHUNG & FERRIER, 1995). MINE (1997) encontrou valores de T_d de 77°C para LBD.

Observa-se pelos termogramas (FIGURA 19), que com o aumento de dose de radiação, ocorreu uma diminuição da quantidade de energia necessária (ΔH) para desnaturar um grama desse complexo protéico (gema). Isto indica que a radiação pode estar induzindo uma modificação na conformação da estrutura das proteínas ocasionando, possivelmente, menor número de interações para serem rompidas. A dose de 2,5 kGy não apresenta evidências de alteração nas suas estruturas em relação à GST, pois os valores de ΔH são iguais (1,61J/g). MINE (1997) relatou valores de ΔH de 1,25J/g para LBD de gema de ovo.

Os resultados indicam que houve uma modificação das estruturas protéicas, e o tipo de modificação parece ser diferente daquela induzida pela pasteurização, uma vez que neste caso o ΔH aumentou em relação à GST indicando que a gema PT sofreu um rearranjo das suas estruturas, provavelmente favorecendo um maior número de interações do tipo hidrofóbica, eletrostática e ponte de hidrogênio entre as moléculas (MINE, 1997).

As estruturas das proteínas, tanto do plasma quanto dos grânulos são micelas que podem sofrer modificações expondo diferentes sítios, permitindo interações entre moléculas de diferentes micelas. A formação de complexos firmes pode levar a um incremento da estabilidade térmica, apontada por um aumento de ΔH .

Essa observação é consistente com o comportamento reológico, que apresentou aumento de viscosidade para a gema PT, indicando mudança conformacional com prováveis interações entre as moléculas.

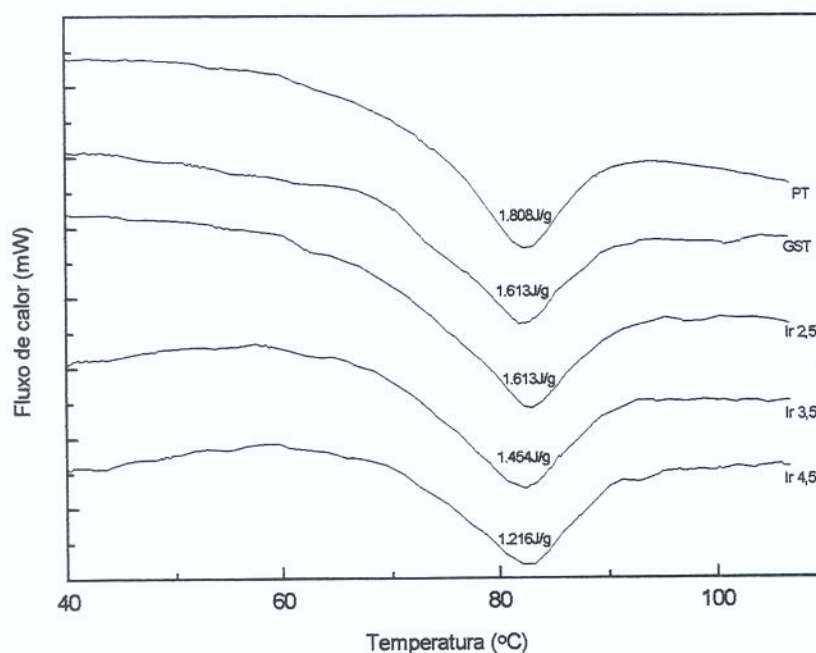


FIGURA 19. Termograma de gema líquida pasteurizada termicamente (PT) e irradiada com diferentes doses.

4.3.5. COR

A cor é uma característica importante para gema de ovo. Sua coloração de amarelo intenso, é requerida em algumas preparações como maionese, massas, etc. Os pigmentos responsáveis pela cor da gema são os carotenóides, representados principalmente pela luteína, zeaxantina e criptoxantina.

A cor da gema foi determinada por meio instrumental (Color Quest II da Hunter Lab), onde três componentes da cor "L", "a" , "b") foram medidos. Onde:

L corresponde a luminosidade

a corresponde ao vermelho (+) e verde (-)

b corresponde ao amarelo (+) e azul (-)

A partir dos componentes a e b foi calculada a diferença de cromaticidade (ΔC). A cromaticidade representa a intensidade da parte cromática da cor, dada pela equação 13.

$$\Delta C = ((\Delta a)^2 + (\Delta b)^2)^{1/2}$$

Equação 13

onde:

$$\Delta a = a_i - a_{\text{padão}} \quad \text{e} \quad \Delta b = b_i - b_{\text{padão}}$$

A análise de cada componente de cor foi observada em três lotes de gema por tratamento, e para cada lote, três repetições foram realizadas, a variável considerada para análise foi a média por lote. Os valores encontrados para os componentes da cor e a diferença de cromaticidade podem ser visto na TABELA 18.

Os valores de luminosidade variam de 0 (preto) até 100 (branco), assim, um aumento no valor de luminosidade representa cores mais claras, no caso da gema, o efeito é uma perda ou clareamento do amarelo intenso.

TABELA 18. Valores de cor "L", "a", "b" e diferença de cromaticidade em relação à GST para os diferentes tratamentos e o resultado do teste SNK

Tratamento	L	a	b	ΔC
GST	64,77 ± 0,30 ^a	11,97 ± 0,07 ^a	53,37 ± 0,27 ^a	-
PT	64,82 ± 0,31 ^a	11,84 ± 0,05 ^a	53,13 ± 0,06 ^b	0,37 ± 0,05 ^a
Ir2,5	65,35 ± 0,09 ^b	10,13 ± 0,06 ^b	50,98 ± 0,04 ^c	3,02 ± 0,06 ^b
Ir3,5	65,34 ± 0,48 ^b	9,40 ± 0,27 ^c	50,14 ± 0,39 ^d	4,13 ± 0,43 ^c
Ir4,5	65,82 ± 0,26 ^c	8,78 ± 0,18 ^d	48,84 ± 0,24 ^e	5,54 ± 0,27 ^d

a b c d : médias com as mesmas letras não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Para o parâmetro luminosidade a GST e gema PT não apresentaram diferença significativa entre si. Os tratamentos irradiados tiveram o valor de L aumentado, repercutindo em amostras mais claras. A gema Ir2,5 kGy não diferiu estatisticamente da gema Ir3,5 kGy. O tratamento com maior dose de radiação, 4,5 kGy, apresentou a amostra mais clara e significativamente diferente dos demais tratamentos.

Para o parâmetro "a" percebe-se a mesma tendência, isto é, a GST não difere significativamente da gema PT. Enquanto que, para os tratamentos com radiação o valor de "a" diminuiu, representando perdas da cor vermelha, sendo que a perda foi significativamente progressiva com a dose de radiação. Os tratamentos irradiados diferem da GST e gema PT.

Os valores encontrados para o componente "b" representam o amarelo dentro do sólido de cor, e uma diminuição do seu valor significa perda de cor amarela. Todos os tratamentos apresentaram valores de "b", significativamente menores em relação à GST, indicando perda da cor amarela. A perda do amarelo na gema PT, embora significativa, foi bem menor do que nas amostras irradiadas, que apresentaram perdas progressivas com a dose.

A cromaticidade (C) representa a somatória do croma, isto é, das cores amarelo e vermelho, e diferença de cromaticidade (ΔC) representa a diferença desse índice de uma dada amostra em relação à amostra padrão ou referência, no caso a GST (equação 13).

Para esse índice, a gema PT apresentou um valor de 0,37, apontando pequena diferença em relação à GST, enquanto as gemas irradiadas apresentaram valores maiores, de 3,02; 4,13; 5,54 para gema Ir2,5, Ir 3,5 e Ir4,5 respectivamente, confirmando maior perda dos pigmentos nos tratamentos com irradiação, sendo que o efeito foi maior quanto maior a dose de radiação. O efeito dos tratamentos sobre a cor das gemas pode ser bem visualizado na FIGURA 20.

A estrutura molecular dos carotenóides, contém duplas ligações, as quais são consideradas sítios facilmente oxidáveis. De fato, os carotenóides reagem, com o oxigênio "singlet", suprimindo-o e se oxidando em seguida. Outros fatores também causam a oxidação desses compostos como tratamento térmico severo, presença de luz, extrusão, tratamento com ácido, radiação (von ELBE & SCHAWARTZ, 1996; MA et al., 1990)

HYANG et al. (1997) avaliaram a cor de gema irradiada congelada por 60 dias de armazenamento e relatou que a radiação provocou uma descoloração das gemas. Os autores sugerem que a descoloração foi devido a destruição dos carotenóides pela irradiação.

KATUZIN-RAZEM et al. (1992) estudaram o efeito de taxa de dose, dose de radiação e presença ou ausência de oxigênio, no conteúdo de carotenóides de gema em pó. A perda de carotenóides aumentou linearmente com o aumento da dose em amostras irradiadas mesmo sob vácuo, o que levou os autores a concluírem que o oxigênio não é essencial para a destruição de carotenóides submetidos à irradiação, isso mostra que esses compostos podem ser oxidados por radicais livres.

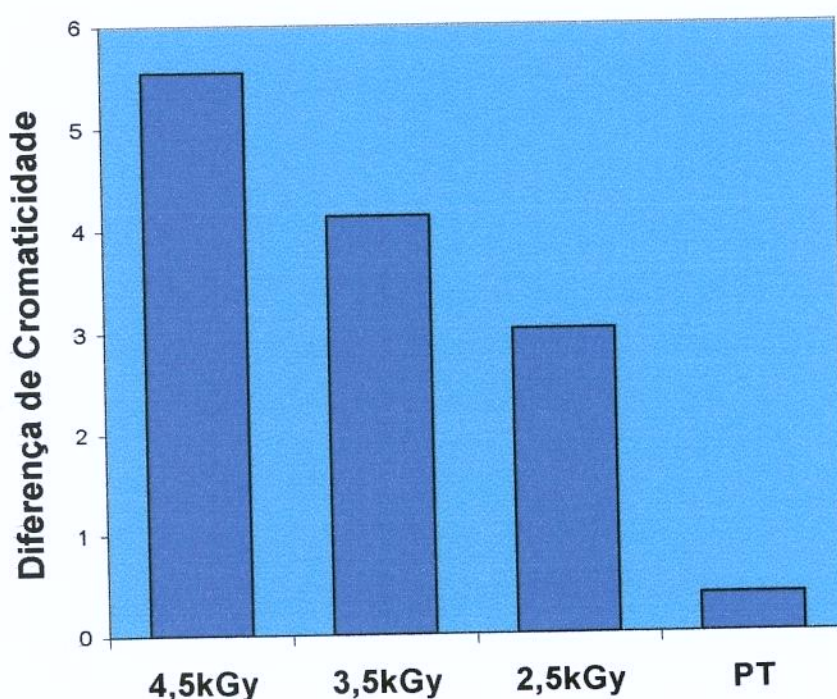


FIGURA 20. Diferença de cromaticidade de gema irradiada e pasteurizada termicamente em relação à GST

4.3.6. Análise Sensorial da gema

Comparou-se as médias das notas dadas ao odor e cor dos diferentes tratamentos em relação à uma gema controle (gema PT) por meio do teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

O resultado das médias dos provadores para os atributos cor e odor e o resultado do teste de Dunnett, podem ser vistos na TABELA 19.

Para o atributo odor, a nota média de cada tratamento diferiu estatisticamente da nota média da gema controle (PT). A nota média de odor da gema Ir2,5 (2,26) foi a que mais se aproximou do controle (1,30). As amostras Ir3,5 e Ir4,5 apresentaram valores de média maiores 5,81 e 6,14. Observa-se portanto um aumento de média com o aumento de dose de radiação, porém não em uma relação linear.

TABELA 19. Média dos atributos odor e cor de análise sensorial e resultado de teste de Dunnett para gemas irradiadas e pasteurizada termicamente

Tratamento	Média dos provadores		Diferença entre médias (Dunnett)	
	Odor	Cor	Odor	Cor
PT	1,30	1,07	0	0
Ir2,5	2,26	1,72	0,95***	0,65
Ir3,5	5,81	3,47	4,51***	2,39***
Ir4,5	6,14	4,28	4,84***	3,21***

*** comparações significativas ao nível de 5%.
DMS para odor = 0,69; DMS para cor = 0,71

Pela avaliação dos provadores, existe uma diferença significativa entre as amostras em termos de odor, e esta diferença reflete a presença de odores estranhos não característicos de gema de ovo. A diferença encontrada para o tratamento Ir2,5 é de apenas 1 ponto aproximadamente, indicando que esse nível

de dose não causa modificações intensas como no caso de maiores níveis de dose, as quais apresentaram valores de diferença de odor em relação à PT de 4,5 e 4,8 pontos respectivamente. Observa-se um incremento de "off flavor" com o aumento da dose de radiação, esse efeito torna-se mais agudo a partir da dose 3,5 kGy.

GRIM & GOLDBLITH (1965) empregaram análise sensorial (teste triangular) para estudar o efeito da produção de "off flavor" em ovo integral líquido, submetido à irradiação sob diferentes temperaturas. Os autores relataram que a dose limite (threshold), a partir da qual se observa efeito significativo da irradiação na formação de "off flavor" foi de 1,98 kGy ($p < 0,05$) podendo variar dentro de uma faixa de 1,74 a 2,32 kGy. Não encontraram diferença significativa nas doses limites para as diferentes temperaturas de irradiação.

Os autores concluíram que a diferença no odor, aumenta com o aumento da dose de radiação e acima de 3,0 kGy o incremento é mais acentuado fugindo de um comportamento linear. Esses resultados estão de acordo com os do presente trabalho, embora se reportem a diferentes matrizes (ovo integral e gema).

No atributo cor foi encontrado uma diferença estatisticamente significativa para os tratamentos Ir3,5 e Ir4,5 em relação à gema PT, cabendo a cor da gema Ir2,5 a semelhança estatística com a amostra controle PT (TABELA 19). Os valores da diferença em relação à PT aumentaram com o aumento da dose, embora um aumento mais efetivo tenha ocorrido a partir da dose 3,5 kGy.

Entre os dois atributos avaliados, cor e odor, este último parece ter sido mais afetado pela irradiação, pois, utilizando a mesma escala (de oito pontos, com a referência igual ao padrão fixada em zero) observa-se que a cor obteve notas mais próximas do padrão, enquanto o odor obteve médias mais distantes do padrão.

A cor da gema avaliada por meio de equipamento apresentou diferença significativa entre as amostras PT e Ir2,5, enquanto que, na avaliação pelos provadores não se encontrou diferença entre essas amostras. Ocorre que a gema é um produto bastante homogêneo e os dados obtidos na leitura do equipamento

apresentaram excelente reprodutibilidade com pequenas variações, dessa forma pequenas diferenças entre os valores médios podem representar diferenças estatisticamente significativas entre as amostras.

4.3.7. Maionese elaborada com gema irradiada e gema pasteurizada termicamente

Foram elaboradas maionese com a gema sob os diferentes tratamentos conforme formulação descrita anteriormente, e estas foram analisadas quanto a estabilidade, consistência e análise sensorial.

4.3.7.1. Estabilidade

A estabilidade da emulsão é medida comumente em termos da quantidade de óleo e ou creme que separa da emulsão durante um certo período de tempo, a uma dada temperatura e força gravitacional.

O cremeamento envolve a separação de parte da fase contínua de uma fase rica em óleo que ainda está bem emulsionada. O resultado é a formação de um gradiente de concentração de gotículas na emulsão. A floculação é o resultado da união de glóbulos, originando aglomerados sem coalescência de gotículas individuais. É um processo de difusão controlada. A drenagem prosseguirá até que o equilíbrio seja quebrado, ou até que o filme se rompa, ocasionando a coalescência com a nítida separação da fase oleosa.

A estabilidade de maionese elaborada com gema submetida a diferentes tratamentos, foi avaliada por meio de duas metodologias.

Os resultados obtidos referentes à metodologia sugerida por Lieu et al. (1971), do nosso ponto de vista, não puderam ser mensuráveis. A separação de óleo (fase líquida) da maionese, após a centrifugação foi muito pequena. Essa quantidade de óleo formava uma fina camada e se encontrava aderida a superfície irregular da maionese, penetrada em interstícios. A recuperação dessa fase líquida de óleo para posterior pesagem, provavelmente incorreria em erros

possivelmente maiores do que as tênues diferenças observadas visualmente. Dessa forma os resultados se restringiram a observações visuais.

Quanto à temperatura de estocagem as maioneses que permaneceram a 42°C apresentaram quebra de emulsão, confirmada por uma fina camada de óleo na superfície da maionese. Além da desestabilização por coalescência, foi observado também um cremeamento, ou seja, uma migração de glóbulos de óleo para a superfície, formando um gradiente de coloração amarelo mais intenso e levemente translúcido na superfície para um amarelo mais claro e opaco em direção oposta.

Quanto aos tratamentos não foi possível observar diferenças entre eles.

Lieu et al. (1978) elaboraram maionese com gema em pó estocada por 3 meses à temperaturas de 1,7; 12,8; 23,9 e 35 °C, após centrifugação a quantidade de óleo separada foi de 0,04; 0,04; 0,04; 0,2g de óleo/5g de maionese, os autores constataram um marcante decréscimo na estabilidade da maionese feita com gema estocada a 35°C, porém não esclarecendo os possíveis fatores para esse comportamento.

Nas maioneses estocadas a 25°C nenhuma variação entre os tratamentos foi observada, somente um gradiente de cremeamento foi formado nos tubos após centrifugação, não houve a separação de óleo na fase líquida.

Em estocagem a 4°C pôde ser observada alguma variação entre os tratamentos. A maionese preparada com gema PT apresentou uma fina camada de óleo (aproximadamente 1 mm de espessura) e a formação de um gradiente de cremeamento.

Na maionese com gema Ir3,5 e Ir4,5 não foi observada a separação de óleo, somente um leve gradiente.

À temperatura de 4°C a maionese com gema PT parece apontar para uma perda de estabilidade em relação às gemas irradiadas. Principalmente as maioneses preparadas com gema Ir3,5 e Ir4,5 as quais parecem ser mais estáveis frente à temperatura de estocagem e condição de centrifugação.

Na análise de estabilidade de emulsão feita com gemas sob diferentes tratamentos, cujos resultados estão descritos no item 2.3.5, a gema PT apresentou uma pequena vantagem em relação às gemas irradiadas e GST, ao contrário da presente condição, em que a gema PT pareceu indicar uma perda de estabilidade.

No entanto há que se considerar que na maionese o meio em que ocorre a emulsão é muito diferenciado daquele anterior, a começar pelo pH, em torno de 6,5, enquanto que na maionese é de 4,0, a fração de óleo adicionada é maior (75%) e existe ainda a presença de aditivos como sal e açúcar, tem-se que mencionar ainda as condições de preparo, ou melhor a forma e quantidade do aporte energético empregado para a produção da emulsão. A própria metodologia empregada para avaliar a estabilidade nas duas situações também foram diferentes.

4.3.7.2. Consistência

Este atributo está relacionado com a textura de um produto. Esse termo é comumente empregado para produtos como purês, molhos, sucos, xaropes e geleias. A consistência da maionese foi avaliada através da força necessária para uma sonda ("probe" - cilindro de 2,5 cm de diâmetro) penetrar 12 mm em um pote contendo maionese. Os resultados observados (média de 7 repetições) assim como a comparação das médias obtidas através do teste SNK podem ser vistos na TABELA 20.

TABELA 20. Consistência de maionese elaborada com diferentes gemas

Tratamento	Força de penetração (g)
PT	64,54 ± 2,12 c
Ir2,5	96,94 ± 9,42 a
Ir3,5	72,65 ± 1,39 b
Ir4,5	64,28 ± 3,32 c

Pelo teste de amplitudes múltiplas SNK evidencia-se que a média da força de penetração da sonda, para maionese com gema irradiada, diminuiu significativamente com o aumento da dose de radiação, significando produtos menos consistentes. A maionese elaborada com gema PT apresentou menor consistência e semelhante à maionese com gema irradiada à uma dose de 4,5 kGy.

Menores doses de radiação parecem contribuir de alguma forma para maior consistência da maionese.

Resultados semelhantes foram relatados por Ma et al. (1993). Maionese feita com gemas irradiadas e congeladas apresentaram valores de 0,150; 0,187; 0,167; 0,150 e 0,153 N, respectivamente para as doses de 0, 1, 2,5, 4 kGy e pasteurizada termicamente. É interessante notar, que nesse trabalho os autores, avaliaram a maionese com dose zero, por isso é possível constatar que a radiação a baixos níveis de dose, contribuiu para aumentar a firmeza da maionese. Nas maioneses preparadas com gema pasteurizada termicamente e irradiada com 4,5 kGy não ocorreram mudanças significativas em relação à maionese preparada com gema com dose zero.

4.3.7.3. Análise Sensorial de maionese

Foram analisados os atributos cor, odor e sabor , em dois tempos distintos, logo após processamento e com 95 dias. Conforme informação de indústria processadora de maionese³, este produto chega à mesa do consumidor, em média com 3 a 4 meses da data de fabricação. Baseado nessa informação, determinou-se fazer uma segunda análise sensorial da maionese dentro desse período.

Nos dois períodos analisados, as maioneses foram avaliadas por uma equipe de 50 provadores.

³ Refinações de Milho Brasil

O resultado das médias encontradas para os atributos analisados juntamente com o resultado do teste de DUNNETT ao nível de 5% de significância estão apresentados na TABELA 21.

Os resultados de cada período, mostram que a maionese Ir2,5 foi a que mais se aproximou da maionese padrão (PT), em relação aos atributos avaliados, não havendo diferença significativa entre suas médias. As maioneses Ir3,5 e Ir4,5 distinguiram das demais significativamente, somente no atributo cor e não diferiram entre si. Nos atributos odor e sabor, embora as médias tenham apresentado valores ligeiramente maiores para as maioneses Ir3,5 e Ir4,5, não foi observada diferença significativa entre as quatro maioneses. Não houve grande variação na intensidade dos atributos quando comparados entre os períodos.

TABELA 21. Médias obtidas nas avaliações sensoriais de maionese em dois períodos de estocagem.

Maionese	5 dias			95 dias		
	cor	Odor	sabor	cor	odor	Sabor
PT	1,9	3,0	2,8	1,0	3,2	3,0
Ir2,5	2,5	3,2	2,8	1,5	3,2	3,1
Ir3,5	4,4***	3,4	2,9	3,3***	3,8	3,9
Ir4,5	4,3***	2,9	3,0	3,4***	4,0	3,7

*** indicam diferença significativa em relação ao padrão

Embora as gemas líquidas irradiadas tenham apresentado diferença significativa de odor como resultado da análise sensorial, essa diferença já não é detectada quando as gemas são empregadas na preparação de maionese.

4.4. EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA ASSOCIADA AO EMPREGO DE ANTIOXIDANTE NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DA FRAÇÃO LIPÍDICA DE GEMA LÍQUIDA

De acordo com resultados de análise sensorial de cor e odor de gema irradiada, encontrados no experimento descrito anteriormente, a radiação provocou uma perda de cor e formação de odores estranhos estatisticamente significativos, nos níveis de doses avaliados. Neste sentido a radiação associada ao emprego de antioxidante poderia prevenir esses efeitos, assim como evitar um possível processo de oxidação da fração lipídica da gema provocado pela radiação.

As doses de radiação empregadas neste estudo foram 3,5 e 4,5 kGy, uma vez que a dose de 2,5 kGy não apresentou diferença significativa na cor (análise sensorial), e quanto ao odor, sua diferença quando comparada com gema controle foi muito pequena.

Dois tipos de antioxidantes foram empregados, um natural (mistura de tocoferóis) e outro sintético (TBHQ), nas concentrações de 300 e 200 µg/g respectivamente,

Os tratamentos avaliados foram os seguintes:

- Gema irradiada com 3,5 kGy sem antioxidante (Ir3,5)
- Gema irradiada com 3,5 kGy com Tocoferol (Ir3,5TC)
- Gema irradiada com 3,5 kGy com TBHQ (Ir3,5TB)
- Gema irradiada com 4,5 kGy sem antioxidante (Ir4,5)
- Gema irradiada com 4,5 kGy com Tocoferol (Ir4,5TC)
- Gema irradiada com 4,5 kGy Com TBHQ (Ir4,5TB)

Como controle ou referência a Gema sem tratamento (GST) isto é, sem aplicação de radiação e sem antioxidante, também foi analisada.

4.4.1. Valor de TBA

Os tratamentos foram analisados quanto ao valor de TBA. Os valores obtidos assim como os resultados do teste de Student Newman Keuls, para avaliar a diferença significativa entre os tratamentos em nível de $p < 5\%$ encontram-se na TABELA 22.

A dose de radiação assim como o antioxidante tiveram efeito significativo nos valores de TBA para os tratamentos avaliados.

No bloco de tratamentos sem antioxidantes (TABELA 22) um aumento na dose de radiação aumentou significativamente o valor de TBA indicando que a radiação provocou oxidação da fração lipídica de gema de ovo proporcionalmente à dose aplicada. KATUZIN-RAZEM et al. (1992) avaliaram o efeito de radiação gama em gema em pó e verificaram que quanto maior a dose maior a formação de hidroperóxidos e a destruição de carotenóides a partir de uma dose de 2,5 kGy.

Nas gemas com antioxidante, a mesma tendência pôde ser observada.

Pelos resultados apresentados, verifica-se um efeito protetor do TBHQ, quando se observam os valores de TBA numa mesma dose, com os diferentes antioxidantes. O efeito protetor do TBHQ apresenta diferença significativa em relação ao tratamento sem antioxidante e com tocoferol, enquanto que o tratamento com tocoferol não difere significativamente da gema sem antioxidante, mostrando baixa ou nenhuma eficiência do tocoferol frente à oxidação por radiação (Experimento 1)

Os resultados do Experimento 2 estão de acordo com os do Experimento 1, apesar das gemas com tocoferol apresentarem uma pequena redução no valor de TBA em relação ao tratamento sem antioxidante (0 dias), indicando um efeito protetor, porém, de menor intensidade quando comparado com o efeito produzido pelo TBHQ. O menor valor de TBA (menor grau de oxidação) ocorreu para tratamento com TBHQ e menor dose de radiação, 3,5 kGy. Esses efeitos podem ser visualizados nos gráficos da FIGURA 21 referente aos experimentos 1 e 2.

KANATT et al. (1998) irradiaram carne de frango (2,5 kGy) com adição de antioxidante BHT e tocoferóis e relataram que o BHT foi mais eficiente em prevenir oxidação do que o tocoferol, embora os dois tenham apresentado efeito significativo. Os valores de TBA variaram de 0,30 a 2,09 para amostras irradiadas com BHT e de 0,38 a 2,60 para as carnes com tocoferol, durante um período de 4 semanas. Paralelamente uma análise sensorial foi conduzida e as carnes foram aceitas para consumo durante as 4 semanas.

TABELA 22. Valores de TBA das amostras de gema líquida irradiadas em função de dose de radiação, antioxidante e tempo de estocagem com resultados do teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

Experimento 1						
Tratamento	TBA* (mg de malonaldeído/kg de gema)					
	1 dia			20 dias		
	Sem antiox.	TC	TB	Sem antiox.	TC	TB
GST	0,03 c			0,03 c		
Ir3,5	(a) 0,69 b	(a) 0,67 b	(b) 0,43 b	(a) 0,64 b	(a) 0,65 b	(b) 0,35 b
Ir4,5	(a) 0,89 a	(a) 0,86 a	(b) 0,47 a	(a) 0,69 a	(a) 0,72 a	(b) 0,45 a
Experimento 2						
Tratamento	TBA* (mg de malonaldeído/kg de gema)					
	1 dia			20 dias		
	Sem antiox.	TC	TB	Sem antiox.	TC	TB
GST	0,02 c			0,03 c		
Ir3,5	(a) 0,77 b	(b) 0,70 a	(c) 0,37 b	(a) 0,50 b	(a) 0,49 b	(b) 0,35 a
Ir4,5	(a) 0,83 a	(b) 0,71 a	(c) 0,46 a	(a) 0,69 a	(b) 0,53 a	(c) 0,38 a

* Letras diferentes acima do número (lidas na horizontal) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os antioxidantes para cada período de tempo.
 Letras diferentes à direita do número (lidas na vertical) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as doses de radiação para cada período de tempo.

Em amostras de gema em pó irradiadas (2,5 e 5,0 kGy) com e sem antioxidantes (BHT 0,01µg/g ou Vitamina E 0,01µg/g), DU et al. (1999) encontraram valores de TBA 3 a 5 vezes maiores que as amostras não irradiadas, e a presença de antioxidantes reduziu significativamente os valores de TBA nas amostras irradiadas.

HUBER et al. (1995), citaram que o ascorbil palmitato (230µg/g), tocoferol (230µg/g) e BHA (100µg/g) preveniram significativamente a oxidação de colesterol em gemas em pó armazenadas a 60°C por 28 dias, em relação à amostra controle, (sem os antioxidantes).

Alguns autores relatam que os tocoferóis podem produzir um efeito pró-oxidante em altas concentrações (CILLARD et al., 1980; KASKAS et al., 1984; JUNG & MIN, 1990; CHEN et al. 1998)

Em uma investigação da variação da concentração de α -tocoferol (obtida por meio de dieta de galinhas) na prevenção de oxidação da fração lipídica da gema de ovo, CHEN et al. (1998) concluíram que uma concentração de 75 µg de tocoferol/g de gema exerceu um efeito pró-oxidante. No presente trabalho, a concentração de tocoferóis empregada foi de 300 µg/g calculada com base na quantidade de gordura, o que representou aproximadamente 93 µg de tocoferol/g de gema. É possível que essa concentração tenha ultrapassado a concentração de maior eficiência desse antioxidante, e dessa forma não apresentou efeito protetor.

Em relação ao período de armazenamento, houve uma pequena diminuição nos valores de TBA após um período de 20 dias, indicando que de alguma forma o malonaldeído, produto secundário da oxidação de lipídeos está sendo consumido, pois uma vez formados não há reversão na direção da reação. Segundo MELTON (1983), a formação de malonaldeído não necessariamente continua a aumentar durante a estocagem dos produtos, e até uma diminuição pode ser observada a qual é atribuída às reações do malonaldeído com proteínas,

Uma redução no valor de TBA durante armazenamento foi também observada por Du et al. (1999). Os autores avaliaram o efeito de embalagem e antioxidante (vitamina E e BHT) na oxidação lipídica de gema de ovo em pó

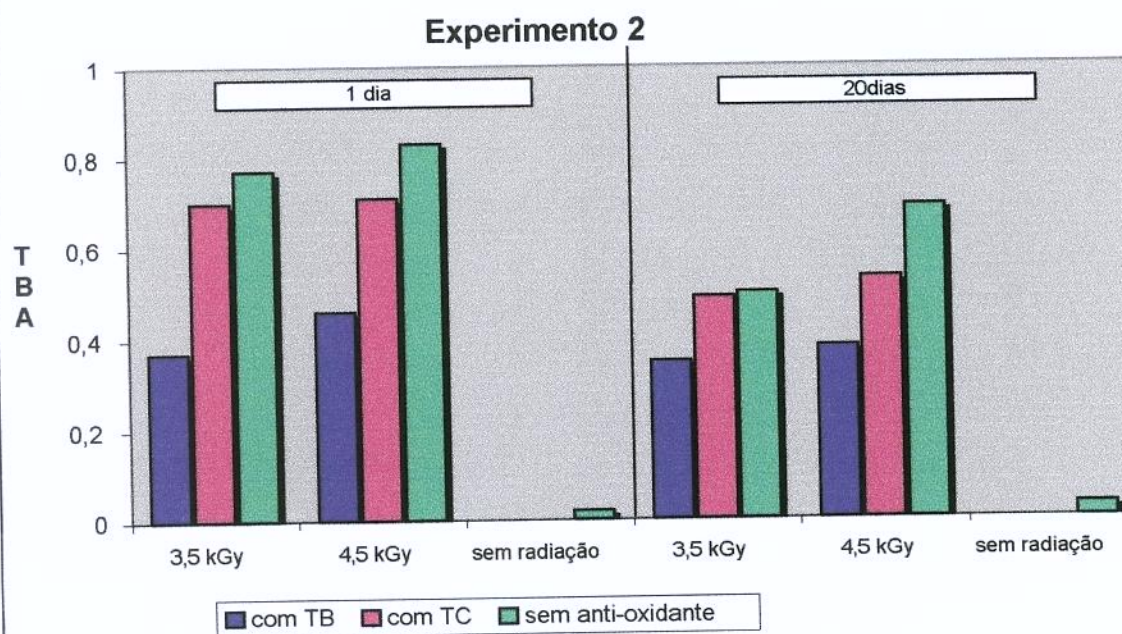
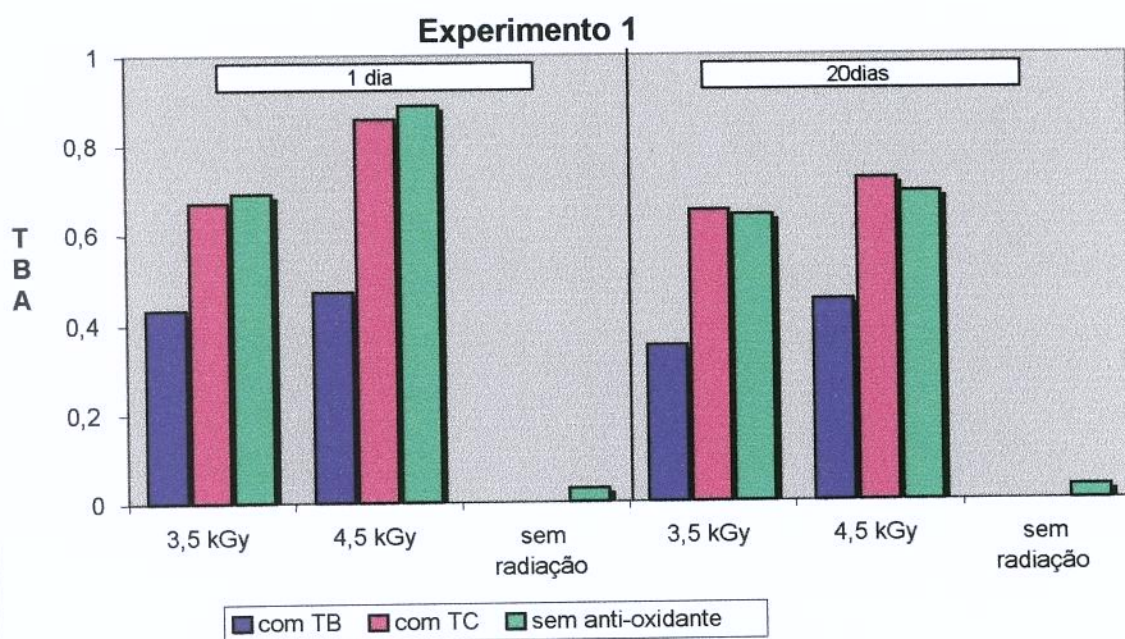


FIGURA 21. Valores de TBA de gema líquida em função de dose de radiação, antioxidante e tempo de armazenamento.

irradiada com 2,5 e 5,0 kGy; os valores de TBA do grupo submetido à irradiação decresceram com 15 dias de armazenamento, enquanto que nas amostras não irradiadas os valores de TBA aumentaram com o tempo de armazenamento. Dessa forma, é possível que a análise de TBA não seja um índice adequado para acompanhamento da oxidação induzida pela radiação durante armazenamento

4.4.2. Extinção específica a 232 nm (E_{232})

A oxidação de ácidos graxos polinsaturados é acompanhada pelo aumento da absorvidade do lipídeo na faixa do espectro ultravioleta. Lipídeos contendo dienos ou polienos apresentam uma alteração na posição de suas duplas ligações durante a oxidação, resultado de isomerização e conjugação. Os dienos conjugados exibem uma intensa absorvidade em 232 nm (SHAHIDI, 1995)

Os tratamentos foram analisados quanto a dienos conjugados e os valores obtidos assim como o resultado da análise estatística podem ser vistos na TABELA 23. Foi aplicado o teste de Student Newman Keuls, para avaliar a diferença significativa entre os tratamentos em nível de $p < 5\%$.

Conforme os resultados da TABELA 23, E_{232} foi maior para os tratamentos irradiados em comparação com gema sem tratamento (GTS), indicando que o processo de irradiação causou oxidação dos lipídeos da gema.

Foi observada diferença significativa dos valores de E_{232} entre as doses de radiação, sendo que maiores doses de radiação provocaram maior nível de oxidação (com exceção dos tratamentos IR4,5 TB para tempo zero nos experimentos 1 e 2).

Os valores de E_{232} para os tratamentos com TBHQ foram significativamente menores que os valores dos tratamentos sem antioxidante e com tocoferol, estes últimos não apresentaram diferença significativa entre si. Novamente, o TBHQ mostrou ser mais efetivo na prevenção da oxidação de lipídeos do que o tocoferol, nas condições dos experimentos, com exceção da dose 3,5 kGy no tempo zero dias do experimento 1. A FIGURA 22 ilustra esses efeitos.

TABELA 23. Valores de extinção específica a 232nm de gema de ovo líquida em função de dose de radiação, antioxidante e tempo de estocagem com resultados do teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls,

Experimento 1						
Tratamento	Extinção específica 232 nm					
	1 dias			20 dias		
	Sem antiox	TC	TB	Sem antiox	TC	TB
GST	1,52 c	-	-	1,51 c	-	-
Ir3,5	(a) 2,28 b	(b) 1,68 b	(c) 1,79 b	(a) 2,19b	(a) 2,23 b	(b) 1,93 b
Ir4,5	(a) 3,31 a	(b) 2,15 a	(c) 1,43 a	(a) 2,32 a	(b) 2,30 a	(c) 1,97 a
Experimento 2						
Tratamento	Extinção específica 232 nm					
	1 dias			20 dias		
	Sem antiox	TC	TB	Sem antiox	TC	TB
GST	1,42 c	-	-	1,37 c	-	-
Ir3,5	(a) 2,28 ab2	(a) 2,25 b	(b) 2,14 a	(a) 2,03 b	(a) 2,03 b	(b) 1,85 b
Ir4,5	(a) 2,34 a	(a) 2,33 a	(b) 2,13 a	(a) 2,42 a	(a) 2,38 a	(b) 2,11 a

* Letras diferentes, (acima do número, lidas na horizontal) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os antioxidantes num mesmo período de tempo.
 Letras diferentes (à direita do número, lidas na vertical) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as doses de radiação num mesmo período de tempo

Após um período de 20 dias de armazenamento alguns tratamentos apresentaram valores significativamente maiores para E_{232} , enquanto outros mantiveram-se constantes e outros ainda apresentaram uma redução significativa no valor, não podendo ser observada tendência desses resultados com o tempo de armazenamento. Os dienos conjugados estão relacionados às alterações primárias da oxidação de lipídeos (SHAHIDI, 1995) portanto após um período de

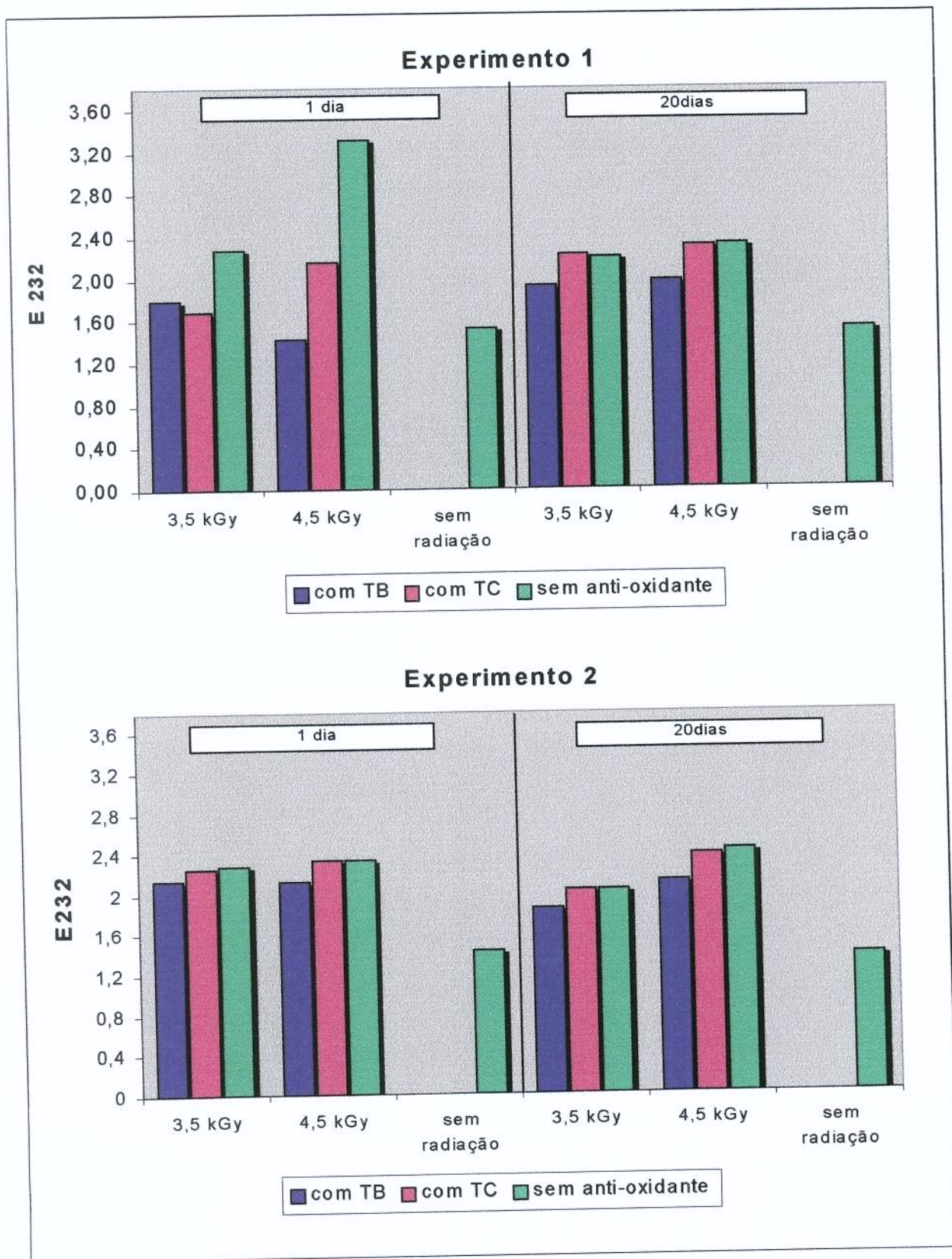


FIGURA 22. Valores de E₂₃₂ de gema de ovo líquida em função de dose de radiação, antioxidante e tempo de armazenamento,

20 dias podem ter ocorrido modificações nesses compostos (reações de formação, degradação, hidrólises) o que explicaria essas variações.

Pela hidrólise de proteínas do plasma da gema (por ação de papaína) combinado com FeCl_3 e EDTA, PIKE & PENG (1988) confirmaram oxidação da fração lipídica por meio de determinação de E_{232} , cujos valores foram da ordem de 0,4 a 1,8. neste trabalho os valores variaram de 1,37 a 3,31(TABELA 23)

De uma maneira geral, a oxidação de gema líquida devido à radiação não parece ter sido extensiva, uma vez que não se observam valores elevados dos índices de oxidação avaliados ,TBA e E_{232} . Os tratamentos irradiados mesmo sem antioxidantes não apresentaram valores muito maiores daqueles encontrados na gema sem tratamento (GST).

PIKE & PENG (1988) estudaram a oxidação da fração gordurosa de gema líquida, devido a desnaturação e hidrólise das proteínas. Pela simples desnaturação das proteínas, provocada pela adição de cloreto de guanidina, os autores detectaram oxidação por meio de determinação de TBA, cujos valores de absorbância a 532 nm (TBA) foram da ordem de 0 a 0,35. No presente trabalho os valores de absorbância a 532 nm não ultrapassaram 0,1

4.4.3. Composição de Ácidos Graxos Polinsaturados

Os cromatogramas resultantes dessas análises contém o perfil dos ácidos graxos presentes na gema, porém nossa análise restringiu-se aos ácidos graxos linolênico (C18:3), araquidônico (C20:4) e DHA (C22:6).

Os resultados relativos aos ácidos graxos polinsaturados dos tratamentos avaliados podem ser vistos na TABELA 24 Os valores encontrados representam uma concentração relativa em %, estimada a partir da somatória das áreas dos picos do cromatograma.

De acordo com os resultados pequenas variações foram encontradas para o ácido linolênico C18:3 apresentando perdas da ordem de 0 até um máximo de 7,9 %. Porém essas variações dentro de cada experimentos num mesmo período não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

Dessa forma tanto a dose de radiação quanto a presença de antioxidante não tiveram efeito significativo na perda de C18:3

TABELA 24. Porcentagem Relativa de Ácidos Graxos Polinsaturados de amostras de gema líquida em função de dose de radiação, antioxidante e tempo de armazenamento (média e desvio padrão de 2 determinações)

Porcentagem Relativa de Ácidos Graxos Polinsaturados *				
Tratamento	R1		R2	
	1 (dia)	20 (dias)	1 (dia)	20 (dias)
C18:3				
GST	4,19 ± 0,01 a	4,25 ± 0,01 a	4,13 ± 0,06 a	4,12 ± 0,06 a
Ir3,5TB	4,25 ± 0,00 a	3,93 ± 0,32 b	4,01 ± 0,04 a	3,93 ± 0,32 a
Ir3,5TC	4,21 ± 0,02 a	4,09 ± 0,14 a	4,10 ± 0,09 a	4,13 ± 0,05 a
Ir3,5	4,14 ± 0,11 a	4,19 ± 0,01 a	4,01 ± 0,06 a	3,86 ± 0,30 a
Ir4,5TB	4,19 ± 0,04 a	4,21 ± 0,04 a	4,03 ± 0,01 a	4,15 ± 0,11 a
Ir4,5TC	4,21 ± 0,02 a	4,19 ± 0,05 a	4,10 ± 0,03 a	4,10 ± 0,06 a
Ir4,5	4,18 ± 0,01 a	4,15 ± 0,04 a	4,03 ± 0,01 a	3,84 ± 0,20 a
C20:4				
GST	1,51 ± 0,02 a	1,59 ± 0,02 a	1,59 ± 0,01 a	1,54 ± 0,10 a
Ir3,5TB	1,50 ± 0,01 a	1,39 ± 0,15 a	1,40 ± 0,19 ab	1,39 ± 0,15 a
Ir3,5TC	1,45 ± 0,04 a	1,42 ± 0,06 a	1,49 ± 0,13 ab	1,36 ± 0,10 a
Ir3,5	1,39 ± 0,13 a	1,47 ± 0,01 a	1,22 ± 0,05 b	1,20 ± 0,08 a
Ir4,5TB	1,48 ± 0,05 a	1,50 ± 0,04 a	1,55 ± 0,02ab	1,39 ± 0,21 a
Ir4,5TC	1,41 ± 0,08 a	1,50 ± 0,01 a	1,53 ± 0,08 ab	1,42 ± 0,18 a
Ir4,5	1,45 ± 0,03 a	1,49 ± 0,01 a	1,30 ± 0,06ab	1,32 ± 0,08 a
C22:6				
GST	1,20 ± 0,04 a	1,23 ± 0,13 a	1,13 ± 0,03 a	1,18 ± 0,23 a
Ir3,5TB	1,15 ± 0,03 a	0,93 ± 0,00 b	0,91 ± 0,01 ab	0,93 ± 0,00 a
Ir3,5TC	1,13 ± 0,16 a	0,97 ± 0,01 b	1,10 ± 0,06 a	0,91 ± 0,10 a
Ir3,5	0,84 ± 0,11 b	1,01 ± 0,08 b	0,98 ± 0,18 ab	0,90 ± 0,01 a
Ir4,5TB	1,12 ± 0,01 a	1,13 ± 0,09 ab	0,90 ± 0,05 ab	1,02 ± 0,10 a
Ir4,5TC	1,01 ± 0,05 ab	1,02 ± 0,08 b	1,06 ± 0,11 ab	1,01 ± 0,02 a
Ir4,5	0,88 ± 0,01 b	1,11 ± 0,03 ab	0,75 ± 0,21 b	0,82 ± 0,03 a

- Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa segundo teste de Student-Newman-Keuls, ao nível de 5% de probabilidade.

O mesmo comportamento pode ser observado para o ácido araquidônico C20:4, que embora tenha acusado perdas maiores do que o C18:3, ainda não foram estatisticamente significativas, com exceção do experimento 2, tempo inicial (zero dias) em que o tratamento Ir3,5 apresentou perda significativa em relação à GST. No entanto o Ir3,5 não difere dos demais tratamentos.

O ácido docosahexaenóico (DHA) C22:6, dentre os três, o mais susceptível à oxidação devido ao seu número de insaturações, apresentou maiores perdas, atingindo cifras da ordem de 33%.

As variações apresentadas foram estatisticamente significativas, com exceção do experimento 2, tempo de 20 dias, onde não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, as variações significativas encontradas não estabelecem uma relação com os fatores estudados (dose de radiação e antioxidante), não podendo ser definida nenhuma tendência. A evidência comum a todas as situações (R1 e R2, com 1 e 20 dias) é que as amostras irradiadas sem antioxidantes apresentaram menores valores de C22:6 em relação à gema sem tratamento (GST) indicando uma perda desse ácido após a irradiação. Estas observações podem ser visualizadas através da FIGURA 23.

Embora os resultados comparativos dos tratamentos avaliados para C22:6 (DHA) apresentem sob o ponto de vista estatístico resultados significativamente diferentes, devemos com cautela verificar como é feita esta avaliação sob o ponto de vista químico.

Na cromatografia gasosa que quantifica ácidos graxos desde C12:0 até C22:6 sob as mesmas condições o pico do DHA elui da coluna com o tempo de 34-36 minutos. Este tempo na avaliação de teores da ordem de 1% do componente resultam em um pico que na verdade aparece como último componente em diferentes formatos. Pode-se visualizar em sua grande maioria a presença de um pequeno ombro e não um pico característico gaussiano (FIGURA 24 e 25). A maneira de calcular a área deste único pico pode ser realizada considerando diversos formatos levando a resultados alterados. Pequenas variações na demarcação da área repercutem em grande diferença, uma vez que se trata de valores da ordem de 1%. Por si só esses valores estão dentro do erro

metodológico, considerado como diferencial sob o ponto de vista estatístico.

A adição de antioxidante em gema líquida, portanto, não teve efeito significativo, na prevenção de oxidação de C22:6 induzido pela radiação.

GUARDIOLA et al. (1997) avaliaram a perda de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) durante a secagem e armazenamento de gema em pó, adicionada de antioxidantes, galato de propila (PG), α -Tocoferol (α -T) juntamente com de Ascorbil Palmitato (AP). PG pareceu levemente efetivo, prevenido perdas de PUFA, enquanto uma combinação de α -T com AP indicou um leve efeito pró-oxidante a 100 e 200 μ g/g.

DU & AHN (2000) relataram perda significativa de PUFA (C18:3, C20:4 e C22:6) em gema em pó irradiada (2,5 e 5,0 kGy). A prévia adição de antioxidante, vitamina E e BHT, não foi eficiente em prevenir as perdas desses ácidos, induzidas pela irradiação. Para as amostras controle os valores de C18:3, C20:4 e C22:6 foram de 2,59%, 4,58% e 2,46%, respectivamente, enquanto que para as amostras após irradiação com 2,5 e 5,0 kGy os valores foram de 2,02, 3,49, 1,96% e 1,55, 3,07, 1,77%, respectivamente.

No presente trabalho, os resultados não apontaram perda significativa dos ácidos C18:3 e C20:4 indicando que a oxidação induzida pela irradiação em gema líquida não teve efeito tão extensivo quanto para gema em pó irradiada.

TERAO et al. (1987) avaliaram a peroxidação em ovo em pó, medindo entre outros parâmetros de oxidação, a perda de ácidos graxos nos fosfolípidos, e concluíram que ovo em pó é altamente oxidado e muito susceptível à oxidação quando comparado com ovo cru (MARSHALL et al. 1994). Este fato está relacionado à estrutura dos fosfolípidos na gema crua que protege contra a oxidação. Os fosfolípidos estão entrelaçados no exterior da estrutura micelar das LBD e essa compacta superfície previne o contato do oxigênio e radicais livres com o centro lipídico da partícula. A secagem por spray-drier leva a uma ruptura dessa estrutura das LBD e consequentemente, a exposição dos lipídeos à oxidação.

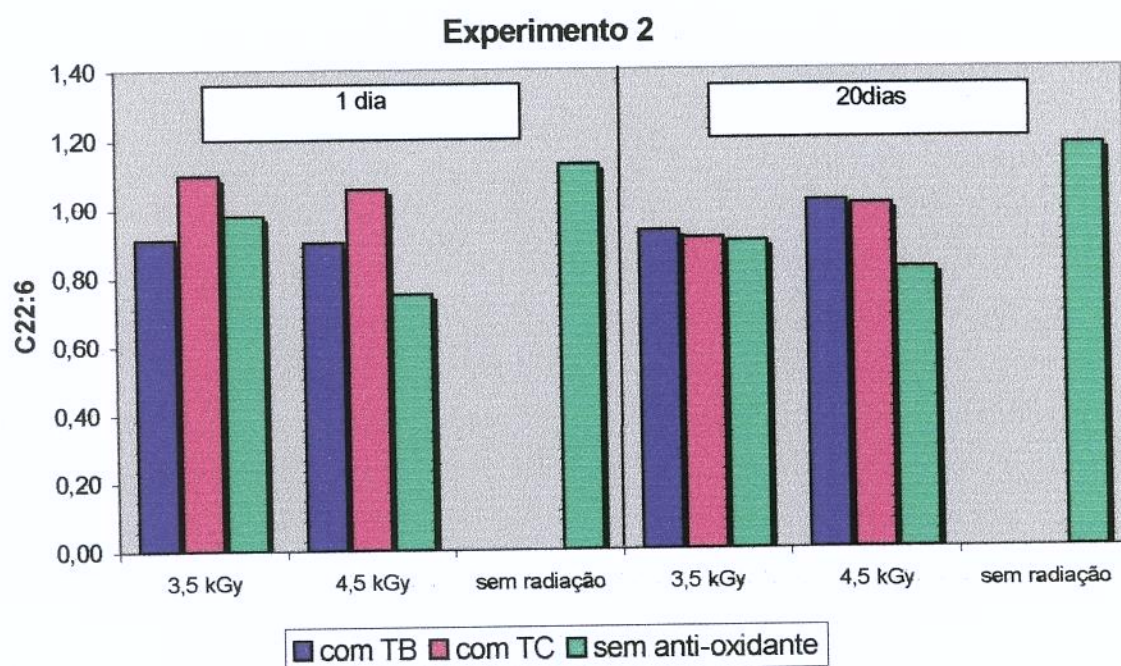
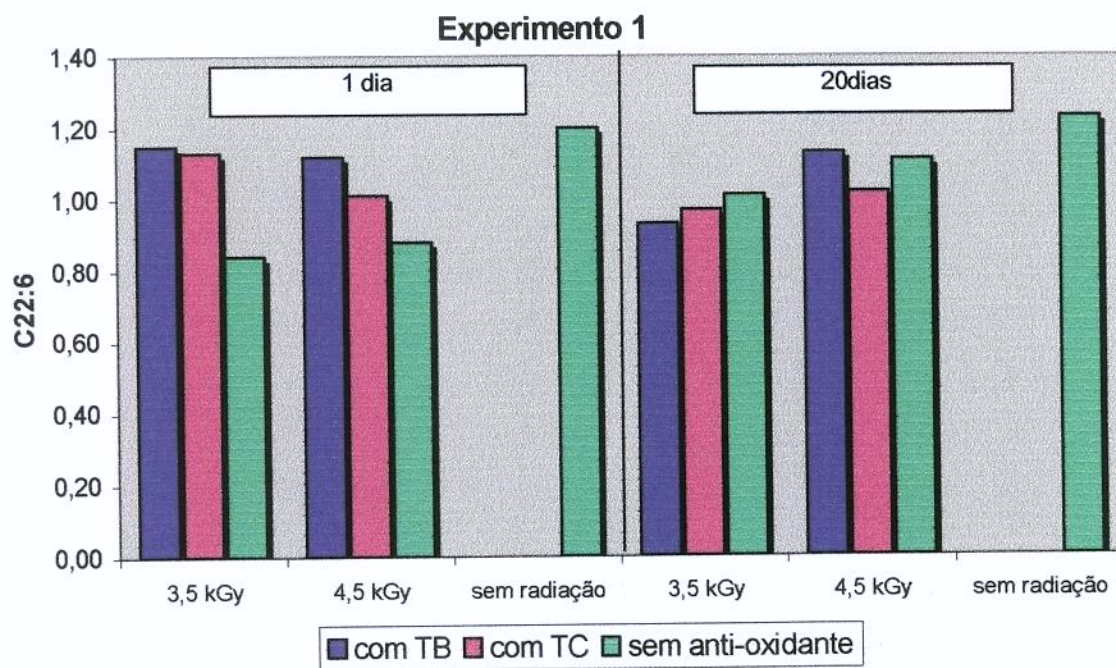


Figura 23. Comparações múltiplas para a porcentagem de C22:6 na gema líquida sem tratamento e sob irradiações de 2,5kGy e 4,5kGy associadas a antioxidantes observados em dois tempos de armazenamento, em dois experimentos.

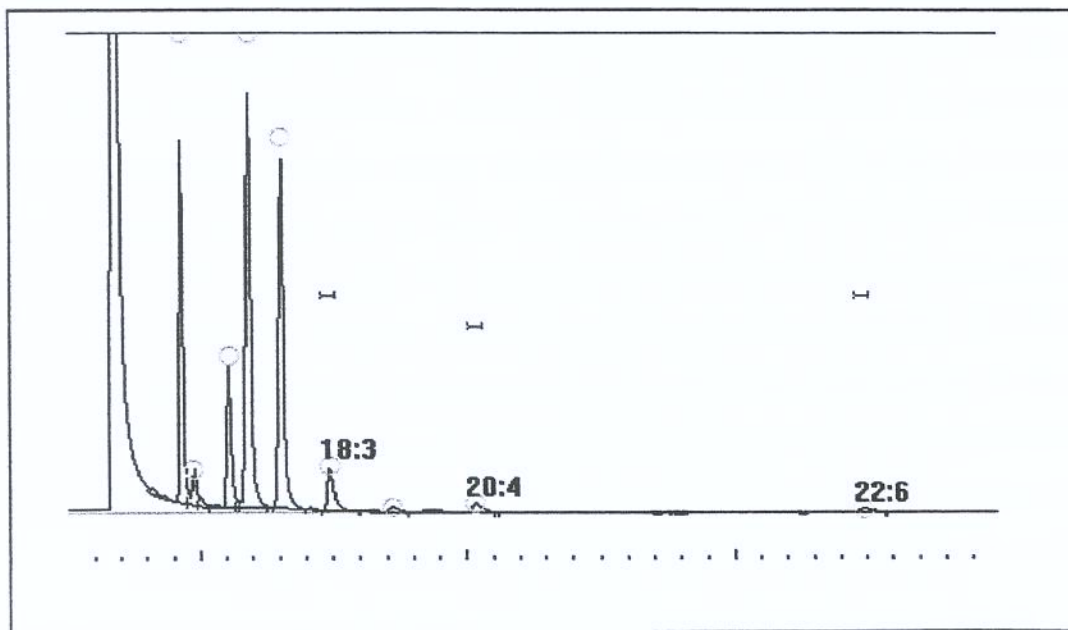


Figura 24. Cromatograma da composição de ácidos graxos de gema de ovo com tocoferol (300µg/g) e irradiada com dose de 3,5kGy (R2,T0)

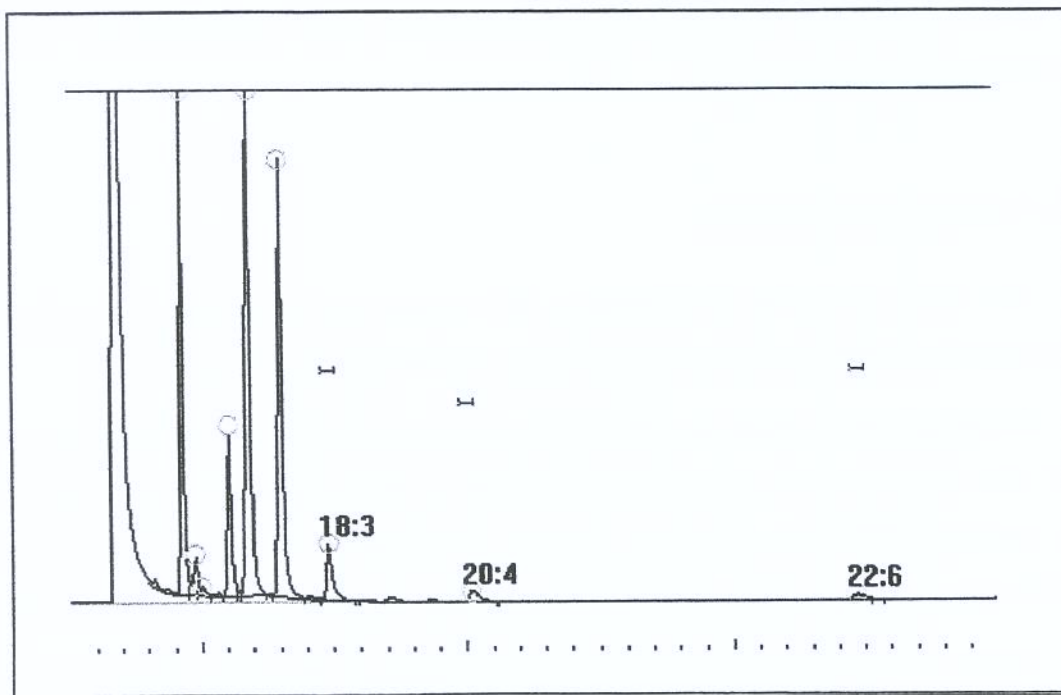


Figura 25 Cromatograma da composição de ácidos graxos de gema de ovo irradiada com dose de 3,5 kGy (R1,T0)

Essas observações foram comprovadas por PIKE & PENG (1988) que induzindo a desnaturação e ou hidrólise das proteínas de gema, constataram um incremento na oxidação dos lipídeos, medido por meio de valor de TBA e E_{232} . Os autores sugeriram que as proteínas da gema mantidas na sua forma nativa oferecem uma condição física espacial protetora aos lipídeos. Essa capacidade protetora foi atribuída ao modelo de estrutura das lipoproteína sugerido por COOK & MARTIN (1962), que localiza os lipídeos não polares, tais como triacilgliceróis, colesterol esterificado no centro de uma estrutura esférica, a qual é envolta por fosfolipídeos e colesterol com a porção polar desses compostos direcionada para a fase aquosa. As moléculas de proteínas também se localizam na superfície com porções de peptídeos não polares entrelaçados com o centro lipídico.

De fato, seria esperado uma oxidação extensiva na gema líquida devido a presença de aproximadamente 50 % de água, a qual sob radiação gama, forma diversos compostos de natureza altamente reativa. No entanto o nível de oxidação na gema líquida irradiada medida por meio de TBA e E_{232} , e perda de Ácidos Graxos Polinsaturados parece não ter sido extensiva, os valores desses índices, para gema irradiada, mesmo sem antioxidante, não apresentaram grandes diferenças em relação à GST.

4.4.4. ANÁLISE SENSORIAL

Por meio de teste de diferença do controle os atributos cor e odor das gemas sob os diferentes tratamentos foram avaliados sensorialmente.

Empregou-se o teste de Dunnett para comparação das médias das notas dadas aos atributos cor e odor dos diferentes tratamentos, em relação à uma gema padrão (GST) ao nível de 5% de significância. Os resultados para os atributos cor e odor são apresentados nas TABELAS 25 e 26 respectivamente.

Todos os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação à GST, indicando que a irradiação induziu a perda de cor das gemas, e os antioxidantes empregados não foram eficientes para prevenir totalmente esse efeito.

No entanto, o bloco dos tratamentos com 3,5 kGy apresentaram notas mais próximas do padrão do que o bloco das gemas irradiadas com 4,5 kGy, indicando que a perda de cor aumenta com o aumento da dose de radiação.

Entre os tratamentos irradiados com dose de 3,5 kGy, recebeu menor nota (nos dois experimentos) aquele com adição de TBHQ. O mesmo ocorreu para os tratamentos com dose de 4,5 kGy. Isto mostra que o TBHQ, apresentou um discreto efeito protetor, prevenindo levemente a oxidação dos carotenóides.

As médias obtidas pelos tratamentos com adição de tocoferol, foram, em geral, ligeiramente maiores que as médias do tratamento sem antioxidante, sugerindo um discreto efeito pró-oxidante. Esse fato foi observado e discutido anteriormente (item 4.4.1).

TABELA 25. Teste de comparações de DUNNETT entre valores médios de cor para gemas irradiadas com e sem antioxidantes.

Tratamento	Experimento 1		Experimento 2	
	1 dia	20 dias	1 dia	20 dias
	(dms = 0,97) média GST: 0,48	(dms = 1,00) média GST: 0,36	(dms = 0,95) média GST: 0,29	(dms = 0,83) média GST: 0,27
Ir3,5TB	2,36***	2,59***	1,63***	2,36***
Ir3,5TC	3,24***	4,00***	2,58***	3,68***
Ir3,5	3,60***	3,27***	3,04***	2,77***
Ir4,5TB	3,24***	4,05***	3,04***	2,68***
Ir4,5TC	3,84***	4,96***	3,96***	3,68***
Ir4,5	4,08***	4,55***	3,67***	3,59***

*** comparações significativas ao nível de 5%

MA et al. (1990) observaram perda de coloração de gema após irradiação. KATUZIN-RAZEM et al. (1992) encontraram que a perda de carotenóides foi

positivamente correlacionada com a dose de radiação, e sugeriu que os radicais livres induzido pela irradiação podem ter contribuído para destruição desses compostos.

A cor da gema é dependente da concentração e tipo de carotenóides, os quais contém insaturações em sua estrutura e podem ser oxidados pelo mesmo mecanismo de oxidação de lipídeos, perdendo a característica de coloração amarela. DU & AHN (2000) observaram uma perda de cor da gema em pó irradiada, porém, nos tratamentos com adição de antioxidante (vitamina E e BHT) constataram um ligeiro efeito protetor reduzindo a destruição dos carotenóides. Relataram ainda, um aumento do valor do parâmetro "a", referente à cor vermelha de medida de cor, e sugeriram que o antioxidante preveniu a perda de corotenóides. No entanto, a presença dos antioxidantes pode não ser o único motivo de um aumento no valor do parâmetro "a", mas também a presença de produtos de reação de Maillard, que se forma em gema de ovo em pó (GUARDIOLA et al, 1997)

TABELA 26. Teste de comparações de DUNNETT entre valores médios de odor para gemas irradiadas com e sem antioxidantes.

Tratamento	Experimento 1 (E1)		Experimento 2 (E2)	
	1 dia (dms = 1,14)	20 dias (dms = 1,22)	1 dia (dms = 0,97)	20 dias (dms = 0,93)
	média GST:0,12	média GST:0,23	média GST:0,21	média GST:0,27
Ir3,5TB	4,80***	4,73***	5,04***	4,86***
Ir3,5TC	4,32***	4,23***	3,88***	3,50***
Ir3,5	4,00***	4,32***	3,25***	2,36***
Ir4,5TB	5,32***	5,18***	5,62***	5,23***
Ir4,5TC	4,48***	5,05***	4,84***	3,42***
Ir4,5	4,36***	4,23***	4,63***	3,41***

*** comparações significativas ao nível de 5%

Pelo teste de Dunnett todos os tratamentos foram significativamente diferentes do padrão, isto é, apresentaram "off flavor" em relação ao padrão, induzido pela radiação, e os antioxidantes não foram efetivos para evitar a formação desses odores.

Os tratamentos Ir3,5 e Ir3,5TC receberam as menores notas, portanto mais próximas do padrão, Ir4,5 e Ir4,5TC receberam notas intermediárias, porém próximas de Ir3,5 e Ir3,5TC. Nas quatro situações (E1 e E2, nos tempos T=1 e T=20 dias). As amostras Ir4,5 TB seguida de Ir3,5TB apresentaram as maiores notas, distanciando-se da amostra padrão, indicando maior intensidade de odores estranhos. As tendências permaneceram as mesmas para os dois períodos de análise (1 e 20 dias) e foram confirmadas pela repetição do experimento (E1 e E2).

O grau de diferença encontrado entre as amostras sugere que a intensidade de "off flavor" aumenta com a dose de radiação.

O TBHQ parece ter contribuído para a intensidade dos odores, pois as amostras irradiadas com 3,5 e 4,5 kGy (sem antioxidante) receberam menores notas do que as correspondentes com TBHQ, por outro lado ele se mostrou efetivo na prevenção de oxidação de lipídeos, baseado nos resultados de TBA e E₂₃₂ dos diferentes tratamentos. De fato não houve nenhuma ocorrência de identificação dos odores da gema com rancidez, por parte dos provadores, inclusive durante as sessões de treinamento, o que sugere que os odores formados devido a irradiação não foram provenientes da oxidação de lipídeos.

AHN et al. (1999) sugeriram que compostos voláteis responsáveis pelo "off flavor" em carne irradiada foram produzidos pelo impacto da radiação nas moléculas de proteína e lipídeos, porém são diferentes daqueles que provém da oxidação de lipídeos.

Compostos voláteis de emulsões irradiadas (0; 2,5 ; 5,0 ou 10 kGy) contendo aminoácidos glutamato, albumina bovina, gelatina ou proteína miofibrilar foram analisados. Verificou-se que a radiação incrementou a produção de aldeídos como hexanal, heptanal, octanal e nonanal, indicando que a oxidação lipídica na emulsão foi acelerada pela irradiação. A irradiação, produziu por

degradação radiolítica, outros compostos voláteis a partir de emulsões contendo leucina, valina, isoleucina, fenilalanina, metionina ou cistina. Isso indica que a radiólise de proteínas pode ocupar um importante papel na formação de odores em produtos protéicos como carnes e ovos (JO & AHN, 2000).

É possível que os antioxidantes tenham exercido algum efeito preventivo na formação de "off flavor", proveniente da oxidação de lipídeos, no entanto, este efeito seria mascarado pela presença de outros voláteis formados a partir de outros compostos não lipídicos, cuja formação independe da ação de antioxidantes.

Pouca informação existe sobre a formação de odores em alimentos irradiados, mais estudos são necessários para conhecimento de sua procedência e por quais mecanismos são gerados, para que ações possam ser tomadas no sentido de evitar sua formação, melhorando a qualidade organoléptica de alimentos irradiados.

5. CONCLUSÃO

- O processo de radiação gama mostrou-se eficiente para conservação de gema líquida. Uma dose de 1,5 kGy foi suficiente para destruir *Staphylococcus aureus* em gema líquida num nível de contaminação de 410 UFC/g. Existe uma dose mínima de radiação gama entre 1,5 e 2,5 capaz de destruir *Salmonella Enteritidis* em um nível de contaminação de 750 UFC/g.. Os microrganismos psicrotróficos incubados a 7°C/10 dias são os que limitam a vida útil de gema líquida pasteurizada e irradiada.
- O processo de radiação gama em níveis de dose até 3,5 kGy poderá ser empregado como um processo alternativo à pasteurização térmica para conservação de gema líquida, com a vantagem de estender a vida útil desse produto até 3 vezes mais daquela oferecida pela pasteurização térmica (PT), sendo 4 dias para gema PT, 8 e 15 dias para as gemas irradiadas a 2,5 e 3,5 kGy respectivamente
- As propriedades funcionais de gema líquida irradiada e gema PT foram muito semelhantes às da gema sem tratamento (GST). Gemas irradiadas com dose de 3,5 e 4,5 kGy apresentaram uma redução na capacidade de emulsificação (pH aproximado de 6,5) e do índice de atividade de emulsificação.. A perda de cor para gema irradiada com 2,5 kGy não foi significativa.
- A irradiação causou oxidação da fração lipídica da gema irradiada. A presença de TBHQ contribuiu para prevenir oxidação significativamente, tanto dos lipídeos como dos pigmentos, (carotenóides), enquanto que o Tocoferol não apresentou nenhuma atividade antioxidante.
- Tanto o TBHQ quanto o Tocoferol não apontaram nenhum efeito para evitar a formação de odores estranhos nas gemas irradiadas. Os odores estranhos não foram relacionados com odor oxidado ou rancidez pela análise sensorial. Essas duas evidências sugerem que os odores estranhos teriam outra origem e não aquela de oxidação dos lipídeos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABE, Y.; ITOH, T.; ADACHI, S. Fractionation and characterization of hen's egg yolk phospholipids. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, n.6, p.1903-1907, 1982.
- [2] ABRIL, R.; BARCLAY, B. **Fatty acid analysis of poultry eggs as methyl esters - method OT-GCFAME**. 2 Versão 2.0. Omega, 1999
- [3] ACTON, J. C.; SAFFLE, R. L. Stability of oil in water emulsions: effects of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v.35, p.852-855, 1970.
- [4] AHN, D. U.; JO, C.; OLSON, D. G. Analysis of volatile components and the sensory characteristics of irradiated raw pork. **Meat Science**, Barking, v.54, n.3, p.209-215, 1999.
- [5] ALLEN, J. C.; HAMILTON, R. J. **Rancidity in foods**. 2.ed. London: Elsevier Applied Science, 1989.290p.
- [6] ALLEN, C. Manufacture egg products: a growing market **Lohmann Information International** Jan/Fev., p. 21-24, 1993.
- [7] ALLEONI, A. C. C. **Efeito da temperatura e do período de armazenamento na qualidade do ovo, nos teores de S-ovalbumina e nas propriedades funcionais das proteínas da clara do ovo**. Campinas, 1997. 110p. Dissertação (Mestre em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [8] AMERINE, M. A.; ROESSLER E. B. **Wines their sensory evaluation**. New York : W. H. Freeman and Company, 1976. 4320p.
- [9] ANTON, M.; DENMAT, M.; GANDEMER, G. Thermostability of Hen Egg Yolk Granules: Contribution of Native Structure of Granules. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.4, p. 581-584, 2000.
- [10] AOKI, H. ; TANEYAMA, O.; ORIMO, N.; KITAGAWA, I. Effect of lyophilization of soy protein on its emulsion stabilizing properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.46, n.4, p.1192-1195, 1981.

- [11] AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 14.ed. Arlington: AOAC, 1984. 1141p.
- [12] BAILEY, C. A .; CHEN, B. H. Chromatographic Analyses of Xanthophylls in Egg Yolks from Laying Hens Fed Turf Bermudagrass(*Cynodon dactylon*) Meal. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.3, p.584-586,592, 1989.
- [13] BANCHER, E.; WASHVETTL, J.; RIEDERER, P. Investigation of gamma-irradiated palm oil. I. Qualitative TLC analysis of carotenes and carotenoids and their radiolysis products. II. Quantitative TLC analysis. *Seifen-Oele-Fette-Wachse*, v.97, n.5, p.121-126, 1971. **FSTA** Acesion Number 71-09-NO425.
- [14] BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. New York: Elsevier Science Publishers, 1989. 198p.
- [15] BEAN, N. H.; GRIFFIN, P. M. Food borne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens, Vehicles and trends. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.9, p.804 - 837, 1990.
- [16] BERGENSTAHL, B. A.; CLAESSION, P. M. Surface forces in emulsion. In: LARSSON, K.; FRIBERG, S. E. **Food emulsion**. 2ed. New York: Marcel Dekker, 1990. p.41-96.
- [17] BERNARD, G.; COOK, W. H. Separation and characterization of the two high-density lipoproteins of egg yolk α and β -lipovitelin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.44, n. p.96-105, 1960.
- [18] BLIGH, E.G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.
- [19] BOARD, R.G.; TRANDER, H. S. The microbiology of Eggs In: STADELMAN, W.J.; COTTERILL, O. J. **Eggs science and technology**. 4.ed. New York: Food Products Press,1995. 591p.
- [20] BORDERIAS, A. J.; MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidades de las proteínas en alimentos. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v.28, n.2, p.159-169, 1988.

- [21] BRENNAN, J.R.; BUTTERS, J. R.; COWELL, N. D.; LILLEY, A. E. V. **Food engeneering operations**. 3.ed. London: Elsevier Applied Science, 1990. p.114-133.
- [22] BUCK, D. F. Antioxidants. In: SMITH, J. **Food additive user's handbook**. Glasgow: Blackie, 1990.286p.
- [23] BURLEY,R. W., Recent advances in the chemistry off egg yolk, CSIRO. **Food Research**, Chicago, v.35, p.1295-1307, 1975.
- [24] BURLEY, R.W.; COOL, W. H. Isolation and composition of avian egg yolk granules and their constituents α and β lipovitellins. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.39, p.1295-1307, 1961.
- [25] BURLEY, R. W. VADEHRA, D. V. Egg yolk: structure and properties In: **The avian egg chemistry and biology**. New York: John Willey & Sons, 1989. 209p.
- [26] CAUSERET, D.; MATRINGE, E.; LORIENT, D. Ionic strength and ph effects on composition and microstructure of yolk granules. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, n.6, p.1532-1536, 1991.
- [27] CHANG, P. K.; POWRIE, W.D.; FENNEMA, O. Disk gel electrophoresis of proteins in native and heat treated albumen, yolk and centrifuged whole egg. **Journal of Food Science**, Chicago, v.35, n.6, p.864-867, 1970.
- [28] CHANG, P. K.; POWRIE, W. D.; FENNEMA, O. Microstructure of egg yolk . **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, n.5, p.1193- 1200, 1977.
- [29] CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENTE, D. **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1989. 346p.
- [30] CHEN, J.Y.; LATSHAW, J. D.; LEE, H. O.; MIN, D.B. α -Tocopherol content and oxidative stability of egg yolk as related to dietary α -Tocopherol. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63, n.5, p.919-922, 1998.
- [31] CHUNG, S.L.; FERRIER, L. K. Partial lipid extraction of egg yolk powder; Effects on emulsifying properties and soluble protein fraction. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, n.5, p.1255-1258, 1991.

- [32] CHUNG, S.L.; FERRIER, L. K. pH and Sodium Chloride Effects on Emulsifying Properties of Egg Yolk Phosvitin. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.1, p.40-42, 1992.
- [33] CHUNG, S. L.; FERRIER, L. K. Heat Denaturation and Emulsifying Properties of Egg Yolk Phosvitin. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.5, p.906-908, 1995.
- [34] CILLARD, J.; CILLARD, P.; CORNIER, M. Effect of experimental factors on the prooxidant behavior of tocopherol. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.57, n.8, p.255-261, 1980.
- [35] CLARK, D.C.; KISS, I. F.; WILDE P. J.; WILSON, D. R. The effect of irradiation on the functional properties of spray-dried egg white protein. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.5, n.6. p.541-548, 1992.
- [36] CLAVERO, M. R. S.; MONK, J. D.; BEUCHAT, L. R.; DOYLE, M. P.; BRACKETT, R. E. Inactivation of Escherichia coli O157:H7, salmonellae, and Campylobacter jejuni in raw ground beef by gamma irradiation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.6, p.2069-2075, 1994.
- [37] COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimentals designs**. 3.ed. New York: John Wiley & Sons, 1993.
- [38] COOK, W. H.; MARTIN, W. G. Composition and properties of soluble lipoproteins in relation to structure. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.40, p.1273, 1962.
- [39] COOK, F.; BRIGGS, G.M. The nutritive value of egg. In: STADELMAN, W .J.; OTTERILL, O. J .**Egg science and technology**. 3.ed. New York: Food Products Press, 1990. p.141-163.
- [40] COOSIN, M. A.; JAY, M.J.; VASAVADA, P.C. Psychrotrophic microorganisms In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Whashington, APHA, 1992. p.153-168.
- [41] CORT, W. M. Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate, and ascorbic acid, and their mode of action. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.51, n.7, p.321-325, 1974.

- [42] COTTERILL, J. O.; McBEE, L. E. Egg Breaking. In: STADELMAN, W. J.; OTTERILL, J. O. **Egg science and technology**. 4.ed. New York: Food Products Press, 1995. p.231-264.
- [43] CUNNINGHAM, F. E. Egg Product Pasteurization. In: STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Eggs science and technology** 4.ed. New York: Food Products Press, 1995. 591p.
- [44] DAGORN-SCAVINER, C.; GUEGUEN, J.; LEFBVRE, J. Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.2, p.335-341, 1987.
- [45] DAMÁSIO, M. H.; CCOSTELL, E. Analises sensorial descriptivo: generación de descriptores y selección de catadoras. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 31, n.1, p.102-115, 1991
- [46] DAMODARAN, S. Molecular properties affecting binding of proteins na interfaces. In: SEMINARIO INTERNACIONAL: TOPICOS ESPECIAIS EM CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25, 26 e 27 de novembro 1997, ITAL, Campinas. p.19-28.
- [47] DAMODARAN, S. Amino Acids, Peptides, and Protein. In: FENNEMA, O. **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.321-429.
- [48] DIEHL, J. F. **Safety of irradiated foods**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 297
- [49] DRAPER, N.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 2.ed. New York: John Wiley, 1980.
- [50] DU, M.; AHN, D. U.; SHI, Z.; ZHANG, B.; JO, C. **Effext of antioxidant and packaging on lipid oxidation of irradiated egg yolk powder during storage**. Chicago: FT Annual Meeting, July 24-28, 1999.
- [51] DU, M.; AHN, D. U.. Effects of antioxidants and packaging on lipid and cholesterol and color changes of irradiated egg yolk powder. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.4, p.625-629, 2000
- [52] DZIEZAK, J. D. Preservatives: Antioxidants, the ultimate answer to oxidation. **Food Technology**, Chicago, v.40, n.9, p.94-102, 1986.

- [53] EBEL, E.D.; MASON, J.; THOMAS, L. A.; FERRIS, K. E.; BECKMAN, M. G.; CUNNINSA; D. R.; TUCKER, L.S.; SUTHERLIN, W. D.; GLASSHOFF, R. L.; SMMITHISLGR, N. M. Ocurrance of Salmonella enteritidis in unpasteurized liquid egg in the United States. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.37, p.135-142, Jan-Mar, 1993.
- [54] von ELBE, J. H.; SCHWARTZ S. J. Colorants. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996.p. 651-722
- [55] ELLIOT, R. P.; HOBBS, B. C. Eggs and Eggs Products . In: **Microbiology ecology of foods**. New York: Academic Press, v.2. 1980. 521p.
- [56] FANG, Y.; DALGLEISH, D. G. The conformational of α -lactalbumin as function or pH, heat treatment and adsorption at hydrophobic surfaces studied by FTIR. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.12, n.2, p.121-126, 1998.
- [57] FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: a review **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.44, n.3, p.189-204, 1998.
- [58] FENNEMA, O. **Food chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. 1069p.
- [59] FHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. **Structure-function properties of food proteins**. Boston: Academic Press, 1994. 265p.
- [60] FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, 182p.
- [61] FRANKEL, E. N. Chemistry of autooxidation: mechanism, products and flavour significance. In: MINS, D. B.; SMOUSE, T. H. **Flavour chemistry of fats and oils**. Champaign: American Oil Chemists Society, 1985.
- [62] FRIBERG, S. E.; GOUBRAN, R. F.; KAYALI, I. H. Emulsion Stability In: LARSSON, K.; FRIBERG, S. E. **Food emulsion**. 2.ed. New York: Markel Dekker, 1990. p.1-39.
- [63] GARLAND, T. D.; POWRIE, W. D. Isolation of mielym figures and low-density lipoprotein from egg yolk granules. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, n.2, p.592-597, 1978.

- [64] GAST, R. K.; BEARD, C. W. Research to understand and control *Salmonella enteritidis* in chickens and eggs. **Poultry Science**, Champaign, v.72, n.6, p.1157-1163, 1993.
- [65] GAST, R. K.; BERD, C. W. Evaluation of a chik mortality model for predicting the consequences of *Salmonella enteritidis* infections in laying hens. **Poultry Science**, Champaign, v.71, n.2, p.281-287, 1992a.
- [66] GAST, R. K.; BEARD, C. W. Detection enumeration of *Samonella enteritidis* in fresh estored eggs laid by experimentally infected hens. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.3, p.152-156, 1992.
- [67] GORESLINE, H. F.; INGRAM, P.; MACUCH, G.; MOCQUOT, G.; MOSSEL, D. A. A.; NIVEN, C. F.; TATCHER, F. S. Tentative classification of food irradiation processes with microbiological objectives. **Nature**, London, v.204, p.237-238, 1964.
- [68] GRIM, A. C.; GOLDBLITH S. A. The Effect of Ionizing radiation on the flavor of whole-egg magma. **Food Tecnology**, Chicago, October, v.19, n.10, p.138-140, 1965.
- [69] GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; MANICHI, A.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. **Stability of polyunsaturated fatty acids in egg powder processed and stored under various conditions**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Whasington, v.43, n.8, p.2254-2259, 1995.
- [70] GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; GRAU, A.; JORDAN, A.; BOATELLA, J. Oxysterol Formation in Spray Dried Egg Processed and Stored under Various Conditions: Prevention and Relationship with Other Quality Parameters. **Poultry Science**, Champaign, v.45, n.6, p.2229-2243, 1997.
- [71] HÁLASZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Budapest: CRC Press, 1991. 312p.
- [72] HAMILTON, R. J. The chemistry of rancidity in foods. In: ALLEN, J.; HAMILTON, R. J. **Rancidity in foods**. 2.ed. London: Elsevier Applied Science, 1989. p.1-21
- [73] HAMILTON, P. B.; PARKHURST, C. R. Improved deposition of Oxycarotenoids in Egg Yolks by dietary Cottonseed Oil. **Poultry Science**, Champaign, v.69, n.2, p.354-359, 1990.

- [74] HILL, S. E. Mulsions. In: HALL, G. M. (ED.) **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. p.153-182.
- [75] HOUH, H.; SINGH, R. X.; MURIANA, P. M.; STADELMAN, W. J. Pasteurization of intact shell eggs. **Food Microbiology**, London, v.13, n.2, p.93-101, 1996.
- [76] HUANG, S.; HERALD, T.J.; MUELLER, D. D. Effect of electron beam irradiation on physical, physicochemical, and functional properties of liquid a yolk during frozen storage. **Poultry Science**, Champaign, v.76, n.11, p.1607-1615, 1997.
- [77] HUBER, K. C.; PIKE, O. A.; HUBER C. S. Antioxidant inhibition of cholesterol oxidation in a spray-dried system during accelerated storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.5, p.909-912,916, 1995.
- [78] IAEA. International Atomic Energy Agency. **Food and Environmental Protection Newsletter (Supplement)**, Ames, v.1, n.2, 1998.
- [79] INCERTEZA na economia e os desafios da avicultura **Aves e Ovos**, São Paulo, v. 14, n. 4, p. 4-13, 1998.
- [80] IRINO, K.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO. A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G. Progression of *Salmonella enteritidis* phage type 4 strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.38, n.3, p.193-196, 1996.
- [81] JARRET, R. D. Isotope (gamma) radiation sources. In: JOSEPHSON, E. S.; PETERSON, M. S. **Preservation of food by ionizing radiation**. v.1. Boca Raton: CRC Press, 1982. p.137-163.
- [82] JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1992, 804p.
- [83] JO, C.; AHN, D. U. Volatiles production and oxidative changes in irradiated pork sausage with different fatty acid composition and packaging during storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.2, p.270-275, 2000.
- [84] JOUBERT, F. J.; COOK, W. H. Preparation and characterization of phosvitin from hen egg yolk. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.36, p.399-408, 1958.

- [85] JUNG, M. Y.; MIN D. B. Effects of tocopherols on oxidative stability of soybean oil. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.5, p.1464-1465, 1990.
- [86] JUNGLE, F. Egg product manufactured and raw material requirements. **Lohmann Information International**. Jan/Fev., p.15-20, 1993.
- [87] KAMAT, V. B.; LAWRENCE, G. A.; BARRATT, M. D.; DARKE, A. LESLIE, R. B.; SKIPLEY, G. G.; STUBBS, J. M. Physical studies of egg yolk low-density lipoproteins **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v.9, n.1, p.1-25, 1972.
- [88] KANATT, S. R.; PUSHPA, P.; D'SOUZA, S. F.; THOMAS, P. Lipid Peroxidation in chicken Meat during chilled storage as affected by antioxidants combined with low dose gamma irradiation. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63, n.2, p.198-200, 1998
- [89] KASKAS, J. P.; CILLARD, J.; CILARD, P. Antioxidation of linoleic acid and behavior of its hydroperoxides with and without tocopherols. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.61, n.9, p.1466-1469, 1984.
- [90] KATO, A.; MATSUDOMI, N.; KOBAYASHI, K. Changes in the emulsifying and foaming properties during heat denaturation. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.47, n.1, p.33-37, 1983.
- [91] KATUSIN-RAZEM, B.; RAZEM, D.; MATIC, S.; MIHOKOVIC, N.; KOSTROMIN-SOS, N. MILANOVIC, N. Chemical and organoleptic properties of irradiated dried whole egg and egg yolk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.11, p.781-786, 1989.
- [92] KATUSIN-RAZEM, B.; MIHALJEVIC, B.; RAZEM, D. Radiation-induced oxidative chemical in dehydrated egg products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.40, n.4, p.662-668, 1992.
- [93] KHAN, M. A.; BABIKER, E. E.; AZAKAMI, H.; KATO, A. Effect of protease digestion and dephosphorilation on High emulsifying properties of hen egg yolk phosvitin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.46, n.12, p.4977-4981, 1998.
- [94] KILARA, A.; SHARKASI, T. Y. Effects of temperature on food protein and its implication on functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v.23, n.4, p.323-395, 1986.

- [95] KINSELLA, J. E. Functional properties in foods, a survey. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v.7, n.3 p.219-280, 1976.
- [96] KIOSSEOGLOU, V. D.; SHERMAN, P. Influence of egg yolk lipoproteins on the rheology and stability of o/w emulsions and mayonese 1. Viscoelasticity of groundnut oil-in-water and mayonaise. **Journal of Texture Studies**, Westport, v.14, n.4, p. 397-417, 1983.
- [97] KOHL, W. F. A. New process for pasteurizing egg whites. **Food Technology**, Chicago, v.25, n.9, p.1176-1184, 1971.
- [98] LABUZA, P. T.; KANDLER, M. Z.; GOLDBLITH, S. A. Functional property of whole egg magma simultaneously treated by thermal and ionizing energy. **Food Technology**, Chicago, v.22, n.9, p.117-125, 1968.
- [99] LAI, S. M.; GRAY, J. I.; BUCKLEY, D. J.; KELLY, P. M. Influence of free radicals and others factors on formation of cholesterol oxidation products in spray-dried whole egg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.43, n.5, p.1127-1131, 1995.
- [100] LAI, S. M.; GRAY, J. I.; CHEN,C.; GRULKE, E. A. Nitrogen oxide-initiated cholesterol oxidation and carotenoid degradation in na egg lipid model system. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.72, n.2, p.179-186, 1996.
- [101] LEOVICS, V. K.; GAAL, O.; FARKAS, J.; SOMOGYI, L. Influence of packaging atmosphere on the formation of cholesterol oxides in gamma irradiated egg powder. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.66, n.1, p.71-73 1994.
- [102] LEOVICS, V. K.; GAAL, O. FARKAS, J.; SOMOGYI, L. Cholesterol oxides in γ irradiated spray-dried egg powder **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.60, n.2, p.251- 254, 1992.
- [103] LEITÃO, M. F. F. Fatores que afetam o desenvolvimento microbiano em alimentos. In: ROITMAN, I.; TRAVASSO, L.R.; AZEVEDO, J. L. **Tratato de Microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988. 186 p.
- [104] LEPKI, L.F.S.F. **Efeito da radiação ionizante na viscosidade do ovo industrializado**. São Paulo, 1998. 70p. Dissertação (Mestre) – IPEN, Universidade de São Paulo.

- [105] LI, S. X.; CHERIAN, G. SIM, J. S. Cholesterol oxidation en egg yolk powder during storage and heating as affected by dietary oil and tocopherol. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, n.4, p.721-725, 1996.
- [106] LI-CHAN, E. Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate. **Journal of Food Science** , Chicago, v.48, n.1, p.47-56, 1983.
- [107] LI-CHAN, E. C. Y.; POWRIE, W. D.; NAKAI, S. The chemistry of egg and egg products. In: STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Eggs science and technology**. 4.ed. New York: Food Products Press, 1995. 591p.
- [108] LI-CHAN, E.; NAKAI, S.; WOOD, D. F. Hydrophobicity and solubility of meat protein and their relationship to emulsifying properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, n.2, p.345-350, 1984.
- [109] LIEU, E. H.; FRONING, G. W.; DAM, R. Effect of storage on lipid composition and functional properties of dried eggs products. **Poultry Science**, Champaign, v.57, n.4, p.912-923, 1978.
- [110] LUCKTON, A.; MACNNEY, G. Effect of ionizing radiation on carotenoids stability. **Food Technology**, Chicago, v.10, p.630-632, Dez. 1956.
- [111] MA, C. Y.; HARWALKER, V. R.; POSTE, L. M.; SAHASRABUDHE, M. R. Effect of gamma irradiation on the physicochemical and functional properties of frozen liquid egg products. **Food Research International**, Essex, v.26, n.4, p.247-254, 1993.
- [112] MA, C. Y.; SAHASRABUDHE, M. R.; POSTE, L. M.; HARWALKAR, V. R.; CHAMBERS, J. R. Gamma irradiation of shell eggs. internal and sensory quality, physicochemical characteristics, and functional properties. **Journal Canadian Institute of Food Science and Technology**, Ottawa, v.23, n.4/5, p.226-232, 1990.
- [113] MARSHALL, A. C.; SAMS, A. R.; VAN ELSWYK, M. E. Oxidative stability and sensory quality of stored eggs from hens fed 1,5% menhaden oil. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.3, p.561-563, 1994
- [114] MARTIN, W. G.; TATTRIE, W. G.; COOK, W. H. Lipid extraction and distribution studies of egg yolk lipoproteins. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** , Ottawa, v.41, p.657-666, 1963.

- [115] MARTIN, W.G.; AUGUSTYNIAK, J.; COOK, W.H. Fractionation and characterization of the low-density lipoproteins of hen's egg yolk. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.84, p.714-720, 1964.
- [116] MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation techniques. Boca Raton, Florida CRC Press Inc 1991. 281p.
- [117] MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E., REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. M.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MAGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.
- [118] NARVAIZ, P.; LESCANO, G.; KAIRIYAMA, E. Physicochemical and sensory analysis on egg powder irradiated to inactivate *Salmonella* and reduce microbial load. **Journal of Food Safety**, Westport, v.12, n.4, p.263-282, 1992.
- [119] O'NEIL, C. A.; SCHWARTZ, S. J. Effect of gamma irradiation on isomerization of β -carotene in sweet irradiated to inactivate *Salmonella* and reduce microbial load. **Journal of Food Safety**, Westport, v.12, n.4, p.263-282, 1992.
- [120] NAKAMURA, S.; OGAWA, M.; NAKAI, S.; KATO A ; KITTS, D. D. Antioxidant activity of a Maillard-Type Phosvitin-Galactomannan Conjugate with Emulsifying Properties and Heat Stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.46, n.10, p.3958-3963, 1998.
- [121] NIKI, E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v.44, n. 2-4, p.227-253, 1987.
- [122] OHATA, S. M. **Comportamento reológico do ovo integral, gema e clara nas formas pasteurizada e reconstituída**. Campinas, 2000. 116p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [123] OLIVEIRA, D. D. **Salmonella em ovo: prevalência, influência das condições ambientais na penetração e multiplicação através da casca e efeito de sanificantes no controle da contaminação externa**. Campinas, 2000. 82p. Dissertação (Mestre) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- [124] OLLILAINEN, V.; HEINONEN, M.; LINCOLA, E.; VARO, P.; KOIVISTOINEN, P. Carotemoides and retinoids in finnish foods: dairy products and eggs. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, n.9, p.2257-2265, 1989.
- [125] O'MAHONY, M. **Sensory evaluation of food**. New York: Marcel Dekker, 1986.
- [126] OPTIZ, H. M. Progress bein mode im *S. enteritidis* reduction on the form, **Poultry digest**, Mount Morris, p.16-22, 1992.
- [127] PACKER, J. E.; SLATER, T. F.; WILSON, R. L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. **Nature**, London, v.278, p.737-738, 1979.
- [128] PAPAS, A. M. Antioxidantes. **Eastman Chemmical Company Publication**, n. ZG-165, 1991.
- [129] PARASKEVOUPOULOU, A.; KIOSSEOGLOU, V. Effect of cholesterol extraction from dried yolk with the aid of Polysorbate 80 on yolk's functional properties. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.9, n.3 p.205-209, 1995.
- [130] PARASKEVOUPOULOU, A.; PANAYIOUTOU, K.; KIOSSEOGLOU, V. Functional properties of egg yolk concentrade with a reduced cholesterol content prepared by treatment with supercritica CO₂. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.11. n.4, p.385-391, 1997.
- [131] PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of protein: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.26, n.3, p.716-725, 1978.
- [132] PIKE , O. A.; PENG, I. C. Effect of protein disruption by desnaturaion and hydrolisis on egg yolk lipid oxidation. **Journal of Food Science**, Chicago, v.53, n.2, p.428-430, 1988.
- [133] PHILLIPS, M. C. Protein conformational at liquid interfaces and its role in stabilizaing emulsion and foams. **Food Technology**, Chicago, v.35, n.1, p.50-57, 1981.
- [134] POKORNY, J. E.; POSKOCILOVA, H.; DAVIDEK, J. Effect of phospholipids on the decomposition of hydroperoxides. **Nahrung**, Berlin, v.25, n.1, p.29-31, 1981.

- [135] POWRIE, D. W.; NAKAI, S. The chemistry of egg and egg products. In: STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg science and technology**. 4.ed. New York: Food Products Press, 1990. p.97-140.
- [136] PRIVETT, O. S.; BLAND, M. L.; SCHMIDT, J. A. Studies on the composition of egg lipid. **Journal of Food Science**, Chicago, v.27, n.5, p.463-468, 1962.
- [137] RADOMSKI, M. W.; COOK, W. H. Fractionation and dissociation of the avian lipovitellins and their interaction with phosvitin. **Canadian Journal Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.42, p.395-406, 1964.
- [138] RAO, M. A. Rheological properties of fluid foods. In: RAO, M. A.; RIZVI, S. S. H. (Eds) **Engineering properties of foods**. New York: Marcel Dekker, 1986. p.1-47.
- [139] RALSTON, M. L. ; JENNRICH, R. I.; DUD, A derivative free algorithm for nonlinear least squares. **Technometrics**, Washington, v.20, n.1, p.7-14, 1978.
- [140] READ, M. S.; KRAYBILL, H. F.; WORTS, W. S.; THOMPSON, S. W.; ISAAC, G. J.; WITT, N. F. Successive generation rat-feeding studies with a composite diet of gamma-irradiated foods. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.3, p.153-173, 1961.
- [141] REED, G. H. Foodborne illness: Salmonellosis. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.13, n.12, p.706-708, 1993.
- [142] RHODES, D. N.; LEA, C. H. Phospholipides. 4. On the composition of hen's egg phospholipides. **The Biochemical Journal**, London, v.54, p.526-533, 1957.
- [143] RODRIGUE, D. C.; TAUXE, R. V. ; ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.105,n.1, p.21-27, 1990.
- [144] SAARI, A.; POWRIE, W. D.; FENNEMA, O. Isolation and characterization of low-density lipoproteins in native egg yolk plasm. **Journal of Food Science**, Chicago, v.29, n.3, p.307-315, 1964.
- [145] SAS. **Statistical Analysis Systems**. version 6.02. North/carolina: SAS Institute Inc., 1986.

- [146] SCHAEFFER, J.L.; TYCZKOWSKI, J. K.; PARKHURST, C. R.; HAMILTON, P. B. Carotenoid composition of serum and egg yolk of hens. **Poultry Science**, Champaign, v.67, n.4, p.608-614, 1988.
- [147] SCHAFFNER, M. K.; HAMDY, M. K.; TOLEDO, R. T.; TIFT, M. L. Salmonella inactivation in liquid whole egg by thermoradiation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, n.4, p.902-905, 1989.
- [148] SCHMIDT, G.; BESSMAN, M. J.; HICKEY, M. D. THANNHAUSER, S. J. The concentration of some constituents of egg yolk in its soluble phase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.223, p.1027-1031, 1956.
- [149] SCHNEIDER, H.; MORROD, R. S.; COLVIN, J. R.; TATTRIC, N. H. The lipid core model of lipoproteins. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v.10, p.328, 1973.
- [150] SCHULER, P. Natural Antioxidants Exploited commercially. In: HUDSON, B. J. F. **Food Antioxidants**, 1990, p 99-170.
- [151] SEBER, G. A. F., WILD, C. J. **Non Linear Regression**. New York, John Wiley. 1989, 768p.
- [152] SERRANO, L. E.; MURANO, E. A.; SHENOY, K.; OLSON, D. G. D. Values of eggs *Salmonella enteritidis* isolates and quality attributes of shell egg and liquid whole treated with irradiation. **Poultry Science**, Champaign, v.76, n.1, p.202-205, 1997.
- [153] SHAFI, R.; COTTERILL, O. J.; NICHOLAS, M. L. Microbial flora of commercially pasteurized egg products. **Poultry Science**, Champaign, v.49, n. 2, p.578-585, 1970.
- [154] SHAHIDI, F. Stability of fats and oil In: LATIN AMERICAN CONGRESS AND EXHIBIT ON FATS AND OILS PROCESSING, 6. 1995, Campinas. **Proceedings**. Campinas: Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, 1995. p. 47-54.
- [155] SHANTZ, R. C.; DAWSON, L. E. Electrophoretic examination of native and phosphovitin fraction of avian egg yolk. **Poultry Science**, Champaign, v.53, n.3, p.969-974, 1974.

- [156] SHERWIN, E.R. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.55, n.11, p.809-814, 1978
- [157] SHEPARD, C.C.; HOTTLE, G. A. Studies of the composition livetin fraction of the yolk of the hen eggs with the use of electrophoretic analysis. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.79, p.349-357, 1949.
- [158] SHERWIN, E. R. Antioxidant. In: BRANEN A. L.; DAVIDSON, P. M.; SALMINEN, S. **Food additives**. New York: Marcel Dekker, 1992. p.139-193.
- [159] SIMIC, M. G. Radiation chemistry of water-soluble food components. In: JOSEPHSON, E. S.; PETERSON, M. S. (Ed.) **Preservation of food by ionizing irradiation**. v. 2. Boca Raton: FL CRC Press, 1983. p.2-70.
- [160] SIMIC, M. G.; JOVANOVIC, S. V.; NIKI, E. Mechanisms of lipid oxidative processes and their inhibition. In: St. ANGELO, A. J. (Ed.) **Lipid oxidation in food**. Washington: ACS Symposium SER. 500 American Chemical Society, 1992. 14p.
- [161] SIMIC, M. G.; KAREL, M. Autoxidation. In: **Foods and biological systems**. New York: Plenum Press, 1980. 129p.
- [162] SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids im health and disease and in growth and development. **American Journal Clinical Nutrition**. New York, v. 54, p. 438-463, 1990
- [163] SMITH, I. D.; PERDUE, H. S. Isolation and tentative identification of carotenoids present in chicken skin and egg yolks. **Poultry Science**, Champaign, v.45, p.577-581, 1966.
- [164] SPACKMAN, D. Salmonella em poultry en the U.K/ observations and actions. **West Poultry Disease Conference Davis Ca**, 1989. p.207-210.
- [165] STADELMAN, W. J.; PRATT, D. E. Factors influencing composition of the hen's egg. **World's Poultry Science Journal** v. 45, p.247-266, 1989
- [166] St. ANGELO, A. J. Lipid oxidation in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v.36, n.3, p.175-224, 1996.
- [167] STAUFER, C. E.. **Fats and Oils**. New York: Eagan Press Handbook, 1996. 149p.

- [168] STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill, 1960, 481p.
- [169] St LOIUS, M. E.; MORSE, D. L.; PORTER, M. E.; DEMELFI, T. M.; GUZEWICH, J. J.; TAUXE, R. V.; BLAKE, P. A. The emergence of grade A eggs as major source of *S. enteritidis* infections **Journal American Medicine Association** Whasintgton, v. 259, p.2103-2107, 1988
- [170] STUCKEY, B. N. Antioxidants as Food Stabilizers. In: FURIA, T. E. **CRC Handbook of food addites**. 2.ed. v.1. Florida: CRC Press, 1975. 997p.
- [171] SWIFT, C. E.; LOCKETT, C.; FRYER, A. J. Comminuted meat emulsions: the capacity of meat for emulsifying fat. **Food Technology**, Chicago, v.15, n. 11, p.468-72, 1961.
- [172] TARLADGIS, B. G.; WATTS, B. M.; YOUNATHAN, M. T. A destillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.37, n.1, p. 44-48, 1960
- [173] THAYER, D. W.; BOYD, G.; FOX, J. B.; LAKRITZ, L. Elimination by gamma irradiation o *Salmonella* SPP. and strains of *staphylococcus aureus* inoculated in bison, ostrich, alligator, and caiman meat. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.7, p.756-760, 1997.
- [174] TERA, J. KAWANISHI, M.; MATSUSHITA, S. Application of high-performance liquid chromatography for the estimation of peroxidized phospholipids in spray-dried egg and musclue foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.35, n.4, p.613-617, 1987.
- [175] THAKUR, B. R.; ARYA, S. S. Effect of sorbic acid on irradiation-induced sensory and chemical changes in sweetened orange juice and mango pulp. **International Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.28, n.4, p.371-376, 1993.
- [176] THAYER, D. W. Effect of NaCl, sucrose and water content on the survival of *Salmonella typhimurium* on irradiated pork and cheiken. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.6, p.596-600, 1995.
- [177] THAYER, D. W; BOYD, G.; FOX, J. R. LAKRITZ, L.; HAMPROM, J. W. Variation in radiation sensitivity of foodborne pathogens associated with the suspending medium. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.1, p.63-67, 1995.

- [178] TORNBERG, E. Functional characterization of protein stabilized emulsions: emulsifying behavior of protein in a sonifier. **Journal of Food Science**, Chicago, v.45, n.6, p.1662-1668, 1980.
- [179] VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Whashington, APHA, 1992.
- [180] VINCENT, R.; POWRIE, W.D.; FENNEMA, O. Surface activity of yolk plasma and dispersion of yolk fractions. **Journal of Food Science**, Chicago, v.31, n.5, p.643-647, 1996.
- [181] VOUTISINAS, L. P.; CHEUNG, E.; NAKAI, S. Relationships of hidrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v.48, n.1, p.26-56, 1983.
- [182] WHALE, W. J. K.; HOPPE, P. P.; MC-INTOCH, G. Effects of storage and various intrinsic vitamin E concentrations on lipid oxidation in dried egg powders. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.61, n.4, p. 463-469, 1993.
- [183] WHO - World Health Organization. **Safety and nutritional adequacy of irradiated food**. WHO, 1994. 161p.
- [184] WONG, Y.C.; HERALD, T. J.; HACHMEISTER, K. A. Comparison between irradiated and thermally pasteurized liquid egg white on functional, physical, and microbiological properties. **Poultry Science**, Champaign, v.75, n.6, p.803-808, 1996.
- [185] YAMAMOTO, Y.; ARAKI, M. Effects of lecitin addition in oil or water phase on the stavility of emulsions made with whey proteins. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.61, n.11, p.1791-1795, 1997.

7. APÊNDICE

TABELA A1. Contagem de Mesófilos totais, psicrotróficos e bolores e leveduras de 8 lotes de gema líquida pasteurizada termicamente (valores observados)

MESÓFILOS

Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
0	8,5.10	3,0.10	3,0.10	6,0.10	5,5.10	7,5.10	1,0.10 ²	6,0.10
2	5,4.10 ²	1,1.10 ²	4,1.10 ²	2,5.10 ²	9,0.10	2,4.10 ²	2,4.10 ²	2,4.10 ²
4	2,5.10 ⁵	1,4.10 ⁴	2,3.10 ⁴	2,9.10 ³	1,2.10 ⁵	8,0.10 ³	1,6.10 ⁵	2,8.10 ⁴
6	3,5.10 ⁵	1,9.10 ⁵	4,1.10 ⁵	2,8.10 ⁴	5,7.10 ⁵	4,6.10 ⁵	3,0.10 ⁶	1,3.10 ⁶
8	6,9.10 ⁶	6,0.10 ⁶	1,3.10 ⁷	2,4.10 ⁶	9,0.10 ⁶	6,3.10 ⁶	5,4.10 ⁷	1,7.10 ⁷

PSICROTRÓFICOS

Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
0	4,0.10	5,0.10	3,0.10	2,0.10	2,0.10	2,0.10	<10	2,0.10
2	3,7.10 ²	1,1.10 ²	1,4.10 ³	2,4.10 ²	4,5.10 ²	2,2.10 ³	1,4.10 ³	4,0.10 ²
4	8,5.10 ⁵	4,7.10 ⁵	4,3.10 ⁵	2,8.10 ⁴	1,8.10 ⁵	2,5.10 ⁴	6,1.10 ⁵	2,1.10 ⁵
6	1,5.10 ⁷	1,5.10 ⁷	1,0.10 ⁷	4,8.10 ⁶	5,4.10 ⁶	1,2.10 ⁶	1,3.10 ⁷	9,7.10 ⁶
8	8,5.10 ⁷	1,1.10 ⁸	5,6.10 ⁷	2,5.10 ⁷	1,3.10 ⁸	3,3.10 ⁷	1,2.10 ⁸	4,3.10 ⁷

BOLORES E LEVEDURAS

Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
0	6,0.10	1,6.10 ²	5,0.10	2,2.10 ²	7,0.10	1,3.10 ²	1,3.10 ²	8,0.10
2	6,1.10 ²	3,9.10 ²	6,2.10 ²	5,0.10	2,5.10 ²	≤10	2,9.10 ²	1,6.10 ²
4	2,6.10 ³	8,0.10 ³	1,8.10 ⁴	3,3.10 ³	1,0.10 ⁴	8,0.10 ²	3,4.10 ⁴	8,7.10 ³
6	1,5.10 ⁵	1,3.10 ⁶	3,7.10 ⁵	3,1.10 ⁵	2,4.10 ⁵	8,8.10 ⁴	2,9.10 ⁵	4,0.10 ⁵
8	7,8.10 ⁶	7,0.10 ⁶	1,7.10 ⁶	1,6.10 ⁶	5,3.10 ⁶	1,8.10 ⁶	5,5.10 ⁶	1,8.10 ⁶

TABELA A2. Contagem de mesófilos totais, psicrotróficos e bolores e leveduras de 8 lotes de gema líquida Irradiada com 2,5 KGy (valores observados)

MESÓFILOS								
Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
0	2,0.10	2,5.10	5,0.10	1,5.10	3,0.10	3,0.10	3,0.10	4,0.10
3	3,0.10	2,0.10	≤10	4,0.10	≤10	3,0.10	3,0.10	3,0.10
6	≤10	2,0.10	2,5.10	2,0.10	2,5.10	4,0.10	3,5.10	3,0.10
8	1,0.10	1,5.10	1,5.10	≤10	≤10	≤10	2,0.10	2,0.10
10	2,5.10	1,5.10	1,5.10	<10	3.10	<10	1,5.10	1,5.10
12	1,5.10	2,0.10	1,5.10	2,0.10	8.10	≤10	7,5.10	6,0.10
14	2,2.10 ²	1,5.10 ²	4,5.10	≤10	2.10	≤10	4,8.10 ²	2,1.10 ³
PSICROTRÓFICOS								
Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
0	<10	<10	<10	<10	<10	≤10	2,0.10	2,0.10
3	<10	<10	3,0.10	≤10	<10	2,0.10	1,2.10 ²	<10
6	2,5.10 ²	4,8.10 ³	2,9.10 ⁴	2,0.10 ²	<10	<10	7,0.10 ²	9,0.10 ²
8	1,2.10 ⁵	9,1.10 ⁵	4,3.10 ⁵	3,4.10 ⁴	2,5.10 ²	4,0.10 ⁴	3,1.10 ³	4,5.10 ³
10	3,4.10 ⁶	4,2.10 ⁶	4,8.10 ⁶	6,0.10 ⁶	4,5.10 ³	3,3.10 ⁶	2,0.10 ⁵	5,3.10 ⁴
12	1,2.10 ⁷	1,9.10 ⁷	1,3.10 ⁷	5,0.10 ⁶	1,3.10 ⁵	8,3.10 ⁶	5,7.10 ⁵	5,0.10 ⁵
14	1,9.10 ⁷	3,0.10 ⁶	3,1.10 ⁷	2,7.10 ⁷	5,0.10 ⁴	3,0.10 ⁷	2,5.10 ⁶	5,8.10 ⁵
BOLORES E LEVEDURAS								
Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
0	<10	<10	≤10	<10	≤10	≤10	≤10	<10
3	<10	<10	<10	<10	≤10	≤10	8,0.10	≤10
6	4,0.10 ²	1,1.10 ²	1,5.10 ²	2,0.10	3,0.10	2,0.10	3,1.10 ²	3,2.10 ²
8	1,9.10 ⁴	5,8.10 ²	3,5.10 ²	5,0.10	5,0.10	1,2.10 ²	3,2.10 ³	4,1.10 ³
10	4,6.10 ⁴	2,7.10 ³	2,9.10 ³	2,9.10 ³	1,2.10 ³	2,5.10 ³	8,6.10 ⁴	3,9.10 ⁴
12	4,1.10 ⁵	3,4.10 ³	3,2.10 ³	2,0.10 ³	1,3.10 ⁴	3,8.10 ³	6,9.10 ⁵	4,9.10 ⁵
14	5,5.10 ⁵	5,3.10 ⁴	3,5.10 ³	1,0.10 ³	2,0.10 ⁴	1,5.10 ³	2,0.10 ⁶	4,2.10 ⁵

TABELA A3: Contagem de mesófilos totais, psicrotróficos e bolores e leveduras de 8 lotes de gema líquida irradiada com 3,5 KGy (valores observados)

MESÓFILOS								
Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
1	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10	< 10	$6,0 \cdot 10$	≤ 10	≤ 10
3	≤ 10	≤ 10	$2,5 \cdot 10$	< 10	< 10	< 10	≤ 10	≤ 10
6	< 10	< 10	$6,5 \cdot 10$	< 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10	$1,5 \cdot 10$
9	≤ 10	$2,0 \cdot 10$	$5,0 \cdot 10$	$1,5 \cdot 10$	$4,0 \cdot 10$	$1,5 \cdot 10$	≤ 10	≤ 10
12	$7,5 \cdot 10$	$1,0 \cdot 10$	$2,5 \cdot 10$	≤ 10	$7,5 \cdot 10$	$1,3 \cdot 10^2$	$6,0 \cdot 10$	$1,0 \cdot 10^2$
15	≤ 10	≤ 10	≤ 10	$3,0 \cdot 10$	$2,5 \cdot 10$	≤ 10	< 10	< 10
18	< 10	≤ 10	< 10	$1,5 \cdot 10$	≤ 10	≤ 10	$2,0 \cdot 10$	< 10
21	$4,0 \cdot 10$	≤ 10	≤ 10	$6,0 \cdot 10$	$1,5 \cdot 10$	$2,0 \cdot 10$	≤ 10	$2,0 \cdot 10$
PSICROTRÓFICOS								
Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
1	$2,0 \cdot 10$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	≤ 10
3	< 10	≤ 10	$2,0 \cdot 10$	< 10	≤ 10	< 10	$2,0 \cdot 10$	< 10
6	< 10	< 10	≤ 10	< 10	< 10	< 10	< 10	$3,0 \cdot 10$
9	< 10	< 10	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$2,5 \cdot 10^2$	< 10	< 10	$4,9 \cdot 10^3$
12	< 10	$4,5 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^3$	< 10	$2,4 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^3$
15	$2,5 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^4$	$9,2 \cdot 10^3$	< 10	$7,9 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	$6,8 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$
18	$1,1 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^6$	$9,3 \cdot 10^5$	< 10	$1,7 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^5$
21	$1,7 \cdot 10^6$	$6,2 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$
BOLORES E LEVEDURAS								
Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
1	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
3	< 10	< 10	< 10	$2,0 \cdot 10$	< 10	< 10	< 10	< 10
6	< 10	$1,1 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10$	< 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10	< 10
9	< 10	< 10	≤ 10	< 10	$2,4 \cdot 10^2$	< 10	$6,0 \cdot 10$	≤ 10
12	$\leq 10^2$	$8,5 \cdot 10^2$	$7,5 \cdot 10^2$	< 10	$5,2 \cdot 10^3$	< 10	$1,4 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^2$
15	$1,5 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^4$	$7,0 \cdot 10^3$	< 10	$8,8 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^2$
18	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^5$	$\leq 10^2$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$7,9 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^2$
21	$1,7 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^6$	$4,9 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^2$

TABELA A4. Contagem de mesófilos totais, psicrotróficos e bolores e leveduras de 8 lotes de gema líquida irradiada com 4,5 KGy (valores observados)

MESÓFILOS								
Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
1	<10	≤10	<10	≤10	<10	<10	<10	<10
3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
6	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	2,0.10
9	<10	3,5.10	<10	<10	<10	<10	≤10	<10
12	4,5.10	1,5.10	<10	<10	<10	<10	<10	≤10
15	<10	2,5.10	<10	5,5.10	<10	2,0.10	<10	<10
18	<10	2,0.10	≤10	4,9.10 ³	<10	<10	<10	<10
21	1,1.10 ²	4,0.10	1,1.10 ²	8,7.10 ³	1,4.10 ²	<10	1,5.10	<10
PSICROTRÓFICOS								
Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
1	≤10	≤10	<10	≤10	2,0.10	2,0.10	<10	≤10
3	3,0.10	3,0.10	<10	<10	<10	<10	≤10	≤10
6	<10	2,0.10	2,0.10	<10	<10	<10	<10	<10
9	<10 ²	≤10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
12	<10 ²	1,5.10 ²	≤10 ²	≤10 ²	<10 ²	1,0.10 ³	2,5.10 ²	≤10 ²
15	<10 ²	5,0.10 ²	≤10 ²	9,0.10 ²	<10 ²	3,0.10 ⁴	1,6.10 ⁴	8,5.10 ²
18	≤10 ²	2,0.10 ³	≤10 ²	1,2.10 ⁶	≤10 ²	1,6.10 ⁶	1,1.10 ⁶	2,7.10 ⁵
21	≤10 ²	7,0.10 ³	2,0.10 ²	2,0.10 ⁶	1,5.10 ³	3,4.10 ⁶	3,2.10 ⁶	3,8.10 ⁶
BOLORES E LEVEDURAS								
Tempo (dias)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
1	<10	≤10 ²	<10	2,0.10	≤10	<10	2,0.10	<10
3	<10	2,0.10	≤10	<10	<10	<10	<10	<10
6	<10	3,3.10	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	<10
9	<10	2,0.10	<10	≤10	<10	≤10 ²	<10	3,0.10
12	<10	7,0.10	<10	<10	<10	9,0.10	6,0.10 ²	<10
15	<10 ²	2,5.10 ²	2,0.10 ²	2,2.10 ³	1,5.10 ³	2,0.10 ⁴	1,0.10 ⁴	2,3.10 ³
18	<10 ²	1,3.10 ³	1,3.10 ³	6,2.10 ⁵	2,7.10 ³	3,3.10 ⁵	7,6.10 ⁵	3,2.10 ⁵
21	1,5.10 ²	4,3.10 ³	3,7.10 ³	2,1.10 ⁶	1,4.10 ⁴	2,7.10 ⁶	2,9.10 ⁶	4,4.10 ⁶

TABELA A5. Média, desvio padrão da média, valores mínimo e máximo e, coeficiente de variação do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e, bolores e leveduras em uma amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente (PT) em diferentes tempos de armazenamento (dias)

MICROORGANISMOS	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão da Média	Coeficiente de Variação(%)
0 dia de prateleira					
Mesófilos	1,48	2,00	1,76	0,07	3,87
Psicrotróficos	1,00	1,70	1,37	0,08	5,60
Bolores e leveduras	1,70	2,34	2,00	0,08	3,96
2 dias de prateleira					
Mesófilos	1,95	2,73	2,36	0,09	3,90
Psicrotróficos	2,04	3,34	2,74	0,16	5,72
Bolores e leveduras	1,00	2,79	2,24	0,22	9,67
4 dias de prateleira					
Mesófilos	3,46	5,40	4,50	0,24	5,33
Psicrotróficos	4,40	5,93	5,31	0,21	3,92
Bolores e leveduras	2,90	4,53	3,81	0,18	4,78
6 dias de prateleira					
Mesófilos	4,45	6,48	5,61	0,21	3,76
Psicrotróficos	6,08	7,18	6,87	0,13	1,91
Bolores e leveduras	4,94	6,11	5,47	0,12	2,20
8 dias de prateleira					
Mesófilos	6,38	7,73	6,98	0,14	2,00
Psicrotróficos	7,40	8,11	7,81	0,10	1,23
Bolores e leveduras	6,20	6,89	6,52	0,11	1,66

TABELA A6.. Média, desvio padrão da média, valores mínimo e máximo e, coeficiente de variação do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em uma amostra de 8 lotes de gemas líquidas irradiadas na dose 2,5 kGy em diferentes tempos de armazenamento (dias)

MICROORGANISMOS	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão da Média	Coeficiente de variação(%)
0 dia de prateleira					
Mesófilos	1,18	1,70	1,45	0,06	3,96
Psicrotrófico	1,00	1,30	1,08	0,05	4,57
Bolores e leveduras	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
3 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,60	1,35	0,08	6,07
Psicrotrófico	1,00	2,08	1,23	0,14	11,13
Bolores e leveduras	1,00	1,90	1,11	0,11	10,11
6 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,60	1,38	0,07	4,77
Psicrotrófico	1,00	4,46	2,58	0,42	16,43
Bolores e leveduras	1,30	2,60	1,99	0,20	9,84
8 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,30	1,12	0,05	4,30
Psicrotrófico	2,40	5,96	4,42	0,42	9,50
Bolores e leveduras	1,70	4,28	2,77	0,34	12,15
10 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,48	1,20	0,06	4,98
Psicrotrófico	3,65	6,78	5,85	0,41	7,03
Bolores e leveduras	3,08	4,93	3,88	0,25	6,58
12 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,90	1,44	0,13	8,75
Psicrotrófico	5,11	7,28	6,46	0,29	4,46
Bolores e leveduras	3,30	5,84	4,40	0,39	8,97
14 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	3,32	1,93	0,30	15,34
Psicrotrófico	4,70	7,49	6,63	0,36	5,37
Bolores e leveduras	3,00	6,30	4,55	0,44	9,75

TABELA A7. Média, desvio padrão da média, valores mínimo e máximo e, coeficiente de variação do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em uma amostra de 8 lotes de gemas líquidas na dose 3,5 kGy em diferentes tempos de armazenamento (dias)

MICROORGANISMOS	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão da Média	Coeficiente de variação(%)
1 dia de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,78	1,10	0,10	8,88
Psicrotrófico	1,00	1,30	1,04	0,04	3,61
Bolores e leveduras	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
3 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,40	1,05	0,05	4,76
Psicrotrófico	1,00	1,30	1,08	0,05	4,57
Bolores e leveduras	1,00	1,30	1,04	0,04	3,61
6 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,81	1,12	0,10	8,95
Psicrotrófico	1,00	1,48	1,06	0,06	5,66
Bolores e leveduras	1,00	2,04	1,19	0,14	11,36
9 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,70	1,25	0,10	7,64
Psicrotrófico	1,00	3,69	1,76	0,34	19,49
Bolores e leveduras	1,00	2,38	1,27	0,19	14,75
12 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	2,11	1,63	0,16	9,56
Psicrotrófico	1,00	3,72	2,60	0,37	14,12
Bolores e leveduras	1,00	3,72	2,40	0,35	14,66
15 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	2,40	1,24	0,18	14,31
Psicrotrófico	1,00	4,90	3,72	0,47	12,76
Bolores e leveduras	1,00	4,94	3,45	0,51	14,69
18 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,30	1,06	0,04	3,86
Psicrotrófico	1,00	6,23	5,10	0,64	12,65
Bolores e leveduras	2,00	6,28	4,80	0,66	13,71
21 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,78	1,27	0,10	8,13
Psicrotrófico	3,72	6,79	6,18	0,36	5,80
Bolores e leveduras	2,40	6,69	5,68	0,58	10,14

TABELA A8. Média, desvio padrão da média, valores mínimo e máximo e, coeficiente de variação do logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em uma amostra de 8 lotes de gemas líquidas irradiadas na dose 4,5kGy, em diferentes tempos de armazenamento (dias)

MICROORGANISMOS	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão da Média	Coeficiente de variação(%)
1 dia de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
Psicrotrófico	1,00	1,30	1,08	0,05	4,57
Bolores e leveduras	1,00	2,00	1,20	0,12	10,33
3 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
Psicrotrófico	1,00	1,48	1,12	0,08	7,01
Bolores e leveduras	1,00	1,30	1,04	0,04	3,61
6 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,30	1,04	0,04	3,61
Psicrotrófico	1,00	1,30	1,08	0,05	4,57
Bolores e leveduras	1,00	1,52	1,07	0,07	6,10
9 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,54	1,07	0,07	6,32
Psicrotrófico	2,00	2,00	2,00	0,00	0,00
Bolores e leveduras	1,00	2,00	1,22	0,13	10,51
12 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,65	1,10	0,08	7,35
Psicrotrófico	2,00	3,00	2,20	0,13	5,71
Bolores e leveduras	1,00	2,78	1,45	0,24	16,49
15 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	1,74	1,18	0,10	8,31
Psicrotrófico	2,00	4,48	2,91	0,34	11,86
Bolores e leveduras	2,00	4,30	3,11	0,29	9,34
18 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	3,69	1,37	0,33	24,24
Psicrotrófico	2,00	6,20	4,13	0,70	17,03
Bolores e leveduras	2,00	5,88	4,29	0,54	12,66
21 dias de prateleira					
Mesófilos	1,00	3,94	1,87	0,34	18,21
Psicrotrófico	2,00	6,58	4,66	0,72	15,40
Bolores e leveduras	2,18	6,64	4,80	0,59	12,22

TABELA A9: Estimativa dos parâmetros, erro padrão assintótico e intervalo de confiança assintótico ao nível de probabilidade de 95%, de modelos de regressão ajustados ao logaritmo decimal ($\log_{10}$) das contagens totais de Mesófilos, Psicrotróficos e Bolores e Leveduras em uma amostra de 8 lotes de gemas líquidas pasteurizadas termicamente e irradiadas nas doses 2,5 kGy, 3,5 kGy e 4,5kGy.

TRATAMENTO	MICROORGANISMOS	Parâmetros	Estimativa	Erro padrão assintótico	Intervalo de Confiança Assintótico ao nível de probabilidade de 95%	
					Limite Inferior	Limite Superior
Pasteurização Térmica	Mesófilos ($d_m=1,01$)	α	6,19	0,24	5,71	6,67
		β	4,59	0,36	3,86	5,31
		sse	9,01			
	Psicrotróficos ($d_m=0,83$)	α	7,21	0,14	6,94	7,49
		β	3,82	0,20	3,41	4,24
		sse	6,10			
	Bolores e Leveduras ($d_m=0,86$)	α	5,83	0,24	5,35	6,31
		β	5,95	0,45	5,04	6,86
		sse	6,60			
2,5 kGy	Psicrotróficos ($d_m=1,82$)	α	6,08	0,25	5,57	6,59
		β	14,13	1,80	10,52	17,75
		Sse	42,98			
	Bolores e Leveduras ($d_m=1,60$)	α	3,81	0,24	3,34	4,28
		β	16,36	3,00	10,34	22,38
		Sse	33,09			
3,5kGy	Psicrotróficos ($d_m=1,98$)	α	6,36	0,53	5,30	7,43
		β	15,53	2,43	10,66	20,39
		Sse	58,85			
	Bolores e Leveduras ($d_m=2,12$)	α	6,03	0,60	4,84	7,23
		β	17,19	3,00	11,20	23,18
		Sse	6,03			
4,5kGy	Psicrotróficos ($d_m=2,10$)	α	4,30	0,53	3,25	5,35
		β	12,91	3,25	6,41	19,40
		Sse	68,10			
	Bolores e Leveduras ($d_m=1,76$)	α	4,02	0,29	3,44	4,60
		β	262,76	57,04	148,74	376,77
		Sse	46,55			

sse = soma de quadrados do erro. (d_m =semi amplitude do intervalo de confiança (LS - LI) para o verdadeiro valor do log 10 da contagem total ao nível de probabilidade de 95%)

