

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**SOBREVIVÊNCIA DE *Salmonella enteritidis* EM OVOS
ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS E SUBMETIDOS A
DIFERENTES TIPOS DE COCÇÃO E EM ALIMENTOS
PREPARADOS A BASE DE OVOS E CONSUMIDOS SEM
TRATAMENTO TÉRMICO**

MAGALY ANANIAS AFONSO 66
Engenheira de Alimentos

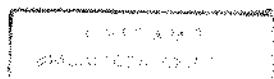
PROF. DR. EDIR NEPOMUCENO SILVA †
Orientador

Tese apresentada Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, para
obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

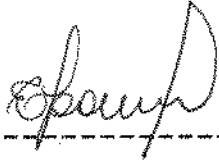
Paricez

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Magaly Ananias Afonso
e aprovada pela Comissão Julgadora em
25/04/94.*

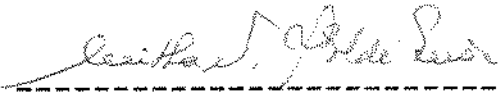
Campinas, SP.
1994



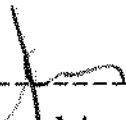
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva
Orientador



Dra. Mirtha Nelly Uboldi Eirca
Membro



Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuage
Membro



Prof. Dr. José Luiz Pereira
Membro

Campinas, 25 de Abril de 1994

A meus pais, instrumentos de
Deus na concessão da Vida e
mestres primeiros nos caminhos
do aprendizado dessa jornada

Ao Admir, companheiro sempre
presente no decorrer desse
trabalho

Ao Gustavo, meu filho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. EDIR NEPOMUCENO DA SILVA, Orientador seguro e atento que me conduziu ao longo deste caminho, agradeço a atenção e amizade recebidas.

As funcionárias do Laboratório de Higiene, Dirce, Raquel e Dona Jacinta, agradeço a colaboração técnica na execução desta tese e a amizade sincera e desprendida com que me agraciaram, suavizando os momentos mais difíceis.

Aos companheiros do Laboratório de Higiene de Alimentos, cuja amizade e colaboração muito contribuíram para a execução deste trabalho.

A Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes pela gentileza do texto em inglês.

A Neusely da Silva, amiga sempre presente, agradeço a atenção e sugestões oferecidas durante a execução desta tese.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a elaboração desta tese.

ÍNDICE GERAL

Página

ÍNDICE GERAL.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1. Fontes de Salmonelas para as Aves.....	6
3.2. Controle da Infecção por Salmonelas em Aves.....	7
3.3. <i>Salmonella enteritidis</i> em aves e saúde pública.....	9
3.3.1. Patogenia de <i>Salmonella enteritidis</i> em aves.....	9

3.3.2. <i>Salmonella enteritidis</i> em ovos de galinha (<i>Gallus gallus</i>).....	10
3.4. Fontes de contaminação de ovos por <i>Salmonella</i>	11
3.4.1. Transmissão vertical (transovariana).....	11
3.4.2. Contaminação através da casca.....	12
3.4.3. Temperatura da água.....	12
3.4.4. Temperatura de armazenamento.....	14
3.5. Termorresistência de salmonelas.....	15
3.6. Resistência de salmonelas à acidificação.....	17
3.6.1. Espécie.....	17
3.6.2. Temperatura.....	17
3.6.3. Tipo de ácido utilizado.....	17
3.6.4. Atividade de água.....	17
3.6.5. Número inicial de microrganismos.....	18
3.6.6. Composição do alimento.....	18
3.6.7. Potencial de óxido redução.....	18
3.7. Composição e estrutura do ovo.....	19
3.7.1. Gema.....	19
3.7.2. Clara ou Porção Albuminídica.....	20
3.7.3. Membranas da Casca do Ovo (Interna e Externa).....	20

3.7.4. Câmara de Ar.....	21
3.7.5. Casca.....	21
3.7.6. Poros.....	21
3.7.7. Cutícula.....	22
3.8. Vias de contaminação de ovos por salmonelas.....	22
3.8.1. Penetração da Casca.....	22
3.8.2. Penetração e colonização da membranas da casca.....	24
3.8.3. Crescimento bacteriano na clara do ovo.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Amostra bacteriana.....	32
4.2. Ovos.....	33
4.3. Contaminação artificial dos alimentos.....	33
4.4. Determinação da presença e enumeração da cepa <i>Salmonella enteritidis</i> -Nal ^r em ovos e alimentos artificialmente contaminados.....	34
4.5. Experimentos.....	35
4.5.1. Sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> -Nal ^r em ovos artificialmente contaminados e submetidos a diferentes tipos de preparo e cocção.....	35
4.5.1.1. Ovos cozidos.....	35
4.5.1.2. Ovos mexidos.....	36

4.5.1.3. Ovos tipo pochê.....	37
4.5.2. Sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> -Nal ^r em alimentos à base de ovos e consumidos sem tratamento térmico, artificialmente contaminados e submetidos a diferentes temperaturas de armazenagem.....	37
4.5.2.1. Maionese.....	38
4.5.2.2. Glacê de clara.....	39
4.5.2.3. Gemada.....	39
4.5.2.4. Sorvete de Creme.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1. Resultados do efeito do tempo de cocção em água em ebulição e em forno microondas sobre a sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> em ovos contaminados.....	41
5.1.1. Os resultados do efeito do tempo de cocção em água em ebulição e em forno microondas sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em ovos artificialmente contaminados.....	41
5.1.2. Efeito da cocção em água e em forno microondas sobre a sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> em ovos contaminados.....	47
5.1.3. Resultados da cocção em água em ebulição e em forno microondas na sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> em ovos pochê contaminados.....	49
5.1.4. Resultados de dois procedimentos de cocção de ovos pochê na eliminação da contaminação por <i>Salmonella enteritidis</i>	54
5.1.5. Resultados do tempo de cocção em água em ebulição e em microondas sobre a sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> em ovos mexidos contaminados.....	55

5.2. Resultados da sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> em alimentos à base de ovos e consumidos sem tratamento térmico, artificialmente contaminados e submetidos a diferentes tempos de armazenagem.....	57
5.2.1. Resultados do efeito do tempo de congelamento à -18°C sobre sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> em sorvete caseiro contaminado.....	57
5.2.2. Resultados do tempo de refrigeração (8°C a 10°C) sobre a sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> em glacê caseiro de clara contaminado.....	60
5.2.3. Resultados da sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> em gemada contaminada.....	63
5.2.4. Efeito do pH e tempo de armazenamento à 25°C sobre a sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> em maionese caseira contaminada.....	64
5.2.5. Efeito do pH e tempo de armazenamento refrigerado à 8°C sobre a sobrevivência de <i>Salmonella enteritidis</i> em maionese contaminada.....	66
5.2.6. Efeito do tempo e temperatura de armazenagem sobre o pH de maionese contaminada com <i>Salmonella enteritidis</i>	68
5.2.7. Efeito do pH, tempo e temperatura de armazenagem sobre a sobrevivência de bolores e leveduras em maionese contaminada com <i>Salmonella enteritidis</i>	69
6. CONCLUSÃO.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
8. ANEXO.....	90

ÍNDICE DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Taxas de destruição de alguns sorotipos de salmonelas em ovo integral homogeneizado em diferentes combinações de tempo e temperatura.....	15
TABELA 2 - Componentes antimicrobianos da clara do ovo de galinha.....	28
TABELA 3 - Resultado do tempo de cocção em água em ebulição sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em ovos artificialmente contaminados.....	42
TABELA 4 - Resultados do tempo de cocção em forno microondas (490w/2450Hz) sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em ovos artificialmente contaminados.....	47
TABELA 5 - Resultados de dois procedimentos de cocção sobre sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em ovos artificialmente contaminados.....	48
TABELA 6 - Resultados da cocção em água em ebulição sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em ovos pochê artificialmente contaminados.....	51
TABELA 7 - Resultados do tempo de cocção em forno microondas (490w/2450Hz) sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em ovos Pochê artificialmente contaminados.....	53

TABELA 8 - Resultados de dois procedimentos de cocção sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em ovos Pochê artificialmente contaminados.....	55
TABELA 9 - Resultados da cocção em chama de gás sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em ovos mexidos artificialmente contaminados.....	56
TABELA 10 - Resultados da cocção em forno microondas (490w/2450Hz) sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em ovos mexidos artificialmente contaminados.....	57
TABELA 11 - Resultados do tempo de congelamento em freezer a -18°C sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em sorvete caseiro artificialmente contaminado.....	59
TABELA 12 - Resultados do tempo de refrigeração (8°C) sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em glacê caseiro de clara artificialmente contaminado.....	62
TABELA 13 - Sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em gemada artificialmente contaminada.....	63
TABELA 14 - Resultado do pH e tempo de armazenamento a 25°C sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em maionese caseira artificialmente contaminada.....	65
TABELA 15 - Efeito do pH e tempo de armazenamento a 8°C sobre a sobrevivência de <i>S. enteritidis</i> em maionese caseira artificialmente contaminada...	67

TABELA 16 - Efeito do tempo e da temperatura de armazenagem sobre o pH de maionese caseira artificialmente contaminada com <i>S. enteritidis</i>	69
TABELA 17 - Efeito do pH, tempo e temperatura de armazenagem sobre a sobrevivência de bolores e leveduras em maionese caseira artificialmente contaminada com <i>S. enteritidis</i>	70

RESUMO

Determinou-se a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos artificialmente contaminados e submetidos à cocção em chama de gás e forno de microondas (FMO), e, em alimentos preparados com ovos contaminados e submetidos a diferentes temperaturas de armazenagem. Foi utilizado *Salmonella enteritidis* patogênico, fagotipo 28 isolado de aves e ovos brancos de galinhas comerciais. Os alimentos contaminados com aproximadamente 10^6 a 10^8 UFC e examinados foram: ovos cozidos em água em ebulição por até oito minutos, ou em forno microondas por 1 minuto, ovos mexidos; ovos tipo pochê; maionese, glacê de clara, gemada e sorvete de creme. A recuperação da *Salmonella enteritidis* contaminante foi feita quantitativamente através do plaqueamento em duplicata de alíquotas de diluições decimais da amostra sobre agar e, qualitativamente, com enriquecimento da mesma para verificar presença ou ausência de células viáveis na amostra original. A cocção de ovos em FMO foi mais eficiente na eliminação de *Salmonella enteritidis* que a em água, num mesmo período de tempo. A cocção de ovos em água em ebulição, até 8 minutos, reduziu drasticamente, mas não foi capaz de eliminar totalmente a contaminação por *Salmonella enteritidis*. A cocção de ovos em FMO por 1:00 minuto reduziu drasticamente, mas não foi capaz de eliminar totalmente a contaminação por *Salmonella enteritidis*. O preparo convencional de ovos tipo pochê em chama de gás reduziu drasticamente, mas não foi capaz de eliminar totalmente a contaminação por *Salmonella enteritidis*. Novamente, a cocção de ovos tipo pochê em FMO eliminou totalmente a contaminação por *Salmonella enteritidis* de ovos inoculados, quando o tempo de cocção era igual ou superior a 1m:30s. A cocção de ovos mexidos em ambos os métodos foi capaz de eliminar totalmente a contaminação de ovos inoculados. Sorvete

contaminado, mantido a -18°C , teve grande redução na sua contaminação original por *Salmonella enteritidis* mas deixou, ainda, uma população residual após 35 dias de armazenagem. A população inicial de *Salmonella enteritidis* contaminante da glacê de clara reduziu gradativamente na armazenagem refrigerada (8°C) mas, continha, ainda, população residual após 7 dias. A escaldagem com o leite fervente no preparo da gemada artificialmente inoculada exerceu efeito "pasteurizante" destruindo quase totalmente a contaminação por *Salmonella enteritidis*. A detecção de células viáveis sobreviventes (<101 UFC/g) só foi possível através de cultivo qualitativo. Tanto a variação do pH (3,80 a 4,04), do tempo (4 a 72 horas), quanto a variação da temperatura de armazenagem (8 e 25°C) tiveram pequeno ou nenhum efeito na redução ou aumento da contaminação por *Salmonella enteritidis* de maionese. A população de fungos e leveduras aumentou gradativamente quando maionese contaminada com *Salmonella enteritidis* foi mantida a 25°C , mas não quando estocada a 8°C , no período de 72 horas, independente da variação do pH da amostra de 3,80 a 4,04. Nossos experimentos determinaram que alimentos que contenham ovos e os ovos propriamente ditos, quando apresentam uma carga alta da contaminante como *Salmonella enteritidis* podem, em alguns casos, trazer risco à saúde do consumidor quando sofrem preparo doméstico convencional.

SUMMARY

The survival of *Salmonella enteritidis* was determined in artificially contaminated eggs cooked using both a gas flame and microwave oven (MWO). It was also determined in foods prepared with contaminated eggs and stored at different temperatures. The pathogenic *Salmonella enteritidis* used was phagotype 28, isolated from chicken meat and white eggs produced commercially. The following foods were examined, having been contaminated with approximately 10^6 to 10^8 UFC: eggs cooked in boiling water for 8 minutes or in the microwave oven for 1 minute, scrambled eggs, poached eggs, mayonnaise, eggwhite glaze, milk drink containing beaten egg yolk, vanilla ice-cream. The quantitative recuperation of *Salmonella enteritidis* contamination was carried out by plating decimal dilutions of the sample on agar in duplicate. For the qualitative determination, an enrichment procedure was used to check for the presence or absence of viable cells in the original sample. Using the same time period, MWO cooking was more efficient than boiling water in eliminating *Salmonella enteritidis*. Boiling in water for 8 minutes reduced the count drastically, but was not capable of eliminating the *Salmonella enteritidis* completely. Similarly, poaching eggs over a gas flame reduced the count drastically but did not completely eliminate *Salmonella enteritidis* contamination, whereas MWO totally eliminated it if a cooking time equal or greater to 1 min 30 sec was used. Both methods of cooking scrambled eggs completely eliminated the contamination. When contaminated ice-cream was stored at -18°C , a considerable reduction in the *Salmonella enteritidis* count occurred, but after 35 days of storage, there was still a residual population. In egg white glaze the initial population of *Salmonella enteritidis* declined gradually during refrigerated storage (8°C), but there was still a residual population after 7 days. In the milk drink containing beaten egg yolk, the scalding of the contaminated yolk with boiling milk effectively pasteurized the yolk, almost completely destroying

the *Salmonella enteritidis* contamination. The detection of surviving viable cells was only possible by way of qualitative cultivation ($<10^1$ /UFC/g). With respect to mayonnaise, variations in pH (3.80 - 4.04), time (4-72 hours) and storage temperature (8-25°C) had little or no effect on the reduction or increase of the *Salmonella enteritidis* contamination. The yeast and mould count increased gradually when mayonnaise contaminated with *Salmonella enteritidis* was held at 25°C, but not when held at 8°C for a period of 72 hours, independent of the variation in sample pH (from 3.80 to 4.04). These experiments showed that foods containing eggs can, in some cases, present health risks to the consumer when prepared by conventional domestic methods, if the original eggs show a high level of contamination by *Salmonella enteritidis*.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella enteritidis tem sido o sorotipo de maior significância recente em surtos de infecções por *Salmonella sp* nos Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Reino Unido e alguns países europeus envolvendo ovos, ou alimentos preparados com os mesmos (COYLE et al., 1988, LIN et al., 1988, ST. LOUIS et al., 1988, ANÔNIMO, 1989, SPACKMAN, 1989; HUMPHREY, 1990, CDC, 1990).

A primeira forte evidência do envolvimento de *Salmonella enteritidis*, ocorreu num grande surto em 1986 nos EUA, implicando massa comercial congelada e cheada com mistura de queijo, condimentos esterilizados e ovos crus (POTTER, 1987). O levantamento epidemiológico levou ao isolamento de *Salmonella enteritidis*, de várias amostras oriundas de granjas que forneceram ovos, além de outras espécies de salmonelas.

Uma análise retrospectiva realizada nos EUA, dos surtos de infecção alimentar com causas determinadas revelou que, entre 1973 a 1984, 43% dos surtos causados por *Salmonella enteritidis* foram veiculados por ovos, e 18% dos surtos ocorreram devido a outros sorotipos de *Salmonella*. A continuidade das análises revelou que no período compreendido entre janeiro de 1985 à maio de 1987, em 77% destes surtos, as infecções foram veiculadas por ovos tipo A, consumidos mal cozidos ou crus (ST. LOUIS et al., 1988).

Em 1987, segundo o Centers for Diseases Control (CDC), dos Estados Unidos da América (EUA), a *Salmonella enteritidis* foi o agente etiológico responsável em 53 surtos alimentares, envolvendo 2498 pessoas e causando 15 óbitos. Destes casos, 80% envolveram ovos ou alimentos contendo ovos. Em 1988, ocorreram 40 surtos e a *Salmonella enteritidis* foi isolada de 6970 amostras. Em 1989, foram relatados 77 surtos ao CDC, dos quais 20% foram causados por *Salmonella enteritidis* e 21% causados por *Salmonella*

typhimurium. Esses números são muito próximos, que demonstram a ascensão da incidência de *Salmonella enteritidis*, pois até então *Salmonella typhimurium* era o sorotipo mais prevalente.

Estudos iniciados na Grã-Bretanha e confirmado em outros países, demonstraram que o fagotipo 4 é o mais prevalente (SPACKMAN, 1989). Esse fagotipo tem mostrado ser mais invasivo para aves que outros examinados (HINTON, 1990a).

Enquanto no Reino Unido os surtos de infecção de origem alimentar são causados por *Salmonella enteritidis* fagotipo 4 (COYLE et al., 1988, ANÔNIMO, 1989, RAMPLING et al., 1989, COWDEN et al., 1989), nos EUA e Canadá o fagotipo 8 (CDC, 1990) é predominante.

No Brasil, a *Salmonella enteritidis* foi isolada recentemente de galinhas reprodutoras que apresentavam sinais clínicos de salmonelose aviária e mortalidade considerável (FERREIRA et al., 1990). Exames dessas cepas, realizadas na Grã-Bretanha, revelaram pertencer ao fagotipo 28. Este constitui o primeiro relato de *Salmonella enteritidis* em aves no nosso país, e, não há razões para acreditar que sua ocorrência esteja restrita a este único surto.

Segundo dados dos Estados Unidos da América, a maioria dos casos de infecção por *Salmonella enteritidis* ocorre como casos esporádicos ou limitados a surtos familiares e não como grandes surtos de fonte comum (CDC, 1990; CDC, 1992).

Na maioria dos casos de infecção por *Salmonella enteritidis* foram incriminados alimentos contendo ovos, ou ovos *in natura*, inadequadamente cozidos ou consumidos crus (ST. LOUIS et al., 1988). Nos últimos anos, a maionese caseira tem sido o alimento mais frequentemente envolvido nas infecções alimentares na ESPANHA e, a *Salmonella enteritidis*, o agente etiológico da maioria dos surtos (PERALES e AUDICANA, 1989).

Nos EUA, a prevalência de ovos contaminados com *Salmonella enteritidis* foi estimada em 0,01% (1 ovo/10.000) segundo o Center for Diseases Control (CDC, 1990; CDC, 1992). No Reino Unido, a prevalência de conteúdo positivo para esse microrganismo foi estimada em 0,1%, isto é (1 ovo/1000), segundo o Public Health Laboratory Service (ANSHIMO, 1989).

Nos últimos anos tem sido crescente a utilização de microondas no preparo caseiro de alimentos, comparando-se aos equipamentos convencionais que utilizam gás ou eletricidade (ANNIS, 1980; FUNG e CUNNINGHAM, 1980). Neste processo, denominado "cozção à frio", o calor é gerado no interior do próprio alimento, quando as moléculas polares constituintes do alimento ficam submetidas à fortes campos elétricos alternantes: a radiação eletromagnética, e o rápido alinhamento das moléculas do alimento com o campo elétrico, produz atrito intermolecular, gerando calor e, dessa forma, produzindo a cozção do interior para o exterior do alimento (HARRISON, 1980; ANNIS, 1980).

Entretanto, a maior rapidez no processo de cozção do alimento através de microondas, implica na redução do tempo e da temperatura aos quais ficam expostos os microrganismos eventualmente presentes no alimento (SPITE, 1984). O efeito de microondas sobre os microrganismos que possam estar presentes no alimento, depende de fatores como: pH, potencial de oxidação-redução, nutrientes, e fatores extrínsecos como temperatura, umidade, frequência, intensidade e tempo de exposição à irradiação eletromagnética. Também interferem na eficiência da irradiação a constituição física e química dos microrganismos que estão sendo irradiados, seu estágio vital, e o número inicial de células viáveis presentes (CHEN ET AL., 1973; CRAVEN e LILLARD, 1974; TEOHIA e MILLER, 1975; CUNNINGHAM, 1978; FUNG e CUNNINGHAM, 1980; HARRISON, 1980; BLANCO e DAWSON, 1984).

A aplicação de microondas durante dois minutos em galinha cozida, caldo de galinha e galinha ao molho branco reduziu a população de *S. senftenberg*, *S. typhimurium* e *S. aureus* para menos de 10 UFC/g, partindo de um inóculo inicial de 10^5 - 10^7 UFC/g (WOODBURN et al., 1962). Esta mesma aplicação em produtos contendo clara de ovo artificialmente contaminada com *S. typhimurium*, gerou resultados conflitantes. na torta de limão, houve eliminação do microrganismo, mas não na torta de chocolate (BALDWIN et al., 1968).

Nossos experimentos visam apresentar dados inéditos sobre o que aconteceria com esta amostra "brasileira" da *Salmonella enteritidis* se ela contaminasse ovos e os mesmos fossem utilizados pouco cozidos ou em determinados alimentos preparados a base de ovos.

2. OBJETIVOS

- 2.1. Determinar a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos artificialmente contaminados e submetidos a diferentes tipos de preparo e cocção.
- 2.2. Determinar a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em alimentos preparados com ovos, artificialmente contaminados e submetidos à diferentes temperaturas de armazenagem.

3- REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Salmonella* persiste em considerável importância na indústria avícola mundial, em virtude das patologias produzidas, que podem resultar em grandes perdas econômicas, assim como devido à extensa associação com infecções humanas de origem alimentar.

O termo salmonelose aviária designa três tipos de patologias aviárias, causadas por espécies do gênero *Salmonella*. *Salmonella pullorum* e *Salmonella gallinarum* são espécies hospedeiro-específicas das aves e agentes etiológicos da pulorose e do tifo aviário, respectivamente. As demais espécies de *Salmonella* podem determinar patologias aviárias denominadas infecções paratífóides, ou apenas colonizar o trato intestinal das aves, e são denominadas grupo paratífóide. O grupo paratífóide inclui espécies mais virulentas e invasivas ou linhagens epidêmicas, como *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*, que penetram na cadeia alimentar humana, causando infecções humanas de origem alimentar.

3.1. Fontes de Salmonelas para as Aves

Em geral as infecções paratífóides aviárias estão relacionadas com a contaminação e a penetração de salmonelas através da casca dos ovos. A superfície externa da casca dos ovos pode ser contaminada durante a postura, pelo contato com as fezes da matriz portadora, e a penetração ocorre através dos poros, sendo favorecida pela umidade, temperatura, tempo de exposição, espessura da caeca, etc. (PADRON, 1990; WILLIAMS e DILLARD, 1968).

Desse modo, as salmonelas são transportadas para o interior do ovo ou são introduzidas na incubadora. As salmonelas são altamente prevalentes no ambiente da incubadora, onde a temperatura, aeração e umidade adequadas ao desenvolvimento embrionário, favorecem a multiplicação microbiana (COX, 1989).

As salmonelas podem penetrar no ambiente da granja através da compra de aves contaminadas, ou através de vetores: homem, equipamentos de manejo, água, ração, roedores, aves e animais, domésticos ou silvestres.

As aves se infectam por via oral e a ração é considerada o principal veículo de contaminação por salmonelas através dessa via. As farinhas de origem animal, que contêm subprodutos de origem animal como carne, ossos, vísceras, penas, sangue, pescado, etc., e que são incorporados na fabricação das rações, são as principais responsáveis pela introdução de salmonelas nas mesmas. (SILVA, 1973, BERCHIERI Jr. et al., 1993).

No caso de se utilizar rações paletizadas, a recontaminação por salmonelas pode ocorrer através de manejo inadequado, manipulação humana ou armazenamento inadequado.

3.2. Controle da Infecção por Salmonelas em Aves

No controle da infecção por salmonelas em aves, as medidas sanitárias visam reduzir a penetração de salmonelas nas granjas, minimizar sua transmissão via ovos e eliminar suas consequências na prole. Elas podem ser agrupadas em três grandes etapas.

a. Compra de aves com garantia de estarem isentas de salmonelas;

- b. Manutenção dos lotes de aves isentos de contaminação por salmonelas, adotando as medidas de biossegurança possíveis,
- c. Para reduzir os riscos de contaminação via-ração, as matérias-primas de origem animal tem sido eliminadas das formulações. Também tem sido adotados processos de peletização e tratamentos químicos das rações que reduzem mas não eliminam a contaminação das mesmas (HINTON et al., 1990, HINTON e BALE, 1990, McCAPES et al., 1989).

Trabalhos experimentais recentes, têm demonstrado que a adição de ácidos orgânicos (ácido fórmico, ácido propiônico) e lactose, previnem a recontaminação das rações e o estabelecimento das infecções aviárias (HINTON e LINTON, 1988; CORRIER et al., 1990a,b, ZIPRIN et al., 1990, McHAN et al., 1991, FURUSE et al., 1991; McHAN e SHOTS, 1992, NISBET et al., 1993).

As aves possuem mecanismo natural de proteção no trato digestivo contra as infecções paratífóides. Esse mecanismo é constituído pela microbiota normal do intestino, principalmente a anaeróbica, que produz metabólitos (bacteriocina e ácidos graxos de cadeia curta, por ex.), estabelecendo um mecanismo de competição exclusiva, que evita a entrada de uma determinada bactéria num local específico, devido ao sítio de ligação deste já estar ocupado por outro microrganismo. Estes mecanismos naturais tem sido extensivamente pesquisados e utilizados ultimamente (NURMI e RANTALA, 1973, STAVRIC, 1993).

Apesar dessas técnicas disponíveis, a erradicação das salmonelas do grupo paratífóide das produções avícolas permanece impossível. Entretanto, a presença de *Salmonella sp* no trato intestinal das aves não parece interferir com sua produtividade. (SPEARS et al., 1990).

3.3. *Salmonella enteritidis* em aves e saúde pública

3.3.1. Patogenia de *Salmonella enteritidis* em aves

A *Salmonella enteritidis* é um sorotipo invasivo, isto é ela coloniza e penetra o trato intestinal das aves, atinge a corrente sanguínea, causando uma bacteremia, invadindo e atingindo órgãos como fígado e ovário e induzindo a produção de anticorpos específicos. A infecção das aves causa a contaminação dos ovos, resultando em progênie infectada ou ovos comerciais contaminados. O grau de patogenicidade, invasibilidade e transmissibilidade é muito variável dentro as cepas de *Salmonella enteritidis* (GAST e BEARD, 1992a).

A infecção sistêmica das aves por *Salmonella enteritidis*, pode ou não provocar os sintomas clássicos da depressão, anorexia, redução de postura e diarreia. A ocorrência desses sinais clínicos vai depender da dose infectiva, virulência da cepa, resistência genética e idade das aves (GAST e BEARD, 1992b; SHIVAPRASAD et al., 1990).

A reprodução clínica experimental da enfermidade é fácil mas, a ocorrência natural dos sintomas clínicos é muito rara.

Na Grã-Bretanha, o fagotipo mais prevalente de *Salmonella enteritidis* é o fagotipo 4, causando infecção em matrizes pesadas (LISTER, 1988). Esse fagotipo é mais invasivo para pintos e poedeiras que outros examinados (HINTON, 1990a, BARROW, 1991) e sua maior virulência é devida a presença de determinados plasmídeos (SINGER et al., 1992).

3.3.2. *Salmonella enteritidis* em ovos de galinha (*Gallus gallus*)

Uma proporção significativa de surtos de origem alimentar causados por *Salmonella enteritidis* nos últimos anos, tem sido atribuído ao consumo de ovos contaminados ou alimentos contendo ovos (St. LOUIS et al., 1988, Centers for Disease Control (CDC), 1990).

As investigações epidemiológicas dos diversos surtos causados por *Salmonella enteritidis* buscou a origem da infecção dos ovos implicados, lavando a lote de poedeiras infectadas (TELZAK et al., 1990).

A conexão entre o estado de infecção por *Salmonella enteritidis*, determinado por amostras ambientais e órgãos das aves, e a probabilidade de produção de ovos infectados pelo microrganismo, não é ainda completamente compreendida (GAST, 1993a).

Mesmo com alto grau de infecção sistêmica de aves por *Salmonella enteritidis*, elas eliminam o microrganismo via intestinal com mais persistência que via ovos. Os ovos somente são contaminados em alta frequência durante a fase aguda da infecção, durante uma a duas semanas, depois permanece baixa por longo período, até vinte a duas semanas. A infecção dos ovos por *Salmonella enteritidis* é mais frequente durante a postura e a penetração via casca do que pela via transovariana (MAWER et al., 1989, TIMONEY et al., 1989, SHIVAPRASAD et al., 1990, GAST e BEARD, 1990a, b, GORHAM et al., 1991, BARROW et al., 1991c, BARROW e LOVELL, 1991b, HUMPHREY et al., 1991a).

Após a infecção experimental de galinhas, *Salmonella enteritidis* coloniza o trato intestinal das aves e é liberada nas

fazas (GAST e BEARD, 1990a), invade via corrente sanguínea para atingir os órgãos (GAST e BEARD, 1990c), elicita níveis detectáveis de soro específico e anticorpos na gema do ovo (GAST e BEARD, 1990b, 1991) e o microrganismo é localizado no conteúdo dos ovos (GAST e BEARD, 1990a, 1992b). Não foi observada uma correlação previsível entre os parâmetros de infecção e a produção de ovos contaminados por *Salmonella enteritidis* (HUMPHREY et al., 1991a, GAST e BEARD, 1992a), entre aves infectadas natural ou experimentalmente.

Em aves poedeiras infectadas experimentalmente, tem sido detectado baixo número de células de *Salmonella enteritidis*, cerca de 10^3 UFC (HUMPHREY et al., 1991a). Em aves naturalmente infectadas, observou-se a produção de ovos com gema e clara contaminadas (HUMPHREY et al., 1989b). Contudo, uma extensa pesquisa em ovos de lotes de poedeiras comerciais infectadas na Grã-Bretanha, indicou que menos de 1% dos ovos examinados estavam contaminados por *Salmonella enteritidis*, sendo que a maioria continha baixo número de células viáveis (HUMPHREY et al., 1991b).

3.4. Fontes de contaminação de ovos por *Salmonella*

Várias são as formas através das quais pode ocorrer a penetração, o crescimento e a transmissão de *Salmonella enteritidis* em ovos, ou alimentos que os contenham como ingredientes.

3.4.1. Transmissão vertical (transovariana)

Os folículos ováricos das aves sofrem infecções crônicas causadas por *Salmonella enteritidis* e outras espécies como *S. pullorum* e *S. gallinarum*; a transmissão do microrganismo ocorre durante a formação do ovo, e a prole nasce infectada. A

infecção transovariana é sugerida como uma das prováveis formas de contaminação do conteúdo do ovo, durante sua formação e antes da deposição da casca (St. LOUIS et al., 1988).

3.4.2. Contaminação através da casca

As aves excretam a bactéria de forma intermitente através das fezes e contaminam seu meio ambiente (água, ninho, cama e ração). Essa forma de contaminação é considerada a mais frequente (PADRON, 1990) e pode ocorrer de diversas formas:

- a. Postura de ovos em condições não-higiênicas - ocorre pelo contato dos ovos com os excrementos contaminados da matriz portadora ou por material de ninho contaminado;
- b. Umidade - A presença de umidade nos ninhos ou estalares coletoras de ovos, favorecem a penetração microbiana para o interior dos ovos (PADRON, 1990). Ovos secos e limpos são essenciais para a produção e manutenção de produto de boa qualidade microbiológica,
- c. Água de lavagem dos ovos - Pode veicular a penetração microbiana para o interior do ovo, de vários modos;

3.4.3. Temperatura da água

A existência de um grande diferencial de temperatura entre a água de lavagem e os ovos, produz a contração do conteúdo destes, gerando pressão negativa no seu interior e, desse modo, sucionando os microrganismos presentes na superfície para o interior do ovo;

- pH da água de lavagem - Durante o transcorrer do processo de lavagem, a água fica carregada de matéria orgânica e impurezas

do solo, alterando o pH para próximo da neutralidade e favorecendo o crescimento microbiano. A ausência e o controle impróprio de temperatura e pH da água podem acarretar em maior carga bacteriana nos ovos após etapa de lavagem.

- Qualidade microbiológica da água utilizada na lavagem dos ovos,
- Água com alto teor de ferro - A presença excessiva desse íon metálico na água pode favorecer a contaminação microbiana do ovo, devido à ausência da Conalbumina. Esse componente bacteriostático presente na clara é agente sequestrante de ferro e não fica disponível para impedir o crescimento de microrganismos.
- Efeito do sanitizante utilizado - A escolha do sanitizante utilizado na água de lavagem pode ter efeitos positivos ou deletérios.

RISK et al. (1966), pesquisando ovos artificialmente contaminados com salmonelas, encontraram que vários sanitizantes à base de cloro e compostos quaternários de amônio foram efetivos na remoção dos microrganismos presentes na casca, não demonstrando efetividade contra os que conseguiram penetrar no interior do ovo.

GILLESPIE (apud Hoats, 1978) relatou que o uso de sanitizante composto quaternário de amônio teve sua efetividade reduzida com o decorrer do uso, sugerindo que ocorreu adaptação bacteriana, principalmente do gênero *Pseudomonas*, um dos principais deterioradores de ovos.

Recentemente tem sido sugerida a postura em condições higiênicas dos ovos, coletas diversas vezes ao dia, limpeza a seco da superfície e refrigeração imediata dos mesmos na faixa

+20°C até +8°C. Ovos armazenados em condições de temperatura que permitem a multiplicação microbiana sofrem um aumento significativo no número de células viáveis no conteúdo dos ovos (GAST e BEARD, 1992a).

d. Espessura da casca - é influenciada por quantidades de elementos nutricionais presentes na dieta das aves, especialmente cálcio, fósforo, vitamina D e provavelmente magnésio (ROMANOFF e ROMANOFF, 1963);

e. Ovos sujos e quebrados - O contato com esse tipo de ovos pode acarretar na contaminação de toda uma partida de ovos.

3.4.4. Temperatura de armazenamento

O gênero *Salmonella* é capaz de crescer numa ampla faixa de temperatura que vai de +5°C até +45°C, com temperatura ótima em 35°C-37°C. A importância da temperatura de armazenamento no controle microbiológico de salmonelas foi relatado por BRADSHAW et al. (1990) em ovos artificialmente contaminados via gema com *Salmonella enteritidis*: o tempo de geração foi de 25 minutos à 37°C e de 3 horas e 30 minutos à 15,5°C. Os mesmos autores não observaram nenhum crescimento bacteriano em ovos incubados 94 dias à +7°C. *Salmonella enteritidis* multiplica-se rapidamente em ovos armazenados na faixa de +10°C até +15°C (HUMPHREY, 1990a). À 26°C, o número de células viáveis é superior a 8×10^6 após 16 dias de armazenamento (HAMMACK et al., 1993).

Após a coleta, os ovos devem ser imediatamente refrigerados à temperaturas na faixa de +2°C até +8°C.

Nas plantas processadoras de ovos é ainda mais importante a manutenção da refrigeração, pois ocorre uma mistura de grande quantidade de ovos. Um só ovo contaminado pode prejudicar toda a partida, se as condições de armazenamento não forem obedecidas.

Estudos recentes nos EUA, demonstraram que a presença de *Salmonella enteritidis* foi muito elevada em ovo líquido não-pasteurizado, realizado em vinte plantas processadoras de ovos, revelou que 52% das amostras eram positivas para *Salmonella sp.* dentre um total de 1002 isolamentos, 13% eram *Salmonella enteritidis* pertencentes a diferentes fagotipos (EBEL et al., 1993). Porém, a pasteurização em condições padrões, 60°C durante 3 minutos e 30 segundos destrói *Salmonella enteritidis* presente em ovos líquidos (BAKER, 1990).

3.5. Termorresistência de salmonelas

A termorresistência de *Salmonella enteritidis* é similar a de outras espécies de salmonelas (BAKER, 1990), exceção feita à *S. senftenberg 775W* que apesar de ser extremamente termorresistente é de ocorrência pouco comum. Qualquer forma de cocção, onde a gema ou parte dela permaneça líquida, permite a sobrevivência do microorganismo (HUMPHREY et al., 1989a).

TABELA 1

Taxas de destruição de alguns sorotipos de salmonelas em ovo integral homogeneizado em diferentes combinações de tempo e temperatura

Microorganismo	55°C/5m	60°C/2m	64°C/1m
<i>S. enteritidis</i> fagotipo 4	6,4	0,44	0,22
<i>S. enteritidis</i> fagotipo 8	5,9	0,30	N.T.
<i>S. enteritidis</i> fagotipo 13a	3,9	0,22	N.T.
<i>S. typhimurium</i> 110	4,7	0,26	N.T.
<i>S. typhimurium</i> 141	2,3	0,20	0,15
<i>S. senftenberg 775W</i>	34,3	5,60	2,80

ref. HUMPHREY et al., 1990c

N.T. = não testado

A TABELA 1 demonstra a termorresistência comparativa em ovo integral homogeneizado onde *Salmonella enteritidis* fagotipo 4 demonstrou ser mais termorresistente que outros sorotipos associados a ovos. Entretanto, o mesmo fagotipo demonstrou ser 5 vezes menos termorresistente à 55°C e quase 13 vezes menos termorresistente à 64°C que *S. senftenberg* 775W (HUMPHREY et al., 1990c).

Nesse mesmo trabalho, o autor demonstrou que a termorresistência é afetada pelo meio de suspensão, maior termorresistência na gema que no ovo integral e na clara, nas temperaturas de 55°C e 60°C. A termorresistência também é afetada pela idade da cultura, as células bacterianas na fase estacionária são mais termorresistentes que na fase de crescimento exponencial (HUMPHREY, 1990c). As células bacterianas na gema do ovo rapidamente atingem a fase estacionária (HUMPHREY et al., 1989a) e, nesse estado fisiológico, os microrganismos apresentam aumento na termorresistência (BEAUCHAT e LECHOWICH, 1968). A natureza viscosa da gema do ovo e seu alto conteúdo lipídico também ajudam a proteger as células bacterianas dos efeitos térmicos (HUMPHREY, 1989).

O armazenamento refrigerado dos ovos, além de prevenir a multiplicação de salmonelas torna as células de *Salmonella enteritidis* mais termossensíveis (diminui a termorresistência) favorecendo sua destruição quando da aplicação do processamento térmico (HUMPHREY, 1990b).

Porém, as células termossensibilizadas de *Salmonella enteritidis* recuperam rapidamente sua termorresistência anterior notadamente se incubadas à 37°C por 30 minutos (HUMPHREY, 1990b).

3.6. Resistência de salmonelas à acidificação

O gênero *Salmonella* apresenta tolerância à uma ampla faixa de pH: 4,0 até 9,0.

O pH mínimo que permite o crescimento é dependente de vários fatores, segundo DOYLE e CLIVER (1990).

3.6.1. Espécie

Algumas são mais ácido tolerantes que outras;

3.6.2. Temperatura

Quanto mais próxima da temperatura ótima, maior tolerância à acidez,

3.6.3. Tipo de ácido utilizado

O grupo mais tolerante ao crescimento microbiano inclui: ácidos cítrico, tartárico e clorídrico nos quais a multiplicação celular iniciou-se em valores de pH igual a 4,05. Um grupo intermediário inclui os ácidos: fumárico, glucônico, glutárico, láctico, málico e succínico, nos quais o crescimento iniciou na faixa de pH igual a 4,20-4,70 variando conforme o ácido empregado. A classe de ácidos mais restritiva compreende os ácidos adípicos, pimélicos e os ácidos graxos de cadeia curta (acético e propiônico) (CHUNG e GOEPFERT, 1970).

3.6.4. Atividade de água

Quanto mais próximo da faixa de a_w que permite o crescimento (0,945-0,999), maior tolerância ao pH ácido.

3.6.5. Número inicial de microrganismos

Quanto maior a população inicial, maior capacidade de multiplicação em pH desfavorável.

3.6.6. Composição do alimento

Embora o gênero *Salmonella* não seja fastidioso, cresce melhor em meio rico, em presença de maior número de nutrientes disponíveis.

3.6.7. Potencial de óxido redução

Embora *Salmonella* seja microrganismo anaeróbio facultativo, podendo crescer em condições aeróbias ou anaeróbias, seu crescimento pode ser impedido em potencial OR inferior a -30 mV.

Dentre os alimentos incriminados como veiculadores de infecções por *Salmonella enteritidis*, a maionese preparada com ovos crus, não pasteurizados e molhos prontos para salada são os alimentos mais prevalentes. A sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em pH ácido é parcialmente dependente da temperatura. Na temperatura de 23°C, o microrganismo é rapidamente destruído na faixa de pH igual à 3,0 até 3,50 e apresenta crescimento lento em pH igual a 4,0.

Nas temperaturas de refrigeração, na faixa de +4°C até +8°C, ocorre pouca alteração no número de células viáveis quando a faixa de pH for entre 3,5 até 4,0, porém ocorre rápida perda de viabilidade celular em pH igual a 3,0 ou inferior (HUMPHREY, 1989).

3.7. Composição e estrutura do ovo

O conteúdo dos ovos de galinha (*Gallus gallus*) é constituído principalmente por água (74%), proteínas (12%), lípidos (12%), carboidratos (1%) e matéria inorgânica (1%) (ROMANOFF e ROMANOFF, 1963).

Fonte de proteína de alta qualidade nutricional, são frequentemente utilizados como padrão para outras proteínas alimentares. São importante fonte de Ácidos Graxos Insaturados, principalmente ácido oleico, e contém ferro, fósforo, traços de sais minerais; vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) estão presentes na gema, o complexo B vitamina hidrossolúvel, pode estar presente em ambos, clara e/ou gema. São pobres em cálcio, principal constituinte da estrutura da casca, contém pouca ou nenhuma vitamina C (COOK e BRIGGS, 1973).

O ovo é uma das mais complexas e altamente diferenciadas células reprodutivas. Seus elementos estruturais são arranjados com grande precisão, e sua organização total é essencial para função específica de cada parte (ROMANOFF e ROMANOFF, 1963).

3.7.1. Gema

Contém os nutrientes necessários para suportar o desenvolvimento embrionário. O ovário da galinha contém cerca de 2000 óvulos e a gema é formada em três etapas distintas: durante o desenvolvimento embriônico da fêmea, no desenvolvimento lento do óvulo até atingir a maturidade sexual; no período acelerado de crescimento, cerca de 10 dias antes da ovulação, quando o óvulo é liberado no interior do oviduto da ave, onde pode (ou não) ser fertilizado.

A gema representa cerca de 30-33% do peso total do ovo, e sua estrutura consiste de:

- lãtabra
- disco germinal
- camadas concêntricas da gema (tonalidades claras e escuras)
- membrana vitalina - película envolvente da gema

3.7.2. Clara ou Porção Albuminóide

Representa cerca de 60% do peso total do ovo. É formada dentro de poucas horas, enquanto o óvulo maduro percorre o interior do oviduto, numa região secretora de clara.

A composição da clara do ovo, ocorre em quatro camadas.

- a. Camada chalazífera (ou camada espessa interna) - É adjacente à membrana vitelina e em continuidade com a chalaza. A chalaza consiste em dois cordões protéicos, que tem a função de suprir um eixo de rotação para a gema, porém impedindo o deslocamento desta para fora do centro do ovo.
- b. Camada delgada interna - fica contida num envelope de clara espessa (camada espessa externa)
- c. Camada espessa externa
- d. Camada delgada externa

3.7.3. Membranas da Casca do Ovo (Interna e Externa)

A membrana interna começa a ser formar durante a passagem pelo oviduto. A membrana externa é adicionada quando o óvulo atinge o útero da ave. A membrana interna é mais delgada e as duas membranas juntas medam cerca de 0,01-0,02 mm de espessura.

3.7.4. Câmara de Ar

Desenvolve-se pela separação entre as membranas interna e externa da casca, na extremidade mais larga do ovo, como decorrência da "retração" do conteúdo do ovo durante o resfriamento, após a postura.

Com o envelhecimento do ovo, a câmara de ar continua a aumentar em tamanho devido à perda de umidade e dióxido de carbono para o ambiente.

3.7.5. Casca

É o revestimento externo do ovo e compreende cerca de 9 a 12% do peso total deste. Consiste principalmente em carbonato de cálcio (94%), carbonato de magnésio (1%), fosfato de cálcio (1%) e matéria orgânica, principalmente proteína (4%).

3.7.6. Poros

A casca do ovo não é uma superfície contínua, contém aberturas em forma de funil, formando canais não interligados, que penetram a espessura da casca e são denominados poros.

Os poros não estão uniformemente distribuídos sobre a superfície do ovo, concentrando-se em maior número na porção equatorial e câmara de ar.

Estima-se que o número médio de poros de ovos de galinha esteja entre 7.000-17.000 poros (ROMANOFF e ROMANOFF, 1963). Os poros são parcialmente vedados pela cutícula, o que não impede as trocas gasosas e de umidade do ovo para a atmosfera.

Sob determinadas condições, os poros podem permitir a penetração microbiana através das membranas da casca.

3.7.7. Cutícula

Antes de ser expelido pela cloaca da ave, o ovo recebe um revestimento "ceroso" de proteína semelhante à queratina. A cutícula apresenta espessura média de 10 μ m, podendo essa espessura variar de 5 até 12,8 μ m.

A cutícula reveste a casca de modo irregular, apresentando camadas estruturais semelhantes a escamas e vários orifícios em forma de estrela.

3.8. Vias de contaminação de ovos por salmonelas

GILLESPIE e SCOTT (1950) concluíram que três ocorrências principais ocorriam na deterioração de ovos.

3.8.1. Penetração microbiana através da casca;

3.8.2. Crescimento nas membranas da casca e possível digestão das mesmas,

3.8.3. Infecção da porção albuminóide (clara). A validade geral desses conceitos tem sido confirmada por várias investigações.

3.8.1. Penetração da Casca

Segundo TYLER (1961a) a espessura da casca dos ovos varia de 241-371 μ , e contém cerca de 7.000-17.000 poros (TYLER, 1953, ROHANOFF e ROHANOFF, 1963), cujos diâmetros variam de 9 até 35 μ

(ROMANOFF e ROMANOFF, 1963; TYLER, 1956). Os poros são parcialmente vedados com material proteináceo: a cutícula (SIMKISS, 1961).

Leveduras e bactérias podem penetrar através da casca de ovos cujas membranas da casca tenham sido removidas (HAINES e MORAN, 1940; GARIBALDI e STOKES, 1958).

A casca é susceptível à penetração bacteriana por curto período de tempo após a postura, devido à contração da gema e da clara durante o resfriamento, permitindo que microrganismos presentes na superfície da casca sejam succionados através dos poros, os quais ainda estão úmidos e não totalmente vedados pela cutícula (FERDINANDOV, 1944). Não existem evidências concretas do processo exato pelos quais os microrganismos penetram os poros da casca. Nosso conhecimento é baseado na evidência de experimentos nos quais ovos são mergulhados numa suspensão de bactérias deterioradoras e a incidência de deterioração é utilizada como índice da eficiência da casca como barreira à penetração microbiana.

Uma maior incidência de contaminação (GORDON e TUCKER, 1954) e uma acentuada incidência de deterioração (HAINES, 1939; HAINES e MORAN, 1940) ocorre quando a casca dos ovos são esfregadas com lixa de papel ou palha de aço antes dos ovos serem imersos na suspensão bacteriana. Esses resultados indicam que o revestimento cuticular no orifício dos poros exercem um importante papel na prevenção da penetração microbiana da casca. A remoção da cutícula resulta em acentuado aumento na desidratação da clara (BRYANT e SHARP, 1934; MARSHALL e CRVICKSHANK, 1938; TYLER, 1945).

3.8.2. Penetração e colonização da membranas da casca

Muitos investigadores notaram uma demora de mais de 20 dias entre a penetração das cascas dos ovos recém postos e a ocorrência de grandes números de organismos ou de alterações macroscópicas na clara (ZAGAEVSKY e LUTIKOVA, 1944; GILLESPIE e SCOTT 1950, BIGLAND e PAFAS, 1953, MILLER e CRAWFORD, 1953, ELLIOT, 1954; STOKES *et al.*, 1956; OREL, 1959; FROMM e MONROE, 1960, GARIBALDI e BAYNE, 1960). Isso foi atribuído às membranas da casca que proveriam uma barreira mecânica contra a invasão microbiana (KRAFT, ELLIOTT e BRANT, 1958; HARTING e STADELMANN, 1962) ou uma combinação dessa propriedade e substâncias antimicrobianas presentes nas membranas (BROOKS e TALYOR, 1955). Investigações posteriores (BROOKS, 1960, BOARD, 1964, BOARD e AYRES, 1965) demonstraram que o atraso é primariamente um reflexo da natureza antimicrobiana da clara e que as membranas da casca exercem um papel menor na restrição da invasão microbiana da clara do ovo.

a. Penetração - A espessura das membranas externa e interna da casca são 50-70 μ e 15-17 μ , respectivamente (TYLER, 1961b, LIFSHITZ e BAKER, 1964). Cada membrana é formada de camadas compostas de redes de fibras, principalmente queratina e mucina e os interstícios são preenchidos com clara (ROMANOFF e ROMANOFF, 1963). As fibras da membrana mais interna são mais finas e mais fechadas do que nas camadas mais externas (MASSHOFF e STOLPHAN, 1961).

O processo que resulta na penetração das membranas da casca não é conhecido, porém não parece ocorrer devido à digestão das membranas por proteases bacterianas (GARIBALDI e STOKES, 1958; BOARD, 1965b).

A inoculação da câmara de ar e a tentativa de recuperar os microrganismos a partir da clara, demonstraram que as membranas não impõem uma barreira efetiva contra a invasão bacteriana, porque a partir desse sítio a bactéria penetra através da membrana interna da casca, sendo que esta é muito mais resistente à penetração que a membrana mais externa (LIFSHITZ *et al.*, 1964). A membrana é rapidamente invadida quando é utilizada uma grande quantidade de inóculo (BROOKS, 1960, BOARD, 1964) particularmente se os ovos foram mantidos a 37°C (BOARD & AYRES, 1965a).

b. Colonização - A presença de lisozima nas membranas da casca, além de desempenhar importante papel na defesa do embrião em desenvolvimento (KOROTKOVA, 1957), causaria baixa incidência de bactérias gram positivas no conteúdo dos ovos deteriorados.

Evidências diretas do processo de colonização das membranas da casca derivaram de experimentos nos quais foram empregados métodos bacteriológicos e químicos para estudar o comportamento de microrganismos localizados na membrana interna da casca.

Na faixa de temperatura (20-30°C), ocorre uma fase primária de multiplicação dentro de 2 a 4 dias após inoculação da câmara de ar de ovos frescos (BROOKS, 1960, BOARD, 1964). Para pequenas quantidades de inóculo ocorre um pequeno aumento na população da membrana interna, porém, quando são empregados grandes inóculos ocorre invasão da clara, mas não ocorre multiplicação bacteriana.

BROOKS (1960), era de opinião que o crescimento de bactérias "in situ" nas membranas da casca era restrito devido a uma deficiência na disponibilidade de ferro. BOARD (1964) deu suporte à essa hipótese demonstrando que ocorria considerável multiplicação bacteriana imediatamente após inoculação da câmara de ar com organismos suspensos numa solução fraca de sulfato

ferroso. Essa evidência sugere que a fase primária de multiplicação é limitada pela ação do agente quelante de ions ferro - a Conalbumina. Isso sugere que as propriedades antimicrobianas da clara são as responsáveis primárias por confinar a multiplicação às membranas da casca. O período de declínio que ocorre após a fase primária de multiplicação resulta provavelmente da morte bacteriana nas membranas ou a migração das células para a clara.

Posteriormente, ocorre uma fase secundária de multiplicação, induzida por uma alteração espontânea nas propriedades das membranas da casca (BROOKS, 1960). Investigações posteriores (BOARD, 1964; BOARD e AYRES, 1965a) estabeleceram que o reinício das multiplicações ocorrem apenas quando a gema entra em contato com a membrana interna da casca. Nesse ponto ocorre uma grande infecção da clara e da gema (BROOKS, 1960); uma acentuada redução na quantidade de glicose presente na clara, e o pH da clara aproxima-se da neutralidade; em ovo inoculado com microrganismo cromogênicos ou proteolíticos, ocorrem mudanças macroscópicas na clara e na gema (BOARD, 1964). A evidência sugere que a duração da demora do crescimento bacteriano, após os microrganismos terem penetrado a casca é determinada pela taxa de velocidade na qual a gema move-se em direção à membrana da casca.

Ovos inoculados com *Pseudomonas* e armazenados à 10°C (BOARD e AYRES, 1965a) não apresentam duas fases distintas de multiplicação.

Durante 14 dias seguintes após incubação, ocorreu lenta multiplicação do microrganismo nas membranas da casca, e aumento gradual do número de microrganismos na clara. No período 14 a 21 dias muitos dos ovos demonstraram aumento acentuado no número de microrganismos nas membranas da casca, a clara e gema ficaram coloridas com pigmento verde fluorescente (pioverdina). Essas

alterações ocorreram sem qualquer evidência de união da gema com as membranas da casca e presumiu-se que foram iniciadas pelos microrganismos que atingiram a superfície da gema.

Ovos inoculados com *Serratia marcescens* armazenados à 37°C, apresentaram apenas uma fase de multiplicação, ocorrida quando a gema entrou em contato com a membrana. A temperatura pode exercer um importante papel nas defesas antimicrobianas do ovo.

3.8.3. Crescimento bacteriano na clara do ovo

A noção de que a clara dos ovos contém substâncias inimigas do crescimento bacteriano originou-se da investigação conduzida na década 1880-1890 (HAINES, 1939).

Foi demonstrado que vários dos constituintes, principalmente proteínas da clara possuem atividades biológicas específicas e concluiu-se que elas exercem um papel na defesa do ovo. Tais substâncias e sua atividades biológicas são fornecidas na TABELA 2.

TABELA 2

Componentes antimicrobianos da clara do ovo de galinha

Componente	Ação	Pesquisadores
lisozima	- lise da parede celular de bactérias gram positivas - floculação de células bacterianas	LASCHTSCHENKO (1909), FLEMING (1922) FRIEDBERG e HODER (1932)
Conalbumina	- quelação de ferro	SCHADE e CAROLINE (1944), FEENEY e NAGY (1952), GARIBALDI (1960)
OVOMUCOIDE	- inibição de Tripsina	BALLS e SWENSON (1934), LINEWEAVER e MURRAY (1947)
AVIDINA	- combinação com biotina	EAKIN, SNELL e WILLIAMS, (1940); WOOLEY e LONGSWORTH (1942); BAUMGÄRTNER (1957)
RIBOFLAVINA	- quelação de cátions	FEENEY e NAGY (1952)
Proteínas não Caracterizadas		
A	- inibição de Tripsina e quimotripsina	RHODES, BENNET e FEENEY (1960)
B	- inibição de proteases fúngicas	HASUSHIMA (1958)
C	- combinação com riboflavina	RHODES, BENNET e FEENEY (1959)
D	- combinação com vitamina B6	EVANS, BUTTS e DAVIDSON (1951)

REF. BOARD, R.G., 1966.

- Lisozima - LASCHTSCHENKO (1909) observou lise de *Bacillus subtilis* inoculado na clara, porém observou que não ocorria lise celular na clara à temperatura de 65-70°C durante 30 minutos. Em 1922, FLEMING confirmou a natureza enzimática do fenômeno, propondo o nome de lisozima para o agente causador da lise celular bacteriana. A lisozima exerce o papel principal na defesa dos ovos contra a ação de bactérias gram positivas. Foi demonstrado também que microrganismos sensíveis ou insensíveis à ação lítica, sofrem aglutinação na presença de altas concentrações de lisozima (FRIEDBERG e HODER, 1932), e isso foi atribuído às propriedades básicas da molécula (SALTON, 1957).

Não é certo se este atributo de basicidade da lisozima exerce papel de impedir o movimento bacteriano na clara.

- Conalbumina - A alteração do pH da clara de 7,5 para 9,5, ocorrida uma semana após a postura (PETER e HEALEY, 1925), levou à investigação da influência da concentração do íon hidrogênio da clara sobre o crescimento bacteriano (SHARP e WHITAKER, 1927).

Os mesmos pesquisadores verificaram que ocorria rápida multiplicação bacteriana na clara desnaturada, por processo químico ou térmico, em pH igual 9,4 e em clara dializada. Isso levou-os a concluir que o pH sozinho exercia papel menor na defesa da clara contra infecção por bactérias gram negativas. O componente principal parecia ser uma substância termolábil cuja atividade era influenciada pelo pH. A perda da toxicidade após diálise da clara levou SHARP e WHITAKER a considerar que essa substância não era uma proteína.

SHADE e CAROLINE (1944) notaram que ocorria inibição do crescimento bacteriano em caldo nutriente suplementado com clara

quando a mistura era ajustada para pH >7,4 mas não ocorria inibição para pH <5,8. Foram testados 10 vitaminas e 31 elementos e apenas o ferro superou a inibição do crescimento bacteriano. A substância inibidora, ligante do ferro, foi isolado da clara por ALDERTON, WARD e FEVOLD (1946), e foi identificada como CONALBUMINA, proteína albuminosa originalmente isolada a partir de ovos por OSBORNE e CAMPBELL (1900). Esse ligante orgânico contribui com 10% para os sólidos totais da clara (LONGSWORTH, CANNAN e MacINNES, 1940; ALDERTON *et al.*, 1946) e está uniformemente distribuída em toda a clara (FEENEY, DUCAY, SILVA e MacDONELL, 1952).

O poder sequestrante da Conalbumina não é reduzido de modo detectável, após armazenamento de ovos por curto período (FEENEY *et al.*, 1952) e seu potencial quelante não parece ser exaurido pelo ferro que difunde-se através da casca durante o armazenamento de ovos por períodos curtos (SCHAIBLE, BANDEMER e DAVIDSON, 1946). A Conalbumina forma um complexo cromogênico (rosa-salmão) com íons férricos, e os grupos hidroxila da tirosina tem sido implicados (WARNER e WEBER, 1953). É importante dizer que o complexo conalbumina-ferro é mais resistente que a conalbumina sozinha à digestão enzimática e desnaturação térmica.

GARIBALDI (1960), demonstrou que a adição de ferro à clara do ovo, ou a modificação do nível de pH permitiu extensa multiplicação bacteriana.

BROOKS (1960) e BOARD (1964) demonstraram que ocorria extensiva multiplicação bacteriana após a adição de ferro às membranas da casca ou à clara de ovos intactos. A contaminação natural ou artificial da água com sais de ferro também resulta em alta incidência e rápida taxa de deterioração em ovos lavados. (GARIBALDI e BAYNE, 1960, BRANT e STARR, 1962; GARIBALDI e BAYNE, 1962a,b). Essa evidência indica que a quelação do ferro pela

Conalbumina é um dos fatores primários na prevenção do crescimento de microrganismos insensíveis à lisozima, na clara do ovo.

Outros fatores exercem papel na defesa antimicrobiana do ovo: existem proteínas presentes na clara que tornam as seguintes vitaminas indisponíveis aos microrganismos que as necessitam como requerimento nutricional BIOTINA, RIBOFLAVINA, VITAMINA B₆.

Foi dito anteriormente que a fase secundária de multiplicação em ovos armazenados à 27°C, ocorre quando a gema entra em contato com as membranas da casca. A posição centralizada da gema no ovo fresco deve-se primariamente ao suporte que ela recebe do saco albuminoso, que é um gel na qual a fase transparente é permeada por fibras de ovomucina (BROOKS e HALE, 1959). Durante o armazenamento a rigidez do saco albuminoso decresce rapidamente e contrai, aumentando a liberdade de movimento da gema. A base físico-química dessas mudanças não foram estabelecidas (BROOKS e HALE, 1959), mas há evidência de alteração na associação de lisozima e ovomucina (HAWTHORNE, 1950, COTTERILL e WINTER, 1955; WILCOX, 1955).

Na prática é conhecido que a taxa de deterioração da camada espessa da clara é influenciada por muitos fatores (SHERWOOD, 1958): qualidade inicial do saco albuminoso, de origem genética (BAKER, 1960); temperatura de armazenamento (JORDAN et al., 1954) são de importância primária. Existem evidências indiretas de que a natureza viscosa da clara exerce seu papel impedindo a migração bacteriana no conteúdo do ovo, por exemplo, durante os estágios iniciais de crescimento bacteriano na clara, os organismos ou pigmentos produzidos por elas permanecem localizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

4.1. Amostra bacteriana

Foi utilizada a cepa de *Salmonella enteritidis* isolada de aves, anteriormente mencionada (FERREIRA et al., 1990).

Para efeito dos experimentos foi desenvolvida um mutante resistente ao Ácido Nalidixico (*Salmonella enteritidis*-Nal^r) através de repiques sucessivos em Caldo Nutriente(1) (CN) contendo 100 ug/ml da droga, conforme metodologia descrita (WEINACK et al., 1982). A amostra foi identificada segundo técnicas pré-estabelecidas (EWING, 1986).

A fagotipagem da cultura realizada na Inglaterra, indicou pertencer ao fagotipo 28.

A cultura estoque foi mantida em tubos de ensaio (13x100 mm), com tampas rosqueáveis, contendo Ágar Nutriente(1) (AN) e armazenados em geladeira à temperatura entre 4°C e 8°C.

(1) Difco

4.2. Ovos.

Foram utilizados ovos brancos de galinhas comerciais, colhidos de um único lote de poedeiras, de uma mesma granja, sem lavagem ou limpeza prévia e transportados para o laboratório no mesmo dia. No laboratório os ovos foram mantidos sob refrigeração até o momento do uso.

4.3. Contaminação artificial dos alimentos.

Os diferentes alimentos - ovos cozidos, ovos pochê, ovos mexidos, maionese, sorvete de creme, glacê de clara e gemada - foram contaminados com *Salmonella enteritidis*-Nal^r utilizando seringa plástica estéril descartável de 1 ml e agulha de 13x3,8 mm de parede fina(1). Os procedimentos na inoculação artificial visaram uma melhor adequação a cada alimento específico.

Os inóculos, em todos os experimentos, eram culturas de *Salmonella enteritidis*-Nal^r em CN(2) incubadas de 18 a 24 horas à 37°C, contendo aproximadamente 10^6 a 10^7 UFC/ml.

A enumeração nos inóculos foi feita através de diluições decimais seriadas em Água Peptonada Tamponada (APT) com os procedimentos descritos a seguir.

(1) FLASTIPAK

(2) NB-DIFCO

4.4. Determinação da presença e enumeração da cepa *Salmonella enteritidis*-Nal^r em ovos e alimentos artificialmente contaminados.

A recuperação da *Salmonella enteritidis*-Nal^r foi feita, individualmente, de cada ovo ou alimento artificialmente contaminado, homogeneizando-se e triturando-se em triturador mecânico(1), por 1 a 2 minutos em sacos plásticos estéreis contendo 10 gramas de amostra em 90 ml de APT. Aliquotas de 0,1 ml da suspensão e das diluições decimais foram plaqueadas, em duplicata, na superfície de placas de Petri contendo Agar Padrão para Contagem Bacteriana (PCA) (2) a 2,5%. Após três a quatro horas de incubação - procedimento adotado para favorecer a recuperação de células injuriadas pelo calor, cada placa recebeu uma sobrecamada de agar MacConkey(2) contendo 100 ug/ml de ácido Nalidíxico e reincubada à 37°C por 48 horas para a contagem das células viáveis. Para os alimentos não submetidos à tratamento térmico, as alíquotas foram plaqueadas diretamente em agar MacConkey contendo 100 ug/ml de ácido Nalidíxico e incubadas à 37°C por 48 horas em estufa BOD(3).

Para a determinação qualitativa da presença de *Salmonella enteritidis*-Nal^r as sobras da suspensão original dos alimentos (10 g em 90 ml de APT), eram incubadas por 24 e 48 horas a 37°C e plaqueadas em agar MacConkey contendo 100 ug/ml de ácido Nalidíxico para verificar presença ou ausência de células viáveis na amostra original.

(1) Triturador mecânico Stomacher - Lab. Blender 400

(2) Difco

(3) Modelo 347CB da FANEN

4.5. Experimentos:

4.5.1. Sobrevivência de *Salmonella enteritidis*-Nal^r em ovos artificialmente contaminados e submetidos a diferentes tipos de preparo e cocção.

4.5.1.1. Ovos cozidos.

Os ovos foram inoculados via gema, injetando-se 0,1 ml da cultura de *Salmonella enteritidis*, após perfuração da casca com agulha estéril.

Os orifícios de inoculação dos ovos que sofreram cocção em água foram vedados com cola adesiva comercial (Cascolac - polímero de acetato de vinila) e, após secagem, com fita adesiva tipo crepe.

A. Cocção em água em ebulição. Grupos de cinco ovos eram imersos simultaneamente em becker de vidro de dois litros, contendo um litro de água em ebulição sobre bico de Bunsen e, retirados após determinados tempos, até o tempo máximo de oito minutos, para a determinação da sobrevivência bacteriana.

Imediatamente após cocção, os ovos em casca foram resfriados por imersão em água.

B. Cocção em forno microondas (FMO) (1). Os orifícios de inoculação na casca foram ampliados para dois a três mm com agulha estéril, para melhor permitir sua cocção e evitar quebras, decorrentes do aumento da pressão interna devido à formação de vapor de água. Cada um foi acondicionado em becker de vidro de 50 ou 80 ml e submetidos à cocção por 1 minuto na potencia fixa de

(1) BRASTEMP modelo BMF40EGA

70%, equivalente a 490w/2450Hz. Não foi aplicado o tempo de residência pós cocção. Ao final foi tomada a temperatura interna de cada ovo com auxílio de termopar(1).

Para a determinação da sobrevivência da cepa *Salmonella enteritidis*-Nal^r, o conteúdo de cada ovo, foi assépticamente removido com colher estéril e transferido para saco plástico estéril sendo submetido à trituração em triturador mecânico por dois minutos. Dez gramas da amostra foram homogeneizadas com 90 ml de Água Peptonada Tamponada em saco plástico em triturador mecânico durante meio até um minuto para as diluições e determinações como anteriormente descritas. A determinação qualitativa da presença de *Salmonella enteritidis*-Nal^r no restante da suspensão original dos alimentos foi, também, realizada como descrito.

4.5.1.2. Ovos mexidos.

Os ovos mexidos foram inoculados injetando-se na mistura 0,1 ml da cultura de *Salmonella enteritidis*-Nal^r para cada ovo empregado na receita, imediatamente antes da cocção.

Para os ovos mexidos foram utilizados o conteúdo integral de ovos, margarina vegetal comercial e clorato de sódio, homogeneizados em misturador manual doméstico(2). Cada amostra foi inoculada em superfície, com 0,1 ml da cultura de *Salmonella enteritidis*-Nal^r, para cada ovo utilizado, contendo 10^6 - 10^7 UFC/ml. Os ovos mexidos foram preparados em fogão a gás e microondas. Na cocção em fogão a manipulação foi feita com garfo estéril com tempo de cocção para se obter produto com características semelhantes ao obtido em microondas. Neste último, o tempo de cocção variou de 3 a 4 minutos com 70% de potência fixa (490w /2450Hz), seguindo as instruções do receituário do fabricante do equipamento, com garfo estéril, mexendo uma vez após cada minuto de cozimento.

(1) FAC-400B MULTI-TERMOMETER

(2) ARNO-MIXER

Foram analisadas aliquotas de 10 g em triplicata para cada amostra.

Os procedimentos para a recuperação de células bacterianas termicamente injuriadas foram realizados como já descritos.

4.5.1.3. Ovos tipo pochê.

O conteúdo de cada ovo foi asépticamente transferido para vidro de relógio estéril e inoculado com 0,1 ml de cultura de *Salmonella enteritidis* e posteriormente transferido para becker contendo 200 ml de água pré-aquecida à 80°C. Assim, foram cozidos em fogão a gás até que a gema mantivesse seu aspecto mole. Em microondas o cozimento foi feito em potência fixa de 70% (490w/2450Hz), com tempos de cocção variando de 45 segundos até 3 minutos.

A temperatura interna da gema era medida imediatamente após a cocção individual com o uso de um termopar(1), após drenagem da água de cozimento.

4.5.2. Sobrevivência de *Salmonella enteritidis*-Half^r em alimentos à base de ovos e consumidos sem tratamento térmico, artificialmente contaminados e submetidos a diferentes temperaturas de armazenagem.

Os alimentos deste grupo - maionese, sorvete de creme, glacê de clara e gemada - foram armazenados em recipientes de vidro estéreis com tampas rosqueáveis e mantidos em temperatura ambiente de 25°C em estufa B.O.D.(2) e, sob refrigeração, em refrigerador doméstico(3) de 8°C a 10°C. Amostras de 10 g foram analisadas nos períodos de 4, 24, 48 e 72 horas após o preparo, para a recuperação e enumeração bacteriana.

(1) FAC460B MULTI-THERMOMETER

(2) MODELO 347 CD DA FANEN

(3) QUALITY 420 - FROST-FREE BRASTEMP

4.5.2.1. Maionese

Foram preparadas empregando-se com o conteúdo integral de 2 a 3 ovos, cloreto de sódio P.A., óleo de soja comercial e suco de limão em quantidade suficiente para obter os valores de pH de 3,80, 3,85, 3,95, 4,04.

O conteúdo dos ovos e o cloreto de sódio, receberam a adição lenta do óleo de soja com o liquidificador(1) em velocidade máxima para atingir a consistência desejada para a emulsão. A seguir, adicionou-se o suco de limão em volumes suficientes para atingir valores de pH desejados.

Após o preparo, aliquotas de 10 gramas foram transferidas para vidros com tampas rosqueáveis, estéreis, contaminadas na superfície com 0,1 ml de *Salmonella enteritidis*-Nal^r e armazenadas em temperatura ambiente de 25°C em estufa B.U.U.(2) e em refrigerador doméstico(3) de 8°C a 10°C. As análises microbiológicas de células viáveis e contagem total de bolores e leveduras foram realizadas após os períodos de 4 h, 24 h, 48 h e 72 h de armazenamento para ambas as temperaturas.

(1) ARNO

(2) modelo 347 CD-FANEN

(3) QUALITY 420 FROST-FREE BRASTEMP

Para a contagem total de bolores e leveduras foi empregado o Agar Batata-Dextrose(1) com pH 3,5 obtido pela adição de solução de ácido tartárico a 10% estéril. As placas foram incubadas a 25°C em estufa BOD(2), não invertidas, por 5 dias. O intervalo considerado para enumeração foi de 10 a 150 UFC/ml ou g, baseando-se na média das duplicatas das placas de Petri, segundo metodologia descrita (FDA-Bacteriological Analytical Manual, 6th edition, 1984).

4.5.2.2. Glacê de clara

Foram empregados albumina de ovos e açúcar refinado na proporção de 1:2 (p/p), utilizando-se misturador manual elétrico(3).

Após a preparação do glacê de clara, alíquotas de 10 g em triplicatas, foram artificialmente contaminadas, injetando-se 0,1 ml de cultura pura de *Salmonella enteritidis*-Nal^r, armazenadas em refrigerador doméstico(4) à temperatura de 8°C a 10°C, e as análises microbiológicas foram realizadas após períodos de 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias.

4.5.2.3. Gemada

Foi utilizado gema de ovo, açúcar refinado comercial e leite integral esterilizado. Em cada amostra foi utilizado o conteúdo de uma gema para 2 colheres de sopa de açúcar refinado (1/2), com batimento manual utilizando colher estéril.

(1) FDA-DIFCO

(2) Modelo 347 CD- FANÉM

(3) ARNO MIXER

(4) QUALITY 420 - FROST-FREE BRASTEMP

A contaminação artificial foi feita injetando-se 0,1 ml de cultura da *Salmonella enteritidis*-Nal^r na superfície da mistura gema e açúcar, antes da escaldagem com 200 ml de leite à temperatura de ebulição. Repetiu-se a homogeneização com bastão de vidro estéril até se obter a consistência característica desse alimento. As amostras foram mantidas em condições normais até atingirem temperatura ambiente, e tomou-se aliquotas de 10 g (triplicata ou mais) para realização das análises microbiológicas.

4.5.2.4. Sorvete de Crema.

Foram utilizados leite integral esterilizado pelo processo UHT (2000 ml), açúcar refinado comercial (560 g), glicose de milho comercial - Karo (100 g), gema de ovo (140 g), clorato de sódio P.A. (0,8 g), gelatina comercial sem sabor (6 g). O preparo e as proporções entre ingredientes empregados na formulação, foi realizado segundo BEHMER. O batimento da massa maturada foi realizado em sorveteira descontinua(1) durante 20 minutos.

Um lote único do sorvete pronto, foi devidamente acondicionado em recipiente plástico próprio e mantido em freezer doméstico(2) na temperatura de -18°C até o momento de sua utilização. Amostras de 10 g de sorvete foram pesadas e acondicionadas em recipientes de vidro com tampas rosqueáveis, estéreis, em ambiente asséptico da Câmara de Fluxo Horizontal(3). Cada amostra (em quadruplicata) foi inoculada em superfície com 0,1 ml de cultura da *Salmonella enteritidis*-Nal^r, e armazenada em freezer de refrigerador duplex(4), sendo retiradas para análise microbiológica após períodos de 24 h, 48 h, 72 h, 7 e 35 dias de armazenamento.

(1) DS/3-INADAL

(2) Quality 270 FROST-FREE BRASTEMP

(3) CANADIAN CABINETES CO. Ld.

(4) Quality 420 FROST-FREE BRASTEMP

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultados do efeito do tempo de cocção em água em ebulição e em forno microondas sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos contaminados.

5.1.1. Os resultados do efeito do tempo de cocção em água em ebulição e em forno microondas sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos artificialmente contaminados são apresentados nas TABELAS 3 e 4.

A cocção em água em temperatura de ebulição causou redução bacteriana de 2 a 5 \log_{10} UFC/ovo nos tempos de 1 até 8 minutos de cozimento (TABELA 3).

A cocção em forno microondas resultou numa destruição bacteriana de 5 \log_{10} UFC/ovo após 45 segundos e de 7 \log_{10} UFC/ovo após 1 minuto (TABELA 4).

A cocção de ovos em forno microondas, potência fixa de 70% (490w/2450Hz), foi mais eficiente na destruição de *Salmonella enteritidis* que a cocção convencional em água fervente em fogão a gás. Enquanto que na cocção por microondas durante 1 minuto (490w/2450Hz), *Salmonella enteritidis* (<10UFC/g) só foi detectada através do cultivo qualitativo, a cocção convencional em água fervente em fogão a gás durante 8 minutos permitiu células viáveis da ordem de 10^2 - 10^3 UFC/ovo.

A fim de evitarmos os vários fatores que interferem na cocção por microondas (temperatura, frequência e intensidade de irradiação, tempo de exposição, etc.), fixamos o inóculo inicial ($4,5 \times 10^7$ UFC/ovo), o tempo de exposição (1 minuto), 70% potência (490w/2450Hz), o peso das amostras também foi bastante homogêneo com uma variação percentual de 4,0% entre amostras mais leve e mais pesada.

TABELA 3

Resultado do tempo de cocção em água em ebulição sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos artificialmente contaminados

Tempo de cocção	Ovo (unidade)	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de <i>Salmonella</i>	
			Cultivo Quantitativo (UFC/ovo)	Cultivo Qualitativo (presença/ausência)
1m:00s	1	$4,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	N.R.
	2	$7,2 \times 10^7$	$9,0 \times 10^4$	N.R.
	3	$7,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	N.R.
	média	$2,8 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$	---
1m:30s	1	$4,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$	N.R.
	2	$7,2 \times 10^7$	$4,2 \times 10^4$	N.R.
	3	$7,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	N.R.
	média	$2,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^5$	---
2m:00s	1	$4,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	N.R.
	2	$7,2 \times 10^7$	$9,0 \times 10^3$	N.R.
	3	$7,1 \times 10^6$	$9,0 \times 10^3$	N.R.
	média	$2,8 \times 10^7$	$3,8 \times 10^4$	---
2m:30s	1	$4,6 \times 10^6$	$7,3 \times 10^4$	N.R.
	2	$7,2 \times 10^7$	$3,5 \times 10^4$	N.R.
	3	$7,1 \times 10^6$	$9,0 \times 10^4$	N.R.
	média	$2,8 \times 10^7$	$6,6 \times 10^4$	---

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

N.R. = não realizado

TABELA 3 cont...

TABELA 3 cont...

Resultado do tempo de cocção em água em ebulição sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos artificialmente contaminados

Tempo de cocção	Ovo (unidade)	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de <i>Salmonella</i>	
			Cultivo Quantitativo (UFC/ovo)	Cultivo Qualitativo (presença/ausência)
3m:00s	1	$4,6 \times 10^6$	$7,9 \times 10^3$	N.R.
	2	$7,1 \times 10^6$	$9,0 \times 10^3$	N.R.
	3	$3,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	N.R.
	4	$8,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^5$	N.R.
	5	$7,2 \times 10^6$	$9,5 \times 10^3$	N.R.
	6	$5,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^5$	N.R.
	média	$5,9 \times 10^6$	$8,1 \times 10^4$	---
3m:30s	1	$3,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	N.R.
	2	$8,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	N.R.
	3	$7,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	N.R.
	4	$5,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^3$	N.R.
	média	$6,0 \times 10^6$	$9,5 \times 10^4$	---
4m:00s	1	$3,0 \times 10^6$	$9,0 \times 10^2$	N.R.
	2	$8,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^3$	N.R.
	3	$7,2 \times 10^6$	$5,9 \times 10^4$	N.R.
	4	$5,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$	N.R.
	média	$6,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$	---

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

N.R. = não realizado

TABELA 3 cont...

TABELA 3 cont...

Resultado do tempo de cocção em água em ebulição sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos artificialmente contaminados

Tempo de cocção	Ovo (unidade)	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de <i>Salmonella</i>	
			Cultivo Quantitativo (UFC/ovo)	Cultivo Qualitativo (presença/ausência)
4m:30s	1	$3,0 \times 10^6$	$<10^1$	presença
	2	$8,6 \times 10^6$	$<10^1$	presença
	3	$7,2 \times 10^6$	$6,5 \times 10^3$	N.R.
	4	$5,1 \times 10^6$	$3,2 \times 10^3$	N.R.
	média	$6,0 \times 10^6$	$2,4 \times 10^3$	---
5m:00s	1	$6,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^3$	N.R.
	2	$8,4 \times 10^6$	$<10^1$	ausência
	3	$1,6 \times 10^7$	$1,4 \times 10^3$	N.R.
	4	$1,2 \times 10^7$	$3,5 \times 10^3$	N.R.
	média	$1,0 \times 10^7$	$2,2 \times 10^3$	---
5m:30s	1	$6,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^2$	N.R.
	2	$9,7 \times 10^6$	$3,5 \times 10^2$	N.R.
	3	$1,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^3$	N.R.
	4	$8,4 \times 10^6$	$<10^1$	presença
	5	$1,6 \times 10^7$	(-)	ausência
	6	$1,2 \times 10^7$	$3,0 \times 10^2$	N.R.
média	$1,1 \times 10^7$	$3,0 \times 10^2$	---	

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

N.R. = não realizado

TABELA 3 cont...

TABELA 3 cont...

Resultado do tempo de cocção em água em ebulição sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos artificialmente contaminados.

Tempo de cocção	Ovo (unidade)	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de <i>Salmonella</i>	
			Cultivo Quantitativo (UFC/ovo)	Cultivo Qualitativo (presença/ausência)
6m:00s	1	$6,0 \times 10^6$	(10^1)	presença
	2	$9,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^3$	N.R.
	3	$1,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	N.R.
	4	$8,4 \times 10^6$	(-)	ausência
	5	$1,6 \times 10^7$	(-)	ausência
	média	$1,1 \times 10^7$	$5,0 \times 10^2$	---
6m:30s	1	$6,0 \times 10^6$	(10^1)	presença
	2	$9,7 \times 10^6$	$9,0 \times 10^3$	N.R.
	3	$1,5 \times 10^7$	$2,4 \times 10^3$	N.R.
	4	$8,4 \times 10^6$	(-)	ausência
	5	$1,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^3$	N.R.
	6	$1,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^3$	N.R.
média	$1,1 \times 10^7$	$2,3 \times 10^3$	---	
7m:00s	1	$6,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^3$	N.R.
	2	$9,7 \times 10^6$	(10^1)	presença
	3	$1,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^3$	N.R.
	4	$8,4 \times 10^6$	(-)	ausência
	5	$1,6 \times 10^7$	$5,0 \times 10^4$	N.R.
	6	$1,2 \times 10^7$	(10^1)	ausência
média	$1,1 \times 10^7$	$8,8 \times 10^3$	---	

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

N.R. = não realizado

TABELA 3 cont...

TABELA 3 cont...

Resultado do tempo de cocção em água em ebulição sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos artificialmente contaminados.

Tempo de cocção	Ovo (unidade)	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de <i>Salmonella</i>	
			Cultivo Quantitativo (UFC/ovo)	Cultivo Qualitativo (presença/ausência)
7m:30s	1	$6,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^3$	N.R.
	2	$9,7 \times 10^6$	$4,5 \times 10^3$	N.R.
	3	$1,5 \times 10^7$	$5,0 \times 10^2$	N.R.
	4	$8,4 \times 10^6$	(-)	ausência
	5	$1,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^4$	N.R.
	6	$1,2 \times 10^7$	(-)	ausência
	média	$1,1 \times 10^7$	$4,6 \times 10^3$	---
8m:00s	1	$6,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^3$	N.R.
	2	$9,7 \times 10^6$	$2,1 \times 10^3$	N.R.
	3	$1,5 \times 10^7$	$6,5 \times 10^2$	N.R.
	4	$8,4 \times 10^6$	(-)	ausência
	5	$1,6 \times 10^7$	(-)	ausência
	média	$1,1 \times 10^7$	$8,3 \times 10^2$	N.R.

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

N.R. = não realizado

TABELA 4

Resultados do tempo de cocção em forno microondas (490w/2450Hz) sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos artificialmente contaminados

Tempo de cocção	Peso da amostra (g)	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de <i>Salmonella</i> Cultivo Quantitativo (UFC/g)	Cultivo Qualitativo (Pres/Aus)	Temperatura cocção (°C)
0m:45s	59,9	$4,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^2$	N.R.	72,0
1m:00s	61,0	$4,5 \times 10^7$	(10^1)	Presença	98,2
1m:00s	61,1	$4,5 \times 10^7$	(10^1)	Presença	97,0
1m:00s	61,2	$4,5 \times 10^7$	(10^1)	Presença	97,0
1m:00s	60,6	$4,5 \times 10^7$	(10^1)	Presença	98,3
1m:00s	62,3	$4,5 \times 10^7$	(10^1)	Presença	98,4

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

N.R. = não realizado.

5.1.2. Efeito da cocção em água e em forno microondas sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos contaminados.

O efeito dos dois procedimentos de cocção sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos artificialmente contaminados são apresentados na TABELA 5.

Na cocção de ovos em água em ebulição de 69 amostras analisadas, 59 (85,5%) foram positivas para a presença de *S. enteritidis* nos diferentes tempos de cocção. A destruição celular

se iniciou a partir de 5 minutos e 30 segundos (5 amostras positivas em 6 examinadas). No entanto, após 8 minutos de cozimento, foram detectadas células viáveis da ordem de 10^2 a 10^3 UFC por ovo (3 amostras positivas em 5 examinadas).

Na cocção por microondas, a *Salmonella enteritidis* só foi detectada através do cultivo qualitativo das suspensões originais dos alimentos. Uma única amostra, com 45 segundos de cocção, apresentou células viáveis em quantidade enumerável (10^2 UFC/g).

A temperatura no interior dos ovos após cocção em forno microondas variou desde 72,0°C até 98,3°C (TABELA 4). O acréscimo de 15 segundos no tempo de cocção dos ovos em microondas, de 45 segundos para 1 minuto, resultou num acréscimo da temperatura de 26,3°C.

TABELA 5

Resultados de dois procedimentos de cocção sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos artificialmente contaminados

Procedimentos de cocção	Amostras Positivas		Recuperação de <i>Salmonella</i>	
	(Nº)	(%)	Cultivo Quantitativo (UFC/ovo)	Cultivo Qualitativo (Pres/Aus)
Água em ebulição	59/69	(85,5%)	10^2 a 10^5	presença
Forno microondas	6/6	(100,0%)	10^1 a 10^2	presença

5.1.3. Resultados da cocção em água em ebulição e em forno microondas na sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos pochê contaminados.

Os resultados do efeito de cocção em água em ebulição e em forno microondas na sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos pochê artificialmente contaminados estão apresentados nas TABELAS 6 e 7.

A cocção em água em ebulição causou reduções de 6 a 7 \log_{10} (TABELA 6), enquanto que a cocção em microondas reduziu em 5 a 6 \log_{10} (TABELA 7), para o inóculo inicial de 10^7 a 10^8 UFC/ml.

A temperatura no interior dos ovos após cocção em água em ebulição variou de 41°C à 80,2°C, produzindo uma variação de temperatura de +39,2°C. A cepa de *Salmonella enteritidis* sobreviveu à temperatura de 62,3°C (amostra 24) e foi destruída à 60,3°C (amostra 25), demonstrado através do cultivo qualitativo das amostras (TABELA 6).

Na cocção em FMO, a temperatura no centro da gema variou de 53,3°C até 96°C, com uma variação de temperatura de 42,7°C (TABELA 7). Foram detectadas células viáveis de *Salmonella enteritidis* à 76,3°C (amostra 11) e destruição celular à 60,5°C (amostra 19).

Na cocção em água em ebulição, o grau de destruição microbiana foi bastante alto. A ampla faixa de variação de temperatura no interior dos ovos, pode ser devido a variação de peso dos mesmos.

Na cocção em microondas, sobrevivência microbiana tem sido atribuída a uma transferência de calor não uniforme nos alimentos expostos à radiação, e/ou, devido ao curto período de exposição do alimento, insuficiente para garantir a destruição microbiana, principalmente, sendo o conteúdo do alimento rico em substâncias protetoras como lipídeos e proteínas.

A eficiência na destruição de *Salmonella enteritidis* em ovos pochê artificialmente contaminados foi maior na cocção em FMO a 70% potência (490w/2450Hz).

O percentual de amostras negativas foi de 40,2% (51,8% amostras positivas) em FMO, enquanto que na cocção convencional em água à temperatura de ebulição foi de apenas 14,3% (85,7% amostras positivas).

O grau de destruição foi $8 \times \log_{10}$ nas amostras submetidas à irradiação durante 1 minuto e 30 segundos até 3 minutos.

A fixação do tempo de cocção em 45 segundos e potência fixa de 70% (490w/2450Hz) causou reduções de $7 \log_{10}$ até $5 \log_{10}$. A variação de temperatura foi muito ampla: 42,7°C entre o menor (53,3°C) e o maior valor (96,0°C), registrados pelo termopar no centro da gema. Foi possível observar destruição bacteriana à 68,5°C em amostra pesando 51,5g e submetida a 45 segundos de cocção (amostra 18) e sobrevivência à 76,3°C em amostra pesando 47,8g e submetida à cocção durante 1 minuto (amostra 11).

A cocção convencional resultou em reduções da ordem de $8 \log_{10}$ a $6 \log_{10}$ e as temperaturas registradas foram inferiores à cocção em FMO.

TABELA 6

Resultados da cocção em água em ebulição sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos pochê artificialmente contaminados

Ovo (unidade)	Peso da amostra (g)	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de <i>Salmonella</i>		Temperatura cocção (°C)
			Quantitativo (UFC/g)	Cultivo Qualitativo (Pres/Aus)	
1	54,2	$1,0 \times 10^8$	$(10^1$	PRESENCIA	57,5
2	54,7	$1,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^1$	N.R.	57,3
3	56,8	$1,0 \times 10^8$	$(10^1$	PRESENCIA	58,5
4	57,5	$1,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^2$	N.R.	59,0
5	52,5	$1,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^1$	N.R.	55,5
6	55,4	$1,0 \times 10^8$	$(10^1$	PRESENCIA	54,0
7	59,4	$1,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^1$	N.R.	50,7
8	54,9	$1,0 \times 10^8$	$(10^1$	PRESENCIA	49,5
9	54,1	$1,0 \times 10^8$	$(10^1$	PRESENCIA	50,3
10	59,0	$2,2 \times 10^7$	$(10^1$	PRESENCIA	46,3
11	54,7	$2,2 \times 10^7$	$(10^1$	PRESENCIA	48,0
12	48,9	$2,2 \times 10^7$	$2,5 \times 10^1$	N.R.	52,6
13	54,2	$2,2 \times 10^7$	$(10^1$	PRESENCIA	48,1
14	51,5	$2,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^1$	N.R.	41,0
15	56,9	$2,2 \times 10^7$	$(10^1$	PRESENCIA	52,2
16	52,7	$2,2 \times 10^7$	$(10^1$	PRESENCIA	57,5
17	49,2	$2,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^2$	N.R.	62,0
18	54,2	$2,2 \times 10^7$	$(10^1$	AUSÊNCIA	66,0
19	63,9	$1,4 \times 10^7$	(-)	AUSÊNCIA	60,2
20	63,2	$1,4 \times 10^7$	(-)	AUSÊNCIA	66,0

N.R. = não realizado

Cont....

Cont...

TABELA 6

Resultados da cocção em água em ebulição sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos pochã artificialmente contaminados

Ovo (unidade)	Peso da amostra (g)	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de <i>Salmonella</i> Cultivo Quantitativo (UFC/g)	Cultivo Qualitativo (Pres/Aus)	Temperatura cocção (°C)
21	62,7	$1,4 \times 10^7$	(-)	AUSENCIA	61,3
22	62,5	$1,4 \times 10^7$	$<10^1$	PRESENCIA	57,1
23	62,9	$1,4 \times 10^7$	$<10^1$	PRESENCIA	57,8
24	63,4	$1,4 \times 10^7$	$<10^1$	PRESENCIA	62,3
25	61,9	$1,4 \times 10^7$	(-)	AUSENCIA	60,3
26	65,5	$1,4 \times 10^7$	$<10^1$	PRESENCIA	59,8
27	67,5	$1,4 \times 10^7$	$<10^1$	PRESENCIA	61,3
28	67,1	$1,4 \times 10^7$	$<10^1$	PRESENCIA	56,2

TABELA 7

Resultados do tempo de cocção em forno microondas (490w/2450Hz)
sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos Pochê
artificialmente contaminados

Ovo (unid.)	Tempo cocção	Peso da amostra	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de <i>Salmonella</i>		Temperatura cocção (°C)
				Prova Quantitativa (UFC/g)	Prova Qualitativa (Pres/Aus)	
1	3m.00s	NR	$1,4 \times 10^8$	(-)	ausência	88,9
2	2m.30s	NR	$1,4 \times 10^8$	(-)	ausência	87,2
3	2m.30s	NR	$1,4 \times 10^8$	(-)	ausência	81,6
4	2m.30s	NR	$1,4 \times 10^8$	(-)	ausência	71,6
5	2m.30s	NR	$1,4 \times 10^8$	(-)	ausência	76,0
6	2m.30s	NR	$1,4 \times 10^8$	(-)	ausência	69,7
7	2m.00s	NR	$1,4 \times 10^8$	(-)	ausência	71,4
8	1m.30s	NR	$1,4 \times 10^8$	(-)	ausência	67,5
9	1m.00s.	46,2	$6,4 \times 10^7$	(-)	ausência	79,5
10	1m.00s.	47,7	$6,4 \times 10^7$	$8,0 \times 10^1$	N.R.	55,1
11	1m.00s.	47,8	$6,4 \times 10^7$	$(10^1$	presença	76,3
12	0m.45s.	48,9	$6,4 \times 10^7$	$1,7 \times 10^2$	N.R.	63,2
13	0m.45s.	48,8	$6,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^2$	presença	72,0
14	0m.45s.	48,9	$6,4 \times 10^7$	$(10^1$	presença	72,0
15	0m.45s.	49,0	$6,4 \times 10^7$	$6,1 \times 10^2$	N.R.	68,5

N.R. = não realizado

cont...

cont...

TABELA 7

Resultados do tempo de cocção em forno microondas (490w/2450Hz) sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos Pochê artificialmente contaminados

Ovo (unid.)	Tempo cocção	Peso da amostra	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de Prova Quantitativa (UFC/g)	<i>Salmonella</i> Prova Qualitativa (Pres/Aus)	Temperatura cocção (°C)
16	0m.45s.	48,1	$1,1 \times 10^7$	$4,1 \times 10^4$	N.R.	67,7
17	0m.45s.	49,4	$1,1 \times 10^7$	$7,7 \times 10^2$	N.R.	63,4
18	0m.45s.	50,6	$1,1 \times 10^7$	(10^1)	presença	53,3
19	0m.45s.	51,5	$1,1 \times 10^7$	(-)	ausência	68,5
20	0m.45s.	51,2	$2,1 \times 10^7$	(-)	ausência	76,1
21	0 m.45s.	51,3	$2,1 \times 10^7$	(-)	ausência	76,4
22	0m.45s.	51,3	$2,1 \times 10^7$	(-)	ausência	68,9
23	0m.45s.	51,8	$2,1 \times 10^7$	$2,7 \times 10^2$	N.R.	67,8
24	0m.45s.	51,9	$2,1 \times 10^7$	(10^1)	presença	64,5
25	0m.45s.	52,1	$2,1 \times 10^7$	(10^1)	presença	70,1
26	0m.45s.	52,4	$2,1 \times 10^7$	(10^1)	presença	65,3
27	0m.45s.	52,6	$2,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^2$	N.R.	54,9

N.R. = Não realizado

5.1.4. Resultados de dois procedimentos de cocção de ovos pochê na eliminação da contaminação por *Salmonella enteritidis*.

Os resultados de dois procedimentos de cocção em ovos pochê artificialmente contaminados são apresentados na TABELA 8.

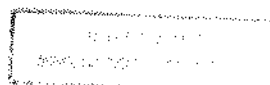


TABELA 8

Resultados de dois procedimentos de cocção sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos Pochê artificialmente contaminados

Procedimentos de cocção	Amostras Positivas		Recuperação (UFC/g.)
	(Nº)	(%)	
Água em ebulição	24/28	(85,7%)	10^1 UFC/g - 16 amostras
			10^1-10^2 UFC/g - 8 amostras
Forno microondas	14/27	(51,8%)	10^2 UFC/g - 9 amostras
			presença - 6 amostras

5.1.5. Resultados do tempo de cocção em água em ebulição e microondas sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos mexidos contaminados

Os resultados do tempo de cocção em água em ebulição e microondas sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos mexidos artificialmente contaminados são apresentados nas TABELAS 9 e 10, respectivamente.

Em ambos os tipos de cocção de ovos mexidos, fogão à gás e forno microondas 70% potência (490w/2450Hz), a destruição no número de células viáveis de *Salmonella enteritidis* foi quase 100% ($6 \log_{10}$ a $7 \log_{10}$), e nos dois tipos de cocção, apenas uma das amostras indicou presença positiva de *Salmonella enteritidis* no cultivo qualitativo.

A alta eficiência na destruição de *Salmonella enteritidis* em ovos mexidos deve-se ao próprio alimento que requer manipulação frequente durante seu preparo, aumentando a taxa de transferência de calor por todo seu conteúdo, e, assim, incrementando o grau de destruição celular bacteriana.

Avaliando-se comparativamente os dois métodos de cocção, convencional e em fogão à gás, em relação aos três tipos de alimentos (ovos cozidos, ovos pochê, ovos mexidos) concluímos que: A cocção por FMO foi mais eficiente na destruição de *Salmonella enteritidis* para ovos cozidos e ovos pochê, a eficiência na destruição de *Salmonella enteritidis* em ovos mexidos foi a mesma para ambos os métodos (convencional e FMO). Acreditamos que essa equivalência deve-se ao próprio alimento, que requer manipulação frequente durante seu preparo, aumentando a taxa de transferência de calor por todo seu conteúdo e incrementando a taxa de destruição bacteriana.

TABELA 9

Resultados da cocção em chama de gás sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos mexidos artificialmente contaminados

Repetições da análise	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de <i>Salmonella</i>	
		Prova Quantitativa (UFC/g)	Prova Qualitativa (Pres/Aus)
A-1	$8,0 \times 10^6$	(-)	ausência
A-2	$8,0 \times 10^6$	(-)	ausência
A-3	$8,0 \times 10^6$	(-)	ausência
B-1	$8,0 \times 10^6$	(-)	ausência
B-2	$8,0 \times 10^6$	(-)	ausência
B-3	$8,0 \times 10^6$	(-)	ausência
C-1	$2,0 \times 10^7$	(10^1)	presença
C-2	$2,0 \times 10^7$	(-)	ausência
C-3	$2,0 \times 10^7$	(-)	ausência
D-1	$9,0 \times 10^6$	(-)	ausência
D-2	$9,0 \times 10^6$	(-)	ausência
D-3	$9,0 \times 10^6$	(-)	ausência

A, B, C, D - aliquotas de 10 g das amostras originais

TABELA 10

Resultados da cocção em forno microondas (490w/2450Hz) sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em ovos mexidos artificialmente contaminados

Repetições da análise	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação de <i>Salmonella</i>	
		Prova Quantitativa (UFC/g)	Prova Qualitativa (Pres/Aus)
A-1	$2,1 \times 10^7$	$< 10^1$	presença
A-2	$2,1 \times 10^7$	(-)	ausência
A-3	$2,1 \times 10^7$	(-)	ausência
B-1	$8,2 \times 10^6$	(-)	ausência
B-2	$8,2 \times 10^6$	(-)	ausência
B-3	$8,2 \times 10^6$	(-)	ausência
C-1	$1,6 \times 10^7$	(-)	ausência
C-2	$8,2 \times 10^6$	(-)	ausência
C-3	$8,2 \times 10^6$	(-)	ausência

A, B, C, D - alíquotas de 10 g das amostras originais

5.2. Resultados da sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em alimentos à base de ovos e consumidos sem tratamento térmico, artificialmente contaminados e submetidos a diferentes tempos de armazenagem.

5.2.1. Resultados do efeito do tempo de congelamento à -18°C sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em sorvete caseiro contaminado.

Os resultados do efeito do tempo de congelamento em freezer doméstico à -18°C sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em sorvete caseiro artificialmente contaminado estão apresentados na TABELA 11.

A armazenagem de sorvete de crema artificialmente contaminado e armazenado em freezer à temperatura de -18°C , causou redução constante no número de células viáveis de *Salmonella enteritidis* igual a 3×10^6 até 7 dias de estocagem. Ao final de 35 dias, a destruição de células viáveis foi ampliada para 4×10^6 , restando 10^2 UFC sobreviventes por grama.

A maioria dos surtos de toxinfecção por sorvetes, ocorrido nos últimos anos, foi veiculada por produtos de preparo caseiro. Havia, sempre, a combinação de práticas higiênicas inadequadas como uso de leite e creme de leite não-pasteurizados, ovos crus, tratamento térmico inadequado e contaminação originada de manipuladores infectados. Esses surtos ocasionais, quase sempre, eram salmoneloses ou intoxicações estafilocócicas (SNYDER et al, 1978).

O grau de destruição de células viáveis de *Salmonella enteritidis* no sorvete de crema artificialmente contaminado, foi grande, considerando-se o valor bastante alto da contaminação inicial (10^6 UFC/g). O sorvete foi inoculado pós-preparo e imediatamente armazenado à -18°C , portanto a destruição das células bacterianas deveu-se à ação da temperatura de armazenamento.

TABELA 11

Resultados do tempo de congelamento em freezer a -18°C sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em sorvete caseiro artificialmente contaminado

Armazenamento	Repetições da análise	Recuperação (UFC/g)
Tempo zero	contaminação inicial	$1,0 \times 10^7$ UFC/ml
24 horas	A-1	$3,4 \times 10^3$
	A-2	$3,8 \times 10^3$
	A-3	$3,3 \times 10^3$
	A-4	$3,8 \times 10^3$
	média	$3,6 \times 10^3$
48 horas	B-1	$7,6 \times 10^3$
	B-2	$6,0 \times 10^3$
	B-3	$8,0 \times 10^3$
	B-4	$3,6 \times 10^3$
	média	$6,3 \times 10^3$
72 horas	C-1	$8,7 \times 10^3$
	C-2	$6,1 \times 10^3$
	C-3	$5,3 \times 10^3$
	C-4	$5,6 \times 10^3$
	média	$6,4 \times 10^3$

cont...

cont...

TABELA 11

Resultados do tempo de congelamento em freezer a -18°C sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em sorvete caseiro artificialmente contaminado

Armazenamento	Repaticões da análise	Recuperação (UFC/g)
07 dias (168 horas)	D-1	$2,4 \times 10^3$
	D-2	$3,6 \times 10^3$
	D-3	$1,8 \times 10^3$
	D-4	$2,3 \times 10^3$
	médias	$2,5 \times 10^3$
35 dias (840 horas)	E-1	$8,3 \times 10^2$
	E-2	$2,4 \times 10^2$
	E-3	$2,8 \times 10^2$
	média	$4,5 \times 10^2$

A, B, C, D - alíquotas de 10 g das amostra original

S.2.2. Resultados do tempo de refrigeração (8°C a 10°C) sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em glacê caseiro de clara contaminado.

Os resultados do tempo de refrigeração (8°C a 10°C) sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em glacê caseiro de clara artificialmente contaminado são apresentados na TABELA 12.

A viabilidade de *Salmonella enteritidis* em glacê caseiro artificialmente contaminado foi reduzida para $3 \times \log_{10}$ da população inicial, resultando em 10^3 UFC/g no decorrer de 7 dias de armazenamento refrigerado (8°C-10°C).

Nessa faixa de temperatura, segundo BOARD et al. (1989, apud MOSSELL & Van HETTEN, 1989), ocorre limitação de crescimento de qualquer sorotipo de *Salmonella*, presente na clara ou gema de ovos. Entretanto, em estudos realizados *in vitro* para avaliar as propriedades antimicrobianas da clara, *Salmonella enteritidis* fagotipo 4 permaneceu viável à temperatura de 4°C durante 42 dias. (LOCK e BOARD, 1990).

O crescimento microbiano na clara do ovo, é limitado por vários fatores como: ausência ou indisponibilidade de água livre ou nutrientes; presença de agentes antimicrobianos naturais como a lisozima que hidroliza o peptidoglicano, componente da parede celular das bactérias Gram positivas; presença de agentes sequestrantes como Avidina (quelante de Biotina) e Ovotransferrina (quelante de ions Ferro); e o pH alcalino (AYRES e TAYLOR, 1956, BOARD et al., 1988, VADEHRA e NATH, 1973).

A clara de ovo crua é considerada detrimental para células bacterianas, reduzindo a viabilidade celular em 50% após incubação à 37°C durante 4 horas e 90% após 48 horas à mesma temperatura (BRADSHALL et al., 1990).

Na obtenção do glacê foi empregado um misturador elétrico para bater a mistura de clara e açúcar refinado. Esse procedimento de desnaturação mecânica da clara, alterou sua integridade estrutural. Como não empregamos nenhum outro ingrediente além dos já mencionados, e o produto final não sofreu qualquer processamento térmico, sendo imediatamente refrigerado pós-preparo, a destruição microbiana deveu-se aos componentes antimicrobianos naturais da clara. A temperatura de armazenamento não teve efeito destrutivo, sendo apenas limitante do crescimento bacteriano (BOARD et al., 1989).

Após 48 horas de armazenamento refrigerado, as amostras de glacê apresentaram alterações na consistência, com início de liquefação.

A capacidade da clara suportar crescimento microbiano parece estar estreitamente relacionada à integridade das estruturas físicas das suas proteínas componentes, já que alterações na estrutura física expressas como alteração da viscosidade (tratamento com papaína e ultrassom) e precipitação de Ovomucina (tratamento aquoso), permitiu a redução da resistência da clara ao crescimento bacteriano (YADAV e VADEHRA, 1977).

TABELA 12

Resultados do tempo de refrigeração (8°C) sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em glacê caseiro de clara artificialmente contaminado

Armazenamento	Repetições da análise	Recuperação (UFC/g)
Tempo zero	Contaminação inicial	$5,0 \times 10^6$ UFC/ml
24 horas	A-1	$4,1 \times 10^3$
	A-2	$1,8 \times 10^3$
	A-3	$2,0 \times 10^4$
	A-4	$1,2 \times 10^4$
	média	$9,5 \times 10^3$
48 horas	B-1	$8,0 \times 10^3$
	B-2	$1,0 \times 10^4$
	B-3	$9,0 \times 10^3$
	B-4	$3,0 \times 10^3$
	média	$7,5 \times 10^3$
72 horas	C-1	$1,5 \times 10^3$
	C-2	$2,2 \times 10^3$
	C-3	$2,6 \times 10^3$
	média	$2,1 \times 10^3$
97 dias	D-1	$4,5 \times 10^3$
	D-2	$3,6 \times 10^3$
	D-3	$6,0 \times 10^3$
	média	$4,7 \times 10^3$

A, B, C, D - alíquota de 10 g das amostra original

5.2.3. Resultados da sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em gemada contaminada.

Os resultados da sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em gemada artificialmente contaminada são apresentados na TABELA 13.

A destruição de *Salmonella enteritidis* em gemada artificialmente contaminada foi próxima de 100%, apesar da alta contaminação inicial (10^6 UFC/ml), e a detecção de células viáveis sobreviventes ($<10^1$ UFC/g) só foi possível através de cultivo qualitativo. A gema é meio de cultura rico e contém substâncias protetoras para os microorganismos como lipídeos e proteínas e também açúcar, considerado protetor. Apesar do batimento manual ocasionar desnaturação mecânica das proteínas favorecendo o acesso microbiano aos nutrientes da gema, a escaldagem com o leite fervente exerceu efeito "pasteurizante", acarretando na destruição do patógeno. Como esse alimento é ingerido ainda quente, e logo após o preparo, não há tempo suficiente para recuperação e crescimento microbiano.

TABELA 13

Sobrevivência de *S. enteritidis* em gemada artificialmente contaminada

Repetições da análise	Contaminação inicial (UFC/ovo)	Recuperação da Prova Quantitativa (UFC/g)	Prova Qualitativa (Pres/Aus)
A-1	$4,5 \times 10^6$	$<10^1$	presença
A-2	$4,5 \times 10^6$	$<10^1$	presença
A-3	$4,5 \times 10^6$	$<10^1$	presença
A-4	$4,5 \times 10^6$	$<10^1$	presença
A-5	$4,5 \times 10^6$	$<10^1$	presença
A-6	$4,5 \times 10^6$	$<10^1$	presença
B-1	$8,2 \times 10^6$	$<10^1$	presença
B-2	$8,2 \times 10^6$	$<10^1$	presença
B-3	$8,2 \times 10^6$	$<10^1$	presença
C-1	$8,2 \times 10^6$	$<10^1$	presença
C-2	$8,2 \times 10^6$	$<10^1$	presença
C-3	$8,2 \times 10^6$	$<10^1$	presença

A, B, C - alíquotas de 10 g das amostras originais

5.2.4. Efeito do pH e tempo de armazenamento à 25°C sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em maionese caseira contaminada.

Os efeitos do pH e tempo de armazenamento à 25°C sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em maionese caseira artificialmente contaminada são apresentados na TABELA 14.

Na temperatura de 25°C, o emprego de ácido cítrico como acidulante de maionese caseira, foi muito pouco efetivo na destruição de *Salmonella enteritidis* para todos os valores de pH (3,80, 3,85, 3,95, 4,04) e tempo de armazenamento (4, 24, 48 e 72 horas).

Os resultados obtidos no armazenamento de maionese caseira à 25°C foram similares aos de PERALES & GARCIA (1990), em que o número de células bacterianas em maionese permaneceu estável em pH igual à 3,6 até 4,0 e armazenada à 24°C.

O ácido cítrico é mais permissivo para a multiplicação celular bacteriana, exercendo menor efeito bactericida que o ácido acético em pratos como maionese e molhos para salada, demonstrado por vários autores (CHUNG & GOEPFERT, 1970; COLLINS, 1985; MINOR & MARTH, 1972; PERALES & GARCIA, 1990).

A maionese caseira armazenada à temperatura de 25°C, para todos os valores de pH analisados, apresentou redução máxima de \log_{10} . A amostra de maionese com pH inicial de 3,80 apresentou multiplicação celular bacteriana de \log_{10} . Essa amostra foi a que apresentou maior variação de pH no decorrer de 72 horas de armazenamento, igual à +0,28 unidades de pH, apresentando pH final de 4,08 (TABELA 16).

O grau de destruição para todos os valores de pH, demonstrou que o ácido cítrico foi muito pouco efetivo na destruição bacteriana, para uma contaminação inicial variando de 10^6 a 10^7 UFC/ml.

TABELA 14

Resultado do pH e tempo de armazenamento a 25°C sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em maionese caseira artificialmente contaminada

pH inicial	Contaminação inicial (UFC/ml)	Tempo de armazenagem	Recuperação de <i>Salmonella</i> (UFC/g)
3,80	$5,5 \times 10^6$	4 horas	$2,0 \times 10^6$
		24 horas	$1,3 \times 10^7$
		48 horas	$1,1 \times 10^7$
		72 horas	$2,4 \times 10^7$
3,85	$8,0 \times 10^7$	4 horas	$2,6 \times 10^5$
		24 horas	$2,6 \times 10^6$
		48 horas	$9,4 \times 10^6$
		72 horas	$1,6 \times 10^6$
3,95	$9,5 \times 10^6$	4 horas	$1,3 \times 10^5$
		24 horas	$1,0 \times 10^6$
		48 horas	$3,0 \times 10^6$
4,04	$1,1 \times 10^7$	4 horas	$3,5 \times 10^5$
		24 horas	$8,0 \times 10^5$
		48 horas	$1,5 \times 10^6$
		72 horas	$2,2 \times 10^6$

5.2.5. Efeito do pH e tempo de armazenamento refrigerado à 8°C sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em maionese contaminada.

Os resultados do efeito do pH e tempo de armazenamento refrigerado à 8°C sobre a sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em maionese caseira artificialmente contaminada são apresentados na TABELA 15.

O grau máximo de destruição bacteriana obtido foi de $2 \times \log_{10}$ ao final de 72 horas de armazenamento refrigerado. A maionese com pH 3,80 sofreu apenas uma redução decimal ($1 \times \log_{10}$) durante o mesmo período.

HUMPHREY (1989), relata que na faixa de +4°C até +8°C, ocorre pouca alteração no número de células viáveis para pH variando desde 3,5 até 4,0. PERALES & GARCIA (1990) obtiveram resultados similares em maionese caseira acidificada com ácido cítrico, pH na faixa 3,6 - 4,0 e armazenada à 4°C.

Na maionese e molhos para salada a base de ovos, a fonte potencial de contaminação de *Salmonella sp* provém das gemas e/ou ovos integrais frescos, não pasteurizados.

Os fatores preservantes mais importantes encontrados nas maioneses e molhos comerciais são os acidulantes empregados: ácido acético e/ou ácido cítrico. O efeito antimicrobiano não ocorre devido apenas ao pH, mas sim como resultado da moléculas de ácido não dissociadas, responsáveis pelas propriedades tóxicas dos ácidos orgânicos sobre as bactérias (HENTGES, 1967; MINDR & MARTH, 1972). O efeito bactericida dos ácidos orgânicos é dependente da temperatura de armazenamento: a efetividade do ácido acético é maior a 35°C que a 24°C na faixa de pH de 3,6 até 4,0 (PERALES & GARCIA, 1990).

No caso da maionese caseira, o perigo da infecção alimentar veiculada por ovos não pasteurizados, é agravado no caso de não ocorrer acidificação suficiente do alimento e faltar refrigeração imediata; vários autores sugerem que a refrigeração exerce efeito protetor sobre as células bacterianas contra os efeitos antimicrobianos dos ácidos orgânicos (PERALES & GARCIA, 1990, CONNER et al., 1986, HOLTZAPFELL & MOSSEL, 1968).

TABELA 15

Efeito do pH e tempo de armazenamento a 8°C sobre a sobrevivência de *S. enteritidis* em maionese caseira artificialmente contaminada

pH inicial	Contaminação inicial (UFC/ml)	Tempo de armazenagem	Recuperação de <i>Salmonella</i> (UFC/g)
3,80	$5,5 \times 10^6$	4 horas	$2,5 \times 10^5$
		24 horas	$2,0 \times 10^5$
		48 horas	$3,0 \times 10^5$
		72 horas	$1,3 \times 10^5$
3,85	$8,0 \times 10^7$	4 horas	$1,3 \times 10^5$
		24 horas	$1,4 \times 10^5$
		48 horas	$2,7 \times 10^5$
		72 horas	$1,6 \times 10^5$
3,95	$9,5 \times 10^6$	4 horas	NR
		24 horas	$2,0 \times 10^5$
		48 horas	$6,2 \times 10^3$
		72 horas	$8,0 \times 10^4$
4,04	$1,1 \times 10^7$	4 horas	$2,0 \times 10^5$
		24 horas	$8,7 \times 10^4$
		48 horas	$8,2 \times 10^4$
		72 horas	$1,1 \times 10^5$

5.2.6. Efeito do tempo e temperatura de armazenagem sobre o pH de maionese contaminada com *Salmonella enteritidis*.

O efeito do tempo e da temperatura de armazenagem sobre o pH de maionese caseira artificialmente contaminada com *Salmonella enteritidis* são apresentados na TABELA 16.

A avaliação das variações de pH foram realizadas apenas para as amostras com pH = 3,80 e pH = 4,04.

Nas duas temperaturas de armazenamento consideradas, a amostra com pH = 3,80, apresentou a maior variação percentual em relação ao pH inicial.

A 25°C, o pH final da amostra foi de 4,08 indicando uma variação de +0,28 após 72 horas de armazenamento, variação percentual de 6,9% em relação ao pH inicial da amostra.

Na temperatura de refrigeração (8 a 10°C), a maior variação no pH da amostra foi de +0,20 após 48 horas, porém essa variação foi reduzida para mais 0,09 ao final de 72 horas, indicando variação percentual de 2,4% em relação ao pH inicial da amostra.

TABELA 16

Efeito do tempo e da temperatura de armazenagem sobre o pH de maionese caseira artificialmente contaminada com *S. enteritidis*

Armazenagem	pH inicial	Tempo da Armazenagem	pH final	Variação
25°C	3,80	4 horas	3,88	+0,08
		24 horas	3,95	+0,15
		48 horas	3,94	+0,14
		72 horas	4,08	+0,28
25°C	4,04	24 horas	4,04	0,00
		48 horas	4,16	+0,12
		72 horas	4,20	+0,16
8°C	3,80	24 horas	3,99	+0,19
		48 horas	4,00	+0,20
		72 horas	3,89	+0,09
8°C	4,04	24 horas	4,07	+0,03
		48 horas	4,07	+0,03
		72 horas	4,09	+0,05

5.2.7. Efeito do pH, tempo e temperatura de armazenagem sobre a sobrevivência de bolores e leveduras em maionese contaminada com *Salmonella enteritidis*.

O efeito do pH, tempo e temperatura de armazenagem sobre a sobrevivência de bolores e leveduras em maionese caseira artificialmente contaminada com *Salmonella enteritidis* são apresentados na TABELA 17.

O armazenamento das amostras de maionese à temperatura de 25°C, demonstrou ser muito favorável ao crescimento de microbiota contaminante de bolores e leveduras, com crescimento variando na faixa de 2×10^1_0 a 5×10^9_0 , ao final de 72 horas de armazenamento. Entretanto, amostras tomadas em diversos pontos do laboratório indicaram contaminação ambiental bastante expressiva.

No armazenamento refrigerado à 8°C, o crescimento na população contaminante de bolores e leveduras variou de 1×10^1_0 a 3×10^9_0 . O maior aumento na população contaminante ocorreu em pH igual a 3,85 com aumento de 3 \log_{10} após 72 horas de armazenamento.

TABELA 17

Efeito do pH, tempo e temperatura de armazenagem sobre a sobrevivência de bolores e leveduras em maionese caseira artificialmente contaminada com *S. enteritidis*.

pH inicial	Contaminação inicial (UFC/ml)	Tempo de Armazenagem	Recuperação Bolores e Leveduras	
			25°C	8°C
3,80	$3,5 \times 10^2$	4 horas	N.R.	$3,0 \times 10^2$
		24 horas	$4,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$
		48 horas	$6,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^2$
		72 horas	$1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^2$
3,85	$1,0 \times 10^2$	4 horas	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
		24 horas	$1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^2$
		48 horas	$8,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
		72 horas	$1,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
4,04	$8,5 \times 10^1$	4 horas	$1,8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
		24 horas	$2,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^2$
		48 horas	$4,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^2$
		72 horas	$7,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^2$

6. CONCLUSÕES

- 6.1. A cocção de ovos reduziu drasticamente, mas não foi capaz de eliminar totalmente a contaminação por *Salmonella enteritidis* de ovos inoculados com 10^6 a 10^7 UFC e mantidos em água em ebulição. As reduções nas células viáveis de *Salmonella enteritidis* variaram de 1×10^3 até 7×10^5 nos diversos tempo de cocção, dentro do período máximo de 8 minutos.
- 6.2. A cocção de ovos em forno microondas por 1 minuto reduziu drasticamente, mas não foi capaz de eliminar totalmente a contaminação por *Salmonella enteritidis* em ovos inoculados com 10^7 UFC. A presença de *Salmonella enteritidis* foi demonstrada através do cultivo qualitativo em todas as amostras irradiadas durante 1 minuto à 70% potência (490W/2450Hz). Uma única amostra, com tempo de cocção de 45 segundos apresentou número de sobreviventes igual a $1,1 \times 10^2$ UFC/g.
- 6.3. A cocção de ovos pochê em água em ebulição reduziu cerca de 7×10^3 o número de células viáveis de *Salmonella enteritidis* para uma contaminação inicial de 10^7 - 10^8 UFC/ml. Esse tipo de cocção permitiu a sobrevivência de células viáveis na faixa de 10^1 até 10^2 UFC/g.

- 6.4. A cocção de ovos tipo poché em forno microondas eliminou totalmente a contaminação por *Salmonella enteritidis* de ovos inoculados com 10^7 a 10^8 UFC por ml, quando o tempo de cocção era igual ou superior a 1m:30s. A redução do tempo de cocção de 1 minuto até 45 segundos permitiu a sobrevivência de células viáveis de 10^1 a 10^2 UFC/g.
- 6.5. Tanto a cocção de ovos mexidos preparados em chama de gás ou em forno microondas foi capaz de eliminar totalmente a contaminação de ovos inoculados com 10^6 a 10^7 UFC por ml, com exceção de dois casos em 18 repetições, mesmo assim, a contaminação era muito baixa ($<10^1$ UFC/g).
- 6.6. O congelamento do sorvete à -18°C reduziu o número de células viáveis de *Salmonella enteritidis* em $3\log_{10}$ até 7 dias de armazenamento. Após 35 dias, o grau de redução foi ampliado para $4\log_{10}$. A contaminação inicial do sorvete foi de $1,0 \times 10^6$ UFC/g.
- 6.7. O glacê de clara armazenado em refrigerador ($8-10^{\circ}\text{C}$) durante 7 dias, sofreu redução constante e igual à $3\log_{10}$ no número de células viáveis de *Salmonella enteritidis*, para contaminação inicial de $5,0 \times 10^6$ UFC/g.
- 6.8. A escaldagem com o leite fervente no preparo de gemada artificialmente inoculada exerceu efeito "pasteurizante" destruindo a contaminação inicial de 10^5 UFC/g em quase 100%. A detecção de células viáveis sobreviventes ($< 10^1$ UFC/g) só foi possível através do cultivo qualitativo.

- 6.9. A variação do pH (3,80 a 4,04), de tempo (4 até 72 horas), e a temperatura de armazenamento (0, 10 e 25°C) exerceram pouco ou nenhum efeito na redução da contaminação inicial da maionese caseira ($10^6 - 10^7$ UFC/ml). A 25°C, a redução máxima obtida foi de apenas $1 \times \log_{10}$ para amostras com pH iguais a 3,85 e 4,04, após 72 horas de armazenamento. A 8°C, todas as amostras apresentaram redução no número de células viáveis, variando de $1 \times \log_{10}$ para amostra com pH igual a 3,80 a $2 \times \log_{10}$ para as demais amostras.
- 6.10. O armazenamento de maionese caseira favoreceu o aumento da população contaminante de bolores e leveduras. A 25°C, todas as amostras apresentaram aumento de contaminantes, variando de $3 \times \log_{10}$ até $5 \times \log_{10}$ após 72 horas. A 8°C, a amostra com pH igual 3,80 não apresentou variação na população contaminante de bolores e leveduras e as demais apresentaram aumento no número de contaminantes que variou de $1 \times \log_{10}$ a $3 \times \log_{10}$ ao final de 72 horas de armazenamento.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERTON, G., WARD, W.H. e FEVOLD, H.L., 1946 apud BOARD, R.G., 1966
- ANNIS, P.J. Design and use of domestic microwaves ovens. J. Food Protac. 43:629-638, 1980.
- ANÔNIMO. Salmonella in Eggs. PHLS evidence to Agriculture Committee. PHLS Microbiology Digest 6:1-9, 1989; apud HUMPHREY, 1990.
- AYRES, J.C. e TAYLOR, B. Effect of temperature on microbial proliferation in shell eggs. Appl. Microbiol. 4:355, 1956.
- BALDWIN, R.E., CLONINGER, M., FIELDS, M.L. Growth and destruction of *S. typhimurium* in egg with Foam products cooked by microwaves. Appl. Microbiol, 16:1929-1934, 1968.
- BAKER, C.M.A., 1960 apud BOARD, R.G., 1966
- BAKER, R.C. Dairy Food Environ. Sanit. 10:273-275, 1990, apud SILVA, 1993.
- BARROW, P.A. AVIAN Pathology 20:145-153, 1991a. apud SILVA, 1993.
- BARROW, P.A. e LOVELL, M.A. "Experimental infection of egg laying -hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. Avian Pathology 20:335-348, 1991b.
- BARROW, P.A. et al. AVIAN Pathology 20:681-692, 1991c. apud SILVA, 1993.
- BERCHIERI JR., A. Rev. Microbial 24:22-25, 1993. apud SILVA, 1993.

- BIGLAND, C.H. e PAFAS, G., 1953 apud BOARD, R.G. 1966.
- BLANCO, J.F. e DAWSON, L.E. Survival of *C. perfringens* on chicken cooked with microwave energy. P. Sci. 53:1823-1830, 1984.
- BOARD, R.G. "The growth of gram negative bacteria in the hen's eggs. J. Appl. Bacteriol, 27:350, 1964.
- BOARD, R.G. e AYRES, J.C. Influence of temperature on bacterial infection of the hen's egg. Appl. Bacteriol, 13:358, 1965a.
- BOARD, R.G. The properties and classification of the predominant bacteria occurring in rotten eggs. J. Appl. Bacteriol, 28:437, 1965b.
- BOARD, R.G. Review article: the course of microbial infection of the hens'egg. J. Appl. Bacteriol, 29(2):319-341, 1966.
- BOARD, P.A., HENDEN, L.P. e BOARD, R.G. The influence of iron on the course of bacterial infection of the hen egg. Brit. Poult. Sci. 9:211, 1968.
- BRADSHAW, J.G., SHAH, D.B., FORNEY, E., HADDEN, J.M. Growth of *Salmonella enteritidis* in yolk of shell eggs from normal e seropositive hens's. J. Food Protec. 53:1033-1036, 1990.
- BRANT, A.W. e STARR, P.B., 1962 apud BOARD, R.G., 1966
- BROOKS, J. Mechanism of the multiplication of *Pseudomonas* in the hens's eggs. J. Appl. Bacteriol. 23:499, 1960.
- BROOKS, S.J. e HALE, H.P., 1959 apud BOARD, R.G., 1966
- BROOKS, J. e TAYLOR, D.T., 1955 apud BOARD, R.G. 1966.
- BRYANT, R.L. e SHARP, P.L., 1934, apud BOARD, R.G., 1966.

- CAUSEY, K. & FENTON, F. Effect of reheating on palatability, nutritive value and bacterial counts of frozen cooked foods. 2. Meats. J. Am. Med. Assoc. 27:491-495, 1951.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Update. *Salmonella enteritidis* infections and shell eggs. United States, 1990. Morbid Mortal. Weekly Report (MMWR). 39:909-912, 1990.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Outbreak of *Salmonella enteritidis* Infection Associated with Consumption of Raw Shell Eggs. 1991. Morbid. Mortal. Weekly Report (MMWR). 41:369-372, 1992.
- CHEN, T.C., CULCOTTA, J.T., WANE, W.S. Effects of water and microwave energy precooking on microbiological quality of chicken parts. J. Food Sci. 38:155-157, 1973.
- CHUNG, K.S. & BOEFFERT, J.M. "Growth of salmonella at low pH". J. Food Sci. 35:326-328, 1970.
- COLLINS, M.A. 1985, apud PERALES & GARCIA, 1990.
- CONNER, D.E., BRACKETT, R.E. & BEAUCHT, L.R. "Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. Appl. and Environ. Microbiol. 52:59-63, 1986.
- COOK, F. & BRIGGS, G.M. Nutritive value of eggs. In: STADELMAN, W.J. & COTTERILL, O.J. Egg Science and Technology. Connecticut, AVI, 314p., 1973.
- CORRIER, D.E., HINTON JR., A, ZIPRIN, R.L., BEIER, R.C., DeLOACH, JR. Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids and *S. typhimurium* colonization of broiler chicks. Avian Dis. 34:617-625, 1990a.

- CORRIER, D.E., HINTON JR., A, ZIPRIN, R.L., BEIER, R.C., DeLOACH, JR. Effect of dietary lactose in *Salmonella* colonization of market-age broiler chickens. *Avian Dis.* 34:668-676, 1990b.
- COTTERILL, D.J. & WINTER, A.R.H., 1955 apud BOARD, R.G., 1966
- COWDEN, J.M. et al. Report of a national case control study of *S. enteritidis* phage type 4 infection. *Brit. Med. J.* 299:771-773, 1989.
- COX, H.A. *Avic. Profes.* 7:74-78, 1989; apud SILVA, 1993.
- COYLE, E.F. et al. *Salmonella enteritidis* phage type 4, infection: association with hen's eggs. *Lancet.* ii:1295-1297, 1988.
- CRAVEN, S.E. & LILLARD, H.S. Effect of microwave heating and precooked chicken on *C. perfringens*. *J. Food Sci.* 39:211-212, 1974.
- CUNNINGHAM, F.E. The effect of brief microwave treatment on numbers of bacteria in fresh chicken parts. *P. Sci.* 57:296-297, 1978.
- DOYLE, M.P. & CLIVER, D.O. Chapter 11- *Salmonella* in: CLIVER, D.O. ed. *FOODBORNE DISEASES*. Academic Press, Inc. pg 186-203, 1990.
- EBEL, E.D. et al. Occurrence of *Salmonella enteritidis* in unpasteurized liquid eggs in the United States. *Avian Dis.* 37:135-142, 1993.
- ELLIOT, R.P. Spoilage of shell eggs by *Pseudomonas*. *Appl. Microbiol.* 2:158, 1954.

- EWING, W.H. EDWARDS and EWING'S Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th edition. Elsevier, 1986.
- F.D.A. Bacteriological Analytical Manual, 6th edition, 1984.
- FEENEY, R.E., DUCAY, E.D., SILVA, R.S. e MacDONNELL, L.R., 1992 apud BOARD, R.G., 1966.
- FERDINANDOV, 1944 apud BOARD, R.G., 1966.
- FERREIRA, A.J.P., ITO, N.M.K., BENEZ, S.M. e NORONHA, A.M.B. Infecção natural e experimental por *Salmonella enteritidis* em pintos. Conferência FACTA, Campinas, SP, pp. 171, 1990.
- FLEMING, A., 1922 apud BOARD, R.G., 1966.
- FRIEDBERG, E. e HODER, F., 1932 apud BOARD, R.G., 1966.
- FROMM, D. e MONROE, R.J. Interior physical quality and bacterial contamination of market eggs as influenced by egg shell permeability. Food Technol. 14:401, 1960.
- FUNG, D.Y.C. e CUNNINGHAM, F.E. Effect of microwaves on microorganisms in foods. J. Food Protec. 43:641-650, 1980.
- FURUSE, H., YANG, S.I., NIWA, M., OKUMURA, J. Effect of short chain fatty acids on the performance and intestinal weight in germ-free and conventional chicks. Br. P. Sci. 32:159-165, 1991.
- GARIBALDI, J.A. e STOKES, J.L. "Protective role of shell membranes in bacterial spoilage of eggs". Food Res. 23:283, 1958.

- GARIBALDI, J.A. & BAYNE, H.G. The effect of iron on *Pseudomonas* spoilage of experimentally infected eggs. P. Sci. 39:1517, 1960.
- GARIBALDI, J.A. & BAYNE, H.G. Iron and the bacterial spoilage of shell eggs. J. Food Sci. 27:57-, 1962a.
- GARIBALDI, J.A. & BAYNE, H.G. The effect of iron on *Pseudomonas* spoilage of farm washed eggs. Poultry Sci. 41:850-, 1962b.
- GAST, R.K. & BEARD, C.W. Production of *Salmonella enteritidis* contaminated eggs by experimentally infected hens. Avian Dis. 34:438-446, 1990a.
- GAST, R.K. & BEARD, C.W. Serological detection of experimental *Salmonella enteritidis* infections laying hens. Avian Dis. 34:721-728, 1990b.
- GAST, R.K. & BEARD, C.W. Isolation of *Salmonella enteritidis* from internal organs of experimentally infected hens. Avian Dis. 34:991-993, 1990c.
- GAST, R.K. & BEARD, C.W. Detection of *Salmonella* serogroups D-specific antibodies in the yolks of eggs laid by hens infected with *Salmonella enteritidis*. P. Sci. 70:1273-1276, 1991.
- GAST, R.K. & BEARD, C.W. Detection and enumeration of *Salmonella enteritidis* in fresh and stored eggs by experimentally infected hens. J. Food Protec. 55:152-156, 1992a.
- GAST, R.K. & BEARD, C.W. Evaluation of a chick mortality model for predicting the consequences of *Salmonella enteritidis* infections in laying hens. P. Sci. 71:281-287, 1992b.

- GAST, R.K. Detection *Salmonella enteritidis* in experimentally infected laying hens by culturing pools of egg contents. P. Sci. 72(2):267-274, 1993a.
- GAST, R.K. & BEARD, C.W. Research to understand and control *Salmonella enteritidis* in chickens and eggs. P. Sci. 72:1157-1163, 1993b.
- GILLESPIE apud HOATS, 1976.
- GILLESPIE, J.H. & SCOTT, W.J., 1950 apud BOARD, R.G., 1966.
- GORDON, R.F. & TUCKER, J.F., 1954; apud BOARD, R.G., 1966.
- GORHAM, S.L., LAMBERT, H., VAUGHAN, E., PERT, B. & ABEL, J.: "Persistence of *Salmonella enteritidis* in young chickens. Avian Path. 20:433-437, 1991.
- HAINES, R. B., 1939, apud BOARD, R.G., 1966.
- HAINES, R:B. & MORAN, T., 1940, apud BOARD, R.G., 1966.
- HAMMACK, T.S., SHERROD, P.S., BRUCE, V.R., JUNE, G.A., SATCHELL, F.B., ANDREWS, W.H. Research note. Growth of *Salmonella enteritidis* in grade A eggs during prolonged storage. P. Sci. 72:373-377, 1993.
- HARRISON, D.L. Microwaves versus conventional cooking methods: Effects on food quality attributes. J. Food Protec. 43: 633-637, 1980.
- HARTUNG, T. E. & STADELMAN, W. J. "The influence of metallic ions on the penetration of the egg shell membranes by *P. fluorescens*: P. Sci. 41: 1590, 1962.
- HAWTHORNE, J.R., 1950; apud BOARD, R.G., 1966.

- HENTGES, D. J. Influence of pH on the inhibitory activity of formic and acetic acids for *Shigella*. J. Bacteriol. 93: 2029-2030, 1967.
- HINTON, M. & LINTON, A.H. Control of *Salmonella* infections in broiler chickens by the acid treatment of their feed. Vet. Rec. 123:416-421, 1988.
- HINTON, Jr., A.H., CORRIER, D.E., SPATES, G.E., NORRAN, J.O., ZIPRIN, R.L., BEIER, R.C., DeLOACH, J.R. Biological control of *Salmonella typhimurium* in young chickens. Avian Dis. 34:626-633, 1990a.
- HINTON, M. & ROWE, B. The invasive potential of *Salmonella enteritidis* phage types for young chickens. Letters in Applied Microbiol. 10:237-239, 1990.
- HINTON, M. & BALE, M.J. In Feedstuff evaluation. J. WISEMAN & D.J.A. COLE. Ed. London, p.429-443, 1990.
- HUMPHREY, T.J. The effects of high or low temperature or acid on the survival of salmonellas in eggs, eggs-products or poultry meat. Turkeys. 37:13-14, 1989.
- HUMPHREY, T.J., GREENWOOD, K., GILBERT, R.J., ROWE, B. & CHAPMAN, P.A. "The survival of salmonellas in shell eggs cooked under simulated domestic conditions". Epidemiol. Infec. 103:35-45, 1989a.
- HUMPHREY, T.J., BASKERVILLE, A., HAWER, S.L., ROWE, B. & HOPFER, A.S. *Salmonella enteritidis* from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected hens. Epidemiol and Infect. 103:415-423, 1989b.

- HUMPHREY, T.J. Public Health implications of the infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *World's Poultr. Sci. J.* 46:5-13, 1990.
- HUMPHREY, T.J. Growth of *Salmonellais* in intact shell eggs. Influence of storage temperature. *Vet. Rec.* 126:292, 1990a.
- HUMPHREY, T.J. Heat resistance in *Salmonella enteritidis* phage type 4: the influence of storage temperatures before heating. *J. Appl. Bacteriol.* 69:493-497, 1990b.
- HUMPHREY, T.J., BASKERVILLE, A., CHART, H., ROWE, B. & WHITEHEAD, A. *Salmonella enteritidis* PT 4 infection in specific pathogen free hens. influence of infecting dose. *Vet. Rec.* 129:482-485, 1991a.
- HUMPHREY, T.J., WHITEHEAD, A., GAWLER, A.H.L., HENLEY, A. & ROWE, B. Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hen's eggs. *Epidemiol. Infec.* 106:489-496, 1991b.
- HOLTZAPFFEL, D.E. & HOSSELL, D.A.A. The survival of pathogenic bacteria in, and the microbial spoilage of, salads, containing meat, fish and vegetables. *J. Food Technol.* 3:223-239, 1968.
- HUNTON, P. *Salmonella*. Perception Versus Reality. *Poultry International* - August: 32-35, 1991.
- JORDAN, R.; BARR, A.T. & WILSON, M.L., 1954, apud BOARD, R.G., 1966.
- KRAFT, A.A., ELLIOTT, L.E. & BRANT, A.W. The shell membranes as a barrier to bacterial penetration of eggs. *P. Sci.* 37:238, 1958.
- KRAUSE, P. von, 1971, apud SKITTLE, R.B., 1977.

KOROTKOVA, G.P., 1957; apud BOARD, R.G. 1966.

LASCHTSCHENKO, P., 1909, apud BOARD, R.G. 1966.

LEVINE, A. S. e FELLERS, C. R., 1940 apud SMITTLE, R. B., 1977.

LICCIARDELLO, J. L., NICHESON, J. E. R. e GOLDBLINTH, S. A.
"Detection of Salmonellas in hard boiled eggs". apud HUMPHREY,
1990.

LIFSHITZ, A. e BAKER, R. D. Some physical properties of the egg
shell membranes in relation to their resistance to bacterial
penetration. P. Sci 43: 527, 1964.

LIN, F. - Y. C. et al. Investigation of an Outbreak of *Salmonella*
enteritidis gastroenteritis associated with consumption of egg
in a restaurant chain in MARYLAND. Am. J. Epidemiol. 128:
839-844, 1988.

LDNGSWORTH, L.G., CANNAN, R.K. e MacINNES, D.A., 1940, apud
BOARD, R.G. 1966.

LISTER, S. A. *Salmonella enteritidis* infection in broilers and
broiler breeder. Vet. Rec. 123: 350, 1988.

MARSHAL, W. e CRUICKSHANK, D. B., 1938 apud BOARD, R. G., 1966.

HASSHOFF e STOPLMAN, 1961; apud BOARD, R. G., 1966.

MAWER, S. L. et al. Lancet i : 280-281, 1989.

MCCAPES, R. H., EKPERIGIN, H. E., CAMERON, W.J., RITCHIE, W. L.,
SLAGTER, J., STANGELAND, V., NAGARADA, K. V. Effect of a new
Pelleting Process on the level of contamination of Poultry
Wash by *E. coli* and *Salmonella*. Avian Dis. 33: 103-111, 1989.

- MCHAN, F. SHOTTS, E. B., BROWN, J. Effect of Feeding Selected carbohydrates on the *in vivo* attachment of *S. typhimurium* in chick ceca. Avian Dis. 35: 328-331, 1991.
- MCHAN, F. & SHOTTS, E. B. Effect of Feeding Selected Short chain Fatty Acids on the *in vivo* attachment of *S. typhimurium* on chick ceca. Avian Dis. 36: 139-142, 1992.
- MILLER, W. A. & CRAWFORD, L. B. Some factors influencing bacteria population of eggs. P. Sci. 32: 303, 1953.
- MINOR, T. E., & MARTH, E. H. Loss of viability by *S. aureus* in acidified media I. Inactivation by several acids, mixtures of acids, and salts of acids. J. Milk and Food Technol. 35: 191-196, 1972.
- MOATS, W.A. Egg washing - a review. J. Food Prot. 41: 919-925, 1978.
- NICHOLAS, R.A.J. & ANDREWS, S.J. Detection of antibody to *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* in the yolk of hens' eggs. Vet. Rec. 128:98-100, 1991.
- NISBET, D.J., CORRIER, D.E., DeLOACH, J.R. Effect of mixed cecal microflora maintained in continuous culture and of dietary lactose on *S. typhimurium* colonization in broiler chicks. Avian Dis. 37:528-535, 1993.
- NURMI, E. & RANTALA, M. Nature. 241:210-211, 1973.
- OREL, V. The *Pseudomonas* spoilage of eggs laid by individual hens. P. Sci. 38:8, 1959.
- OSBORNE, T.B., CAMPBELL, G.F., 1900, apud BOARD, R. G., 1966.

- PADRON, M. N. *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. Avian Dis. 34: 463-465, 1990.
- PERALES, I. e AUDICANA, A. The role of hens' eggs in outbreaks of salmonellosis in North Spain. Int. J. Food Microbiol. 8:175-180, 1989.
- PERALES, I. e GARCIA, M.I. The influence of pH and temperature on the behavior of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in home-made mayonnaise. Letters in Appl. Microbiol. 10:19-22, 1990.
- PETTER e HEALEY, 1925, apud BOARD, R. G., 1966.
- POTTER, H. Zootec. Inter. Dec.: 44-46, 1987 apud SILVA, 1993.
- RAMPLING, A. et al. *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection of broiler chickens, a hazard to public health. Lancet. ii. 436-438, 1989.
- RISK, S.S., AYRES, J.C., CRAFT, A.A. Effect of holding condition on the development of *Salmonellas* in artificially inoculated hens' eggs. P. Sci. 45:825-829, 1966.
- ROMANOFF, A.L. e ROMANOFF, A. J. The AVIAN EGG. New York, John Wiley e Sons Inc. 2ª edição, 918 p. 1963.
- SALTON, H.R.J., 1957, apud BOARD, R. G., 1966.
- SCHADE, A.L. e CAROLINE, L. 1944, apud BOARD, R. G., 1966.
- SCHAIBLE, F.J., BANDEMER, S.L. e DAVIDSON, J.A., 1946, apud BOARD, R. G., 1966.
- SHARP, P.F. e WITHAKER, R., 1927, apud BOARD, R. G., 1966.
- SHERWOOD, D.H., 1958, apud BOARD, R. G., 1966.

- SHIVAPRASAD, H.L., TIMONEY, J.F., MORALES, S., LUCIO, B, BAKER, R.C. "Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, faecal shedding, and serological responses. Avian Dis. 34:548-557, 1990.
- SILVA, E.N. Salmonellas en AVES Y SALUD PUBLICA con especial referencia a *Salmonella enteritidis*. SEMINARIO TECNICO AVICOLA DE LA ASOCIACION DE MEDICOS VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM AVICULTURA (AMEVEA), SANTA CRUZ, BOLIVIA. 28 a 30/10/93.
- SILVA, E.N. Arq. Esc. Vet. UFMG, 25:169-173 apud SILVA, 1993.
- SINGER, et al. Avian Dis. 36: 324-333, 1992 apud SILVA, 1993.
- SIMKISS, K. Calcium metabolism and avian reproduction. Biol. Rev. 36:321, 1961.
- SHITTLE, R.B. "Microbiology of mayonnaise and salad dressing: A Review. J. Food Protec. 40(6):415-422, 1977.
- SHITTLE, R.B.e FLOWERS, R.S. "Acid tolerant microorganisms involved in the spoilage of salad dressings. J. Food Protec. 45:977-983, 1982.
- SNYDER et al. 1978., U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1967-1979- in: MICROBIAL ECOLOGY OF FOODS VOL. II - CHAPTER 18 Milk and Milk Products. V. Ice Cream and Edible Ices pg. 494-499.
- SPACKMAN, D. *Samonella* in poultry in the U.K. Observations and Actions. Western P. Dis. Conf. DAVIS, C.A.pg. 207-210, 1989.

- SPEARS, K.R., WOOLEY, R.E., BROWN, J., FLETCHER, O.J., PAYER, J.B. Characteristics of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from broiler flocks classified as "good" or "poor" producers. Avian Dis. 34:855-860, 1990.
- SPIE, G.T. Microwave inactivation of bacterial pathogens in various controlled frozen food compositions and in a commercially available frozen food product. J. Food Protec. 47:458-462, 1984.
- STAVRIC, S. & D'ADUST, J.Y. Undefined and defined bacterial preparations for competitive exclusion of salmonella in poultry - A Review. J. Food Protec. 56:173-180, 1993.
- ST. LOUIS, M.E., MORSE, D.L., POTTER, M.E., De MELFI, T.H., GUZEWICH, J.J., TAUXE, R.V., BLAKE, P.A. "The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections: new implications for the control of salmonellosis". J. Am. Med. Assoc. 259:2103-2107, 1988.
- STOKES, D.L., OSBORNE, W.W. & BAYNE, H.G. "Penetration and growth of *Salmonella* in shell eggs. Food Res. 21:510, 1956.
- TELZAK, E.E., BUDNICK, L.D., GREENBERG, M.S.Z., BLUM, S., SHAYEGANI, M., BENSON, C.E. & SCHULTZ, S. A nosocomial outbreak of *Salmonella enteritidis* infection due to the consumption of raw eggs. N. Eng. J. Med. 323:394-397, 1990.
- TEOTIA, J.S. & MILLER, B.F. Destruction of *Salmonella* on poultry meat with lysozyme, EDTA, X-rays, microwaves and chlorine. P. Sci. 54:1388-1394, 1975.
- YIMONEY, J.F., SHIVAPRASAD, H.L., BAKER, R.C. & ROWE, B. Egg transmission after infection of hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. Vet. Rec. 125:600-601, 1989.

- TYLER, C. 1945 apud BOARD, R.G., 1966.
- TYLER, C. 1953 apud BOARD, R.G., 1966.
- TYLER, C. 1956 apud BOARD, R.G., 1966.
- TYLER, C. 1961a apud BOARD, R.G., 1966.
- TYLER, C. 1961b apud BOARD, R.G., 1966.
- VADHRA, D.V. e NATH, K.R. 1973. Egg as source of protein CRC Critical Rev. Food Technol. p. 193, 1973 apud YADAV e VADHRA, 1977.
- WARNER, R.C. e WEBER, I., 1953 apud BOARD, R.G., 1966.
- WEINACK, O.H., SHOENBOS, G.H., SKYSER, C.F., SDERJADI, A.S. Reciprocal competitive exclusion of *Salmonella* and *E. coli* by native intestinal microflora of the chickens and turkeys. Avian. Dis. 26: 585-545, 1982.
- WETHINGTON, M.C. e FABIAN, F.W. Viability of food-poisoning *Staphylococci* and *Salmonellae* in salad dressing and mayonnaise. Food Research. 15:125-134, 1950.
- WILCOX, F.H., 1955 apud BOARD, R.G., 1966.
- WILLIAMS, J.E. e DILLARD, L.H. Avian Dis. 12:645-649, 1968b apud SILVA.
- WINSLOW, C.E.A. e LOCKRIDGE (1966) apud SHITTLE, R.B., 1977.
- WOODBURN, M., BENNION, M., VAIL, G.E. Destruction of *Salmonella* and *Staphylococci* in precooked poultry products by treatment before freezing. Food Technol. 16:98-100, 1962.

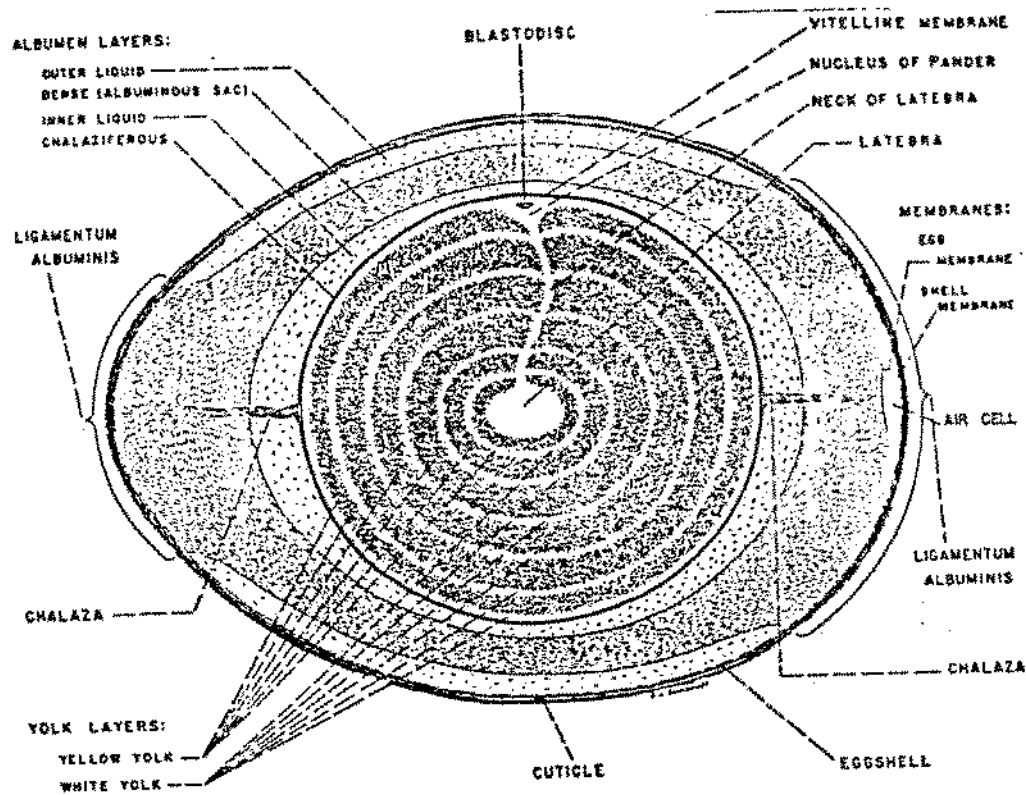
YADAV, N.K. & VADEHRA, D.V. Mechanisms of egg white resistance to bacterial growth. J. Food Sci. 42:97-99, 1977.

ZAGAEVSKY, J.S. & LUTIKOVA, P.O. 1944. apud BOARD, R.G. 1966.

ZIPRIN, R.L., CORRIER, D.E., HINTON JR., L. A., BEIER, R.C., SPATES, G.E. DeLDACH, J.R., ELISSALDE, M.H. Intracloacal *Salmonella typhimurium* infection of broiler - chickens: reduction of colonization with anaerobic organisms and dietary lactose. AVIAN DIS. 34:749-753, 1990.

ANEXO

Estrutura do ovo



Structure of the hen's egg, shown by a section through the long axis.

Fonte: ROMANOFF e ROMANOFF (1963)