

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Tecnologia de Alimentos

ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE *Salmonella* ENTERITIDIS E *Escherichia coli* NA CASCA, SUA PENETRAÇÃO NO CONTEÚDO INTERNO E ALTERAÇÕES NA QUALIDADE EM OVOS DE GALINHA CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE SIMULANDO CONDIÇÕES USUAIS DE PRODUÇÃO COMERCIAL

ANDREA TROLLER PINTO

Médica Veterinária – Mestre em Ciências Veterinárias

EDIR NEPOMUCENO DA SILVA

Orientador

Campinas – SP
2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Tecnologia de Alimentos

ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE *Salmonella* ENTERITIDIS E *Escherichia coli* NA CASCA, SUA PENETRAÇÃO NO CONTEÚDO INTERNO E ALTERAÇÕES NA QUALIDADE EM OVOS DE GALINHA CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE SIMULANDO CONDIÇÕES USUAIS DE PRODUÇÃO COMERCIAL

Tese apresentada à
Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Doutor em
Tecnologia de Alimentos

ANDREA TROLLER PINTO
Médica Veterinária – Mestre em Ciências Veterinárias

EDIR NEPOMUCENO DA SILVA
Orientador

Campinas – SP
2005

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

Pinto, Andrea Troller
P658e Estudo do comportamento de *Salmonella Enteritidis* e
Escherichia coli na casca, sua penetração no conteúdo interno e
alterações na qualidade em ovos de galinha contaminados
artificialmente simulando condições usuais de produção
comercial / Andrea Troller Pinto. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Edir Nepomuceno da Silva
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ovos de galinha. 2. Ovos de galinha - Qualidade. 3.
Qualidade da casca. 4. *Escherichia coli*. 5. *Salmonella*
Enteritidis. I. Silva, Edir Nepomuceno da Silva. II.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: A study of the behavior of *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli*
strains on eggshells. Penetration of the shell and the effect on the
quality of artificially contaminated chicken table eggs; simulating
the usual processing conditions.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Chicken eggs, Chicken eggs – Quality, Egg shell
quality, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Edir Nepomuceno da Silva (orientador)

Angelo Berchieri Junior

Arnaldo Yoshiteru Kuaye

José Luiz Pereira

Luiz Augusto do Amaral

Marise Aparecida Rodrigues Pollonio

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva
(orientador)

Prof. Dr. Ângelo Berchieri Júnior
(Membro)

Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral
(Membro)

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)

Profa. Dra. Marise Aparecida Rodrigues Pollonio
(Membro)

Quando não há saúde, a sabedoria não se revela, a arte não se manifesta, a força não pode combater, a fortuna se torna inútil, a inteligência não pode ser utilizada.

Herophilus, 300 A.C.

*...quanto mais os homens se entregam à sabedoria, mais se distanciam da felicidade..., eles esquecem então que são apenas homens e querem ser vistos como deuses; amontoam, a exemplo dos Titãs, ciências sobre ciências...e servem-se delas como outras tantas máquinas para fazer guerra à natureza....É aproximando-se o quanto puderem da ignorância e da loucura dos brutos, é jamais empreendendo algo que esteja acima de sua condição e de sua natureza, que os homens verão diminuir sensivelmente as misérias inumeráveis que os atormentam e os oprimem....
Tudo, no mundo é tão obscuro e variável que é impossível saber alguma coisa ao certo, como assinalaram muito bem meus bons amigos acadêmicos,...se alguém consegue saber alguma coisa, é quase sempre em detrimento da felicidade da vida.*

Erasmus de Rotterdam, 1469-1536.

Dedico este meu esforço a meu pai e minha avó, que tanto se orgulhariam deste momento e de mim, mas que não puderam esperar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor da minha vida, por tudo;

A meu amor, por me fazer querer ser uma pessoa melhor e por me desafiar, sempre;

A Edir Nepomuceno da Silva, pela confiança, exemplo e oportunidades que me proporcionou neste curto período de convivência. Obrigada por ter me colocado a prova de mim mesma, tantas vezes;

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões dadas e pelo respeito com que trataram meu trabalho;

A Granja Satoshi, especialmente a Eiji e Hideki Ito, pela cedência das amostras da tese, por terem aberto sua empresa para meu trabalho e pela amizade;

A meus dois grandes amigos, incentivadores e professores, Jane Rubensam e Pedro Felício, pelas palavras de incentivo e afeto que venho recebendo deles ao longo da minha vida;

A todos com quem convivi no Laboratório de Higiene, FEA; Dirce, Denir, Celina,. Cíntia, Juliane, João, Luciana, por serem sempre tão pacientes e amigos;

A meus irmãos do coração, Cláudia Pinho e Eduardo Henrique Walter, pelo carinho, amizade, auxílio e cuidado que tiveram comigo durante o período em que estivemos juntos;

A todos os amigos que fiz neste tempo, principalmente Silvia Clareto, que me emprestou sua família; Christiane Vasconcelos, que me permitiu rir o tempo todo; Raquel Manhani, pela atenção desmedida; Cleide Moller, por ter estado sempre tão presente. A elas todas, pelo convívio sempre parceiro, dentro e fora da Universidade;

Aos professores e funcionários do DTA, pela disposição em ajudar;

À Ana Lourdes Gandara, pelo exemplo de amizade e equilíbrio. Obrigada pelas palavras sempre certas nos momentos difíceis;

A Edson Luis David, por estar sempre presente nas minhas “panes”, no laboratório;

Às estagiárias que me auxiliaram, Patrícia, pelo riso sempre fácil e Amanda, pela presença constante;

Aos funcionários da Biblioteca –FEA, pela atenção e orientação;

A Cosme Perota, pelo apoio desde a época da entrevista de seleção;

Aos meus jovens colegas, Juliana, Priscila, Larissa e Guilherme, por me permitirem aprender com a sua juventude;

Às Instituições que acreditaram neste trabalho, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Estadual de Campinas, CAPES e FAPESP.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Epidemiologia das Salmonelas.....	4
2.1.1. Epidemiologia da <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) e a ocorrência de salmonelose associada ao consumo de ovos e seus produtos.....	4
2.1.2. Salmonelas em ambientes de criação de galinhas poedeiras.....	8
2.2. Contaminação de ovos	11
2.2.1. Sobrevivência, penetração e multiplicação de SE em ovos de galinha	15
2.2.2. Defesas intrínsecas da contaminação/multiplicação de microrganismos no ovo	21
2.3. Produção, Processamento e Armazenamento de Ovos com Casca	31
2.4. Conservação de ovos de mesa e perdas de qualidade	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3. 1. MATERIAL.....	39
3.1.a . Unidades amostrais.....	39
3.1.b. Cepas bacterianas utilizadas	39
3.1.c. Fezes.....	40
3.1.d. Material de laboratório.....	41
3. 2. MÉTODOS.....	42
3.2.a. Preparo, manutenção e desenvolvimento das cepas bacterianas mutantes	42
3.2.b. Contaminação experimental dos ovos via fezes	44
3.2.c. Contaminação experimental dos ovos via água de lavagem.....	45
3.2.d. Classificação dos ovos amostrais e determinação da qualidade da casca.....	46
3.2.e. Contagens de SE NAL ^R /NOB ^R e <i>E. coli</i> NAL ^R /NOB ^R	47
3.2.f. Determinação do pH de clara e gema.....	50
3.2.g. Definição das soluções salinas e mensuração da gravidade específica	50
3.2.h. Método de lavagem das unidades amostrais	52
3.2.i. Delineamento experimental.....	53
3.2.j. Verificação da inibição/interação entre as cepas bacterianas utilizadas	54

3.2.l. Comportamento de SE e <i>E. coli</i> inoculados diretamente em albúmen e gema de ovos e armazenados a 8°C e a 30°C.	56
3.2.m. Análise Estatística.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1. Inibição/Interação entre as cepas bacterianas utilizadas nos experimentos	58
4.1.1. Teste de inibição cruzada	58
4.1.2. Multiplicação em caldo	59
4.2. Experimentos com contaminação artificial na superfície de ovos de galinha	61
4.2.1. EXPERIMENTO 1: Influência da integridade da casca de ovos de galinha, submetidos à contaminação via fezes na sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) e <i>Escherichia coli</i> na superfície da casca e sua penetração no conteúdo interno, nas alterações de pH do albúmen e gema e na perda de peso	61
4.2.2. EXPERIMENTO 2: Influência da lavagem industrial de ovos de galinha de casca íntegra, submetidos à contaminação via fezes na sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> na superfície da casca e sua penetração no conteúdo interno, nas alterações de pH do albúmen e gema e na perda de peso	77
4.2.3. EXPERIMENTO 3: Influência da integridade da casca de ovos de galinha, submetidos a contaminação via lavagem manual na sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> na superfície da casca e sua penetração no conteúdo interno, nas alterações de pH do albúmen e gema e na perda de peso	90
4.2.4. EXPERIMENTO 4: Influência da oscilação de temperatura e umidade relativa durante a armazenagem de ovos de galinha de casca íntegra e defeituosa contaminados via fezes na sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> na superfície da casca e sua penetração no conteúdo interno, nas alterações de pH do albúmen e gema e na perda de peso.	105
4.3. Comportamento de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) e <i>Escherichia coli</i> e alterações de pH em albúmen e gema de ovos de galinha submetidos à armazenagem sob diferentes temperaturas	116
4.3.1. Comportamento bacteriano e pH em albúmen de ovos de galinha....	116
4.3.2. Comportamento bacteriano e pH em gema de ovos de galinha	123
CONCLUSÕES	130
CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota da infecção humana por SE.	6
Figura 2: Estudos conduzidos para avaliar a penetração de casca de ovos por bactérias do gênero <i>Salmonella</i>	14
Figura 3: Desenho esquemático da sessão radial da casca do ovo de galinha.	23
Figura 4: Características do crescimento das cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> utilizadas nos experimentos com ovos, em ágar MacConkey.....	58
Figura 5: Comportamento de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> incubadas em conjunto ou isoladamente sob temperatura de 30°C, em TSB NAL/NOB.	59
Figura 6: Comportamento de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> incubadas em conjunto ou isoladamente sob temperatura de 8°C, em TSB NAL/NOB.	60
Figura 7: Influência da contaminação em conjunto no pH e no comportamento de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> em albúmen de ovos de galinha armazenado a temperatura de 30°C.	117
Figura 8: Influência da contaminação em conjunto no pH e no comportamento de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> em albúmen de ovos de galinha armazenado a temperatura de 8°C.	120
Figura 9: Influência da contaminação em conjunto no pH e no comportamento de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> em gema de ovos de galinha armazenada a 30°C.	124
Figura 10: Influência da contaminação em conjunto no pH e no comportamento de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> em gema de ovos de galinha armazenada a 8°C.	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidades de cloreto de sódio utilizadas para o preparo das diferentes soluções utilizadas para determinação da gravidade específica nos ovos da granja de poedeiras.....	51
Tabela 2: Descrição dos procedimentos experimentais com ovos de galinha contaminados com <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> e submetidos a diferentes condições de armazenagem.....	53
Tabela 3: Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis em casca de ovos íntegros ou com defeitos de casca, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).....	64
Tabela 4: Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis em albúmen e gema de ovos com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).....	68
Tabela 5: Contagem de <i>Escherichia coli</i> em casca de ovos íntegros ou com defeitos de casca, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).....	71
Tabela 6: Contagem de <i>Escherichia coli</i> em albúmen e gema de ovos com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).....	71
Tabela 7: Perda de peso (g) acumulada de ovos de galinha com casca íntegra ou defeituosa, submetidos à contaminação via fezes e mantidos sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa (UR).....	73
Tabela 8: pH de albúmen de ovos de galinha de casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.	74
Tabela 9: pH da gema de ovos de galinha de casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.	75
Tabela 10: Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis na superfície de ovos de galinha, lavados industrialmente ou não, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).....	81
Tabela 11: Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis em albúmen e gema de ovos de galinha, lavados industrialmente ou não, contaminados via fezes e	

submetidos a diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).....	81
Tabela 12: Contagem de <i>Escherichia coli</i> na superfície de ovos de galinha, lavados industrialmente ou não, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).****	84
Tabela 13: Contagem de <i>Escherichia coli</i> em albúmen e gema de ovos de galinha, lavados industrialmente ou não, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).....	84
Tabela 14: Perda de peso (g) acumulada de ovos de galinha lavados industrialmente ou não, submetidos à contaminação via fezes e mantidos em diferentes condições de temperatura e umidade relativa(UR).....	85
Tabela 15: pH albúmen de ovos de galinha de casca íntegra, lavados ou não, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.	87
Tabela 16: Valores médios de pH da gema de ovos de galinha de casca íntegra lavados ou não, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.....	89
Tabela 17: Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis na superfície de ovos de galinha, íntegros e com defeitos de casca, que foram submetidos a contaminação via lavagem manual com água fria, e mantidos em diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).****	94
Tabela 18: Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis em albúmen e gema de ovos de galinha com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via lavagem manual com água fria, e mantidos em diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).	97
Tabela 19: Contagem de <i>Escherichia coli</i> na superfície de ovos de galinha, íntegros e com defeitos de casca, que foram submetidos a contaminação via lavagem manual com água fria, e mantidos em diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).****	100
Tabela 20: Contagem de <i>Escherichia coli</i> em albúmen e gema de ovos de galinha com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via lavagem manual com água fria, e mantidos em diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).	100

Tabela 21: Perda de peso acumulada de ovos de galinha com casca íntegra ou defeituosa, submetidos à contaminação via lavagem manual sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa (UR).....	102
Tabela 22: pH albúmen de ovos de galinha de casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via lavagem com água fria e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.	103
Tabela 23: pH de gema de ovos de galinha de casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via lavagem com água fria e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.	104
Tabela 24: Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis na superfície de ovos com casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em regime de oscilação de temperatura e umidade relativa.	109
Tabela 25: Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis em albúmen e gema de ovos de galinha com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via fezes e submetidos a regime de oscilação de temperatura e umidade relativa.	109
Tabela 26: Contagem de <i>Escherichia coli</i> na superfície de ovos com casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em regime de oscilação de temperatura e umidade relativa.	112
Tabela 27: Contagem de <i>Escherichia coli</i> em albúmen e gema de ovos de galinha com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via fezes e submetidos a regime de oscilação de temperatura e umidade relativa.	112
Tabela 28: Perda de peso acumulada de ovos de galinha com casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e mantidos sob oscilação de temperatura e umidade.	114
Tabela 29: pH do albúmen e gema de ovos de galinha de casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e armazenados sob regime de oscilação de temperatura e umidade relativa do ar.	115

RESUMO

A salmonelose humana é epidêmica no mundo todo. O consumo de ovos *in natura* crus ou parcialmente cozidos está associado a esta ocorrência, principalmente quando possuem defeitos de casca e são submetidos a estocagem inadequada. Os trabalhos com contaminação experimental de ovos de galinha geralmente utilizam grandes inóculos e a imersão de ovos em culturas bacterianas puras.

Este trabalho teve como objetivo utilizar metodologia de contaminação de ovos com casca íntegra ou com defeitos que se aproximam da realidade operacional de granjas e entrepostos de ovos a fim de avaliar alguns riscos de contaminação por *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Escherichia coli* em ovos de consumo, a partir da simulação de condições reais como contaminação pós lavagem, lavagem manual, oscilação de temperatura em ovos submetidos a diferentes condições de armazenagem, bem como verificar indicadores de perda de qualidade como a perda de peso e mudanças de pH. Também foi verificado o comportamento destes dois microrganismos em albúmen e gema de ovos de galinha submetidos a duas temperaturas de armazenagem. Os microrganismos estudados tem sua viabilidade diminuída na superfície de ovos com casca íntegra ou com defeitos quando os mesmos são submetidos a temperatura de 30°C, enquanto que a 8°C eles permanecem viáveis na casca. A temperatura de 30°C é responsável pela tendência maior de invasão dos microrganismos no conteúdo

interno de ovos de galinha. Foi possível verificar, também, que há uma maior perda de peso em ovos armazenados a 30°C, independentemente da qualidade da casca. O pH de albúmen e gema aumentou ao longo do tempo, independentemente da forma de armazenagem, entretanto a velocidade de alteração do pH do albúmen foi maior na temperatura mais alta.

ABSTRACT

Human salmonellosis is epidemic all over the world. Food containing raw and partially cooked eggs is associated with this occurrence. Mainly when they have shell defects and/or are submitted to inadequate storage. The researches with experimental hen eggs contamination use big innocua and dipping eggs into bacterial cultures. This research had as objective, by using egg shell contamination methodology, evaluate some risks of contamination by *Salmonella Enteritidis* (SE) and *Escherichia coli* in consumption eggs. It was done by simulation of real operational system, in an egg grading plant, like post-washing and post-manual washing contamination, oscillation of storage temperature; and by submitting eggs under different temperatures, as well as verifying loss of quality as the loss of weight and changes of pH. Also, the behavior SE and E. coli was verified in albumen and yolk that were submitted by 8° and 30°C.

The results were that SE and E. coli decrease their viability on the egg surface, in intact and in imperfect shells, when the eggs were stored by 30°C, while that 8°C they remain viable on the surface. By 30°C, the bacteria can penetrate

more easily in the egg contents. It was possible to verify that there are a bigger loss of weight in the eggs stored at 30°C, independently of the shell quality. The pH of the albumen and the yolk increased, independently of the storage temperature, however the speed of alteration of pH of albumen it was bigger in the highest temperature.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os relatos científicos são unânimes em responsabilizar ovos de consumo como os principais causadores de salmonelose humana (Mayes e Takeballi, 1983; Gast e Beard, 1992; Humphrey, 1994a; Peresi *et al.*, 1998; Latimer *et al.*, 2000). De fato, os produtos avícolas, entre eles, ovos, são importantes fontes de salmonelas (Rodrigue, Tauxe e Rowe, 1990). A maioria dos estudos de contaminação das superfícies das cascas, invasão do conteúdo, sobrevivência e multiplicação destes patógenos em ovos é realizada utilizando-se metodologias que permitem uma extensa contaminação, com grande número de células viáveis em condições como imersão em culturas puras, uso de pressão negativa, inoculações no interior de ovos, entre outras. Os resultados destes trabalhos incriminam, indiscutivelmente, ovos, como importantes transmissores de salmonelas. Entretanto, quando são realizados estudos epidemiológicos e de análise de risco, observa-se que apenas uma pequena parcela dos ovos produzidos contém, em sua superfície ou no seu conteúdo, este microrganismo (Summers, 2002).

Desde a pandemia de salmonelose por *Salmonella* Enteritidis (SE), que iniciou no final dos anos 80, o microrganismo vem sendo identificado continuamente no Brasil, em produtos avícolas em geral, ovos, aves de postura e ambiente de granjas de poedeiras (Ferreira, Ito e Benez, 1990; Silva e Bosquioli, 1996; Tavechio, *et al.*, 2002; Gama, Berchieri e Fernandes, 2003). Além disto, SE é o sorotipo mais prevalente, quando investigam-se alimentos, de uma forma

geral. Além das questões relacionadas à saúde pública, em cada país, este microrganismo constitui uma barreira sanitária, impedindo ou dificultando o comércio internacional de alimentos e *commodities*.

A Organização Mundial da Saúde tem recomendado o uso de metodologias que mais se aproximem das formas naturais e comuns de contaminação de ovos, a fim de que os riscos da disseminação da salmonelose sejam adequadamente quantificados (WHO, 2002). Assim, poderão ser identificadas as medidas efetivas para a prevenção da contaminação e multiplicação deste patógeno.

Ovos de galinha são uma fonte importante de nutrientes e seu consumo é incentivado em todo o mundo, principalmente após os estudos que revelam sua inocuidade para a saúde cardíaca. Os riscos da contaminação microbiana estão associados, principalmente, ao comércio de ovos com casca defeituosa, fina, porosa ou rachada (Tood, 1996), ovos sujos de matéria orgânica e, ainda, falhas ou mesmo a inexistência de uma cadeia de frio adequada à conservação das características desejáveis do produto, sob ponto de vista sensorial e sanitário. O mau uso das técnicas de manuseio do produto, ainda nos locais de produção e classificação são, também, responsáveis pelo aumento do risco de contaminação.

O presente trabalho teve, como objetivos:

- Avaliar alguns riscos de contaminação por *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Escherichia coli* em ovos de consumo, mais especificamente:

- estudar a contaminação da casca, albúmen e gema de ovos íntegros e ovos com defeitos de casca, através do contato dos mesmos com fezes artificialmente contaminadas e estudar a influência da temperatura de armazenagem na perda de peso e alterações de pH.

- estudar efeitos da qualidade da casca sobre os níveis de contaminação por SE e *E. coli*.

- comparar a influência da lavagem industrial de ovos em água sem sanitizantes sobre níveis de contaminação artificial por SE e *E. coli*, pH e perda de peso, usando ovos *in natura* sem lavar, como controle, conservados a temperatura ambiente e de refrigeração.

- estudar, simulando sala de classificação da granja, a influência da lavagem manual de ovos em água fria sobre a contaminação por SE e *E. coli*.

- estudar o efeito da variação de temperatura sobre a multiplicação de SE e *E. coli*, as alterações de pH e a perda de peso em ovos contaminados artificialmente com fezes.

- estudar o comportamento de SE e *E. coli* inoculadas em albúmen e gema de ovos de galinha submetidos a diferentes temperaturas de armazenagem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epidemiologia das Salmonelas

2.1.1. Epidemiologia da *Salmonella* Enteritidis (SE) e a ocorrência de salmonelose associada ao consumo de ovos e seus produtos

De acordo com Mead *et al.*(1999) aproximadamente 40 mil casos de salmonelose são notificados anualmente nos Estados Unidos. Na década de 80, o aumento do número de casos de salmonelose humana provocada por SE foi notável (Rodrigue, Tauxe e Rowe, 1990). Este patógeno é o principal associado a salmoneloses veiculadas por ovos. (Rabsch, Tschäpe e Bäumler, 2001).

Os Centros de Controle de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, relatam um aumento da ocorrência de salmoneloses humanas por SE, sendo que entre 1976 e 1994, o índice subiu de 5 para 26% do total das notificações. Entre 1994 e 1995, pelo menos quatro surtos foram associados ao consumo de ovos crus (Anon, 1996). Quando é possível identificar o alimento envolvido, ovos crus ou insuficientemente cozidos são os principais veículos de transmissão de SE em surtos e mesmo em casos esporádicos (Anon, 2003). Embora a implicação de ovos crus na ocorrência de salmonelose por SE esteja comprovada, Ebel e

Schlosser (2000) estimam que apenas 1:20.000 dos ovos de mesa produzidos nos Estados Unidos esteja contaminado pelo microrganismo.

Estudos epidemiológicos realizados na Polônia, indicaram que alimentos preparados com ovos crus são os principais responsáveis pela ocorrência de casos de salmonelose por SE, principalmente sobremesas preparadas com ovos crus e sorvetes de produção doméstica (Mølbak e Neimann, 2002).

No Brasil, segundo Taunay, Fernandes e Tavechio (1996), o isolamento de SE passou de 0% no período de 1983-1990, para 64,9% de isolamentos em material humano e 40,7% em fontes não humanas no ano de 1995. Peresi *et al.* (1998), investigando os surtos de salmonelose em região do estado de São Paulo, concluíram que 95,7% deles foram causados por alimentos que continham, em sua formulação, ovos, sendo que, em 87% os alimentos continham ovos crus. Oliveira e Silva (2000) encontraram 9,6% de salmonelas nas cascas e 3,2% nas gemas de ovos de consumo disponíveis no mercado de Campinas-SP. Entretanto, Cardoso *et al.* (2002) estudando o mercado de ovos da região de Descalvado – SP, não encontraram o microrganismo. Andreatti Filho *et al.* (2001) e Tavechio *et al.* (2002) identificaram SE como o principal sorovar isolado de materiais avícolas e fontes não humanas, respectivamente, no estado de São Paulo. Nunes *et al.* (2003), determinaram que 79,1% dos isolados de SE de aves, produtos avícolas e fontes humanas eram do fagotipo 4, no Brasil, nos anos de 1995 a 1997. Sendo

este fagotipo encontrado em 95,7% das amostras humanas, 68,2% de galinhas e 63,6% de rações e ambientes de criação de aves.

Guard-Peter (2001) considera a SE como o único patógeno humano que contamina ovos rotineiramente, mesmo que, no ambiente de produção exista um grande número de sorotipos do microrganismo. A pandemia de SE envolve diversas interações com o ambiente, que inclui a granja de poedeiras, a ave, o produto e o ser humano, como hospedeiro do microrganismo, conforme apresentado na figura 1.

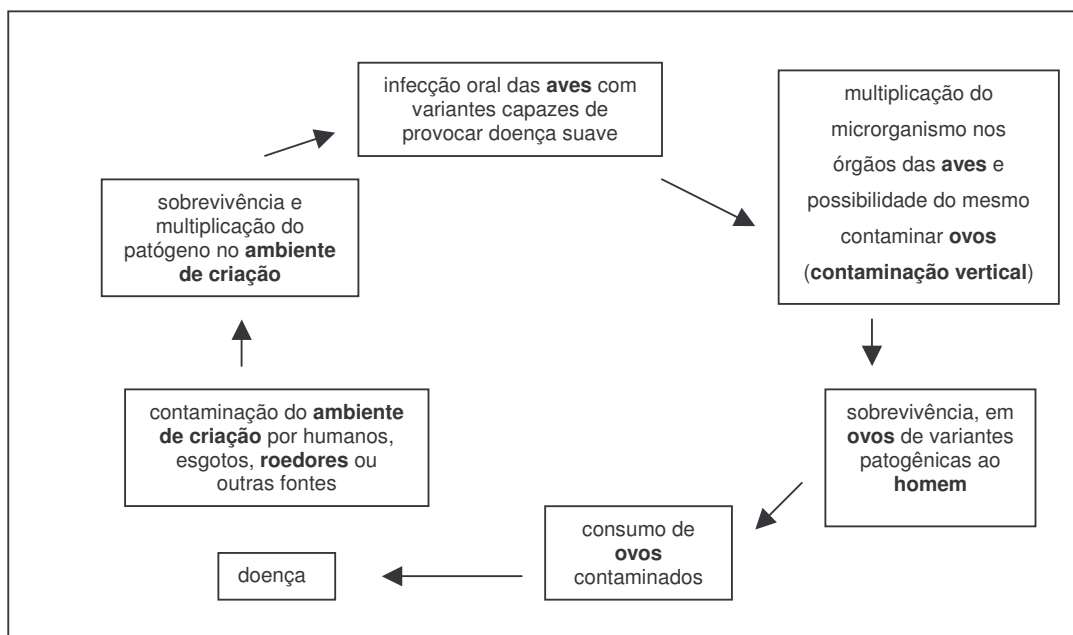


Figura 1: Rota da infecção humana por SE. (Fonte: Guard- Peter, 2001.)

Segundo Guard-Peter(2001), a diversidade de ambientes, seres vivos ou inanimados, podem ser colonizados ou infectados por SE. Para propósitos

epidemiológicos, a rota de infecção humana, via consumo de ovos é primariamente linear, entretanto a transmissão da infecção de seres humanos para aves parece ser cíclica.

A rota de transmissão vertical é reconhecida (Humphrey *et al.*, 1991; Humphrey, 1994b; Gast e Holt, 2000a; Guard- Peter, 2001) e considerada a mais importante para a SE fagotipo 4, segundo Aabo *et al.* (2002). Entretanto, os autores sugerem a necessidade de um maior número de pesquisas relacionando este fagotipo a transmissão horizontal, já comprovada por Nascimento, Cranstoun e Solomon (1992), Miyamoto *et al.* (1998), Gast e Holt (1999) e Soncini, Moraes e Costa (2000), Andreatti Filho *et al.* (2001).

A *Salmonella* Enteritidis pode infectar as aves e não provocar sinais clínicos da doença. Entretanto, há a possibilidade de eliminação do microrganismo via excreta, aumentando a chance de contaminação ambiental e de ovos (Suzuki, 1994).

Para Summers (s.d.), a presença de salmonelas é a maior preocupação dos elos da cadeia produtiva de ovos. Apesar do conteúdo interno raramente estar contaminado, ovos podem veicular estes microrganismos, mesmo após a lavagem.

2.1.2. Salmonelas em ambientes de criação de galinhas poedeiras

a. Ocorrência

A presença de salmonelas no ambiente de criação de aves é um fato incontestável, seja na produção de matrizes, seja nas criações comerciais (Davies, Liebana, Breslin, 2003).

Segundo Davies e Wray (1995), após a contaminação ambiental, há uma grande dificuldade de eliminar as salmonelas, já que a presença de aves silvestres, roedores, animais domésticos, insetos e o sistema de produção intensivo mantêm o microrganismo na granja, mesmo após os procedimentos de limpeza e desinfecção.

Estudos epidemiológicos comprovaram a presença de salmonelas, e mais especificamente SE, nos mais diversos locais de uma granja de poedeiras, como por exemplo correias transportadoras, equipamentos de ovoscopia, mesas de classificação de ovos, áreas de estocagem, ventiladores, fezes de aves, poeira, gaiolas, caixas de transporte (Jones, Rives e Carey, 1995; Henzler, Kradel e Sicho, 1998; Davies e Breslin, 2001; Davies, Liebana e Breslin, 2003; Gama, Berchieri e Fernandes, 2003).

Das diversas fontes capazes de manter o microrganismo no ambiente de criação de aves, os roedores tem papel importante, sendo responsáveis por grande parte dos isolamentos de salmonelas em granjas (Henzler e Opitz, 1992; Henzler, Kradel e Sischo, 1998).

Henzler e Opitz (1992), desenvolvendo estudos epidemiológicos, verificaram que 24% dos roedores capturados eram portadores de SE nas granjas de poedeiras já identificadas como positivas para o microrganismo. Identificaram, também, que um rato adulto infectado é capaz de eliminar $2,3 \times 10^5$ UFC de SE/*pellet* de fezes. Além disto, concluíram que, mesmo quando a granja passa por limpeza e desinfecção, os roedores presentes continuam sendo portadores do microrganismo, sendo capazes de recontaminar o ambiente.

Painter *et al.*(2004) acreditam que o uso de rodenticidas a base de *Salmonella* Enteritidis ou *S. Typhimurium* nas décadas passadas tenha sido a causa do aumento da prevalência de portadores de salmonelas entre os roedores e o conseqüente aumento da ocorrência de salmonelose humana. Segundo estes pesquisadores, embora o uso destes produtos seja proibido em muitos países e que tenha sido desaconselhado seu uso pela Organização Mundial de Saúde, é possível verificar sua aplicação em muitos países das Américas Central e do Sul e Ásia.

Murase *et al.* (2001), entretanto, acreditam que as esteiras transportadoras de ovos entre os galpões de produção e a sala de classificação e lavagem representam o principal ponto de contaminação ambiental e que mantêm a salmonela no ambiente. Este fato pode ser comprovado pela capacidade das salmonelas produzirem biofilmes em superfícies plásticas, como em esteiras transportadoras de ovos (Stepanović *et al.*, 2004).

O ambiente de criação de poedeiras e de produção de ovos pode ser altamente contaminado pelos diferentes sorotipos de *Salmonella*. Quanto maior o número de amostras ambientais positivas para o microrganismo, maior a quantidade de ovos contaminados encontrados (seja na superfície da casca, seja no conteúdo), segundo Henzler, Kradel e Sischo (1998). O microrganismo é encontrado, também, em estabelecimentos onde a vacinação é praticada (Davies e Breslin, 2001).

A lavagem de ovos, nas condições adequadas de temperatura e pH da água, produz a diminuição da contaminação das cascas de ovos, entretanto a persistência de bactérias na água de lavagem é facilitada pela presença de matéria orgânica (proveniente do conteúdo de ovos que quebram no sistema de lavagem) (Catalano e Knabel, 1994). Os sistemas de lavagem de ovos podem ser fontes importantes de contaminação das cascas dos ovos. Em 1981, Moats já havia comprovado a correlação positiva entre o número de microrganismos

(contagem total de mesófilos) encontrados nos equipamentos de lavagem (água, escovas e esteiras) e a superfície de ovos lavados.

b. Medidas de prevenção e controle

A fim de evitar a grande ocorrência e persistência das salmonelas no ambiente de criação de poedeiras e produção de ovos, devem ser tomadas medidas de controle e prevenção, entre elas: limpeza e desinfecção dos locais de classificação, transporte de ovos, alimentos e dejetos, sistemas de ventilação, gaiolas e entre lotes de produção (Valancony *et al.*, 2001).

Nos sistemas de lavagem, deve ser realizado tratamento adequado da água de descarte (Meckes, Johnson e Rice, 2003), bem como mantê-la, enquanto no sistema, nas adequadas condições de temperatura, pH e teores de sanitizantes (Catalano e Knabel, *op.cit.*).

2.2. Contaminação de ovos

Para Board (1966), a contaminação bacteriana de ovos de galinha pode ocorrer antes ou após a postura. A contaminação pré postura pode ocorrer por via ovariana ou mesmo durante seu trânsito no oviduto (Mayes e Takeballi, 1983 e Humphrey, 1994a).

A contaminação após a postura ocorre principalmente por deficiências higiênicas (ovos com fezes ou outras sujidades ou manuseio inadequado). Imediatamente após a postura, ovos apresentam-se úmidos, permitindo a aderência de sujidades e microrganismos. A contaminação é dependente da limpeza da superfície onde ocorre a postura, do manuseio dos ovos após a postura e pelo fato de haver a presença de rachaduras ou defeitos na casca. Outras condições como temperatura ambiente e tratamentos recebidos como lavagem são fatores que podem predispor à contaminação (Humphrey, 1994a; Humphrey, 1994b).

Segundo Cox, Berrang e Cason (2000), o resfriamento imediatamente após a postura é o principal fator que predispõe a contaminação interna de ovos de incubação (ovos são postos a temperatura interna da ave, que é de 42°C e resfriam até a temperatura ambiente), contato com poeira e fezes. Existe uma grande variabilidade nos fatores que interferem na penetração de microrganismos do gênero *Salmonella*. São eles a qualidade da casca, pH, número de poros, temperatura, umidade e pressão de vapor, entre outros (Gregory, 1948; , Walden *et al.*, 1956; Graves e Maclaury, 1962; Sauter e Peterson, 1974; Sauter *et al.*, 1979).

Estudos de Cogan *et al.* (2001) revelam que nem todos estes fatores citados são significativos na penetração de SE em ovos, em condições experimentais. A contaminação interna de ovos está relacionada à metodologia

utilizada para a contaminação, bem como com o número de células inoculadas. Estudos de Nascimento e Solomon (1991) indicam a pouca importância do número de poros na penetração bacteriana, especificamente SE. Para Humphrey (1994a), ainda não foi encontrada a relação entre a contaminação da casca do ovo íntegro e de seu conteúdo quando ovos são naturalmente contaminados ou em estudos epidemiológicos realizados com ovos adquiridos no comércio, entretanto a contaminação após a postura ocorre por penetração da SE através da casca e membranas, invadindo o albúmen sem qualquer multiplicação. Na gema ou em sua proximidade, a disponibilidade de nutrientes (ferro principalmente) permite sua multiplicação.

A SE pode invadir o conteúdo de ovos de galinha tanto pela via vertical como pela via horizontal (Messens, Grijspeerdt, Herman, 2005), entretanto ainda não está clara qual destas formas é a mais importante, uma vez que os autores divergem. A SE, de acordo com Humphrey (1994b), não poderia se mover através da casca e suas membranas, devido a competição com microrganismos de origem fecal presentes na superfície da casca. Entretanto, Berrang *et al.* (1999a), em seus estudos da penetração de salmonelas em ovos, concluíram que salmonelas podem invadir o conteúdo de ovos de casca íntegra.

O desenvolvimento de metodologias de inoculação em ovos é um dos fatores decisivos na penetração de microrganismos em ovos de consumo, devido às características de permeabilidade dos ovos. A figura 2, adaptada de Messens,

Grijdspeerdt e Herman (2005), mostra diversos estudos da penetração de salmonelas, realizados nos últimos dez anos, com a metodologia utilizada e os resultados encontrados.

Autores	Método	Resultados
Radkowski(2002)	0,1 mL de cultura pura de SE espalhada sobre toda a superfície da casca.	0% do conteúdo positivo.
Braun <i>etal.</i> (1999)	Imersão em suspensão bacteriana por 1 a 2 segundos.	0 - 52,5% do conteúdo de ovos positivo (dependendo da carga bacteriana e condição de armazenagem).
Himathongkham <i>et al.</i> (1999)	Imersão em suspensão bacteriana por 5 segundos, sem variação de temperatura.	0% do conteúdo positivo.
Berrang <i>et al.</i> (1998)	Ovos a 42C mergulhados em suspensão bacteriana a 25C por 1 minuto e depois repletos de agar.	67% de ovos positivos.
Miyamoto <i>et al.</i> (1998)	Imersão em suspensão bacteriana por 10 minutos.	5-38% de ovos positivos (dependendo da contaminação inicial).
Wang Slavik(1998)	Imersão em suspensão bacteriana por 3 minutos.	20-25% de ovos positivos.
Schoeni <i>etal.</i> (1995)	Ovos cobertos por fezes contaminadas.	0 a 50% de ovos com conteúdo positivo (dependendo da temperatura de armazenagem).

Figura 2: Estudos conduzidos para avaliar a penetração de casca de ovos por bactérias do gênero *Salmonella*. Adaptado de Messens, Grijdspeerdt e Herman(2005).

2.2.1. Sobrevivência, penetração e multiplicação de SE em ovos de galinha

Muitos pesquisadores estão envolvidos no estudo da penetração de salmonelas no conteúdo de ovos das espécies domésticas, principalmente de galinhas. Os principais fatores que afetam o comportamento dos microrganismos são temperatura de armazenamento, qualidade da casca, quantidade de inóculo e presença de material fecal ou orgânico em sua superfície.

a. Temperatura e umidade relativa do ar:

A temperatura de armazenagem de ovos é fator limitante para a multiplicação de microrganismos em sua superfície. Simons, Ayres e Kraft (1970), Gentry e Quarles (1972), Oliveira e Silva (2000), Radkowski (2002) e Aydin *et al.* (2004), comprovam a presença de células bacterianas viáveis nas cascas de ovos íntegros por mais tempo quando são submetidos a temperaturas de refrigeração (10°C ou menos).

Simons, Ayres e Kraft (1970) utilizaram três diferentes temperaturas de armazenagem para ovos de mesa contaminados e concluiu que, quando armazenados sob refrigeração (10°C), as células bacterianas se mantinham

viáveis na superfície da casca por mais tempo do que quando ovos eram armazenados a temperaturas maiores(23°C).

Gentry e Quarles (1972.), classificaram ovos quanto a sua limpeza (limpos, levemente sujos e sujos) e submeteram-nos a diferentes condições de armazenagem (temperatura ambiente e refrigeração), sendo procedida a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos ao longo do tempo. Concluíram que, com o aumento da temperatura de armazenagem, diminui a quantidade de células bacterianas viáveis na superfície de ovos de galinha, independentemente de sua limpeza. Foi observado que, nas primeiras 24 horas, apenas 10% das células apresentaram viabilidade cultural quando em temperatura ambiente e não houve alteração em temperatura de refrigeração.

Oliveira e Silva (2000) observaram a diminuição da quantidade de células de SE viáveis nas cascas contaminadas via maravalha, já nas primeiras 24 horas de armazenagem sob temperatura ambiente.

Radkowski (2002) submeteu ovos de galinha com suas superfícies artificialmente contaminadas a diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar e os analisou ao longo do tempo (tempo zero, 7, 14 e 21 dias). Concluiu que, quando submetidos a temperaturas mais baixas, a viabilidade das células de SE era maior, ao longo do tempo. A 30°C, apenas 0,83% das amostras foram positivas para este microrganismos, no 14º dia de armazenagem, enquanto

que a 2°C, 25,8% das amostras foram positivas no 21º dia. Em seu estudo, não foi encontrada diferença significativa em diferentes condições de umidade relativa do ar.

Embora a umidade do ar, segundo o autor acima, não seja importante na penetração de microrganismos pela casca, os procedimentos de conservação podem permitir a condensação da umidade na superfície de ovos de galinha caso haja oscilação de temperatura. Ernst *et al.* (1998) relacionam o acúmulo de umidade por condensação a uma maior frequência de contaminação interna de ovos por salmonelas, principalmente em se tratando de ovos com defeitos de casca. Stadelmann (1995) relata que a condensação ocorre quando ovos refrigerados são expostos a temperaturas mais altas.

b. Qualidade da casca:

Ovos com casca íntegra podem ter seu conteúdo contaminado por microrganismos, inclusive salmonelas (Todd, 1996). Segundo Berrang *et al.* (1999b), o grau de invasão é dependente de alguns fatores como quando água, umidade ou outro líquido estiver presente, principalmente se houver diferencial de temperatura entre o ovo e o líquido. Ao ser posto, o ovo possui a temperatura interna da ave, em torno de 42°C. Em contato com o ambiente, ele se resfria, e seu conteúdo se contrai, formando uma pressão negativa em seu interior. Os microrganismos presentes no ambiente ou na superfície do ovo podem ser

forçados para seu interior ou para suas membranas internas. Para estes autores, pode haver contaminação bacteriana do conteúdo de ovos de galinha a qualquer momento da produção, desde que umidade e microrganismos estejam presentes. A possibilidade desta ocorrência aumenta caso haja um diferencial positivo de temperatura (temperatura do ovo superior a temperatura do ambiente).

Nascimento e Solomon (1991), estudando a transferência de SE através da casca de ovos classificados como de baixa qualidade, concluíram que a movimentação desta bactéria pela casca do ovo é dependente das condições de temperatura e umidade, associada a qualidade da casca, sem, entretanto, haver relação com o número de poros

Sauter e Peterson (1974) classificaram ovos de acordo com qualidade da casca, medida por gravidade específica e observaram que, em ovos com gravidade específica (GE) igual ou superior a 1090g/L (casca de excelente qualidade) tiveram um menor índice de contaminação (21%) quando comparados com ovos considerados de média (GE=1080g/L) e de má qualidade (GE=1070g/L), que tiveram respectivamente 27 e 54% de ovos contaminados após 24 horas da contaminação da casca por imersão em caldo de cultura contendo o microrganismo, utilizando gradiente de temperatura.

Estudos epidemiológicos apresentam ovos rachados como fonte de salmonelas (Tood, 1996). De acordo com D'Aoust, Stoltland e Randall (1980),

entre 8 e 13% dos ovos rachados apresentaram salmonela em seu conteúdo ou casca, enquanto que em ovos íntegros, apenas 2% apresentaram a presença do microrganismo. Já, Perales e Audicana (1989), encontraram salmonelas em 5% de ovos rachados e em 0,6% de ovos íntegros submetidos à análise microbiológica.

c. Presença de material orgânico na superfície da casca:

Padron (1990), em estudo realizado com ovos de incubação, concluiu que a presença de material orgânico (maravalha) contaminado pode propiciar a penetração de salmonelas para o interior de ovos, mesmo após estes sofrerem desinfecção com amônia quaternária.

Bruce e Drysdale (1994), relatam diversas condições que propiciam a invasão de microrganismos no conteúdo de ovos, considerando o ambiente onde estes são depositados. Apontam a higiene da superfície dos ovos como fator fundamental para evitar ou diminuir os riscos de invasão. Ovos depositados em ninhos e gaiolas contaminados com fezes tem maior chance de ter seu conteúdo invadido por microrganismos.

Board e Tranter (1994) relatam que as principais fontes de contaminação da superfície de ovos, excetuando-se a cloaca, no momento da postura, são poeira, terra e fezes.

Oliveira e Silva (2000) verificaram a presença de SE no interior de ovos de mesa contaminados superficialmente via maravalha contaminada e armazenados sob diferentes condições de temperatura.

d. Tamanho do inóculo:

Schoeni *et al.* (1995), contaminaram a superfície de ovos com fezes contendo diferentes inóculos de salmonela, armazenaram-os a 4°C e os acompanharam ao longo do tempo. Os resultados destes experimentos comprovaram que, a possibilidade de contaminação do conteúdo e mesmo da permanência do microrganismo na superfície da casca é maior quanto maior a contaminação inicial.

Chen, Clarke e Griffiths (1996), utilizando cepa luminescente de *Salmonella* Enteritidis para monitorar a contaminação e sobrevivência em ovos de galinha, observaram que os índices de contaminação interna aumentavam com o aumento da quantidade de inóculo, sendo que 100% dos ovos contaminados com 10⁸UFC/mL de caldo foram positivos para SE após 6 semanas de armazenagem

enquanto que 27% apresentaram o microrganismo em seu conteúdo quando inoculados com 10^4 UFC/mL no mesmo tempo de armazenagem.

Miyamoto *etal.* (1998), imergiram ovos em suspensões de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium contendo 10^3 e 10^6 Unidades formadoras de colônia/mL e concluíram que, ao aumentar a quantidade de inóculo, aumenta-se a quantidade de ovos com a presença destes microrganismos no conteúdo.

2.2.2. Defesas intrínsecas da contaminação/multiplicação de microrganismos no ovo

Segundo Tranter e Board (1982), a estrutura do ovo foi desenvolvida pela natureza de forma a proteger a gema, que é a reserva energética utilizada pela ave até após o nascimento. Por isso é protegida da contaminação microbiológica pela interação entre as defesas físicas (providas principalmente pelas estruturas da cutícula, casca e membranas internas) e químicas (do albúmen).

a. Cutícula

Estrutura composta de proteínas (85-87%) e carboidratos (3,5-4,4%) que recobre a casca do ovo e faz a obstrução de seus poros. Interfere na permeabilidade da mesma, impedindo a penetração microbiana. Mine, Oberle e

Kassaify (2003) consideram esta estrutura como parte integrante da casca. Esta estrutura tem a capacidade de recobrir os poros, evitando a invasão bacteriana para seu conteúdo no período em que os ovos estão resfriando naturalmente. Além da barreira física aos microrganismos, tem como função evitar a perda de umidade nas primeiras 96 horas após a postura. Quando a cutícula é rompida (por retirada mecânica como abrasão, lavagem ou fatores ambientais como umidade relativa do ar e temperatura ambiente) aumenta a probabilidade de penetração de microrganismos através da casca (Mayes e Takeballi, 1983). Mesmo íntegra, a cutícula não recobre todos os poros da casca, permitindo áreas sem proteção que, segundo Tranter e Board (1982), podem ser os pontos por onde ocorrerá a invasão bacteriana do ovo. Além destes pontos sem cobertura, ovos podem ser postos sem cutícula (Berrang *et al.*, 1999a).

b. Casca

A casca de ovos é uma estrutura altamente especializada composta basicamente de carbonato de cálcio (95%) e uma matriz orgânica composta de glicoproteínas e proteoglicanos (3,5%) (Mine, Oberle e Kassaify, 2003). Analisando sua estrutura da parte externa para a interna, tem-se, imediatamente abaixo da cutícula, a camada cristalizada superficial, a camada palissada e por último a camada mamilar, que se apóia sobre as membranas internas da casca conforme figura 3. A forma como é depositado o carbonato de cálcio sobre as membranas internas dá origem aos poros da casca. O ovo da galinha doméstica

possui entre 7.000 e 17.000 poros, com 9 a 35 μ m de diâmetro, que estão presentes em toda a sua superfície (Parsons, 1982; Li-Chan, Powrie e Nakai, 1994; Mine, Oberle e Kassaify, 2003).

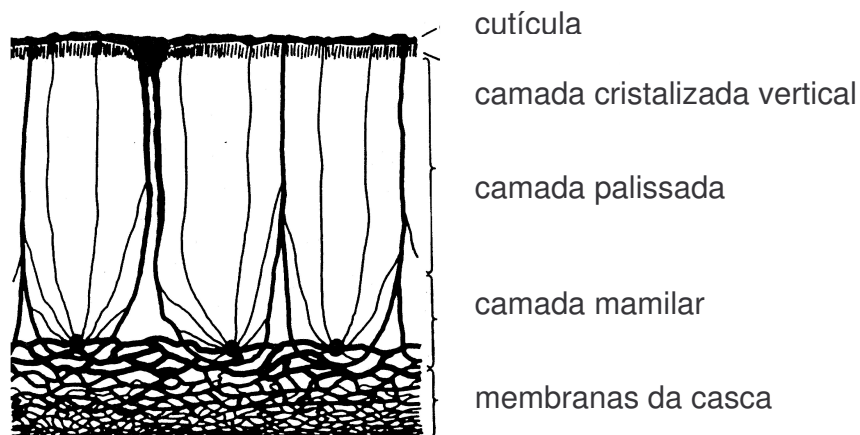


Figura 3: Desenho esquemático da sessão radial da casca do ovo de galinha.(fonte: Parsons, 1982).

Os microrganismos são incapazes de invadir o conteúdo interno de ovos de casca íntegra, permanecendo na superfície da casca a não ser que sejam forçados para o interior, por diferentes mecanismos, como: - infiltração dos poros por hifas de fungos; penetração de água pelos poros por capilaridade ou por aumento da pressão negativa interna. Este último fator é considerado o mais importante, pela indústria avícola (Tranter e Board, 1982).

A espessura da casca está diretamente relacionada a sua capacidade de proteger o ovo contra a contaminação bacteriana. A velocidade da penetração microbiana para o conteúdo de ovos é inversamente proporcional a qualidade da

casca, mensurada por gravidade específica. Outros fatores também interferem naturalmente nesta invasão, como o esfriamento natural do ovo após a postura, umidade do ar e tratamento da superfície da casca como lavagem, ou abrasão (Sauter e Petersen, 1974; Mayes e Takeballi, 1983).

A matriz orgânica da casca também possui características que propiciam proteção à parte interna do ovo. Mine, Oberle e Kassaify (2003) realizaram testes de inibição bacteriana com isolados de matriz protéica de casca de ovo de galinha e concluíram que microrganismos Gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* são inibidos em presença de baixas concentrações destes isolados. Os estudos destes pesquisadores utilizando SE e *E. coli* demonstraram que bactérias Gram negativas são mais resistentes a estes isolados; já que os mesmos revelaram baixa capacidade bacteriostática para estes microrganismos.

A penetração de microrganismos no ovo, mais especificamente a SE, a partir da casca, ocorre tanto em ovos íntegros como em ovos com pequenas rachaduras ou defeitos na casca. As rachaduras nas cascas podem ocorrer durante o processamento, nas fases de apanha, transporte, lavagem, bem como durante o processo de resfriamento, caso o mesmo ocorra muito rápido (Fajardo *et al.*, 1995). A ocorrência de rachaduras e defeitos está vinculada, também, segundo Hamilton (1982), à idade da ave, tipo de gaiola onde a ave está alojada, temperatura na sala de postura, frequência das coletas, linhagem da ave, estado

sanitário e horário da postura. Além disto, segundo Tood (1996), ovos sem classificação podem ser oferecidos à população, aumentando o risco do consumo de ovos com rachaduras.

Mesmo ovos íntegros podem ter seu conteúdo invadido por microrganismos (Humphrey, 1994a), entretanto, a maior frequência ocorre em ovos com defeitos de casca. Embora a invasão ocorra pelos poros, segundo Nascimento, Cranstoun e Solomon (1992) a penetração de microrganismos não é dependente destes e sim de fatores como o gradiente de temperatura entre ambiente e ovo (Berrang *et al.*, 1999a), temperatura ambiente e umidade relativa do ar (Nascimento e Solomon, 1991).

b.1. Gravidade específica

Gravidade específica (GE) é uma medida indireta da qualidade da casca de ovos, sendo útil para inferir sobre sua quantidade e qualidade (força), segundo Hamilton (1982). A GE pode ser determinada por duas metodologias, pelo princípio de Arquimedes (Ahmad *et al.*, 1976; Grunder *et al.*, 1981) ou por flutuação em soluções salinas (Cipera, 1976; Hunt, Voisey e Thompson, 1977). Embora existam diferenças entre os dois métodos, elege-se o método de flutuação por ser possível avaliar um maior número de ovos a um menor custo, segundo relatado por Hamilton (1982).

A determinação da gravidade específica pelo princípio de Archimedes é realizada a partir da pesagem do ovo seco e posteriormente do ovo imerso em água. A diferença entre o peso do ovo seco e na água identifica a quantidade de água deslocada pelo volume do ovo e a relação entre o peso do ovo seco e esta diferença é a GE, conforme definição abaixo (Ahmad *et al.*, 1976; Grunder *et al.*, *op.cit.*):

$$GE = \frac{\text{peso do ovo seco}}{(\text{peso do ovo seco} - \text{peso do ovo na água})}$$

O método de flutuação faz uso de soluções salinas com diferentes densidades. Os ovos são imersos sucessivamente nestas soluções, (da solução salina de menor densidade até a de maior densidade), sendo a GE dada pela densidade da solução onde o ovo primeiro flutua (Cipera, 1976; Hunt, Voisey e Thompson, 1977).

A determinação da densidade específica é amplamente utilizada uma vez que é um método não destrutivo de determinação da qualidade e quantidade de casca. Embora a metodologia não indique exatamente a quantidade de casca, quando são avaliados ovos com pesos semelhantes, é possível inferir adequadamente a força da casca, inclusive com relação a sua espessura e presença ou não de rachaduras (Nordstrom e Ousterhout, 1982). Corroborando com estes achados, Peebles e Brake (1987), encontraram correlação negativa

(-0,088) e Sooncharnying e Edwards (1989) não encontraram correlação entre peso e gravidade específica de ovos de galinha.

Estudos realizados por Thompson, Hamilton e Grunder (1985) associaram um maior dano de casca durante a lavagem de ovos a uma menor gravidade específica. Sooncharnying e Edwards (1989) encontraram alto coeficiente de correlação (0,87) entre gravidade específica e espessura da casca.

Experimentalmente utilizam-se entre 40 (Hamilton e Thompson, 1981) a 1500 ovos (Nordstrom e Ousterhout 1982) para determinação da gravidade específica, entretanto, para fins de determinações nos estabelecimentos produtores é adequada a utilização média de 50 unidades (Silva, 2003¹).

A acurácia da determinação da GE é dependente da temperatura da água e dos ovos, do tempo e forma de conservação dos ovos entre a postura e a determinação. Por isto, é de fundamental importância manter estes valores constantes (Hamilton e Thompson, 1981b). Em trabalho realizado por Hamilton e Thompson (1981a), foi possível identificar que, o tempo de estocagem é inversamente proporcional à GE. Além disto, existem mudanças estruturais da casca que provocam maior possibilidade de rachaduras por compressão e impacto, e portanto, alterações na GE.

¹ SILVA, E.N. informação pessoal.

Sauter e Petersen (1974), estudando a penetração de salmonelas em ovos de galinha, classificaram a qualidade da casca de acordo com a gravidade específica dos mesmos. Consideraram que ovos com baixa qualidade de casca seriam aqueles com $GE = 1070\text{g/L}$; média qualidade da casca, com $GE = 1080\text{g/L}$ e excelente qualidade de casca com $GE = 1090\text{g/L}$.

c. Membranas da casca

Leach Jr.(1982) e Parsons (1982) caracterizaram as membranas internas da casca como sendo duas camadas compostas de filamentos protéicos arranjados aleatoriamente, em forma de rede. São denominadas como membranas externa e interna, sendo similares em composição e construção. A membrana externa está intimamente ligada à camada mamilar da casca e à membrana interna, com exceção da área destinada à câmara de ar, onde elas se separam. A membrana interna é mais fina e forma uma rede de diâmetro menor (no máximo $2\mu\text{m}$) enquanto que rede da membrana externa tem diâmetro maior (entre $0,4$ e $3,6\mu\text{m}$). Aparentemente, estas estruturas impedem que o albúmen permeie para as estruturas mais externas do ovo. Os espaços entre as fibras protéicas atuam como filtros que retêm microrganismos, impedindo que os mesmos atinjam o conteúdo dos ovos (Board e Tranter, 1994). Além disto, os filamentos das membranas possuem capacidade de permitir a adesão de

microrganismos em sua estrutura glicoprotéica, impedindo sua movimentação (Tranter e Board, 1982).

Estudos de Lock, Dolman e Board (1992) comprovaram que microrganismos deteriorantes permanecem retidos nestas membranas por até vinte dias, quando ovos são estocados a temperatura ambiente.

Antes disto, Lifshitz, Baker e Naylor (1964) estudaram a importância das estruturas externas do ovo (casca, membrana externa e membrana interna) na penetração de *Pseudomonas fluorescens* e concluíram que a membrana interna é a estrutura mais importante na retenção do microorganismo fora do conteúdo de ovos contaminados através da casca. Além disto, provaram também que, quando há integridade das duas membranas ou das três estruturas estudadas, mais tempo é necessário para que ocorra a invasão do microrganismo para o conteúdo.

Com o tempo após a postura e conseqüente início dos processos deteriorativos destas membranas, aumenta a possibilidade de penetração de microrganismos no conteúdo (Board e Tranter, 1994).

d. Albúmen

O albúmen possui mecanismos químicos que impedem a multiplicação bacteriana, caso ocorra contaminação. Além destes, existem mecanismos físicos,

como a viscosidade natural, que dificulta o deslocamento das bactérias até a gema, bem como a estrutura das chalazas, que impedem a aproximação da gema das membranas internas e da casca (Board e Tranter, 1994). Yadav e Vadehra (1977), estudaram o comportamento bacteriano em albúmen suplementado ou não de ferro, glicose, gema de ovo e água, concluindo que, a despeito de todas as substâncias adicionadas, o albúmen de ovos frescos tem, em sua estrutura protéica, a primeira barreira antimicrobiana. Da mesma forma, Mayes e Takeballi (1983) relatam que as mudanças decorrentes do armazenamento modificam a estrutura física do albúmen podendo alterar a mobilidade dos microrganismos e conseqüentemente sua multiplicação. Segundo Trander e Board (1982), as proteínas do albúmen possuem propriedades antimicrobianas, sendo a lisozima e a ovotransferrina as mais importantes (Tranter e Board, 1982, Ibrahim, 2000, Mine, Oberle e Kassaify, 2003). A lisozima possui efeito lítico sobre a membrana celular, principalmente de microrganismos Gram positivos. A ovotransferrina atua privando os microrganismos de íons Fe^{++} , necessário para a sua multiplicação.

O potencial hidrogeniônico (pH) também auxilia no controle da multiplicação microbiana. Imediatamente após a postura, o albúmen possui pH em torno de 7,6-7,9, que aumenta rapidamente, durante o armazenamento, podendo ser maior que 9,0, após uma semana de armazenamento a temperatura ambiente. Este pH é o máximo tolerado pela maioria dos microrganismos (Mayes e Takebali, 1983). Existe um efeito sinérgico entre o pH e os demais componentes antimicrobianos

do albúmen, principalmente a ovotransferrina, de acordo com Tranter e Board (1984).

Baron, Gautier e Brule (1997a) estudaram o comportamento de SE em albúmen armazenado a 30°C e concluíram que sua taxa de multiplicação é baixa e variável nestas condições. Estes autores acreditam que esta variabilidade é devida principalmente a consistência não homogênea do albúmen, que dificultaria o acesso do microrganismo aos nutrientes necessários à sua multiplicação, além dos demais fatores.

2.3. Produção, Processamento e Armazenamento de Ovos com Casca

No beneficiamento de ovos, estão incluídas diferentes fases, entre elas a coleta e transporte até o setor de beneficiamento, lavagem (facultativa dependendo da legislação), seleção e classificação, embalagem, armazenamento e distribuição. Além destas fases, ainda estão incluídos o manejo sanitário das aves e do ambiente (procedimentos de higiene e desinfecção ambientais). No Brasil, embora exista legislação que regulamente estes procedimentos, nem sempre os mesmos são executados, sendo que à população são ofertados ovos que não foram adequadamente selecionados e higienizados. Além disto, é prática comum ovos de consumo serem distribuídos sem refrigeração. Estes fatores estão

associados ao desconhecimento dos indivíduos integrantes da cadeia de produção (desde o graneiro até o consumidor final), segundo Rodrigues e Salay (2001).

O beneficiamento consta das seguintes fases:

1. Lavagem

A água de lavagem deve estar com pH entre 10,0 e 11,0 para garantir a inativação de microrganismos. O pH cai rapidamente durante o processo, por adição de água ao tanque, presença de sujidades e de sólidos do albúmen e gema, segundo Moats (1979) e Kinner e Moats (1981).

Holley e Proulx (1986) concluíram que, ao utilizar água com pH alcalino (entre 10,0 e 11,0), a lavagem é capaz de inibir a contaminação de cascas de ovos com salmonelas. Entretanto, estes autores demonstraram que a presença de sólidos de ovos na água de lavagem aumenta a termorresistência do microrganismo, afetando o segundo fator de controle de salmonelas na casca do ovo, que é a temperatura. Para eles, é impraticável a retirada de ovos rachados durante esta fase do processamento, o que aumenta a quantidade de sólidos na água.

A temperatura da água de lavagem é capaz de controlar a contaminação de ovos (Holley e Proulx *op.cit.*; Fajardo *et al.*, 1994; Lucore *et al.*, 1997), devendo esta superar a temperatura do ovo. De acordo com Lucore *et al.* (1997),

temperaturas de água muito baixas, inferiores a temperatura interna do ovo são capazes de produzir um gradiente de pressão que permite a entrada de água entre a casca e as membranas da casca, e conseqüentemente de microrganismos. Estes pesquisadores comprovaram que, ao utilizar água a temperatura de 48,9°C, existe uma diminuição da contaminação superficial. Entretanto, quando são utilizadas estas temperaturas, os ovos podem levar até 140 horas para atingir a temperatura de armazenamento (7°C), o que favorece a multiplicação dos microrganismos sobreviventes.

Tão importante quanto a lavagem adequada, é a secagem da casca a fim de evitar o excesso de umidade superficial que favorece a penetração de microrganismos para o interior dos ovos, principalmente quando há o seu resfriamento (Hutchinson *et al.*, 2003).

Após os procedimentos de lavagem e secagem, muitos processadores utilizam a cobertura das cascas com óleo mineral a fim de selar os poros, evitando a perda de umidade e saída de gás carbônico. Assim pretende-se manter a qualidade funcional do albúmen por mais tempo, independentemente da temperatura de armazenagem. (Sabrani e Payne, 1978)

2. Resfriamento

O resfriamento visa impedir ou diminuir a velocidade de multiplicação de microrganismos e aumentar a vida-de-prateleira do produto. É obrigatório em muitos países (Wilks *et al.*,2000).

Estudos demonstram que, mesmo sob temperaturas baixas, a presença de salmonelas no interior de ovos é possível e dependente do número de dias de estocagem (Fajardo *et al.*, 1995). Em estudo realizado por Hammack *et al.*(1993), com ovos íntegros, classificados como de ótima qualidade e armazenados a 26 °C por 16 dias, foi observada a multiplicação de SE em até oito ciclos logarítmicos na gema de ovos contaminados, enquanto que entre 2º e 8 °C não houve migração do albúmen até a gema nem multiplicação do microrganismo na gema, segundo Hammack *et al.*(1993). A importância da conservação de ovos sob refrigeração foi relatada por Gast e Beard (1992); Mahdi Saed e Koons (1993); Chen, Clarke e Griffiths (1996); Gast e Holt (2000b); Oliveira e Silva (2000); Hara-Kudo *et al.* (2000) e Barros *et al.*(2001). Em contra partida, quando os ovos são submetidos a resfriamento rápido, seja por convecção forçada ou natural, a penetração de SE através da casca é maior que em ovos não resfriados (Fajardo *et al.* 1995). O resfriamento pode provocar pequenas rachaduras na casca do ovo, favorecendo a penetração de microrganismos em seu interior, segundo Kinner e Moats (1981) e Catalano e Knabel (1994).

3. Distribuição

Segundo WHO/FAO(2002) a distribuição de alimentos refrigerados pressupõe a manutenção de uma cadeia de frio, com temperatura constante. Estudos relacionados à análise de risco da SE em ovos relatam oscilações de temperatura, que varia de 4°C a 26°C, em países como o Canadá e Estados Unidos. Com o aumento da temperatura, maior será a velocidade da multiplicação do microrganismo em ovos contaminados.

2.4. Conservação de ovos de mesa e perdas de qualidade

Os procedimentos de conservação de ovos têm por objetivo evitar que microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos penetrem em seu interior (por exemplo *Pseudomonas* sp. e salmonelas, respectivamente) e evitar sua multiplicação; e a manutenção das características de qualidade (Baker e Bruce, 1994).

As mudanças químicas e físicas sofridas pelo produto e que são responsáveis pelo declínio da qualidade são aceleradas pela temperatura, por isso é fundamental o resfriamento rápido. O resfriamento minimiza, também, a multiplicação bacteriana (Stadelman, 1995).

A perda de qualidade de ovos está associada a perda por difusão de dióxido de carbono para o ambiente. Com isto, o pH do albúmen que é em torno de 7,2 no momento da postura, aumenta rapidamente. Quando alcança 8,5, há alteração na consistência da camada mais espessa do albúmen, que fica mais líquida (Baker e Bruce, 1994).

Segundo Yadav e Vadehra (1977), a alteração *in vitro* da viscosidade do albúmen possibilitou o aumento da velocidade na multiplicação de microrganismos como *Salmonella Typhi* e *Escherichia coli*.

A alteração na consistência leva também a um deslocamento da gema, que se aproxima da casca, facilitando sua contaminação por microrganismos. Na postura, a densidade da gema é maior que a do albúmen, entretanto esta condição se altera devido a perda de umidade pelos poros e a absorção de água pela gema. Esta aumenta de volume e passa a se aproximar da extremidade superior do ovo, e, portanto, da casca (Clay e Board, 1991).

Associado a esta alteração de viscosidade, há a perda de umidade do albúmen para o ambiente. Este fenômeno provoca o aumento da câmara de ar para compensar a perda de volume do albúmen. A perda de umidade resulta em perda de peso dos ovos (Baker e Bruce, 1994).

Outras mudanças químicas ocorrem, como a alteração das proteínas constituintes das membranas internas e da gema. A modificação das membranas tem por consequência o aumento da possibilidade de penetração de microrganismos para o interior dos ovos e conseqüente multiplicação, principalmente ao atingir a gema. As alterações na membrana vitelina permitem a difusão de substâncias nutritivas da gema para o albúmen, diminuindo sua capacidade antimicrobiana (Tranter e Board, 1984; Lock, Dolman e Board, 1992).

A mensuração do pH e da perda de peso em ovos de mesa não é freqüente,. Alguns pesquisadores vêm estudando o comportamento do produto ao longo do tempo, em diferentes condições de armazenagem, visando o desenvolvimento de embalagens e tratamentos de casca que mantenham sua qualidade e funcionalidade por mais tempo.

Bernaola, Murillo e Montilla (1979), buscando desenvolver envoltório capaz de manter a qualidade interna de ovos armazenados sob temperatura ambiente determinaram que a perda de peso acumulada de ovos após catorze dias foi de 1,80g. Além disto, o pH do albúmen, já no segundo dia de armazenagem alcançou 9,0 e da gema foi até 6,5 no décimo quarto dia.

Sabrani e Payne (1978), estudaram a perda de peso de ovos com e sem cobertura com óleo mineral e armazenados sob diferentes temperaturas. Concluíram que, mesmo sem cobertura, ovos perdem mais peso quando

armazenados a 28°C do que se armazenados a 12°C. Da mesma forma, o pH do albúmen de ovos armazenados sob refrigeração aumenta mais lentamente do que o de ovos armazenados a 28°C.

Walsh, Rizk e Brake (1995), estudando ovos embrionados, concluíram que a 12,8°C, ovos perdem significativamente menos peso do que quando armazenados a 23,9°C, aos sete e aos catorze dias de armazenagem. O pH do albúmen não variou, nas condições de seus experimentos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1. MATERIAL

3.1.a . Unidades amostrais

Foram utilizados ovos de galinha, brancos, oriundos de um mesmo lote de poedeiras da linhagem HySex White, com idade entre 24 e 64 semanas. As unidades amostrais foram classificadas de acordo com o peso, sendo selecionadas as de tamanho extra (60,0 g), tolerando-se uma variação de $\pm 3,0$ gramas; e de acordo com sua qualidade de casca, através de ovoscopia. As aves faziam parte de um lote alojado em granja de poedeiras comerciais situada na região de Campinas, SP. Após a classificação, os ovos foram incubados a 42°C por 6-8 horas antes da sua contaminação, visando simular a temperatura no momento da postura.

3.1.b. Cepas bacterianas utilizadas

Foram utilizadas cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 (SE FT4). Ambas as cepas foram isoladas da produção avícola e cedidas pelo Prof. Dr. Raphael Andreatti Filho – UNESP, Botucatu, SP. Estas cepas foram enviadas ao Laboratório de Higiene da Faculdade de

Engenharia de Alimentos/UNICAMP, onde se realizou o trabalho experimental. As cepas usadas eram mutantes laboratoriais resistentes a 100µg de ácido nalidíxico (NAL^R) por mL. O uso de cepas marcadas visava auxiliar na recuperação e contagem das mesmas nos materiais biológicos trabalhados. Estas cepas, quando de sua chegada ao Laboratório, foram ativadas por passagem em caldo triptona soja² (TSB), seguido de ágar triptona soja³ (TSA) e incubadas a 35°C para confirmação bioquímica (conforme Vanderzant e Splittstoeller, 1992) e determinação de sua pureza.

A cepa de SE foi enviada à Fundação Osvaldo Cruz e foi confirmado seu sorotipo.

As cepas de SE e *E. coli* foram testadas quanto a sua pureza mensalmente, durante os experimentos.

3.1.c. Fezes

As fezes de galinha utilizadas nos procedimentos experimentais foram provenientes do mesmo lote doador dos ovos amostrais e coletadas no mesmo dia da coleta dos ovos. Encaminhadas, sob refrigeração, ao laboratório, onde foram acondicionadas em recipiente de vidro, com tampa e submetidas à esterilização

² Difco.

³ Difco.

úmida (autoclave por 20 minutos a 121°C), resfriadas naturalmente e utilizadas no dia posterior a sua coleta.

3.1.d. Material de laboratório

Separadores de albúmen e gema autoclaváveis,

Bandejas plásticas para transporte e armazenagem de ovos,

Baldes plásticos graduados, de 20 litros, para determinação da gravidade específica,

Vidraria de laboratório de microbiologia (placas de petri, copos de Becker, pipetas, tubos de ensaio com rosca),

Densímetro,

Meios de cultura – ágar MacConkey, ágar triptona soja, caldo triptona soja, água peptonada tamponada⁴ (BPW), ágar Levine Eosina Azul de Metileno, ágar XLD, ágar Hektoen, ágar verde brilhante, caldo EC, ágar LIA, ágar TSI, peptona de carne⁵

Antimicrobianos: ácido nalidíxico⁶ e novobiocina⁷

Sal de cozinha (cloreto de sódio)

Fitas indicadoras de pH⁸

Homogeneizador de pistões marca Stomacher modelo Blendlab 400

⁴ Oxoid.

⁵ Oxoid.

⁶ Whintomylon.

⁷ Sigma.

⁸ neutralit pH 5,0-10,0, Merck.

Estufas incubadoras para BOD modelo 347 (para incubação a 30°C),
modelo 347CD (para incubação a 8 e a 35 °C)

Estufa de cultura modelo 002CB (para incubação a 42 °C)

Ovoscópio

Centrífuga de Beckman modelo J2-21

Balança analítica marca Toledo modelo AB204

Balança semi-analítica Sartorius modelo U 3600

Potenciômetro Micronal modelo B374

3. 2. MÉTODOS

3.2.a. Preparo, manutenção e desenvolvimento das cepas bacterianas mutantes

As cepas de SE e *E. coli* foram enviadas ao Laboratório de Higiene e Legislação (FEA/UNICAMP) já resistentes ao ácido nalidíxico (NAL^R) a uma concentração de 100µg /mL de meio de cultura.

A resistência à novobiocina (NOB^R) foi desenvolvida utilizando-se metodologia adaptada de Afonso (1994), seguindo o procedimento a seguir.

As cepas foram inoculadas em 10mL de TSB contendo 100µg de ácido nalidíxico e 100µg de novobiocina por mL e procedeu-se a incubação a 35°C por 24 horas. Após este período, as culturas foram centrifugadas (2460 x g, durante 10 minutos, a 25°C). O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionado TSB NAL/NOB e as culturas reincubadas(35°C por 24 horas). A cada três repetições deste procedimento, placas de Petri contendo ágar MacConkey adicionado de 100µg/mL de NAL e 100µg/mL de NOB foram inoculadas com as culturas e incubadas a 35°C por 24-48horas, para verificar crescimento. A partir do crescimento em placa, selecionou-se colônia típica e isolada que foi reinoculada em TSB NAL/NOB por 24 horas a 35°C. Procedeu-se a contagem bacteriana por plaqueamento em ágar MacConkey adicionado e não adicionado dos antimicrobianos, após diluições seriadas em água peptonada 0,1%. Considerou-se a resistência adquirida quando foram obtidos resultados idênticos nas contagens em placa utilizando e não utilizando os antimicrobianos.

Estas cepas mutantes foram mantidas em TSA - NAL/NOB inclinado, sob refrigeração, durante a realização dos experimentos. Foram efetuados repiques mensais.

3.2.b. Contaminação experimental dos ovos via fezes

As culturas de SE e *E. coli* foram inoculadas em TSB NAL/NOB por 24 horas a 35°C. Deste primeiro caldo de cultura, alíquotas de 1 mL foram transferidas para Erlenmeyer contendo 100mL de TSB NAL/NOB e incubados a 35°C por 20-24 horas. Após a incubação, os caldos foram centrifugados (2500 x *g*, 15 minutos a 25°C), o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado, ao precipitado de células, 5mL de água peptonada tamponada seguida de ressuspensão. Desta forma gerou-se o inóculo utilizado para a contaminação das fezes. Estas foram contaminadas, de forma a obter contaminação média de 10⁷ Unidades Formadoras de Colônia(UFC)/g de fezes, para cada um dos microrganismos.

A inoculação dos ovos se deu através da sua leve pressão (somente uma face, em sua região equatorial e sem rotação) sobre fezes previamente contaminadas com SE e *E. coli*. O tempo de contato entre ovos e fezes foi de dez minutos. Após a contaminação, os ovos foram dispostos em bandeja plástica para ovos, limpa e sanitizada. Os ovos contaminados foram secos em fluxo laminar, a temperatura ambiente, por 60 – 75 minutos, antes de serem armazenados nas condições dos estudos (8°C e 70%±5% Umidade Relativa (U.R.); e 30°C e 90±5% U.R.) e procedida a contagem bacteriana em cinco unidades amostrais no tempo zero. A cada tempo de análise (0,24,48,72,168, 336 horas), cinco unidades

amostrais foram retiradas de sua condição de armazenagem, e colocadas em sacos plásticos estéreis para posterior análise.

A metodologia utilizada foi desenvolvida para a execução deste trabalho foi definida, considerando-se a recuperação de células de SE, após 48 horas de armazenagem na condição de 30°C e 90% de Umidade Relativa (UR). Para tal submeteu-se ovos ao contato com fezes por três tempos, contato rápido (apenas encostando ovos nas fezes previamente contaminadas, deixando ovos em contato com as fezes por 5 e por 10 minutos).

3.2.c. Contaminação experimental dos ovos via água de lavagem

As cepas bacterianas cultivadas em TSB (dois repiques sucessivos com 24 horas de incubação a 35°C) foram inoculadas em água estéril fria. Obteve-se uma contaminação da água na ordem de 10^6 UFC/mL de água, para cada microrganismo. Os ovos foram lavados com esponja de espuma de poliuretano e fibra sintética com abrasivo (marca Scotch-Brite – 3M) autoclavadas. Para contaminação experimental, a esponja foi molhada na água previamente inoculada com os microrganismos em estudo, retirado o excesso de água e procedeu-se a esfregação de toda a superfície do ovo, com o lado abrasivo. Esta metodologia foi utilizada para simular processo manual de lavagem de ovos e que ocorre em algumas granjas de poedeiras. O método foi desenvolvido após observação detalhada na granja doadora das amostras. Após a lavagem, os ovos foram

dispostos em bandeja plástica, limpa e sanitizada, e secos em fluxo laminar por 60 – 75 minutos, antes de serem armazenados nas condições dos estudos (8°C e 70%±5%U.R.; e 30°C e 90±5% U.R.) e procedida a contagem bacteriana em cinco unidades amostrais no tempo zero. A cada tempo de análise (0,24,48,72,168, 336 horas), cinco unidades amostrais foram retiradas de sua condição de armazenagem, e colocadas em sacos plásticos estéreis para posterior análise.

3.2.d. Classificação dos ovos amostrais e determinação da qualidade da casca

A classificação dos ovos se deu por pesagem e por ovoscopia. Os ovos foram separados em lotes classificados em casca íntegra e casca defeituosa. Para fins dos experimentos, foram considerados ovos com casca íntegra aqueles que não apresentaram defeitos visíveis enquanto que os com casca defeituosa apresentaram defeitos não desclassificatórios, como casca fina ou porosa, pequenas rachaduras recentes sem rompimento de membranas, utilizando como padrão de classificação fotografias disponíveis em Solomon (1991), Estados Unidos (s.d.) e Egg Quality Guide (s.d.).

As unidades amostrais, após classificação por ovoscopia na granja, foram acondicionadas em bandejas plásticas para ovos, devidamente higienizadas e sanitizadas (200 mg/L cloro ativo) e transportadas ao Laboratório de Higiene e

Legislação para pesagem, reclassificação por ovoscopia e demais procedimentos laboratoriais.

No laboratório, foi efetuada a pesagem individual de todas as unidades amostrais, descartando-se aquelas que não apresentavam o peso definido $60,0 \pm 3,0\text{g}$.

A qualidade da casca foi avaliada, na granja de poedeiras, através da determinação da gravidade específica de amostra de ovos, usando metodologia consagrada (Hamilton, 1982; Thompson e Hamilton, 1982). Foi determinada a cada coleta de ovos para análise. Quando da coleta de ovos amostrais, foi feita amostragem aleatória, de cem unidades para determinação da gravidade específica média dos ovos produzidos pelo lote doador, no turno de produção. Desta forma obteve-se a gravidade específica média dos ovos utilizados nos ensaios laboratoriais.

3.2.e. Contagens de SE NAL^R/NOB^R e *E. coli* NAL^R/NOB^R

A contagem de SE e de *E. coli* foi realizada conforme metodologia descrita por Silva, Junqueira e Silveira (2001), a partir de diluições decimais sucessivas das amostras e plaqueamento de 0,1 mL na superfície de placas de Petri contendo ágar MacConkey adicionado de 100µg de ácido nalidíxico e 100µg de

novobiocina por mL do meio de cultura (MacConKey NAL/NOB). As placas foram incubadas por 24-48h a 37°C antes da realização da leitura e contagem das colônias. Algumas colônias foram caracterizadas bioquimicamente para confirmação. Esperava-se um número pequeno de microrganismos, por isso, foi plaqueado, também, 1 mL da primeira diluição, sendo três placas com 0,3 mL e uma placa com 0,1mL (em triplicata).

e.1. *Contagem bacteriana na casca.*

A recuperação dos microrganismos da casca foi realizada por lavagem da superfície dos ovos, com metodologia adaptada de Gentry e Quarles(1972). Utilizou-se como diluente a água peptonada tamponada aquecida a 35-38 °C (a fim de evitar o fenômeno de pressão negativa nos ovos incubados a 30 °C). Este procedimento foi estendido aos ovos incubados a 8 °C. Os ovos foram colhidos das respectivas incubadoras em sacos plásticos estéreis. Foi adicionada água peptonada tamponada (5mL) para lavar as cascas que receberam esfregação por 60 segundos tomando-se o cuidado de atingir toda a superfície do ovo. Esta água de lavagem foi recolhida e armazenada em tubos de vidro com tampa rosca estéreis. Procedeu-se as diluições seriadas em água peptonada 0,1% e posterior inoculação em superfície em ágar MacConkey NAL/NOB. A água de lavagem foi incubada a 35-37 °C por 24 horas para verificar presença/ausência dos microrganismos caso não fosse obtida contagem. Foi procedido o plaqueamento de 1 mL da água de lavagem, em quatro placas de ágar MacConkey, conforme descrito, quando se esperava contagens muito baixas de microrganismos. As

placas contendo o inóculo foram incubadas a 35°C por 24-48 horas antes de ser procedida a contagem.

e.2. Contagem bacteriana no albúmen e gema.

Os ovos submetidos à lavagem da casca tiveram o excesso de água drenado e foram imediatamente imersos em álcool 70% por aproximadamente 40 minutos. Após este tempo os mesmos foram dispostos em placas de Petri estéreis e mantidos em fluxo laminar até sua completa secagem. Quando necessário, procedeu-se a flambagem dos mesmos para complementar o processo de secagem e eliminar resíduos de álcool.

Os ovos foram quebrados assepticamente em sua extremidade mais obtusa, retiradas suas membranas internas e o albúmen foi pipetado e transferido para saco plástico estéril. A gema e chalazas foram transferidas para o separador de clara e gema a fim de retirar qualquer resíduo de albúmen. As gemas foram, ainda, secas com gaze estéril para garantir a eliminação de qualquer resíduo de albúmen. A gema foi transferida para saco plástico estéril. O conteúdo (albúmen e gema) foi pesado e adicionado de água peptonada tamponada a fim de obter a diluição 10^{-1} . Foi utilizado homogeneizador de pistões (20 segundos) para homogeneização das amostras. Estas diluições foram utilizadas para a realização das contagens bacterianas em ágar MacConkey. As diluições 10^{-1} das amostras foram incubadas a 35-37°C por 24 horas para verificar presença/ausência dos microrganismos caso não fosse obtida contagem.

e.3. Contagem bacteriana nas fezes inoculadas.

A quantificação dos microrganismos em teste nas fezes foi realizada a partir da diluição de 5 g de amostra em 45mL de água peptonada tamponada e posterior inoculação em ágar MacConkey NAL/NOB e incubação a 35°C por 24-48h.

e.4. Contagem bacteriana na água de lavagem.

A água utilizada para contaminar os ovos simulando lavagem com água fria teve os microrganismos quantificados procedendo-se sua diluição em água peptonada tamponada e diluições sucessivas com plaqueamento em ágar MacConkey NAL/NOB.

3.2.f. Determinação do pH de clara e gema.

O pH de albúmen e gema foi determinado com a utilização de fitas de pH Neutralit pH 5,0-10,0 (fita com divisão de 0,50), imediatamente após a quebra das unidades amostrais e antes da realização das análises microbiológicas.

3.2.g. Definição das soluções salinas e mensuração da gravidade específica

A padronização das soluções salinas para mensuração da gravidade específica foi realizada mediante a adição de sal de cozinha (NaCl) em água a temperatura ambiente e determinação de sua densidade com densímetro. Foram

padronizadas oito soluções diferentes com densidade entre 1060,0g/L e 1095,0g/L com subdivisões de 5 g/L. A padronização foi feita utilizando-se água que abastece a granja. As quantidades de sal utilizadas para o preparo das soluções salinas estão na Tabela 1.

A medida da gravidade específica foi realizada na granja, a cada coleta de amostras para os ensaios, a partir de ovos colhidos aleatoriamente provenientes do mesmo lote de aves. Foi utilizada metodologia descrita por Hamilton (1982) e Thompson e Hamilton (1982). Foram utilizadas cem unidades a cada determinação. A cada 20 ovos analisados, procedeu-se a aferição da densidade das soluções salinas e sua correção, quando necessário.

Tabela 1: Quantidades de cloreto de sódio utilizadas para o preparo das diferentes soluções utilizadas para determinação da gravidade específica nos ovos da granja de poedeiras.

Densidade da solução salina (g/L)	Quantidade de NaCl para 1L de solução(g)
1060,0	97
1065,0	103,25
1070,0	109,5
1075,0	117,75
1080,0	126
1085,0	137,5
1090,0	149
1095,0	161,5

3.2.h. Método de lavagem das unidades amostrais

Os ovos amostrais, no experimento 2, sofreram lavagem industrial, na granja doadora. Antes da lavagem, as amostras foram classificadas por peso e ovoscopia, sendo encaminhadas imediatamente ao lavador marca Yamasa, modelo ECB9680 (capacidade: 80 caixas/hora). Foi utilizada água não clorada, a uma temperatura de 55°C (medida na saída dos bicos ejetores). A lavagem foi realizada com um conjunto de seis escovas rotativas de nylon e seis bicos ejetores de água. A secagem foi procedida por sistema composto de dois conjuntos de seis escovas semi-rápidas e ventilação forçada em temperatura ambiente. Após a secagem, os ovos foram colhidos na esteira e dispostos em bandejas plásticas de transporte devidamente lavadas e sanitizadas com hipoclorito de sódio (200 mg/L) e encaminhadas ao Laboratório de Higiene e Legislação.

3.2.i. Delineamento experimental

O planejamento dos experimentos está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Descrição dos procedimentos experimentais com ovos de galinha contaminados com *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* e submetidos a diferentes condições de armazenagem.

ENSAIO	Classificação dos ovos	CONTAMINAÇÃO	CONDIÇÃO DE ARMAZENAGEM
1	Ovos íntegros	com fezes com fezes	8°C e 70 $\pm$ 5%UR(refrigeração) 30°C e 90 $\pm$ 5%UR(abuso)
	Ovos com defeitos de casca	com fezes com fezes	8°C e 70 $\pm$ 5%UR(refrigeração) 30°C e 90 $\pm$ 5%UR(abuso)
2	Ovos íntegros e lavados	com fezes com fezes	8°C e 70 $\pm$ 5%UR(refrigeração) 30°C e 90 $\pm$ 5%UR(abuso)
	Ovos íntegros e não lavados	com fezes com fezes	8°C e 70 $\pm$ 5%UR(refrigeração) 30°C e 90 $\pm$ 5%UR(abuso)
3	Ovos íntegros	lavagem manual lavagem manual	8°C e 70 $\pm$ 5%UR(refrigeração) 30°C e 90 $\pm$ 5%UR(abuso)
	Ovos com defeitos de casca	lavagem manual lavagem manual	8°C e 70 $\pm$ 5%UR(refrigeração) 30°C e 90 $\pm$ 5%UR(abuso)
4	Ovos íntegros	com fezes	de 0 a 24h – 8°C, de 24 a 72h – 30°C, até 336h – 8°C
	Ovos com defeitos de casca	com fezes	

Os ovos foram analisados, seguindo a periodicidade utilizada por Oliveira (2000), sendo coletadas cinco unidades amostrais, que foram analisadas individualmente, nos tempos 0 (após contaminação e secagem das amostras em fluxo laminar), nas 24, 48, 72, 168 e 336 horas de armazenamento.

Optou-se por analisar as unidades amostrais até a 336^a hora devido ao fato de que, nos testes preliminares, houve dificuldade em manipular e separar o

conteúdo de ovos armazenados a 30 °C após este tempo, devido a alteração das características de qualidade, principalmente na resistência da membrana da gema. Após este tempo, a membrana da gema rompia freqüentemente na quebra dos ovos, impedindo a separação do conteúdo.

3.2.j. Verificação da inibição/interação entre as cepas bacterianas utilizadas

Foram utilizadas duas formas de verificação da inibição/interação entre as cepas:

j.1. Inibição cruzada entre cepas:

Foi utilizada metodologia adaptada de Beuchat, Ward e Pettigrew(2001). As cepas foram testadas para verificar sua habilidade de inibir o crescimento da outra nas condições de incubação dos ovos (8 e 30°C) e a 35-37°C. Culturas puras das cepas mutantes de SE e *E. coli* foram estriadas em cruz em ágar MacConkey NAL/NOB e TSA NAL/NOB e incubadas nas temperaturas de interesse por 24-48 horas, até 7 dias (para temperatura de 8°C) A leitura foi realizada através da verificação de zonas de não crescimento do microrganismo no cruzamento das estrias.

j.2. *Comportamento das cepas incubadas em caldo, nas temperaturas de interesse:*

Foi verificado o comportamento dos microrganismos em caldo TSB NAL/NOB individualmente e em conjunto, a 8 e a 30°C. As culturas foram preparadas a partir das culturas estoque em ágar nutriente. Foram feitos dois repiques sucessivos (24 horas) em TSB NAL/NOB (incubados a 35°C). Do segundo repique foi retirada alíquota contendo 10^1 UFC que foi transferida para tubos contendo 30 mL de TSB NAL/NOB de cada um dos microrganismos. Estes tubos foram incubados nas temperaturas de interesse (8 e 30°C) por 72 horas para verificação do crescimento dos microrganismos. Para verificar o comportamento de SE e *E. coli* multiplicando-se em conjunto, um mesmo tubo de TSB foi inoculado com 10^1 UFC de cada um dos microrganismos, em duplicata e incubados nas temperaturas de interesse.

Desta forma mensurou-se e comparou-se o comportamento dos microrganismos inoculados isoladamente (comportamento de cultivo de SE e de *E. coli*) e quando ambos são inoculados em um mesmo caldo de cultivo.

Este procedimento foi realizado a fim de verificar se, durante a multiplicação em caldo, nas temperaturas de interesse, poderia haver a produção de algum fator inibidor, de uma das duas bactérias de interesse, que pudesse prejudicar o comportamento de cultivo da outra.

3.2.I. Comportamento de SE e *E. coli* inoculados diretamente em albúmen e gema de ovos e armazenados a 8°C e a 30°C.

O comportamento de SE e *E. coli* foi estudado, quando inoculados em albúmen e gema de ovos, em conjunto e separadamente, e armazenados nas temperaturas de 8 e 30°C. Os microrganismos foram cultivados em caldo TSB por 24 horas a 35°C em dois repiques sucessivos para sua posterior inoculação no conteúdo dos ovos.

Ovos com menos de 24 horas de produção foram desinfetados por imersão em álcool 70%GL, por 10 minutos e secos em fluxo laminar. Tiveram seus albúmens e gemas separados assepticamente e dispostos em sacos plásticos estéreis e inoculadas com aproximadamente 10^3 UFC de *E. coli*, SE e *E. coli* + SE por grama de albúmen e de gema (*pool* de 15 ovos). Estas amostras foram, então, incubadas sob as temperaturas de 8° e 30°C, de onde foram retiradas alíquotas de 5 mL a cada tempo previamente definido até 336 horas de incubação. As coletas para determinação das curvas de crescimento foram realizadas em tempos predeterminados, de forma a atingir todas as fases de multiplicação dos microrganismos. Nas primeiras 24 horas de incubação foram coletadas alíquotas nos tempos 0 hora, 6 horas, 12 horas, 16 horas e 24 horas, para as amostras incubadas a 8°C. Quando o armazenamento se deu a 30°C, foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 2, 6, 12, 16, e 24 horas. Após as primeiras vinte e quatro horas de incubação, foram coletadas alíquotas a cada 24 horas, seguindo a

periodicidade de coletas definidas para os ovos com casca (48, 72, 168 e 336 horas).

3.2.m. Análise Estatística

Foi realizada a análise de variância (α de 0,05) com o intuito de se verificar a influência das diferentes classificações de ovos e o tipo de armazenagem, ao longo do tempo, sobre as unidades amostrais, através da contagem bacteriana na casca, pH de albúmen e gema e perda de peso. Os experimentos foram realizados de forma a se permitir também a avaliação da existência ou não da interação entre tempo de armazenagem e tratamento(classificação dos ovos). Foi realizado posteriormente o Teste Tukey para se localizar especificamente as diferenças já apontadas na análise de variância (Montgomery, 1997).

Os dados gerados a partir das contagens dos microrganismos no albúmen e gema dos ovos inoculados na casca foram submetidos ao Teste de Fischer, já que praticamente não houve crescimento dos microrganismos em estudo capaz de ser identificado através da categorização binária dos dados (presença e ausência), segundo Fleiss, 1981.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Inibição/Interação entre as cepas bacterianas utilizadas nos experimentos

4.1.1. Teste de inibição cruzada

As cepas de *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Escherichia coli* foram inoculadas em ágar MacConkey e ágar triptona soja formando estrias perpendiculares e incubadas a 8°C por até 7 dias, 30° e 35°C por 24-48 horas. O crescimento verificado após o tempo de incubação não indicou inibição cruzada entre os microrganismos, conforme a Figura 4.

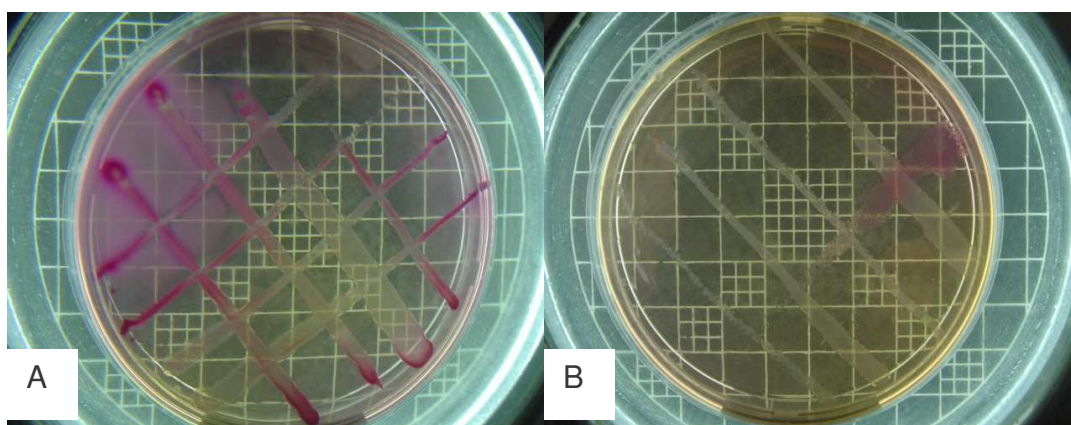


Figura 4: Características do crescimento das cepas de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* utilizadas nos experimentos com ovos, em ágar MacConkey. A=crescimento a 30°C, por 24 horas, B= crescimento a 8°C, por 7 dias.

4.1.2. Multiplicação em caldo

As cepas de SE e *E. coli* foram cultivadas nas temperaturas utilizadas para o armazenamento das unidades amostrais (8 e 30°C), em caldo triptona soja adicionado de 100µg/mL de ácido nalidíxico (NAL) e 100µg de novobiocina/mL (NOB), por 72 horas, a fim de verificar alterações no comportamento dos mesmos quando cultivados juntos. Foi realizada inoculação na ordem de 10^1 UFC no caldo, incubado nas temperaturas de interesse e em TSB e feitas contagens em tempos determinados.

Os resultados estão expressos nas figuras 5 e 6.

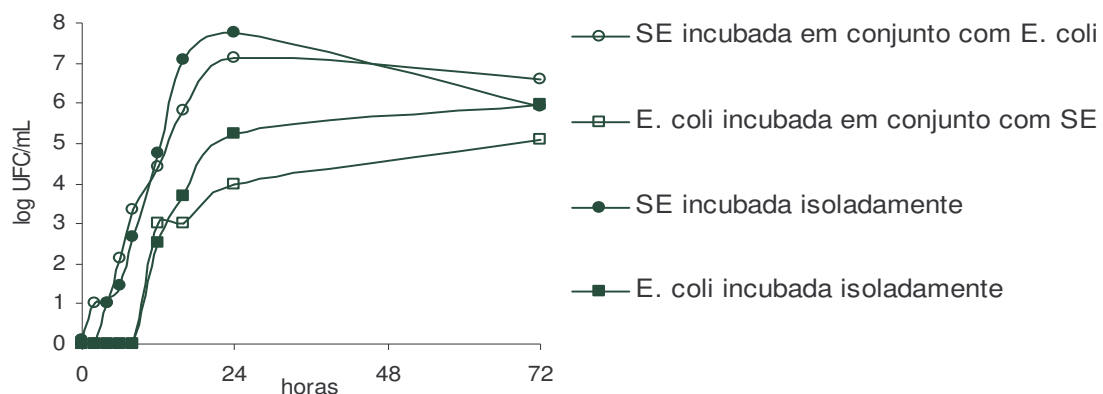


Figura 5: Comportamento de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* incubadas em conjunto ou isoladamente sob temperatura de 30°C, em TSB NAL/NOB.

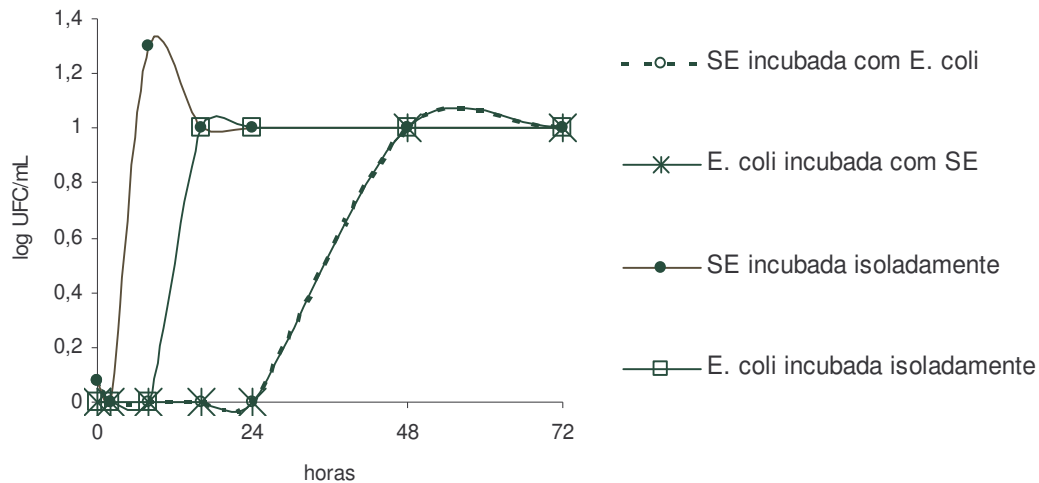


Figura 6: Comportamento de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* incubadas em conjunto ou isoladamente sob temperatura de 8°C, em TSB NAL/NOB.

Observa-se que, ao final do período de análise, os microrganismos estudados não apresentaram diferenças em seu comportamento de cultivo, sendo que os mesmos atingiram taxas de crescimento idênticas quando cultivados a 8°C e bastante semelhantes quando cultivados a 30°C (diferenças menores que 1 ciclo logarítmico). Pode-se afirmar, portanto, que as cepas bacterianas testadas não sofrem influência uma sobre a outra, quando incubadas em conjunto, nas temperaturas de interesse (8° e 30°C).

4.2. Experimentos com contaminação artificial na superfície de ovos de galinha

4.2.1. EXPERIMENTO 1: Influência da integridade da casca de ovos de galinha, submetidos à contaminação via fezes na sobrevivência de *Salmonella Enteritidis* (SE) e *Escherichia coli* na superfície da casca e sua penetração no conteúdo interno, nas alterações de pH do albúmen e gema e na perda de peso

Os ovos de galinha foram selecionados de acordo com peso ($60,0 \pm 3,0$ g) e qualidade da casca, por ovoscopia. Então, foram submetidos à contaminação a partir de fezes de galinha esterilizadas e inoculadas com SE e *E. coli*, por contato destas com a parte equatorial dos ovos por 10 minutos. Após a secagem foram acondicionados em duas condições de temperatura e umidade relativa, abuso (30°C e $90 \pm 5\%$ UR) e refrigeração (8°C e $70 \pm 5\%$ UR) e analisados ao longo do tempo.

Neste ensaio, a gravidade específica média dos ovos submetidos a contaminação foi de 1090,36 g/L, sendo os extremos 1091,0 e 1089,6 g/L. Segundo a classificação de Sauter e Petersen (1974), os ovos amostrais apresentaram, em média, excelente qualidade de casca.

a. Sobrevivência e penetração de *Salmonella Enteritidis* e *Escherichia coli* em ovos de galinha

A tabela 3 apresenta o comportamento de SE na casca de ovos íntegros ou defeituosos, ao longo do tempo, nas diferentes condições de armazenamento. Foi verificada diferença significativa no comportamento do microrganismo na superfície dos ovos quando comparadas as diferentes características de qualidade de casca e condições de armazenagem ($p=0,0275$), bem como em relação ao tempo de armazenamento ($p= 0,0266$).

É possível observar que, na condição de abuso (30°C e $90 \pm 5\%\text{UR}$), a viabilidade do microrganismo foi menor do que quando ovos foram submetidos à temperatura de refrigeração (8°C e $70 \pm 5\%\text{UR}$). Nesta condição, o microrganismo permaneceu viável durante todo o período de análise e sua quantidade se manteve constante, ao longo do tempo. A 30°C , houve um decréscimo de suas contagens já nas primeiras 24 horas de armazenagem, havendo uma diminuição de aproximadamente um ciclo logarítmico a cada 24 horas, comprovando os estudos de Oliveira (2000). Após 72 horas de armazenagem, o microrganismo não foi mais encontrado nas condições experimentais a 30°C . O comportamento do microrganismo em ovos com casca defeituosa foi semelhante, entretanto, pode-se perceber uma tendência à permanência do mesmo ao longo do tempo, mesmo a 30°C . Nesta temperatura, isto provavelmente deve-se ao fato de uma maior perda

de umidade dos ovos para o ambiente devido à fragilidade e maior permeabilidade das cascas, o que pode ter mantido a umidade na superfície dos ovos mais constante. Quando se examina o comportamento de SE a 8°C, pode-se afirmar que não houve diferença quanto a qualidade da casca. O microrganismo comportou-se de forma semelhante, tanto em ovos com casca defeituosa quanto em ovos com casca íntegra, nesta temperatura (α de 0,05). Manteve-se presente ao longo do tempo e em quantidade tendendo a ser constante.

Aydin *et al.*(2004), utilizando inóculos semelhantes ao utilizado neste experimento, concluíram que SE é viável na casca de ovos mantidos a temperatura ambiente por até uma semana. Radkowski (2002) observou um decréscimo da ocorrência de SE artificialmente inoculada na casca, em diversas condições de temperatura e umidade. Em ovos armazenados a 30°C e 80%UR, apenas 9,17% e 0,83% dos ovos analisados apresentaram o microrganismo em suas cascas, no sétimo e no décimo quarto dia de armazenagem, respectivamente. Já, quando submetidos a 2°C, foram positivos 63,33% dos ovos no sétimo, e 49,17% no décimo quarto dia de armazenamento, comprovando que a sobrevivência de SE em cascas de ovos é dependente do tempo e da temperatura de armazenagem. O mesmo autor não encontrou relação entre umidade relativa do ar e sobrevivência de SE em casca de ovos.

Tabela 3: Contagem de *Salmonella* Enteritidis em casca de ovos íntegros ou com defeitos de casca, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90± 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70±5% UR).

Tempo de armazenagem (h)	Ovos com casca íntegra				Ovos com casca defeituosa				
	abuso		refrigeração		abuso		refrigeração		Média***
	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	
0	5/5	2,22x10 ²	5/5	2,22x10 ²	5/5	6,78x10 ²	5/5	6,78x10 ²	4,50 x10 ^{2a}
24	5/5	7,80x10 ¹	5/5	7,26x10 ²	5/5	6,31x10 ³	5/5	7,31x10 ³	3,59x10 ^{3a}
48	5/5	2,02x10 ¹	5/5	8,66x10 ²	5/5	1,40x10 ⁴	5/5	4,75x10 ³	4,50 x10 ^{3a}
72	5*/5	<1, 0x10 ¹	5/5	5,09x10 ²	4/5	1,18x10 ¹	5/5	1,11x10 ³	4,05x10 ^{2a}
168	0/5	n.d.	5/5	6,43x10 ²	2/5	2,41x10 ³	5/5	8,32x10 ²	971 x10 ^{2a}
336	0/5	n.d.	5/5	2,48x10 ²	2/5	9,98x10 ¹	5/5	4,07x10 ²	7,24 x10 ^{2a}
Média**	20/30	4,2x10 ^{1b}	30/30	9,08 x10 ^{2ab}	23/30	3,91 x10 ^{3a}	30/30	2,52 x10 ^{3ab}	

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por unidade de casca.

* crescimento observado após enriquecimento em água peptonada tamponada (35 °C por 24h).

** média geral, por coluna, valores de contagem, na linha, seguidos de letra diferente diferem significativamente para α =0,05.

*** média geral, por linha, valores de contagem, na coluna, seguidos de letra diferente diferem significativamente para α =0,05.

Na tabela 4 estão apresentados os resultados da penetração de SE para o conteúdo dos ovos contaminados. Não houve invasão do microrganismo para o conteúdo dos ovos íntegros, mesmo quando submetidos a temperaturas altas (30°C). Oliveira (2002), *op.cit.*, realizando contaminação artificial de ovos de casca íntegra, utilizando maravalha como veículo de SE, recuperou, já nas primeiras 24 horas, o microrganismo de seu conteúdo. Este pesquisador utilizou inóculos maiores que os utilizados neste ensaio (10^5 UFC/ ovo), podendo-se associar a velocidade da invasão à contaminação inicial. Já, Radkowski (*op.cit.*), inoculando SE na ordem de 10^4 UFC/unidade de ovo de galinha, não encontrou ovos com conteúdo positivo, após 21 dias de armazenagem, mesmo quando estes foram armazenados em temperaturas altas. Inóculos maiores provocam maiores taxas de penetração para o conteúdo de ovos (Stokes, Osborne e Bayne, 1956, Chen, Clarke e Griffiths, 1996; Miyamoto *et al.*, 1998 e Braun *et al.*, 1999, *apud* Messens, Grijspeerdt e Herman, 2005). Grandes quantidades de células bacterianas viáveis não são freqüentes na superfície de cascas de ovos. Embora não existam relatos sobre quantidade de salmonelas, os estudos de Gentry e Quarles (1972) demonstram que ovos frescos podem apresentar em sua superfície entre 10^3 a 10^5 UFC/unidade, em média (contagem total de bactérias mesófilas).

Em ovos com casca defeituosa, foi possível verificar a invasão do conteúdo dos ovos apenas quando a temperatura de armazenagem foi abusiva (30°C). Pode-se, portanto, afirmar que nas condições do estudo, as temperaturas mais altas propiciaram a penetração e multiplicação do microrganismo no conteúdo de ovos cuja casca foi contaminada com SE. Wang e Slavik (1998) testaram diferentes sanitizantes de casca e a invasão de SE para o conteúdo de ovos íntegros submetidos a diferentes condições de armazenagem e não

encontraram diferença entre os sanitizantes nem entre as temperaturas, embora o índice de penetração a 23°C seja levemente superior do que a 4°C. Além disto, a velocidade de penetração é maior nesta temperatura (30% a 23°C e 20% a 4°C, no sétimo dia de incubação) Radkowski (2002) não encontrou relação entre temperatura de armazenagem e penetração de SE em ovos íntegros. Já Schoeni *et al.* (1995) encontraram ovos com seu conteúdo contaminado por SE quando foram armazenados a 25°C e não a 4°C. Não foram encontrados relatos científicos utilizando ovos com defeitos de casca. Embora a qualidade da casca esteja relacionada ao número de poros presentes, Nascimento e Solomon (1991) concluíram que a invasão bacteriana é independente do número de poros, e que ovos de baixa qualidade de casca possuem um maior número de poros em suas cascas. Os estudos de Sauter e Petersen (1974) comprovam que ovos com excelente qualidade de casca são consideravelmente mais resistentes a penetração dos diversos sorotipos de *Salmonella* do que ovos com cascas de baixa qualidade. De Reu *et al.* (2004) utilizando ovos repletos de ágar adicionado de trifetil tetrazolium, contaminados por imersão em suspensão bacteriana e armazenados a 20°C observaram que SE foi identificada no interior de ovos de galinha já no segundo dia de armazenagem. Estes autores concluíram, também, que 35% do total de ovos íntegros, contaminados por imersão em suspensão bacteriana e armazenados a 20°C tiveram seu conteúdo invadido pelo microrganismo em estudo. Entretanto, Sauter e Petersen (1974), imergindo ovos em suspensões de salmonela contendo 10^4 UFC/mL e que foram armazenados a 30°C, encontraram apenas 10% de ovos contaminados, em média, quando os mesmos apresentavam excelente qualidade de casca.

Em ovos refrigerados, SE, embora tenha se mantido viável na casca, não foi encontrada no conteúdo. O fato de não encontrar o microrganismo no conteúdo de ovos

com casca defeituosa e armazenados a 30°C após a 48^a hora de armazenagem comprova os achados de Tranter e Board (1984), que observaram a diminuição de contagem ou a paralisação de sua multiplicação em albúmen quando o mesmo não foi suplementado com ferro ou pela presença de outros componentes com capacidade inibitória da atividade microbiana, em ovos armazenados a 30°C.

Tabela 4: Contagem de *Salmonella* Enteritidis em albúmen e gema de ovos com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90± 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70±5% UR).

Tempo de armazenagem (h))	Ovos com casca íntegra				Ovos com casca defeituosa					
	abuso		refrigeração		abuso		refrigeração			
	albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gem a			albúmen	gema
	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	média ²	N/n ¹	média ²	N/n ¹	N/n ¹
0	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	-	n.r.	-	n.r.	n.r.
24	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	-	0/5	-	0/5	0/5
48	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5*	8,00x10 ¹	1/5	1,00x10 ¹	0/5	0/5
72	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	-	0/5	-	0/5	0/5
168	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	-	0/5	-	0/5	0/5
336	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	-	0/5	-	0/5	0/5
Total	0/25	0/25	0/25	0/25	3/25	-	1/25	-	0/25	0/25

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por mL/grama de amostra.

* ocorrência que caracteriza diferença significativa para $\alpha=0,05$, no teste de Fisher

O comportamento da *E. coli*, nas mesmas condições que SE foi submetida, está apresentado nas tabelas 5 e 6. Foi possível observar que o microrganismo teve comportamento semelhante ao da SE, nas condições do estudo.

A análise de variância revelou diferença significativa na quantidade do microrganismos ao longo do tempo ($p=0,0147$) e em relação às características da casca e condição de armazenagem ($p< 0,0001$).

A 30°C, diminuiu o número de unidades amostrais positivas, ao longo do tempo, bem como a carga bacteriana média. Ovos com casca defeituosa apresentaram uma maior sobrevivência da *E. coli* ao longo do tempo. À semelhança da SE, pode-se afirmar que a maior perda de umidade pelos ovos defeituosos pode ter propiciado uma maior umidade na superfície das cascas, mantendo melhores condições de sobrevivência para o microrganismo.

Quando se compara ovos submetidos a temperatura de 8°C, observa-se que houve diferença significativa (α de 0,05) nas contagens bacterianas de *E. coli*, ao longo do tempo. Este resultado, entretanto, deve ser analisado cuidadosamente, uma vez que a média da contaminação inicial é diferente. Pode-se concluir, neste caso que, embora haja diferença nas contagens, o declínio nas contagens foi semelhante. Este comportamento foi diferente da SE, que se manteve constante ao longo do tempo.

A presença do microrganismo foi identificada no conteúdo de ovos já nas primeiras 24 horas de armazenagem, não sendo mais detectada após a 48^a hora de armazenagem, em ovos com casca defeituosa submetidos à temperatura de abuso. Não existe diferença significativa, pelo teste de Fisher (α de 0,05), para as diferentes condições de armazenagem e qualidade de casca, na invasão do microrganismo.

Gentry e Quarles (1972), acompanharam a viabilidade de microrganismos na casca de ovos armazenados sob temperaturas de 4°C e 38°C, ao longo do tempo e concluíram que a mesma diminui ao longo do tempo, principalmente quando ovos são mantidos em altas temperaturas. Os achados destes autores são semelhantes aos encontrados neste ensaio, considerando as bactérias utilizadas.

Tabela 5: Contagem de *Escherichia coli* em casca de ovos íntegros ou com defeitos de casca, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90± 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70±5% UR).

Tempo de armazenagem (h)	Ovos com casca íntegra				Ovos com casca defeituosa				
	abuso		refrigeração		abuso		refrigeração		
	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	Média ^{***}
0	5/5	2,94x10 ²	5/5	2,94x10 ²	5/5	3,36x10 ⁴	5/5	3,36x10 ⁴	1,69x10 ^{4a}
24	2/5	1,8x10 ¹	5/5	2,39x10 ²	5/5	2,97x10 ³	5/5	3,77x10 ⁴	1,02x10 ^{4ab}
48	1*/5	<1,00x10 ¹	5/5	3,21x10 ²	5/5	1,41x10 ⁴	5/5	2,24x10 ⁴	9,20x10 ^{3ab}
72	0/5	n.d.	5/5	2,62x10 ²	5/5	2,09x10 ¹	5/5	6,64x10 ³	1,73x10 ^{3ab}
168	0/5	n.d.	5/5	3,56x10 ¹	5/5	1,38x10 ³	5/5	8,43x10 ³	2,39x10 ^{3ab}
336	0/5	n.d.	5/5	3,26x10 ¹	4/5	2,00x10 ¹	5/5	5,80x10 ²	1,53x10 ^{2b}
Média ^{**}	8/30	4,90x10 ^{1b}	30/30	2,02x10 ^{2b}	29/30	8,63x10 ^{3ab}	30/30	1,82x10 ^{4a}	

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por unidade de casca.

* crescimento observado após enriquecimento em água peptonada tamponada (35 °C por 24h).

** média geral por coluna, valores de contagem, na linha, seguidos de letra diferente diferem significativamente para α =0,05.

*** média geral por linha, valores de contagem, na coluna, seguidos de letra diferente diferem significativamente para α =0,05.

Tabela 6: Contagem de *Escherichia coli* em albúmen e gema de ovos com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90± 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70±5% UR).

Tempo de armazenagem (h))	Ovos com casca íntegra				Ovos com casca defeituosa					
	abuso		refrigeração		abuso		refrigeração			
	albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gema
	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	média ²	N/n ¹	média ²	N/n ¹	N/n ¹
0	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	-	n.r.	-	n.r.	n.r.
24	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	*	1/5	*	0/5	0/5
48	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	3,00x10 ¹	1/5	1,00x10 ¹	0/5	0/5
72	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	0/5
168	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	0/5
336	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	0/5
Total	0/25	0/25	0/25	0/25	2/25		1/25		0/25	0/25

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por mL/grama de amostra.

* crescimento observado após enriquecimento em água peptonada tamponada (35 °C por 24h).

b. Perda de peso de ovos de galinha com diferentes qualidades

A tabela 7 apresenta a perda de peso acumulada ao longo do tempo, dos ovos com diferentes qualidades de casca e submetidos às condições de temperatura e umidade especificadas.

Tabela 7: Perda de peso (g) acumulada de ovos de galinha com casca íntegra ou defeituosa, submetidos à contaminação via fezes e mantidos sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa (UR).

Efeitos da temperatura e umidade relativa (UR):							
Ovos	Condição de armazenagem	Tempo de armazenagem					média*
		24 horas	48 horas	72 horas	168 horas	336 horas	
casca íntegra	30°C						
	média	0,52 ^{bcde}	0,10 ^a	0,64 ^{cdefg}	0,98 ^{gh}	1,20 ^h	0,688 ^a
	±desvio padrão	0,130	0,077	0,114	0,109	0,158	
	8°C						
	média	0,24 ^{abc}	0,14 ^{ab}	0,40 ^{abcd}	0,66 ^{defg}	0,76 ^{defg}	0,440 ^b
	±desvio padrão	0,230	0,151	0,100	0,167	0,114	
casca defeituosa	30°C						
	média	0,58 ^{bcdef}	0,52 ^{bcde}	0,50 ^{abcde}	0,90 ^{efgh}	1,22 ^h	0,744 ^a
	±desvio padrão	0,259	0,164	0,071	0,158	0,148	
	8°C						
	média	0,42 ^{abcd}	0,54 ^{bcdef}	0,58 ^{bcdef}	0,94 ^{fgh}	1,26 ^h	0,748 ^a
	±desvio padrão	0,109	0,152	0,192	0,297	0,321	

médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($\alpha = 0,05$).

* médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente ($\alpha = 0,05$).

A análise de variância revelou a existência de interação entre as diferentes características de casca, temperatura e tempo de armazenagem ($p=0,012$).

Ovos de casca íntegra perdem mais peso quando armazenados a 30°C do que a 8°C. Sob temperatura de 30°C, ovos de casca íntegra perdem mais peso do que quando armazenados a 8°C (α de 0,05). Entretanto, quando se comparam ovos com casca defeituosa, foi possível identificar que não há diferença na perda de peso, a 8° ou a 30°C. Foi possível verificar, também, que não há diferença entre ovos de casca íntegra armazenados a 30°C e ovos com casca defeituosa, independentemente da temperatura de armazenagem.

Estudos realizados sobre perda de peso de ovos ao longo do tempo privilegiam ovos de incubação, uma vez que a eclodibilidade está relacionada a ela (Rosa *et al.*, 2002). Os relatos sobre ovos de mesa comprovam que há uma maior perda de peso ao longo do tempo, quando os mesmos são armazenados sob altas temperaturas (Sabrani e Payne, 1978).

Peebles *et al.* (1993), estudando ovos de incubação, concluíram que, ovos onde não foi realizado procedimento de abertura da casca apresentaram uma menor perda de peso ao longo do tempo ($p < 0,05$). Embora estes autores não tenham comparado ovos com diferentes qualidades de casca, efetuaram, em seus experimentos, a abertura de pequenos orifícios, seguidos de fechamento artificial. Pode-se assumir que estes orifícios são comparáveis a defeitos de casca. Os ovos defeituosos podem possuir um

maior número de poros, o que permite uma maior troca com o ambiente, inclusive uma maior perda de umidade durante o período de armazenagem.

c. pH de albúmen e gema

O comportamento do pH, do albúmen e da gema dos ovos com casca íntegra ou defeituosa, contaminados via fezes estão descritos nas tabelas 8 e 9.

O albúmen tem seu potencial hidrogeniônico alterado rapidamente após a postura, passando de 7,5 para 9,5 na primeira semana após a postura. Esta alteração é um dos fatores de proteção contra a multiplicação microbiana e está associada à difusão de CO₂ do albúmen para o ambiente através dos poros da casca (Tranter e Board, 1984).

Tabela 8: pH de albúmen de ovos de galinha de casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.

Tempo (h)	ovos com casca íntegra		ovos com casca defeituosa		Média***
	30°C/90%UR	8°C/70%UR	30°C/90%UR	8°C/70%UR	
0	8,50 ^d	8,50 ^d	8,50 ^d	8,50 ^d	8,50 ^d
24	9,17 ^b	9,00 ^c	9,17 ^b	9,00 ^c	9,08 ^c
48	9,25 ^b	9,00 ^c	9,25 ^b	9,00 ^c	9,12 ^c
72	9,50 ^a	9,00 ^c	9,50 ^a	9,00 ^c	9,25 ^b
168	9,50 ^a	9,00 ^c	9,50 ^a	9,50 ^a	9,25 ^b
336	9,50 ^a	9,50 ^a	9,50 ^a	9,50 ^a	9,50 ^a
Média**	9,24 ^a	9,00 ^b	9,24 ^a	9,00 ^b	

* valores médios seguidos de letras diferentes diferem significativamente (α de 0,05).

** valores médios, na linha seguidos de letras diferentes diferem significativamente (α de 0,05).

*** valores médios, na coluna, seguidos de letras diferentes diferem significativamente (α de 0,05).

Houve diferença significativa na análise de variância, que revelou interação entre as diferentes categorias de ovos e suas respectivas condições de armazenagem ($p < 0,0001$). O pH do albúmen aumentou, ao longo do tempo, independentemente da forma de armazenagem ou qualidade da casca. Observa-se, entretanto, um aumento mais rápido do pH em albúmen de ovos submetidos a temperaturas mais altas. Estes resultados confirmam os achados de Sabrani e Payne (1978), que armazenaram ovos com casca íntegra a 12°C e a 28°C e concluíram que o pH do albúmen aumenta mais rapidamente em ovos armazenados a temperaturas maiores e alcançam valores superiores ao final do período de análise.

Não houve diferença no aumento do pH do albúmen, ao comparar ovos com diferentes qualidades de casca, mas submetidos a mesma condição de armazenagem. O gradiente de pH no albúmen depende da difusão de CO₂ do conteúdo interno para o meio ambiente, e esta é dependente da pressão do gás no ambiente (Brooks e Pace, 1938, apud. Li-Chan, Powrie e Nakai, 1994).

Tabela 9: pH da gema de ovos de galinha de casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.

Tempo (h)	Ovos com casca íntegra		ovos com casca defeituosa		Média
	30°C/90%UR	8°C/70%UR	30°C/90%UR	8°C/70%UR	
0	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58 ^b
24	5,58	5,67	5,50	5,67	5,58 ^b
48	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00 ^a
72	5,58	5,67	5,58	5,67	5,58 ^b
168	6,00	5,75	6,00	5,75	5,87 ^a
336	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00 ^a
Média	5,79	5,78	5,78	5,78	

* valores médios seguidos de letras diferentes diferem significativamente (α de 0,05).

O pH da gema aumentou ao longo do tempo de forma significativa ($p < 0,0001$). Não houve influência da qualidade da casca nem da temperatura de armazenagem, como o correu com o albúmen. Segundo Sharp e Powell *apud* Li-Chan, Powrie e Nakai(1994) a gema pode atingir pH de 6,4 em 18 a 50 dias, quando ovos são armazenados a 37° e 2°C, respectivamente.

O resultados das medidas de pH na 48^a hora de armazenagem, deve ser desconsiderado, uma vez que apresentou desvio em seu valor médio. Este desvio pode ter sido causado por falha na determinação, que é visual. Não existe registro na literatura, de oscilação do pH de gema, ao longo do armazenamento, independentemente das condições de armazenagem.

4.2.2. EXPERIMENTO 2: Influência da lavagem industrial de ovos de galinha de casca íntegra, submetidos à contaminação via fezes na sobrevivência de *Salmonella Enteritidis* e *Escherichia coli* na superfície da casca e sua penetração no conteúdo interno, nas alterações de pH do albúmen e gema e na perda de peso

Os ovos de galinha foram selecionados de acordo com peso ($60,0 \pm 3,0$ g). Foi realizada ovoscopia na granja de poedeiras. A lavagem das unidades amostrais foi realizada conforme descrito no capítulo de Material e Métodos. Ovos não lavados, foram simplesmente coletados, classificados e transportados ao laboratório. Foram, então, submetidos a contaminação a partir de fezes de galinha inoculadas com SE e *E. coli*, por contato destas com a parte equatorial dos ovos por 10 minutos. Após a secagem foram acondicionados em duas condições de temperatura e umidade relativa, abuso (30°C e $90 \pm 5\%$ UR) e refrigeração (8°C e $70 \pm 5\%$ UR) e analisados ao longo do tempo.

A gravidade específica média, dos ovos neste experimento foi de $1090,2\text{g/L}$, com extremos de $1090,0$ e $1090,4$, sendo classificados, segundo Sauter e Petersen (1974), como ovos de excelente qualidade.

a. Sobrevivência e invasão de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* em ovos de galinha

O comportamento de SE na casca dos ovos amostrais está apresentado na tabela 10. A análise de variância revelou a existência de diferença significativa na quantidade de células viáveis do microrganismo, ao longo do tempo ($p=0,002$), independentemente do tratamento recebido pelos ovos e que houve interação entre as variáveis analisadas ($p=0,0087$). O teste de Tukey não foi, entretanto, significativo, para α de 0,05, não sendo possível indicar quais condições comprometeram mais sensivelmente o comportamento do microrganismo.

Foi possível observar tendência na redução da quantidade de SE na superfície dos ovos quando estes foram mantidos em temperatura de abuso (30°C). Na temperatura de refrigeração (8°C) observou-se uma lenta diminuição de sua quantidade na superfície dos ovos. A tendência à permanência do microrganismo na superfície de ovos mantidos a 8°C é comprovada pelos estudos de Radkwoski (2002), que encontrou um maior número de ovos com sua superfície contaminada, quando estes eram mantidos a temperatura de 2°C do que a 30°C . Já, ovos mantidos a temperaturas altas tenderam a ter as células bacterianas inviabilizadas, com o passar do tempo. Oliveira (2000), verificou a diminuição da carga bacteriana superficial, em até um ciclo logarítmico diariamente, quando ovos foram mantidos a temperatura ambiente.

Aydin *et al.* (2004) conseguiram recuperar células de SE de cascas de ovos íntegros até o sétimo dia de armazenagem a temperatura ambiente, e não mais nos décimo quarto, vigésimo primeiro e trigésimo dia.

Aparentemente, existe a possibilidade de recuperar células de SE por tempo mais longo de ovos lavados e submetidos a altas temperaturas do que de ovos não lavados, também mantidos em temperaturas altas. Este achado pode ser justificado pela diminuição da microbiota normal da superfície do ovo pela lavagem correta, o que diminuiria a competição, favorecendo os microrganismos inoculados por diminuição da competição (Moats, 1979; Moats, 1981). A lavagem industrial de ovos é prática aceitável, sob ponto de vista higiênico-sanitário desde que atendidos os requisitos de temperatura e qualidade da água. É, inclusive, obrigatória em alguns países, como os Estados Unidos (Hutchison *et al.*, 2003). Deve-se, entretanto, evitar a recontaminação das cascas após os procedimentos de higienização.

A contagem de SE em ovos não lavados nas 72 horas de armazenagem, na temperatura de abuso foi maior que as realizadas nos tempos anteriores. Este fato se deve, não à multiplicação do microrganismo, mas sim à dificuldade de manter níveis sempre padronizados de contaminação da casca. O resultado deve ser visto como a manutenção de SE nos mesmos níveis anteriores. Além disto, a análise estatística não revelou diferença neste resultado, em relação aos demais.

Na tabela 11 estão as informações referentes a penetração de SE no conteúdo dos ovos amostrais. Não houve diferença significativa entre as diferentes condições de

tratamento e temperatura, na invasão do microrganismo em estudo para o conteúdo dos ovos contaminados (α de 0,05), pelo teste de Fisher.

A invasão do conteúdo interno foi observada apenas em uma unidade amostral, não lavada e armazenada a 30°C na 72ª hora de armazenagem. Este achado confirma o descrito por Humphrey (1994a), que afirma que mesmo ovos de casca íntegra podem ter seu conteúdo invadido por SE, principalmente em temperaturas e umidades altas, como foi o caso. Após 72 horas de armazenagem, o microrganismo não foi mais isolado. Tranter e Board (1984) demonstraram a diminuição do número de células viáveis de salmonela, em albúmen armazenado a 30°C, provavelmente por causa de suas características antimicrobianas.

Não houve invasão do conteúdo em ovos lavados ou não lavados e submetidos a temperatura de 8°C. Em ovos submetidos a refrigeração, o índice de invasão de microrganismos para o conteúdo tende a ser menor do que em ovos submetidos a temperaturas altas (Stokes, Osborne e Bayne, 1956; Chen, Clarke e Griffiths, 1996; Miyamoto *et al.*, 1998), mas somente quando contaminados com grande número de células bacterianas, o que não ocorreu neste ensaio.

Tabela 10: Contagem de *Salmonella* Enteritidis na superfície de ovos de galinha, lavados industrialmente ou não, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90± 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70±5% UR).

Tempo de armazenagem (h)	Ovos não lavados				Ovos lavados				
	abuso		refrigeração		abuso		refrigeração		Média**
	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	
0	5/5	3,85x10 ²	5/5	3,85x10 ²	5/5	2,03x10 ⁴	5/5	2,03x10 ⁴	1,33x10 ^{4a}
24	5/5	8,36x10 ²	5/5	2,48x10 ³	5/5	1,36x10 ¹	5/5	9,40x10 ¹	8,52x10 ^{2b}
48	5/5	1,01x10 ²	5/5	3,78x10 ²	2*/5	<1,00x10 ¹	5/5	2,36x10 ²	1,79x10 ^{2b}
72	5/5	1,60x10 ⁴	5/5	2,87x10 ²	1*/5	<1,00x10 ¹	5/5	1,74x10 ²	4,12x10 ^{3ab}
168	2*/5	< 1,00x10 ¹	5/5	8,12x10 ¹	0/5	n.d.	5/5	9,48x10 ¹	4,40x10 ^{1b}
336	0/5	n.d.	5/5	1,98x10 ¹	1/5	1,98x10 ¹	5/5	1,66x10 ²	5,10x10 ^{1b}
Média***	22/30	2,89 x10 ³	30/30	6,04 x10 ²	14/30	3,38 x10 ³	30/30	3,51x10 ³	

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por unidade de casca.

* crescimento observado após enriquecimento em água peptonada tamponada (35°C por 24h).

** média geral, por linha, valores de contagem, na coluna, seguidos de letra diferente, diferem significativamente para α=0,05.

*** média geral, por coluna

Tabela 11: Contagem de *Salmonella* Enteritidis em albúmen e gema de ovos de galinha, lavados industrialmente ou não, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90± 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70±5% UR).

Tempo de armazenagem (h)	Ovos não lavados				Ovos lavados					
	abuso		refrigeração		Abuso		refrigeração		albúmen	gema
	albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gema		
	N/n ¹	média ²	N/n ¹	média ²	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹
0	n.r.	-	n.r.	-	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
24	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
48	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
72	1/5	2,00x10 ¹	1/5	1,00x10 ¹	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
168	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
336	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Total	1/25	-	1/25	-	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por mL/grama de amostra.

As tabelas 12 e 13 contêm as informações referentes ao comportamento da *E. coli* nas mesmas condições ora apresentadas para SE. Existe diferença significativa no comportamento do microrganismo, nas cascas dos ovos amostrais ao longo do tempo ($p=0,002$). Foi possível identificar, também a interação ($p=0,0158$) entre os fatores (tempo e tratamento recebido pelos ovos – temperatura de estocagem e lavagem), indicando que existe interdependência entre as variáveis.

Houve decréscimo da população bacteriana e diminuição da viabilidade das células quando ovos foram armazenados a 30°C e uma tendência a permanência do microrganismo na superfície dos ovos submetidos a temperatura de 8°C, como observado com SE. Os achados com *E. coli* foram bastante semelhantes aos com SE, podendo-se concluir que, nas condições deste estudo, estes microrganismos possuem comportamento similar.

Não foi encontrado o microrganismo em casca de ovos não lavados, mantidos a 30°C , a partir do sétimo dia de estocagem, confirmando os achados de Aydin *et al.* (2004), que contaminaram a superfície de ovos com *E. coli* e os mantiveram a temperatura ambiente. Concluíram que o microrganismo se manteve viável até o sétimo dia de armazenagem, não sendo mais isolado após este período. Não foi verificada a invasão por *E. coli*, do conteúdo dos ovos analisados..

Tabela 12: Contagem de *Escherichia coli* na superfície de ovos de galinha, lavados industrialmente ou não, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90± 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70±5% UR).****

Tempo de ar- mazenagem	Ovos não lavados				Ovos lavados				
	abuso		refrigeração		abuso		refrigeração		
	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	Média ^{**}
(h)									
0	5/5	2,95x10 ^{3ab}	5/5	2,95X10 ^{3ab}	5/5	2,15x10 ^{4a}	5/5	2,15x10 ^{4a}	1,22x10 ^{4a}
24	5/5	2,95x10 ^{3ab}	5/5	3,52X10 ^{3ab}	3/5	5,60x10 ^{1b}	5/5	9,17x10 ^{2ab}	2,03x10 ^{3b}
48	5/5	3,65x10 ^{2ab}	5/5	6,04X10 ^{2ab}	1*/5	< 1,00x10 ^{1b}	5/5	4,52x10 ^{2ab}	3,01x10 ^{2b}
72	5/5	1,48x10 ^{2ab}	5/5	5,36X10 ^{2ab}	0/5	n.d. ^b	5/5	1,30x10 ^{3ab}	4,46x10 ^{3ab}
168	0/5	n.d. ^b	5/5	3,74X10 ^{2ab}	2*/5	<1,00x10 ^{1b}	5/5	6,35x10 ^{2ab}	2,52x10 ^{2b}
336	0/5	n.d. ^b	5/5	4,94X10 ^{1ab}	1/5	2,40x10 ^{1b}	5/5	6,82x10 ^{2ab}	1,84x10 ^{2b}
Média ^{***}	20/30	3.79x10 ³	30/30	1.34x10 ³	12/30	3.58x10 ³	30/30	4.24x10 ³	

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por unidade de casca.

* crescimento observado após enriquecimento em água peptonada tamponada (35°C por 24h).

** média geral, por linha; valores de contagem, na coluna, seguidos de letras diferentes, diferem significativamente para α=0,05.

*** média por coluna.

**** valores de contagem no corpo da tabela, seguidos de letras diferentes, diferem significativamente para α=0,05.

Tabela 13: Contagem de *Escherichia coli* em albúmen e gema de ovos de galinha, lavados industrialmente ou não, contaminados via fezes e submetidos a diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90± 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70±5% UR).

Tempo de armazenagem (h)	Ovos não lavados				Ovos lavados			
	abuso		refrigeração		abuso		refrigeração	
	Albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gema
	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹
0	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
24	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
48	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
72	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
168	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
336	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Total	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

b. Perda de peso de ovos de galinha submetidos ou não a lavagem industrial

Na tabela 14 estão apresentadas as informações sobre a perda de peso acumulada ao longo do tempo, de ovos de galinha submetidos ou não a lavagem industrial e submetidos a diferentes condições de armazenagem.

Tabela 14: Perda de peso (g) acumulada de ovos de galinha lavados industrialmente ou não, submetidos à contaminação via fezes e mantidos em diferentes condições de temperatura e umidade relativa(UR).

Ovos	Condição de armazenagem	Tempo de armazenagem					Média*
		24 horas	48 horas	72 horas	168 horas	336 horas	
Não lavados	30°C e 90±5%UR						
	média(g)	0,52 ^{cde}	0,54 ^a	0,64 ^{defg}	0,98 ^{hijk}	1,2 ^{kl}	0,688 ^b
	±desvio padrão	0,130	0,077	0,114	0,109	0,158	
	8°C e 70±5%UR						
	média(g)	0,24 ^{abc}	0,28 ^{ab}	0,40 ^{abc}	0,66 ^{defg}	0,76 ^{efghi}	0,440 ^c
	±desvio padrão	0,230	0,151	0,100	0,167	0,114	
Lavados	30°C e 90±5%UR						
	média(g)	0,60 ^{def}	0,74 ^{efgh}	0,92 ^{ghijk}	1,14 ^{jkl}	1,36 ^h	0,952 ^a
	±desvio padrão	0,071	0,089	0,084	0,114	0,089	
	8°C e 70±5%UR						
	média(g)	0,54 ^{de}	0,70 ^{efgh}	0,72 ^{efgh}	0,88 ^{fghij}	1,04 ^{ijk}	0,776 ^b
	±desvio padrão	0,114	0,071	0,109	0,084	0,167	

médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($\alpha = 0,05$).

* médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente ($\alpha = 0,05$).

Houve interação entre os tratamentos e o tempo ($p < 0,0001$). A lavagem industrial foi determinante da perda de peso dos ovos testados, principalmente

quando armazenados a 30°C. Embora não tenha havido diferença significativa entre a perda de peso de ovos não lavados armazenados a 30°C e de ovos lavados armazenados a 8°C, a retirada da cutícula por escovação pode ter influenciado a velocidade da evaporação da umidade. Ovos lavados submetidos a temperatura de 30°C perderam mais peso, ao longo do tempo, seguidos de ovos lavados a 8°C e não lavados a 30°C. Este fato se deve, provavelmente, a danos provocados na superfície da casca, com retirada da cutícula, pelo sistema de escovas rotativas da lavadora industrial, permitindo uma maior perda de umidade durante a armazenagem. Os ovos não lavados, incubados a 8°C perderam menos peso que todos os demais tratamentos.

Board (1966), Tranter e Board (1982), Messens, Grijspeerdt e Herman (2005) relatam que tratamentos sofridos pela casca de ovos íntegros, tais como abrasão com toalhas ou papel e tratamentos químicos aumentam a possibilidade de contaminação do conteúdo interno. Portanto, seria possível, também, que, por exposição dos poros ao ambiente, maior quantidade de umidade seja evaporada, diminuindo mais rapidamente o peso de ovos de consumo.

Para ovos sem lavar, os resultados deste ensaio foram semelhantes aos achados de Bernaola, Murillo e Montilla (1979) e Alleoni (2003), que verificaram que a perda de peso em ovos armazenados a 22°C e 25°C no décimo quarto dia de armazenagem foi de 1,80g e de 1,90g, respectivamente. Os estudos destes pesquisadores não informam a umidade relativa do ar durante os experimentos.

c. pH do albúmen e gema de ovos de galinha submetidos a lavagem industrial

O pH do albúmen e gema dos ovos lavados ou não industrialmente e contaminados via fezes estão apresentados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15: pH albúmen de ovos de galinha de casca íntegra, lavados ou não, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.

tempo	ovos não lavados		ovos lavados		Média***
	30°C/90%UR	8°C/70%UR	30°C/90%UR	8°C/70%UR	
0 horas	8,50 ^d	8,50 ^d	8,50 ^d	8,50 ^d	8,50 ^d
24 horas	9,17 ^b	9,00 ^c	9,17 ^b	9,00 ^c	9,08 ^c
48 horas	9,25 ^b	9,00 ^c	9,25 ^b	9,00 ^c	9,13 ^c
72 horas	9,50 ^a	9,00 ^c	9,50 ^a	9,00 ^c	9,25 ^b
168 horas	9,50 ^a	9,00 ^c	9,50 ^a	9,00 ^c	9,25 ^b
336 horas	9,50 ^a	9,50 ^a	9,50 ^a	9,00 ^c	9,38 ^a
Média**	9,24 ^a	9,00 ^b	9,24 ^a	8,92 ^c	

* valores médios seguidos de letras diferentes diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

** valores médios seguidos de letras diferentes, na linha, diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

**** valores médios seguidos de letras diferentes, na coluna diferem significativamente (α de 0,05).

O pH do albúmen dos ovos do experimento 2 diferiu significativamente com relação ao tipo de tratamento, tempo de armazenagem e a interação entre os fatores foi significativa ($p<0,0001$).

Observa-se o aumento do pH no decorrer do período de análise, independentemente do tipo de tratamento a que ovos foram submetidos. Ovos submetidos a temperatura de 30°C tiveram um aumento mais rápido do pH, quando comparados a ovos armazenados a 8°C. A difusão de CO₂ é maior quando ovos são submetidos a altas temperaturas, embora o gradiente de difusão

seja dependente da pressão parcial do gás no ambiente (Brooks e Pace, 1938, apud. Li-Chan, Powrie e Nakai, 1994).

Os resultados deste ensaio foram semelhantes aos encontrados por Alleoni (2003), que avaliou as características físico-químicas e funcionais do albúmen, quando ovos eram armazenados a 25°C.

O pH da gema dos ovos deste ensaio foi significativamente diferente com relação ao tempo de armazenagem($p < 0,0001$), embora a suspeita recaia, neste caso específico, a um erro de medição, uma vez que o pH não oscilaria como apresentado na tabela 16. A medida de pH com fita é bastante confiável, entretanto, por se tratar de determinação visual, é sujeita a erro do operador. É possível observar, neste e nos demais experimentos que a alteração do pH da gema, durante a armazenagem, é pequeno e não é significativo, de acordo com Sharp e Powel, apud Li-Chan, Powrie e Nakai(1994). Pode-se afirmar que o fato de lavar ou não os ovos não interfere na modificação do pH da gema.

Tabela 16: Valores médios de pH da gema de ovos de galinha de casca íntegra lavados ou não, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.

tempo	ovos não lavados		ovos lavados		Média*
	30°C/90%UR	8°C/70%UR	30°C/90%UR	8°C/70%UR	
0 horas	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58 ^b
24 horas	5,50	5,67	5,50	5,67	5,58 ^b
48 horas	5,58	6,00	6,00	6,00	6,00 ^a
72 horas	6,00	5,67	5,58	5,67	5,63 ^b
168 horas	6,00	5,75	6,00	5,75	5,88 ^b
336 horas	6,00	6,00	6,00	5,75	5,94 ^b
Média	5,78	5,78	5,78	5,74	

* valores médios seguidos de letras diferentes diferem significativamente ($\alpha = 0,05$).

4.2.3. EXPERIMENTO 3: Influência da integridade da casca de ovos de galinha, submetidos a contaminação via lavagem manual na sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* na superfície da casca e sua penetração no conteúdo interno, nas alterações de pH do albúmen e gema e na perda de peso

Os ovos de galinha foram selecionados de acordo com peso e qualidade da casca, na granja de poedeiras (inspeção visual) e no laboratório (pesagem e ovoscopia). Foram lavados manualmente, com água fria estéril inoculada com culturas de SE e *E. coli*. e esponja abrasiva (Scotch-Brite). O procedimento de contaminação foi definido após observação no estabelecimento produtor, que utiliza esta metodologia para ovos considerados muito sujos antes dos mesmos serem higienizados no lavador automático. Foi utilizado o lado abrasivo da esponja, tomando-se o cuidado de não imergir os ovos na água de lavagem. Esta prática desaconselhada, uma vez que associa os requisitos necessários para a penetração de microrganismos no interior de ovos, que são umidade e diferencial positivo de temperatura (Berrang *et al.*, 1999b). Além disto, Mayes e Takeballi (1983) afirmam que a contaminação aumenta quando a casca do ovo é tratada, por exemplo, por abrasão, uma vez que estudos em que foi realizada esfregação ou escovação da superfície de ovos com panos ou escovas umedecidas com culturas bacterianas resultaram em contaminação de seu conteúdo.

Após a secagem dos ovos contaminados, em fluxo laminar, cada um dos lotes (ovos sem defeitos de casca e ovos com defeito de casca) foi novamente separado em dois lotes e acondicionados nas duas condições de armazenagem, 30°C e 90 $\pm$ 5% de umidade relativa do ar (UR) e 8°C e 70 $\pm$ 5% UR e analisados ao longo de catorze dias.

A gravidade específica média dos ovos amostrais foi de 1090,36 g/L, sendo os limites superior e inferior 1091,0 g/L e 1089,6 g/L, respectivamente. De acordo com a classificação de Sauter e Petersen (1974), na média, os ovos deste experimento são classificados como de excelente qualidade.

a. Sobrevivência e penetração de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* em ovos de galinha

Na tabela 17 está apresentado o comportamento de SE na casca de ovos íntegros ou defeituosos, ao longo do tempo, nas diferentes condições de armazenagem.

Sob armazenagem de 30°C e 90,0 $\pm$ 5% UR, observa-se que SE se manteve presente até o final do experimento, entretanto, o número de unidades amostrais positivas (com a presença do microrganismo) diminuiu.

Quando armazenados a 8°C e 70,0±5% UR, observa-se também, a permanência do microrganismo na superfície dos ovos, como quando eles foram armazenados a 30°C. Entretanto, verifica-se a ocorrência de um maior número de amostras positivas, ao longo do tempo, na temperatura de 8°C. Radkowski (2002) observou que SE permanece viável na superfície de ovos armazenados sob diversas condições ambientais. Entretanto, quando ovos foram submetidos a temperatura de refrigeração (2°C), 49,17% das amostras apresentaram-se positivas no décimo quarto dia de armazenagem, enquanto que apenas 0,83% dos ovos armazenados a 30°C apresentaram o microrganismo nas cascas.

É possível observar que há diminuição significativa da contagem bacteriana, ao longo do tempo, nas duas condições de armazenagem ($p=0,02$). Oliveira (2000) observou que há um decréscimo de um ciclo logarítmico nas primeiras 24 horas após a contaminação da superfície da casca de ovos armazenados a temperatura ambiente. Nas condições deste experimento, observou-se que a diminuição pode ser variável (de três a menos que um ciclo).

Aydin *et al.* (2004) verificaram que microrganismos patogênicos, entre eles salmonelas, podem permanecer viáveis na superfície de ovos com casca íntegra

por até uma semana. Este ensaio demonstrou a capacidade da SE de permanecer por ainda mais tempo (pelo menos 14 dias) na superfície de ovos submetidos a altas temperaturas (30°C).

Trabalhos realizados com contaminação da superfície de ovos por imersão e/ou utilizando o fenômeno da pressão negativa (Mayes e Takeballi, 1983; Miyamoto *et al.*, 1998; Wang e Slavik, 1998), que se assemelham ao utilizado neste experimento, comprovam a permanência dos microrganismos nas cascas por períodos longos, em diversas condições de armazenagem.

Não houve diferença significativa no comportamento da SE na superfície dos ovos em relação a qualidade da casca ou as condições de armazenagem (α de 0,05).

Tabela 17: Contagem de *Salmonella* Enteritidis na superfície de ovos de galinha, íntegros e com defeitos de casca, que foram submetidos a contaminação via lavagem manual com água fria, e mantidos em diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90± 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70±5% UR).****

Tempo de ar- mazenagem	Ovos com casca íntegra				Ovos com casca defeituosa				Média***
	Abuso		refrigeração		abuso		refrigeração		
	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	
(h)									
0	5/5	1,28x10 ^{3ab}	5/5	1,28x10 ^{3ab}	5/5	6,91x10 ^{2ab}	5/5	6,91x10 ^{2ab}	9,87x10 ^{2a}
24	2*/5	<1,00x10 ^{1b}	5/5	2,67x10 ^{2ab}	3/5	4,51x10 ^{2ab}	5/5	6,56x10 ^{1b}	1,96x10 ^{2ab}
48	2/5	4,54x10 ^{1b}	5/5	1,00x10 ^{3ab}	2/5	4,80x10 ^{3ab}	5/5	2,46x10 ^{1b}	3,88x10 ^{2ab}
72	2/5	1,18x10 ^{1b}	5/5	1,48x10 ^{2ab}	5/5	8,71x10 ^{1b}	5/5	2,46x10 ^{1b}	6,52x10 ^{1b}
168	2/5	1,48x10 ^{1b}	5/5	1,10x10 ^{2b}	2/5	8,18x10 ^{1b}	5/5	2,78x10 ^{1b}	3,39x10 ^{1b}
336	4/5	2,44x10 ^{3a}	5/5	1,80x10 ^{1b}	5/5	2,78x10 ^{1b}	1*/5	<1,00x10 ^{1b}	6,22x10 ^{2ab}
Média**	17/30	6,31x10 ²	30/30	4,71x10 ²	22/30	2,91x10 ²	26/30	1,35x10 ²	

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por unidade de casca.

* crescimento observado após enriquecimento em água peptonada tamponada (35°C por 24h).

** média geral, por coluna.

*** média geral, por linha. Valores de contagem, na coluna, seguidos de letra diferente, diferem significativamente para $\alpha = 0,05$.

**** valores de contagem, no corpo da tabela, seguidos de letras diferentes, diferem significativamente para $\alpha = 0,1$.

A penetração de SE no conteúdo dos ovos experimentais está apresentada na tabela 18. Sob armazenagem a 30°C, é possível observar uma maior velocidade de penetração em ovos com defeitos de casca, já que o microrganismo foi encontrado no conteúdo (albúmen e gema) nas primeiras 24 horas após a contaminação, enquanto que, em ovos íntegros, apenas após 48 horas. A temperatura de 8°C inibiu a penetração da SE, tanto em ovos com casca defeituosa, como em ovos com casca íntegra.

A abrasão da superfície de ovos imediatamente antes da contaminação por imersão em suspensões bacterianas, de acordo com Board (1966), aumenta a incidência de ovos deteriorados, entretanto, pelos achados deste ensaio, a temperatura de armazenagem é fator fundamental para propiciar a penetração do microrganismo no albúmen e gema destes ovos. Schoeni *et al.* (1995) concluiu que a temperatura alta é fundamental para penetração de salmonelas em ovos, já que relata que 50% dos ovos contaminados em sua superfície e submetidos a 25°C por 3 dias tem seu conteúdo invadido por salmonelas, enquanto que a 4°C não foram encontradas unidades com a presença do microrganismo.

Sauter e Petersen (1974) e Tood (1996) afirmam que a penetração ocorre mais freqüentemente e mais rapidamente quando existem defeitos de casca, e mesmo pequenas rachaduras.

Embora seja possível verificar a presença de SE no conteúdo de ovos submetidos à temperatura de abuso, o número de unidades que teve seu conteúdo invadido pelo microrganismo não foi significativo pelo teste de Fischer (α de 0,05).

Tabela 18: Contagem de *Salmonella* Enteritidis em albúmen e gema de ovos de galinha com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via lavagem manual com água fria, e mantidos em diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).

Tempo de armazenagem (h)	Ovos com casca íntegra				Ovos com casca defeituosa					
	abuso		refrigeração		abuso		refrigeração			
	albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gema
	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	N/n ¹
0	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	-	n.r.	-	n.r.	n.r.
24	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	*	1/5	*	0/5	0/5
48	1*/5	1*/5	0/5	0/5	1/5	*	1/5	*	0/5	0/5
72	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	1,00x10 ¹	2/5	4,00x10 ¹	0/5	0/5
168	1*/5	1*/5	0/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	0/5
336	2*/5	1*/5	0/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	0/5
Total	4/25	3/25	0/5	0/5	4/25	-	4/25	-	0/5	0/5

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por mL/grama de amostra.

* crescimento observado após enriquecimento em água peptonada tamponada (35°C por 24h).

Na tabela 19 pode-se observar o comportamento de *E. coli* na superfície dos ovos de galinha. O comportamento do microrganismo em estudo é bastante semelhante ao observado com a SE.

Houve tendência de diminuição do número de unidades amostrais positivas, quando ovos foram armazenados a 30°C, e é possível observar a diminuição significativa da carga de contaminação destas unidades, ao longo do tempo ($p < 0,0001$). A 8°C, observa-se, também, a diminuição da carga de contaminação, entretanto, o número de amostras positivas permanece inalterado ao longo do tempo. Não houve diferença significativa na contagem bacteriana em relação a qualidade da casca dos ovos amostrais e ao tipo de tratamento de armazenagem.

Radwoski (2002), afirma que, ao submeter-se ovos cujas cascas foram contaminadas, a temperaturas altas (20 e 30°C), pode haver a inativação dos microrganismos presentes.

A tabela 20 apresenta as observações referentes a penetração da *E. coli* em ovos. Observa-se, como para SE, que *E. coli* é incapaz de invadir o conteúdo de ovos armazenados a 8°C. A 30°C, entretanto, pode-se observar que já nas primeiras 24 horas após a contaminação, foi encontrado o microrganismo no interior dos ovos. Para *E. coli*, observa-se uma maior ocorrência de ovos com conteúdo contaminado, quando estes apresentavam defeitos de casca. Apesar

desta tendência, não houve diferença significativa na contaminação dos ovos, analisados, considerando-se qualidade da casca e tipo de armazenagem (α de 0,05).

É possível observar, também, que em apenas uma das amostras foi identificado o microrganismo na gema. Esta ocorrência se deve, provavelmente, a baixa resistência da *E. coli* aos fatores antimicrobianos do albúmen, principalmente quando armazenado sob temperaturas altas. O mesmo comportamento foi observado no ensaio onde foi realizada contaminação artificial do albúmen. Além disto, Tranter e Board (1984), já relataram comportamento semelhante deste microrganismo em albúmen de ovos de galinha contaminados artificialmente.

Tabela 19: Contagem de *Escherichia coli* na superfície de ovos de galinha, íntegros e com defeitos de casca, que foram submetidos a contaminação via lavagem manual com água fria, e mantidos em diferentes condições de armazenagem (abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).****

Tempo de armazenagem (h)	Ovos com casca íntegra				Ovos com casca defeituosa				Média***
	Abuso		refrigeração		abuso		refrigeração		
	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	
0	5/5	1,34x10 ³	5/5	1,34x10 ³	5/5	3,31x10 ³	5/5	3,31x10 ³	2,32x10 ^{3a}
24	2/5	3,6x10 ¹	5/5	1,14x10 ²	4/5	1,27x10 ¹	5/5	3,70x10 ²	1,24x10 ^{2b}
48	2/5	3,8x10 ¹	5/5	1,09x10 ³	2/5	1,12x10 ²	5/5	2,29x10 ²	3,57x10 ^{2b}
72	0/5	n.d.	5/5	1,64x10 ²	1/5	1,40x10 ¹	5/5	1,58x10 ²	8,10x10 ^{1b}
168	1*/5	<1,00x10 ¹	5/5	1,98x10 ²	3*/5	<1,00x10 ¹	5/5	1,12x10 ¹	5,25x10 ^{1b}
336	1/5	1,60x10 ¹	5/5	1,25x10 ¹	1*/5	<1,00x10 ¹	5/5	4,54x10 ¹	4,7x10 ^{1b}
Média**	11/30	2,23x10 ²	30/30	4,85x10 ²	16/30	5,73x10 ²	30/30	6,81x10 ²	

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por unidade de casca.

* crescimento observado após enriquecimento em água peptonada tamponada (35°C por 24h).

** média geral, por coluna.

*** média geral, por linha. Valores de contagem, na coluna, seguidos de letra diferente, diferem significativamente para $\alpha = 0,05$.

**** valores de contagem, no corpo da tabela, seguidos de letras diferentes, diferem significativamente para $\alpha = 0,05$.

Tabela 20: Contagem de *Escherichia coli* em albúmen e gema de ovos de galinha com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via lavagem manual com água fria, e mantidos em diferentes condições de armazenagem(abuso: 30°C e 90+ 5% de UR e refrigeração: 8°C e 70+5% UR).

Tempo de armazenagem (h)	Ovos com casca íntegra				Ovos com casca defeituosa			
	abuso		refrigeração		abuso		refrigeração	
	albúmen N/n ¹	gema N/n ¹	albúmen N/n ¹	gema N/n ¹	albúmen N/n ¹	gema N/n ¹	albúmen N/n ¹	gema N/n ¹
0	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
24	1*/5	1*/5	0/5	0/5	1*/5	0/5	0/5	0/5
48	0/5	0/5	0/5	0/5	1*/5	0/5	0/5	0/5
72	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
168	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
336	0/5	0/5	0/5	0/5	1*/5	0/5	0/5	0/5
Total	1/25	1/25	0/25	0/25	3/25	0/25	0/25	0/25

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

* crescimento observado após enriquecimento em água peptonada tamponada (35°C por 24h).

b. Perda de peso de ovos de galinha

As informações referentes a perda de peso acumulada, ao longo do tempo, de ovos lavados manualmente e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade estão apresentadas na tabela 21.

A 30°C observa-se uma maior perda de peso acumulada ao longo do tempo, quando comparada com a ocorrida a 8°C ($p < 0,0001$). A perda de peso, maior sob temperaturas altas foi descrita por Sabrani e Payne (1978).

Não houve diferença na perda de peso quando se compara ovos com diferentes qualidades de casca armazenados nas mesmas condições de temperatura e umidade.

Tabela 21: Perda de peso acumulada de ovos de galinha com casca íntegra ou defeituosa, submetidos à contaminação via lavagem manual sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa (UR).

		Tempo de armazenagem					
Ovos	Condição de armazenagem	24 h	48 h	72 h	168 h	336 h	Média*
30°C e 90±5%UR							
	média(g)	0,40 ^{abc}	0,66 ^{abcd}	0,62 ^{abcd}	1,08 ^{de}	2,22 ^f	0,996 ^a
Casca	±desvio padrão	0,141	0,134	0,083	0,217	0,801	
íntegra	8°C e 70±5%UR						
	média(g)	0,22 ^a	0,42 ^{abc}	0,42 ^{abc}	0,62 ^{abcd}	0,84 ^{acde}	0,504 ^b
	±desvio padrão	0,130	0,045	0,217	0,084	0,195	
30°C e 90±5%UR							
	média(g)	0,58 ^{abcd}	0,46 ^{abc}	0,74 ^{abcd}	0,96 ^{cde}	1,38 ^e	0,824 ^a
Casca	±desvio padrão	0,130	0,089	0,219	0,089	0,349	
com	8°C e 70±5%UR						
defeitos	média(g)	0,24 ^a	0,32 ^{ab}	0,40 ^{abc}	0,70 ^{abcd}	0,90 ^{cde}	0,512 ^b
	±desvio padrão	0,114	0,228	0,158	0,187	0,245	
Média**		0,36 ^c	0,47 ^c	0,55 ^c	0,84 ^b	1,34 ^a	

médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

*médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

** médias seguidas de letras diferentes, nesta linha, diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

c. pH de albúmen e gema

As tabelas 22 e 23 apresentam a evolução do pH do albúmen e gema dos ovos amostrais.

Na tabela 22 pode-se observar que a velocidade do aumento do pH do albúmen de ovos armazenados a 30°C é maior do que quando os mesmos são armazenados a 8°C (α de 0,05). Houve diferença significativa na análise de variância ($p= 0,0008$), demonstrando interação entre as diferentes qualidades de casca de ovo e suas respectivas condições de armazenamento.

Não se observa, entretanto, diferenças significativas, ao longo do tempo, no pH de ovos com diferentes qualidades de casca, submetidos às mesmas condições de armazenagem. Portanto, a qualidade da casca não interfere no comportamento do pH do albúmen em ovos com casca submetidos a lavagem manual.

A difusão de CO₂ para o ambiente, fator determinante do aumento do pH do albúmen, está associada a temperatura de armazenagem (Tranter e Board, 1984)

Tabela 22: pH albúmen de ovos de galinha de casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via lavagem com água fria e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.

Tempo	Ovos íntegros		Ovos com casca defeituosa		Média***
	30°C/90%UR	8°C/70%UR	30°C/90%UR	8°C/70%UR	
0 horas	8,50 ^h	8,50 ^h	8,50 ^h	8,50 ^h	8,500 ^c
24 horas	8,92 ^{efg}	9,00 ^{defg}	9,17 ^{bcdef}	8,75 ^{gh}	8,958 ^b
48 horas	9,33 ^{abcd}	8,83 ^{fgh}	9,25 ^{bcde}	9,00 ^{defg}	9,083 ^b
72 horas	9,50 ^{ab}	9,00 ^{defg}	9,50 ^{ab}	9,08 ^{cdefg}	9,271 ^a
168 horas	9,50 ^{ab}	9,08 ^{cdefg}	9,42 ^{abc}	9,08 ^{cdefg}	9,271 ^a
336 horas	9,50 ^{ab}	9,17 ^{bcdef}	9,67 ^a	9,25 ^{bcde}	9,396 ^a
Média**	9,208 ^a	8,931 ^b	9,250 ^a	8,931 ^b	

* valores médios seguidos de letras diferentes diferem significativamente(α de 0,05).

** valores médios, na linha seguidos de letras diferentes diferem significativamente(α de 0,05).

*** valores médios, na coluna, seguidos de letras diferentes diferem significativamente(α de 0,05).

Segundo Tranter e Board (1984), a alteração de pH do albúmen está associada a difusão de CO₂ para o ambiente. A velocidade de difusão é proporcional a temperatura de armazenagem, portanto a elevação do pH é mais rápida quando ovos são armazenados a temperaturas altas.

O pH da gema dos ovos (descrito na tabela 23) subiu mais lentamente em ovos de casca íntegra armazenados a 8°C e 70±5%UR, alcançando valor significativamente menor ao final do ensaio ($p < 0,0001$).

Houve, também diferença significativa no pH da gema medido ao longo do tempo ($p < 0,0001$).

Tabela 23: pH de gema de ovos de galinha de casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via lavagem com água fria e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.

tempo	Ovos íntegros		Ovos com casca defeituosa		Média**
	30°C/90%UR	8°C/70%UR	30°C/90%UR	8°C/70%UR	
0 horas	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58 ^c
24 horas	6,17	5,67	6,00	6,00	5,96 ^{ab}
48 horas	5,75	5,67	5,92	6,00	5,83 ^b
72 horas	6,00	5,67	6,00	6,00	5,92 ^{ab}
168 horas	6,00	5,83	6,00	6,00	5,96 ^{ab}
336 horas	6,00	5,92	6,33	6,08	6,08 ^a
Média*	5,92 ^a	5,72 ^b	5,97 ^a	5,94 ^a	

* valores médios seguidos de letras diferentes, na linha, diferem significativamente (α de 0,05).

** valores médios seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente (α de 0,05).

4.2.4. EXPERIMENTO 4: Influência da oscilação de temperatura e umidade relativa durante a armazenagem de ovos de galinha de casca íntegra e defeituosa contaminados via fezes na sobrevivência de *Salmonella Enteritidis* e *Escherichia coli* na superfície da casca e sua penetração no conteúdo interno, nas alterações de pH do albúmen e gema e na perda de peso.

Os ovos de galinha utilizados neste experimento foram selecionados na granja e no laboratório por peso e a qualidade da casca foi determinada por ovoscopia. Foram contaminados via fezes e submetidos a conservação com oscilação de temperatura e umidade relativa do ar (UR), sendo mantidos de 0 até a 24^a hora de armazenagem a 8°C e 70,0±5,0% UR, da 24^a até a 72^a hora a 30°C e 90,0±5,0% UR e posteriormente a 8°C e 70,0±5,0% UR até o final do ensaio (336^a hora).

O regime de oscilação de temperatura simula o que ocorre na prática, quando ovos são submetidos a quebra de sua cadeia de conservação refrigerada ou quando são armazenados inadequadamente no nível doméstico (na porta da geladeira). Quando ovos refrigerados são submetidos a temperaturas elevadas ocorre o fenômeno de “sweating” ou seja a condensação de água na superfície dos mesmos. Os intervalos para mudança de temperatura foram definidos a partir das observações descritas em WHO (2002), onde se conclui que, de forma geral,

ovos são armazenados sob refrigeração logo após a coleta e processamento, sendo que a cadeia de frio é quebrada durante o transporte que dura em torno de 48 horas. Após, os ovos são novamente dispostos em refrigeração.

Para este ensaio, os ovos produzidos pelo lote doador das amostras apresentaram uma gravidade específica média de 1093,14 g/L, sendo considerados de excelente qualidade, conforme Sauter e Petersen (1974).

a. Sobrevivência e penetração de *Salmonella Enteritidis* e *Escherichia coli* em ovos de galinha

A tabela 24 apresenta o comportamento de SE na casca de ovos íntegros e defeituosos. Pode-se observar que SE permanece viável durante todo o período de estudo, em todas as unidades amostrais, estando sujeito, inclusive a multiplicação. Esta ocorrência deve-se ao fato da presença de matéria orgânica associado às condições que permitiram a manutenção da umidade superficial (devido à condensação de umidade superficial).

Não houve diferença significativa no comportamento deste microrganismo, na superfície de ovos com casca íntegra ou defeituosa (α de 0,05).

Na tabela 25 estão os resultados referentes à penetração de SE no conteúdo de ovos contaminados. É possível observar que, ovos com casca defeituosa apresentaram invasão do conteúdo interno, após 24 horas do regime de temperatura alta (48ª hora de armazenagem), enquanto que apenas uma unidade amostral com casca íntegra apresentou SE no albúmen, no mesmo tempo de armazenagem. Embora não haja diferença significativa (α de 0,05) pelo teste de Fischer, pode-se observar uma maior tendência a penetração bacteriana em ovos com casca defeituosa submetidos a condensação de umidade. Apenas em ovos com casca defeituosa foi possível proceder a contagem bacteriana, indicando que um maior número de células bacterianas penetraram no conteúdo dos ovos, quando comparado a ovos com casca íntegra, onde só foi identificada a presença de SE. Quanto maior a contaminação inicial, maior a possibilidade de que o microrganismo atinja quantidades suficientes e capazes de provocar dano a saúde do consumidor. Mesmo se apenas um ovo esteja contaminado com grande quantidade de células bacterianas, sendo ele misturado a outros ingredientes ou outros ovos para a preparação de um alimento, o risco da ocorrência da doença aumenta, já que a manifestação da mesma está relacionada a quantidade do agente a ser ingerido pelo hospedeiro.

Ernst *et al.*(1998) concluíram, em seu estudo simulando a condensação de umidade na superfície de ovos que a qualidade da casca aparentemente é mais importante no impedimento da penetração de SE no conteúdo que a própria

presença de umidade. Em seu ensaio foi utilizada a metodologia de imersão das amostras em caldo de cultura contendo o microrganismo, o que pode ter promovido uma maior contaminação de albúmen e gema.

A tendência de um maior número de amostras com defeitos ser invadida pelo microrganismo, neste experimento, indica que, mesmo quando há contaminação localizada na superfície dos ovos, caso eles sejam submetidos a condensação de umidade, pode haver um maior risco de penetração de SE no conteúdo.

Tabela 24: Contagem de *Salmonella* Enteritidis na superfície de ovos com casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em regime de oscilação de temperatura e umidade relativa.

Condição de armazenagem	Tempo de armazenagem (h)	Ovos com casca íntegra		Ovos com casca defeituosa		Média
		N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	Média geral
8°C e 70%UR	0	5/5	1,24x10 ³	5/5	1,24x10 ³	1,23x10 ³
30°C e 90%UR	24	5/5	6,66x10 ³	5/5	1,18x10 ³	3,92x10 ³
30°C e 90%UR	48	5/5	1,14x10 ⁴	5/5	4,19x10 ⁴	2,66x10 ⁴
8°C e 70%UR	72	5/5	1,09x10 ⁵	5/5	3,93x10 ⁴	3,01x10 ⁴
8°C e 70%UR	168	5/5	2,34x10 ⁴	5/5	3,68x10 ⁴	7,39x10 ⁴
8°C e 70%UR	336	5/5	1,56x10 ⁵	5/5	1,08x10 ⁵	1,21x10 ⁵
Média		30/30	5,13x10 ⁴	30/30	3,45x10 ⁴	

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por unidade de casca.

Tabela 25: Contagem de *Salmonella* Enteritidis em albúmen e gema de ovos de galinha com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via fezes e submetidos a regime de oscilação de temperatura e umidade relativa.

Condição de armazenagem	Tempo de armazenagem (h)	Ovos com casca íntegra		Ovos com casca defeituosa			
		albúmen	gema	albúmen		Gema	
		N/n ¹	N/n ¹	N/n ¹	média ²	N/n ¹	Média ²
8°C e 70%UR	0	n.r.	n.r.	n.r.	-	n.r.	-
30°C e 90%UR	24	0/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.
30°C e 90%UR	48	1*/5	0/5	2/5	4,02x10 ⁵	2/5	1,80x10 ³
8°C e 70%UR	72	0/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.
8°C e 70%UR	168	0/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.
8°C e 70%UR	336	0/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.
Total		1/25	0/25	2/25		2/25	

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por mL/grama de amostra.

* crescimento observado após enriquecimento em água peptonada tamponada (35°C por 24h).

Na tabela 26 está apresentado o comportamento da *E. coli* na superfície de ovos com casca íntegra e defeituosa. Não há diferença significativa no comportamento do microrganismo em ovos íntegros ou com defeitos (α de 0,05). A permanência da *E. coli*, viável, na superfície dos ovos, ao longo de todo ensaio deve-se a condição de armazenagem associada ao fenômeno de condensação de umidade na superfície dos ovos utilizados no experimento de simulação de oscilação de temperatura, conforme ocorreu com a SE.

Na tabela 27 é possível verificar que um maior número de ovos com casca íntegra teve seu conteúdo invadido (quando comparado a ovos com casca defeituosa), entretanto, esta diferença não foi significativa pelo teste de Fischer (α de 0,05). Esta ocorrência comprova o descrito por Tood (1996), que relata que, mesmo ovos com casca íntegra podem ter seu conteúdo contaminado por microrganismos, principalmente se forem atendidos alguns requisitos, como a presença de umidade e diferencial de temperatura. Em ovos com casca defeituosa, embora um número menor de unidades amostrais tenham sido contaminadas, observa-se que a carga bacteriana foi maior, já que foi possível proceder a contagem bacteriana, diferente do que ocorreu com ovos íntegros.

É possível verificar, também, que houve uma maior ocorrência de gemas contaminadas, quando se analisou ovos com casca defeituosa, embora também não tenha havido, neste caso, diferença significativa pelo teste de Fischer (α de

0,05). Esta tendência foi observada, também, no comportamento da SE nas condições do experimento.

Ernst *et al.* (1998), trabalhando com ovos de diferentes qualidades de casca, concluíram que a integridade da casca é mais importante para a prevenção da invasão do que propriamente a condensação, entretanto, é possível observar que, mesmo em ovos íntegros, esta condensação, associada a temperaturas de abuso podem propiciar a invasão de bactérias patogênicas para o conteúdo de ovos de galinha, podendo representar riscos a saúde pública.

O comportamento dos dois microrganismos estudados, na casca, deve ser considerado, também, como um importante fator de risco. Nos demais ensaios, onde não foi utilizada a variação de temperatura, houve uma tendência do microrganismo se manter ou se extinguir, dependendo da temperatura de armazenagem. Neste estudo, observou-se que existe uma tendência de os microrganismos se multiplicarem nas condições estudadas (em presença de matéria orgânica, ovos sujos) .

Tabela 26: Contagem de *Escherichia coli* na superfície de ovos com casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e armazenados em regime de oscilação de temperatura e umidade relativa.

Condição de armazenagem	Tempo de armazenagem (h)	Ovos com casca íntegra		Ovos com casca defeituosa		
		N/n ¹	Média ²	N/n ¹	Média ²	Média
8°C e 70%UR	0	5/5	8,23x10 ³	5/5	8,23x10 ³	8,23x10 ³
30°C e 90%UR	24	5/5	3,57x10 ³	5/5	8,22x10 ²	2,20x10 ³
30°C e 90%UR	48	5/5	1,71x10 ⁴	5/5	2,50x10 ⁴	1,60x10 ⁴
8°C e 70%UR	72	5/5	1,76x10 ⁴	5/5	2,02x10 ⁴	1,16x10 ⁴
8°C e 70%UR	168	5/5	1,16x10 ³	5/5	2,58x10 ⁴	8,20x10 ³
8°C e 70%UR	336	5/5	1,30x10 ⁴	5/5	3,54x10 ³	7,54x10 ³
Média		30/30	6,60x10 ³	30/30	1,13x10 ⁴	

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por unidade de casca.

Tabela 27: Contagem de *Escherichia coli* em albúmen e gema de ovos de galinha com casca íntegra ou com defeitos, contaminados via fezes e submetidos a regime de oscilação de temperatura e umidade relativa.

Condição de armazenagem	Tempo de Armazenagem (h)	Ovos com casca íntegra		Ovos com casca defeituosa			
		albúmen N/n ¹	gema N/n ¹	albúmen N/n ¹	gema média ²	gema N/n ¹	gema média ²
8°C e 70%UR	0	n.r.	n.r.	n.r.	-	n.r.	-
30°C e 90%UR	24	1*/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.
30°C e 90%UR	48	1*/5	0/5	2/5	8,15x10 ³	2/5	2,50x10 ²
8°C e 70%UR	72	1*/5	1/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.
8°C e 70%UR	168	1*/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.
8°C e 70%UR	336	0/5	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.
Total		4/25	1/25	2/25	-	2/25	-

¹ Unidades amostrais com crescimento/total de amostras analisadas.

² Unidades formadoras de colônia(UFC) por mL/grama de amostra.

* crescimento observado após enriquecimento em água peptonada tamponada (35°C por 24h).

b. Perda de peso de ovos de galinha com diferentes qualidades de casca

Na tabela 28 estão apresentadas as informações de perda de peso de ovos incubados em regime de oscilação de temperatura.

Ovos íntegros perderam menos peso, ao longo do tempo ($p = 0,009$) em comparação com ovos com defeitos de casca, sendo que na média, ovos com casca íntegra perderam $0,668 \pm 0,229\text{g}$ e ovos com casca defeituosa perderam $0,752\text{g}$. Não houve interação entre o tempo de incubação e as diferentes qualidades de casca de ovo (α de $0,05$). O tempo de armazenagem, provocou, também, uma diferença significativa ($p < 0,0001$), na perda de peso acumulada dos ovos amostrais.

Peebles *et al.* (1993), monitorando o peso de ovos de incubação, concluíram que, quando não foi realizado procedimento de abertura da casca, ovos tinham uma perda menor de peso ao longo do tempo. Embora estes autores não tenham comparado ovos com diferentes qualidades de casca, pode-se inferir que a abertura da casca e subsequente fechamento artificial podem ser considerados um defeito. Os ovos defeituosos podem possuir um maior número de poros e com isso permitir uma maior saída de umidade durante o período de incubação. Considerando a oscilação de temperatura, pode-se afirmar que, quando ovos são armazenados a 8°C , perdem menos peso do que quando armazenados a 30°C .

Tabela 28: Perda de peso acumulada de ovos de galinha com casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e mantidos sob oscilação de temperatura e umidade.

	Tempo de armazenamento					Média*
	24 horas ¹	48 horas ²	72 horas ²	168 horas ¹	336 horas ¹	
Ovos com casca íntegra média(g)	0,44	0,52	0,62	0,70	1,06	0,668 ^b
+desvio padrão	0,055	0,084	0,045	0,071	0,089	
Ovos com casca defeituosa média(g)	0,46	0,60	0,78	0,82	1,10	0,752 ^a
+desvio padrão	0,055	0,100	0,164	0,130	0,187	
Média**	0,45 ^c	0,56 ^c	0,70 ^b	0,76 ^b	1,08 ^a	

¹ armazenagem a 8°C e 70 ± 5% UR.

² armazenagem a 30°C e 90 ± 5% UR.

*médias, na coluna, seguidas de letra diferentes diferem significativamente ($\alpha = 0,05$).

**médias, na linha, seguidas de números diferentes diferem significativamente ($\alpha = 0,05$).

Sabrani e Payne (1978), estudando o efeito do uso de óleo mineral em ovos de mesa e a sua perda de peso quando armazenados em diferentes temperaturas, chegaram a conclusão que, ovos submetidos a temperaturas mais altas (28°C) perderem mais peso ao longo do tempo, sendo ou não tratados com óleo mineral, do que ovos armazenados a temperaturas mais baixas (12°C). Não existem relatos sobre a perda de peso de ovos com defeitos de casca, entretanto pode-se supor que, ovos com casca fina e/ou pequenas rachaduras de casca, permitem uma maior saída de umidade, e por isto perdem mais peso. Os estudos realizados comprovam os trabalhos dos autores e confirmam a hipótese de que, ovos com casca defeituosa perdem mais peso que ovos de casca íntegra.

c. pH do albúmen e gema

Na tabela 29 estão apresentados os valores de pH de albúmen e gema dos ovos com casca íntegra ou com defeitos submetidos a um regime de oscilação de temperatura e umidade do ar. Apenas o tempo de armazenagem provocou diferença significativa na alteração de pH de albúmen e gema nas condições do experimento ($p < 0,0001$). A qualidade da casca não afetou o comportamento do pH nestas condições.

Tabela 29: pH do albúmen e gema de ovos de galinha de casca íntegra ou defeituosa, submetidos a contaminação via fezes e armazenados sob regime de oscilação de temperatura e umidade relativa do ar.

Tempo de armazenagem	Ovos com casca íntegra		Ovos com casca defeituosa		Média*	
	albúmen	gema	albúmen	gema	albúmen	gema
0 horas ¹	8,50	5,58	8,50	5,58	8,50 ^c	5,58 ^c
24 horas ¹	8,92	6,00	9,00	6,00	8,96 ^c	6,00 ^{ab}
48 horas ²	8,92	5,83	9,00	5,83	8,958 ^c	5,83 ^b
72 horas ¹	9,42	6,00	9,50	6,00	9,46 ^{ab}	6,00 ^{ab}
168 horas ¹	9,50	6,08	9,50	5,92	9,50 ^a	6,00 ^{ab}
336 horas ¹	9,33	6,00	9,17	6,08	9,25 ^b	6,04 ^a
Média	9,10	5,92	9,11	5,90		

* valores médios seguidos de letras diferentes, na linha, diferem significativamente (α de 0,05).

¹ 8°C e 70% de umidade relativa do ar.

² 30°C e 90% de umidade relativa do ar.

A alteração de pH do albúmen deve-se a difusão de CO₂ para o ambiente (Brooks e Pace, 1938, *apud* Li-Chan, Powrie e Nakai, 1994. Esta foi independente da qualidade da casca.

Os valores de pH das gemas, neste ensaio, foi compatível com o descrito por Sharp e Powell, 1931 e Brooks e Taylor, 1955, *apud* Li-Chan, Powrie e Nakai, 1994.

4.3. Comportamento de *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Escherichia coli* e alterações de pH em albúmen e gema de ovos de galinha submetidos à armazenagem sob diferentes temperaturas

4.3.1. Comportamento bacteriano e pH em albúmen de ovos de galinha

Albúmen de ovos de galinha foi inoculado com SE e *E. coli* em conjunto e isoladamente com aproximadamente 10^2 UFC/g de cada uma das culturas bacterianas. Após a inoculação, as amostras foram homogeneizadas manualmente e armazenadas sob duas condições de temperatura (30 e 8°C). A cada tempo determinado (0, 2, 6, 12, 16, 24, 48, 72, 168 e 336 horas no caso de albúmen armazenado a 30°C e 0, 6, 12, 16, 24, 48, 72, 168 e 336 horas quando a armazenagem se deu a 8°C), de cada uma das amostras, foi retirada alíquota de 5mL e realizadas as medidas de pH, e os procedimentos para a contagem bacteriana.

O comportamento dos microrganismos em estudo, no albúmen contaminado e armazenado nas temperaturas de estudo (30 e 8°C), bem como as alterações de pH estão apresentados nas figuras 7 e 8. Na figura 7 estão apresentados os resultados referentes ao armazenamento do albúmen a temperatura de 30°C e na figura 8, a temperatura de 8°C.

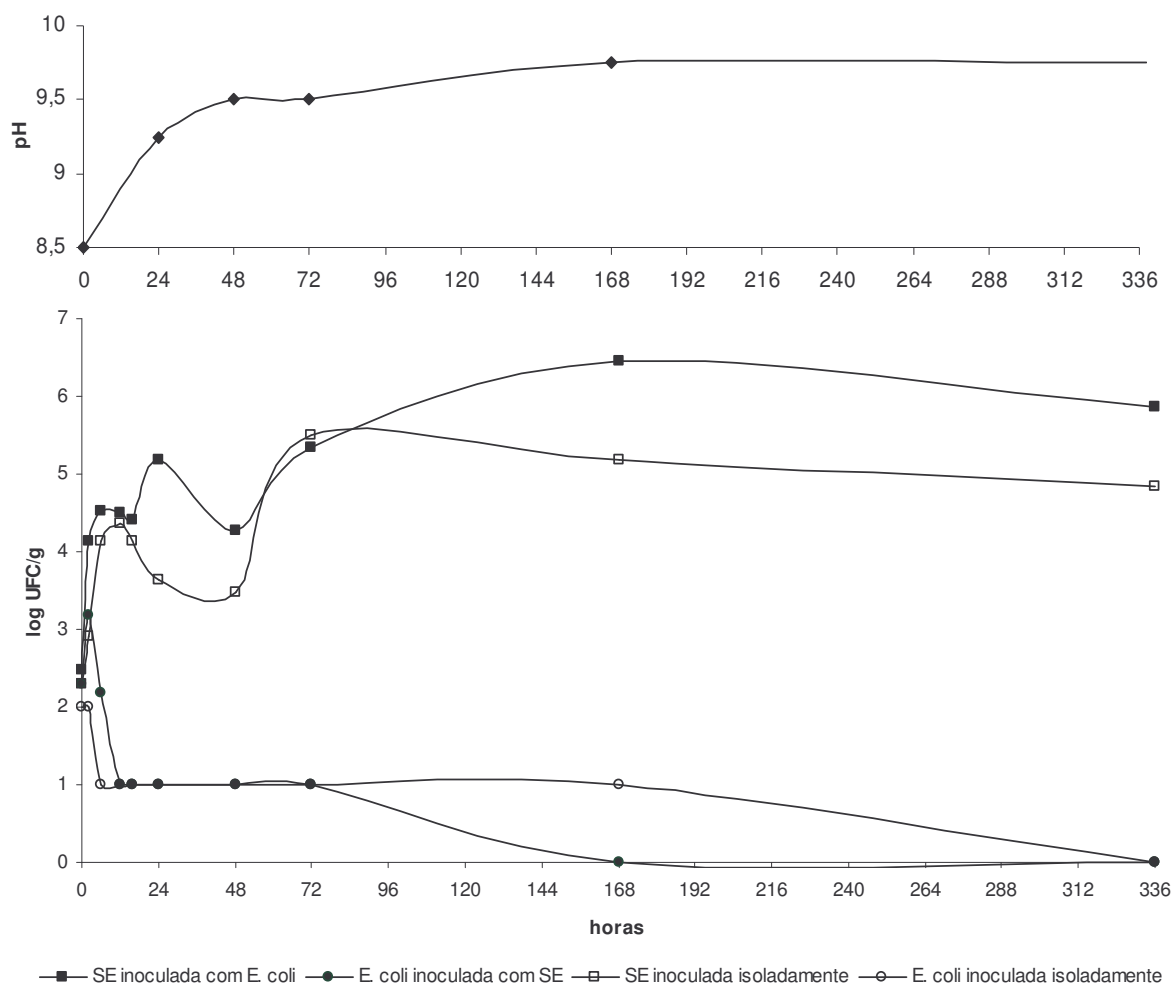


Figura 7: Influência da contaminação em conjunto no pH e no comportamento de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* em albúmen de ovos de galinha armazenado a temperatura de 30°C.

A 30 °C, SE atingiu 5,88 log UFC/g, ao final do ensaio, quando inoculada em conjunto com *E. coli* e 4,85 log UFC/g quando inoculado isoladamente. A diferença de até um ciclo logarítmico não foi significativa (α de 0,05), portanto não há diferença na multiplicação deste microrganismo, quando inoculado ou não em conjunto com *E. coli*. Além disto, o comportamento no crescimento desde a inoculação até a 336^a hora foi semelhante.

Embora o albúmen possua substâncias inibidoras da multiplicação bacteriana, mais especificamente para microrganismos gram positivos, alguns estudos revelam capacidade antimicrobiana do albúmen, mesmo para bactérias gram negativas (Yadav e Vadehra, 1977; Tranter e Board, 1982; Tranter e Board, 1984; Baron, Gautier e Brule, 1997a; Gast e Holt, 2001). Pode-se verificar, entretanto, que SE foi capaz de se desenvolver, a despeito das condições desfavoráveis impostas pelo meio.

Lock e Board (1992) estudaram diversos sorovares de *Salmonella* e mais especificamente, SE de diversos fagotipos e identificaram sua multiplicação em albúmen armazenado a 30°C por 42 dias. Além disto, Baron *et al.* (2004), estudando o comportamento de SE a 30°C, em albúmen, concluíram que já, nas primeiras oito horas de incubação há um aumento de um ciclo logarítmico em sua contagem. Embora o albúmen seja um meio de crescimento não favorável, estes mesmos pesquisadores concluíram que o albúmen não provoca qualquer modificação quanto a termorresistência, capacidade de formar biofilmes ou virulência em SE, mesmo que sob condições laboratoriais, diferentes bactérias possam ter sua resistência aumentada quando submetidas a condições desfavoráveis. A capacidade de multiplicação das salmonelas em albúmen, se deve, segundo Baron, Gautier e Brule (1997b), à capacidade do microrganismo de secretar sideróforos e com isto obter íons ferro necessários para seu metabolismo.

O comportamento da *E. coli* mostrou-se diferente. O microrganismo não foi capaz de vencer as barreiras do meio, diminuindo de 2,3 log UFC/g para 1 log, já nas primeiras 6 horas após a inoculação, até não serem isoladas células viáveis, ao final do período de análise. Também não houve diferença no comportamento deste microrganismo com relação às condições de inoculação. A *E. coli* mostrou pouca resistência ao ambiente (albúmen) quando armazenado a 30°C, demonstrando que, a despeito da temperatura alta, as características antimicrobianas do albúmen podem ser efetivas contra alguns microrganismos gram negativos, muito embora sua principal atividade seja contra os microrganismos gram positivos. Os achados deste estudo discordam dos publicados por Yadav e Vadehra (1977), quando, estudando o comportamento de cepa de *E. coli* K12, concluíram que este microrganismo é capaz de se multiplicar em albúmen de ovos de galinha submetido à incubação a temperatura de 30-32°C. Já Tranter e Board (1984) concluíram que *E. coli* é inviabilizada ou sua quantidade se mantém inalterada quando é inoculada em albúmen sem adição de ferro e incubado a 30°C. Segundo estes autores, em temperaturas de conforto para estes microrganismos, o albúmen possui maior capacidade bacteriostática/bactericida que temperaturas baixas.

O pH do albúmen armazenado a 30°C subiu rapidamente, de 8,5 para 9,5 nas primeiras 48 horas de armazenagem. Após este período praticamente não houve alteração, chegando ao final do período a 9,75. O valor de pH, em albúmen armazenado a 30°C foi idêntico nas três condições de inoculação, não havendo portanto, influência da presença e/ou multiplicação dos microrganismos inoculados sobre o acréscimo dos valores de pH. Sabrani e Payne (1978), utilizando a medida

de pH de albúmen como característica de qualidade de ovos íntegros e armazenados sob temperatura de 28°C, concluíram que, ao décimo segundo dia de armazenagem, os valores encontrados estavam entre 9,53 e 9,54. O comportamento do aumento do pH nos experimentos destes pesquisadores foi bastante semelhante ao encontrado neste ensaio, quando a velocidade do aumento foi maior nos primeiros dois dias de armazenagem.

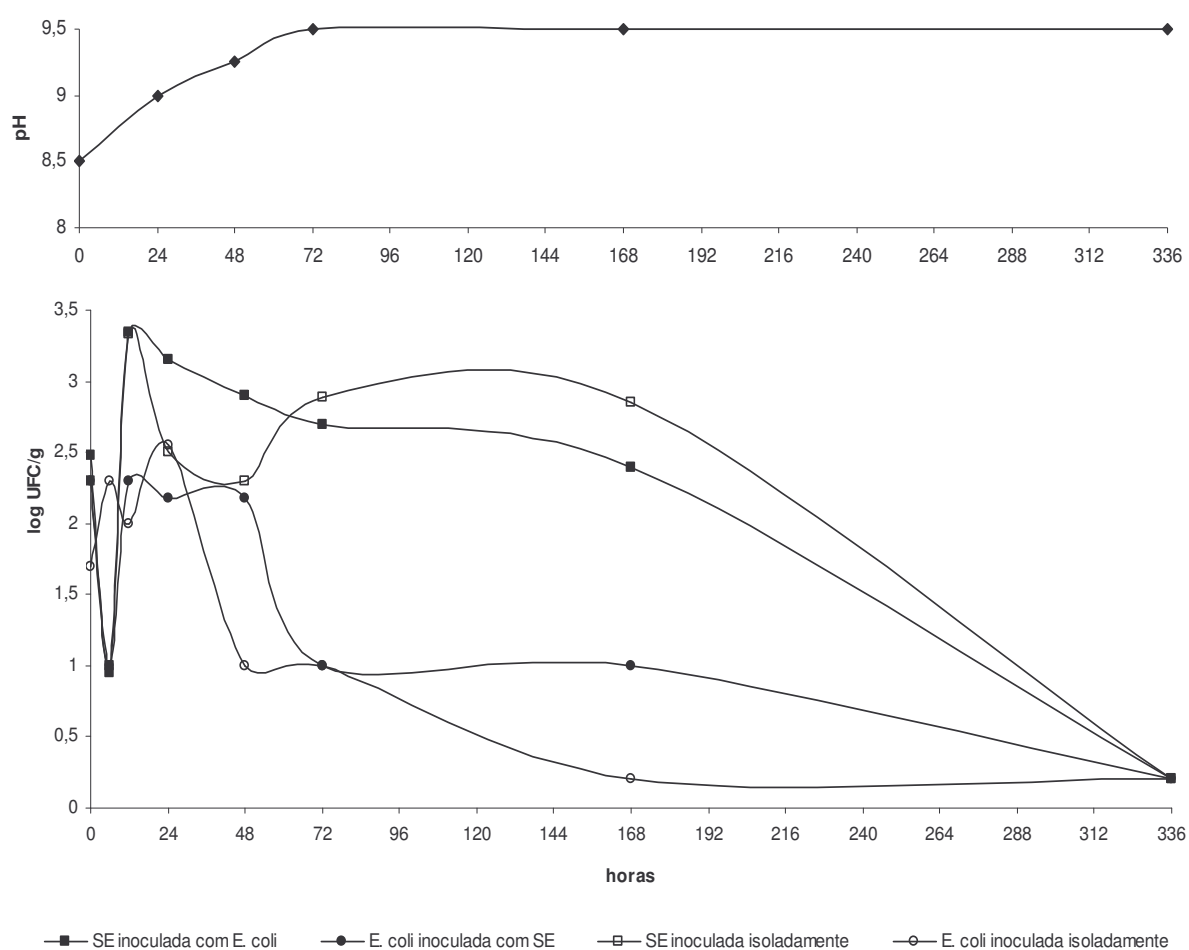


Figura 8: Influência da contaminação em conjunto no pH e no comportamento de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* em albúmen de ovos de galinha armazenado a temperatura de 8°C.

SE incubada a temperatura de 8°C mostrou tendência para a multiplicação nas primeiras 48 horas de armazenagem e posterior declínio. Apesar desta

tendência, o microrganismo permaneceu viável e em número suficiente para atingir contagens altas rapidamente, caso as condições de temperatura sejam favoráveis durante o período de análise. Não foi verificada diferença significativa no comportamento dos microrganismos, quando inoculados em conjunto ou isoladamente (α de 0,05). Quando comparados aos achados a 30 °C pode-se afirmar que, em temperaturas altas, o microrganismo possui condições de se multiplicar e atingir quantidades que podem levar à manifestação de doença no consumidor e mesmo contaminar outros alimentos. Gast e Holt (2000b), concluíram que existe pouca ou nenhuma variação no número de células de SE viáveis, quando albúmen é inoculado e submetido a diferentes temperaturas (10, 17,5 e 25 °C). Neste ensaio, entretanto, utilizando-se temperaturas mais extremas, pode-se observar que há, a 30 °C, um aumento de até 3 ciclos logarítmicos e, a 8 °C, um decréscimo de até 2,2 ciclos logarítmicos, comparando-se com a quantidade de células na inoculação. Pode-se verificar, também, que não há diferença no comportamento bacteriano, quando os microrganismos são incubados juntos ou isoladamente. As temperaturas de refrigeração impedem o aumento rápido do número de células bacterianas. Assim é possível garantir, de forma mais eficiente, a inocuidade do alimento. Para Gast e Holt (2001), a refrigeração pode evitar que o número de células viáveis de SE alcance níveis perigosos para a saúde pública. Entretanto, o sucesso do processo depende do tempo entre o início do resfriamento e a chegada à temperatura inibitória da multiplicação.

Angelote, Fotter e Lewis (1961), Matches e Liston (1968), Alford e Palumbo (1969), Palumbo (1986), D'Aoust (1991) relatam a multiplicação de salmonelas em

alimentos, mesmo em temperaturas de 2°C. Embora estes achados sejam conclusivos da possibilidade de multiplicação de diferentes sorotipos de *Salmonella* em alimentos, Gibson, Bratchell e Roberts (1988) encontraram dificuldades em ajustar as curvas de crescimento do microrganismo quando o mesmo é submetido a temperaturas baixas, já que a maioria dos modelos matemáticos preditivos se adequam melhor às temperaturas de multiplicação próximas das ótimas. Isto pode indicar o comportamento não típico de multiplicação quando esta bactéria é submetida a condições de refrigeração, dificultando prever seu comportamento em situações variadas de temperatura.

Com relação a *E. coli*, foi possível observar que, sob temperatura de refrigeração, o microrganismo manteve-se viável em maior quantidade no albúmen do que quando o mesmo foi armazenado a 30°C. Este comportamento pode ser atribuído, como para SE, a uma menor taxa metabólica dos microrganismos em temperaturas inferiores e, conseqüente, menor influência dos fatores antimicrobianos e maior tempo de sobrevivência das células bacterianas. A conservação em temperaturas mais baixas provoca um aumento mais lento do pH do albúmen e conseqüentemente menor dano às células bacterianas. Tranter e Board (1984) relataram que há uma maior toxicidade do albúmen para células bacterianas quando o mesmo é armazenado em temperaturas próximas da condição de conforto para os microrganismos.

Na temperatura de 8°C, o pH aumenta mais lentamente que a 30°C, mas após 72 horas de armazenagem já é de 9,5. Foi possível observar, entretanto, que este se

manteve constante até o final do período de análise. As temperaturas mais altas propiciam um maior e mais rápido aumento do pH no albúmen, o que confirma os achados de Sabrani e Payne (1978). Estes pesquisadores mediram o pH de albúmen de ovos íntegros armazenados sob temperatura próxima à utilizada (12°C) e encontraram valores semelhantes aos deste ensaio.

Não houve diferença nos valores de pH nas diferentes condições de inoculação, comprovando que os microrganismos inoculados não afetaram o albúmen no que se refere a sua alcalinidade.

4.3.2. Comportamento bacteriano e pH em gema de ovos de galinha

Gema de ovos de galinha foi inoculada com *SE* e *E. coli* em conjunto e isoladamente com aproximadamente 10^2 UFC/g de cada uma das culturas bacterianas. Após a inoculação, as amostras foram homogeneizadas manualmente e armazenadas sob duas condições de temperatura (30 e 8°C). A cada tempo determinado (0, 2, 6, 12, 16, 24, 48, 72, 168 e 336 horas no caso de gema armazenada a 30°C e 0, 6, 12, 16, 24, 48, 72, 168 e 336 horas quando a armazenagem deu a 8°C), de cada uma das amostras, foi retirada, alíquota e realizada a medida de pH e os procedimentos para a contagem bacteriana.

O comportamento dos microrganismos e as alterações no pH em gema de ovos de galinha contaminada e armazenada nas temperaturas de estudo (30 e 8°C)

estão apresentadas nas figuras 9 e 10. Na figura 9 estão apresentados os resultados referentes ao armazenamento da gema temperatura de 30°C e na figura 10, a temperatura de 8°C.

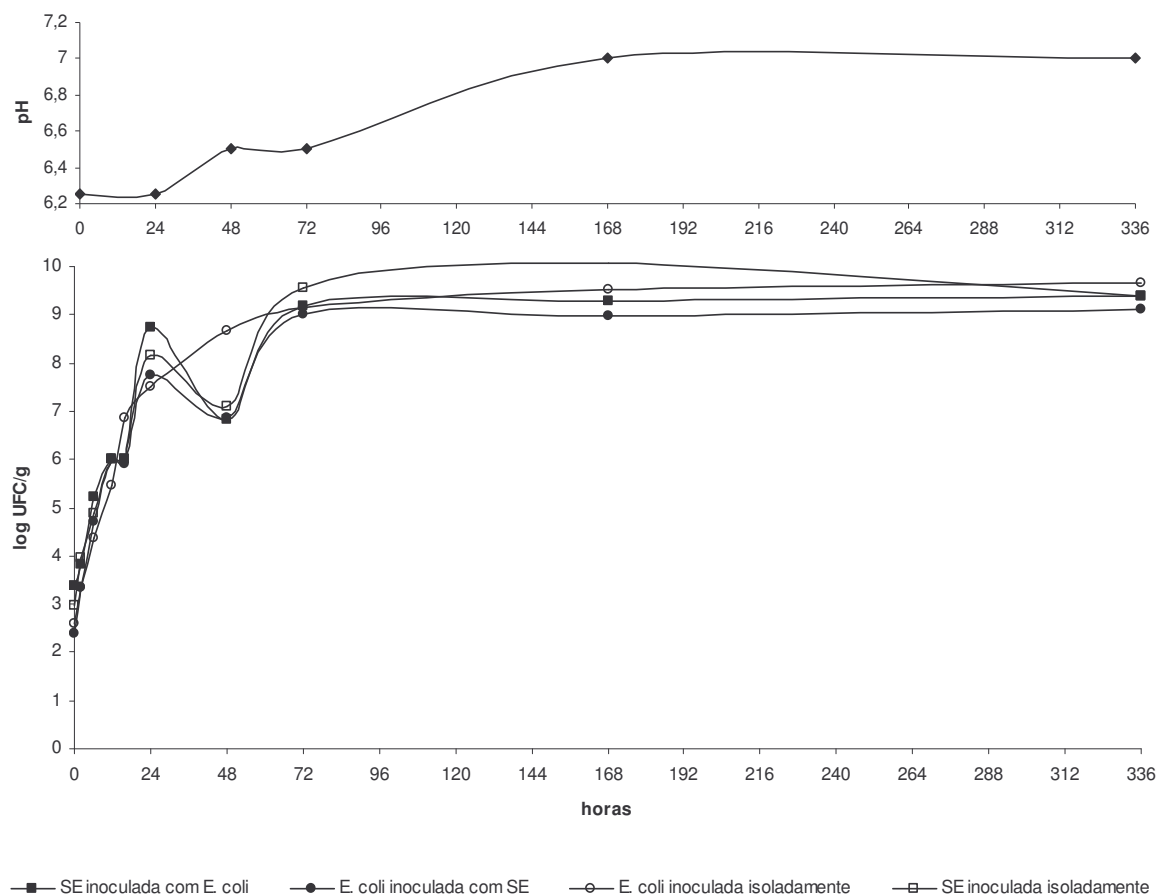


Figura 9: Influência da contaminação em conjunto no pH e no comportamento de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* em gema de ovos de galinha armazenada a 30°C.

A gema, ao contrário das outras estruturas que compõem o ovo, não possui qualquer fator capaz de impedir ou dificultar a multiplicação microbiana. É, por isto, ótimo substrato para a multiplicação bacteriana e ao contrário do albúmen, não possui qualquer impedimento da multiplicação bacteriana (Tranter e Board, 1982).

Sob a temperatura de 30°C, em ambas as situações de inoculação (microrganismos inoculados em conjunto e separadamente) os dois microrganismos em estudo apresentaram aumento de 6,45 a 7,07 log UFC/g no período de zero a 336 horas de armazenagem. Os microrganismos atingiram as contagens de 7,5 a 8,7 log UFC/g já nas primeiras 24 horas de armazenagem, sendo que a partir deste tempo a multiplicação passou a apresentar menor velocidade, tendendo a estabilização a partir das 48 horas, atingindo ao final das 336 horas de incubação, 9,1 a 9,7 log UFC/g de gema. Não houve diferença significativa no comportamento dos microrganismos, quando os mesmos foram inoculados em conjunto ou separadamente (α de 0,05).

É possível observar que, na quadragésima oitava hora de incubação, SE, nas duas condições de inoculação e *E. coli* inoculada com SE apresentaram uma diminuição na contagem bacteriana. Esta diminuição deve ser desconsiderada, já que muitos fatores podem estar envolvidos nesta ocorrência, inclusive falha na coleta de alíquota de amostra, já que o conteúdo de ovos, devido a sua viscosidade e densidade pode provocar dificuldades na homogeneização.

Não houve diferença significativa no comportamento de SE e de *E. coli*, seja incubadas isoladamente ou em conjunto, em nenhuma das duas condições de armazenagem.

Gast e Holt (2001), investigando diferentes cepas de *Salmonella* Enteritidis, dos fagotipos 4, 8, 13a, e 14b, incubadas em gema de ovos de galinha, a 25°C,

encontraram crescimento de até 8,65 logUFC/g, nas primeiras 24 horas de incubação, resultados estes, bastante semelhantes aos encontrados neste experimento. Os autores não encontraram diferença no comportamento dos fagotipos de SE durante sua multiplicação em gema.

A multiplicação na gema pode atingir níveis altos e perigosos sob ponto de vista de saúde pública. Caso apenas um ovo esteja contaminado e seja incluído em uma preparação, a carga bacteriana inicial poderá ser suficiente para alcançar níveis perigosos a saúde do consumidor, principalmente caso o tratamento térmico a que for submetido este alimento não seja suficiente para eliminar o microrganismo. Segundo Humphrey *et al.*(1989), salmonelas presentes em ovos a um nível de 10^8 UFC/g de gema podem sobreviver a qualquer método convencional de cozimento. Já, Mahdi Saeed e Koons (1993) encontraram células viáveis de SE em ovos prontos para o consumo (ovos fritos, mexidos, omeletes e cozidos) em até 44% das amostras produzidas com ovos cujas gemas foram inoculadas e os ovos íntegros armazenados por cinco dias a temperatura de 23°C, comprovando que, mesmo após o tratamento térmico, alimentos contendo ovos são potencialmente capazes de transmitir salmoneloses.

O pH da gema armazenada a 30°C foi idêntico nas três condições de inoculação, logo, a presença dos microrganismos não influenciou seu comportamento. Em gemas de ovos, há pouca alteração de pH, quando as mesmas são comparadas com albúmen, mas o mesmo sobe ao longo do tempo. Gemas de ovos frescos apresentam pH em torno de 6,0 e este sobe gradualmente até 6,4-6,9.

Em temperaturas de 37°C, o pH de gemas sobe de 6,0 para 6,4 em aproximadamente 18 dias (Sharp e Powell, 1931, apud Li-Chan, Powrie e Nakai, 1995). Os achados deste ensaio demonstraram que o pH pode atingir índices ainda mais altos.

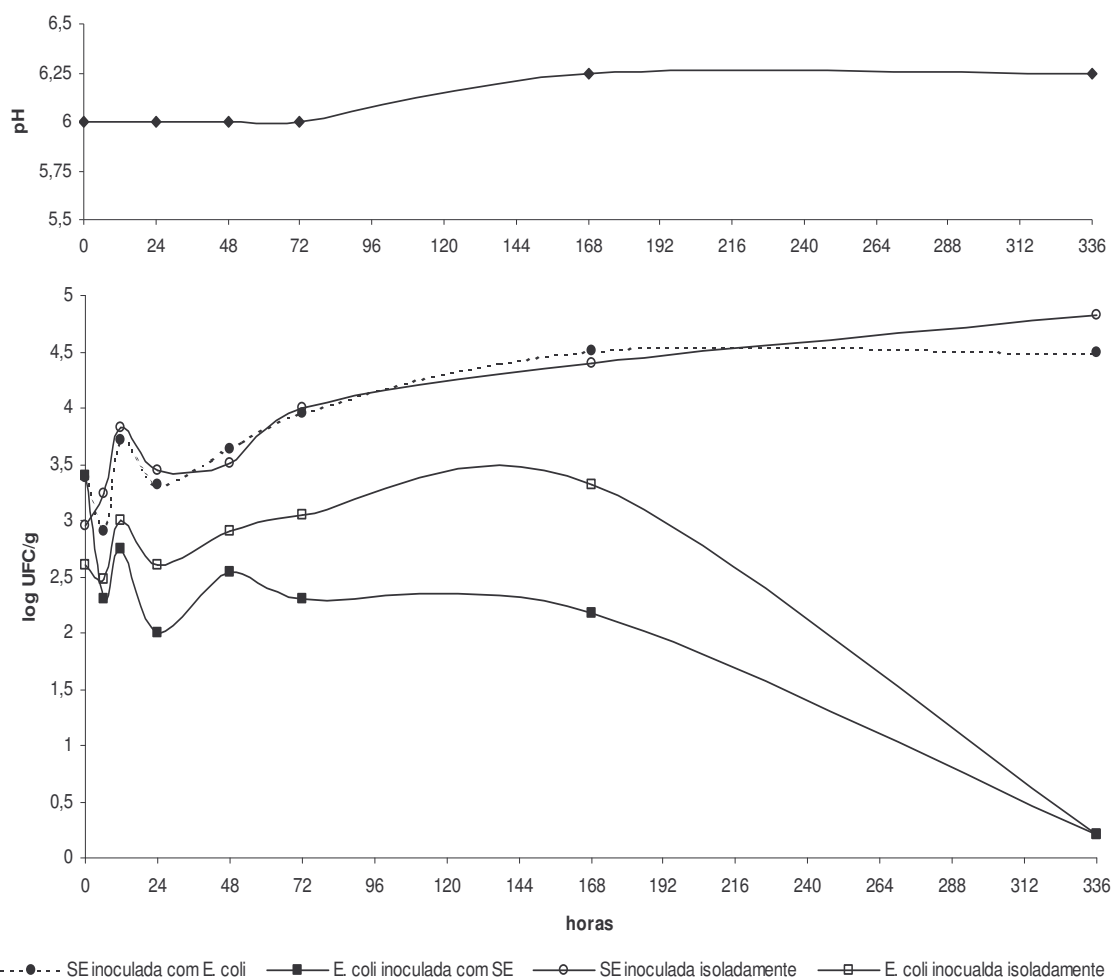


Figura 10: Influência da contaminação em conjunto no pH e no comportamento de *Salmonella Enteritidis* e *Escherichia coli* em gema de ovos de galinha armazenada a 8°C.

Na temperatura de 8°C, a salmonela mostrou-se ativa, enquanto que a *E. coli* teve sua multiplicação inibida. Nas 336 horas de observação, SE apresentou um aumento entre 1,12 e 1,87 log UFC/mL enquanto que *E. coli* apresentou declínio de 0,82 a 1,12 log UFC/mL. Os trabalhos de Schoeni *et al.*(1995) e Gast e Holt (2000b),

onde gemas de ovos foram contaminadas com 2 log UFC de SE e submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento demonstraram que, em 24 horas, a 25°C, as contagens de SE alcançam 9,5 log UFC/g já no terceiro dia de armazenagem, dados estes compatíveis com os encontrados nestes ensaios. Mesmo sob baixas temperaturas (10°C), a SE pode se multiplicar nos primeiros dias de armazenagem, tendendo a partir do sétimo dia a ter seu crescimento estabilizado. Bradshaw *et al.*(1990) observaram o comportamento de SE em gema de ovo armazenada a 7,2°C e não observaram multiplicação no período de 24 dias, apenas sua permanência no substrato. Em sendo a gema, substrato adequado para a multiplicação bacteriana, pequenas variações na temperatura de armazenagem podem provocar aumento na taxa de multiplicação. Não houve diferença no comportamento da SE, nas condições de inoculação (em conjunto ou isolada), para α de 0,05.

A *E. coli* apresentou baixa resistência quando submetida a temperatura de refrigeração (8°C), estando praticamente ausente após 336 horas de armazenagem (foi encontrada apenas sua presença, após enriquecimento em água peptonada tamponada). Não houve diferença no comportamento do microrganismo em presença ou não de SE (α de 0,05).

O pH da gema armazenada a 8°C teve um ligeiro aumento durante o período de análise, passando de 6,0 para 6,25 após a septuagésima segunda hora de armazenagem e se mantendo assim até o final do experimento. Observa-se que em temperaturas mais baixas, o pH da gema sobe mais lentamente e alcança valores

menores que quando é armazenado a temperaturas mais altas, confirmando os achados de Sharp e Powell (1931), apud. Li-Chan, Powrie e Nakai (1995).

CONCLUSÕES

- a temperatura de armazenagem de 30°C favorece a inviabilização de SE e *E. coli* na superfície da casca de ovos de galinha;
- a temperatura de 8°C permite a maior viabilidade de SE e *E. coli* na superfície da casca de ovos de galinha;
- a qualidade da casca não interfere na viabilidade dos microrganismos estudados na superfície da casca de ovos de galinha;
- a lavagem industrial prévia à contaminação não influencia o comportamento de SE e *E. coli* inoculados via fezes na superfície de ovos de galinha armazenados sob temperaturas de 8° e 30°C;
- a lavagem manual com água fria contaminada não influencia o comportamento de SE e *E. coli* na superfície de ovos de galinha armazenados sob temperaturas de 8° e 30°C;
- a oscilação de temperatura durante a armazenagem favorece a manutenção da viabilidade de SE e *E. coli* na superfície de ovos de galinha;
- existe a tendência de que ovos de galinha com casca defeituosa, submetidos a temperatura de 30°C terem seu conteúdo mais freqüentemente contaminado;
- a lavagem manual de ovos com água contaminada favorece a penetração de SE e *E. coli*, tanto com casca íntegra, quanto com defeitos, quando ovos são armazenados a 30°C;

- ovos submetidos a oscilação de temperatura podem ter seu conteúdo invadido por *SE* e *E. coli*, principalmente no período em que forem submetidos a temperaturas mais altas;
- ovos submetidos a temperaturas altas perdem mais peso que ovos armazenados em refrigeração, independentemente do tratamento recebido (lavagem manual ou industrial, nenhum tipo de tratamento);
- ovos com casca defeituosa, submetidos a temperatura de 30° ou de 8°C perdem mais peso que ovos com casca íntegra;
- ovos com casca íntegra perdem menos peso que ovos com casca defeituosa quando são submetidos a oscilação da temperatura de armazenagem;
- o pH do albúmen de ovos de galinha aumenta ao longo do tempo, independentemente da qualidade da casca e do tratamento recebido;
- ovos armazenados a 30°C tem o aumento do pH do albúmen mais rápido e atinge valores maiores que aqueles armazenados a 8°C;
- o pH da gema de ovos é afetado pelo tempo de armazenagem e não pela temperatura de armazenagem;
- em albúmen armazenado a 30°C, *SE* se multiplica, independentemente dos fatores antimicrobianos presentes, enquanto que a *E. coli*, nestas condições é inviabilizada;
- a 8°C, tanto *SE* como a *E. coli*, em albúmen, tendem a ser inviabilizadas, embora estejam presentes até a 336ª hora de armazenagem;
- em gema de ovo, a 30°C, tanto *SE* como *E. coli* se multiplicam até a 336ª hora de armazenagem;
- a temperatura de 8°C inviabiliza a multiplicação de *E. coli*, enquanto que *SE* se multiplica em gema de ovo;

- SE e *E. coli*, armazenadas a 8° ou a 30°C, tanto em albúmen ou gema, não exercem efeito sinérgico ou antagônico uma sobre a outra, nas condições do ensaio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A salmonelose humana continua sendo um grande problema de saúde pública, mesmo em países onde são feitos grandes investimentos no controle de enfermidades transmitidas por alimentos. Infecções por *Salmonella* Enteritidis continuam a ocorrer como pandemia e tem ovos e seus derivados como principal fonte de infecção

É necessário, para o controle das infecções humanas por SE, um amplo trabalho de prevenção e erradicação nos vários segmentos da produção avícola. Algumas cepas de SE parecem ter se adaptado bem às aves que, como portadoras assintomáticas, eliminam o microrganismo via fezes ou via ovariana e ainda podem contaminar a casca dos ovos produzidos.

Na produção de ovos de consumo devem ser tomados cuidados específicos, além do controle sanitário do plantel, tais como:

- manter o ambiente livre de salmonelas através do controle de roedores que podem contaminar a ração das aves, esteiras transportadoras, entre outros;
- controlar periodicamente o ambiente e roedores nas granjas, buscando a presença do microrganismo e realizar desinfecção quando for o caso;

- adequar os sistemas de lavagem de ovos, quando existentes para a remoção do microrganismo da superfície da casca, de forma eficaz e sem os riscos de facilitar a penetração dos mesmos devido a umidade e variação de temperatura entre água de lavagem e ovos;
- desenvolver sistemas alternativos de desinfecção e/ou lavagem da superfície das cascas.

Além destes cuidados, os estudos de penetração de salmonelas em ovos com casca devem ser feitos a luz das condições usuais de produção e armazenagem, quando poderão ser avaliados adequadamente os riscos de contaminação do conteúdo interno a partir das cascas.

Este trabalho não diminui a necessidade da realização de tantos outros sobre a possibilidade da invasão de microrganismos em ovos de mesa. Ao contrário, abre uma série de possibilidades de adaptações metodológicas que visem simular uma contaminação natural. O pesquisador deve ter em mente que, quando se busca a aproximação da realidade de produção, muitas são as variáveis a controlar. Por isso, os resultados de um trabalho como este não podem ser simplesmente extrapolados para a prática como uma verdade indiscutível. Cabe ao pesquisador identificar as limitações e, na medida do possível, contorná-las. Muitas podem ser enumeradas, como por exemplo a definição e conceituação de ovos com defeitos de casca, e a possibilidade do conteúdo interno extravasar quando da alteração das membranas internas. Neste caso, por exemplo, aumentaria a possibilidade de os microrganismos estarem por mais tempo viáveis na superfície da casca, devido a presença de

matéria orgânica capaz de sustentar a viabilidade bacteriana. Talvez uma das limitações mais importantes seja a definição das quantidades amostrais, que será sempre questionada. O pesquisador deverá assegurar-se que, dentro do modelo experimental proposto, a definição do número de amostras norteado a partir de um padrão já definido em outras publicações, para que seja possível a comparação entre os resultados.

Muitos outros modelos experimentais que se assemelhem a contaminação natural podem e devem ser propostos. Assim será possível identificar os reais riscos da penetração de salmonelas em ovos de consumo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABO, S.; CHRISTENSEN, J.P.; CHADFIELD, M.S.; CARSTENSEN, B.; OLSEN, J.E.; BISGARD, M. Quantitative comparison of intestinal invasion of zoonotic serotypes of *Salmonella enterica* in poultry. **Avian Pathology**, v.31, p.41-47, 2002.
- AFONSO, M.A. **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**. 1994. 104p. (Dissertação, Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1994.
- AHMAD, M.M., FRONING, G.W., MATHER, F.B., BASHFORD, L.L. Relationships of egg specific gravity and shell thickness to quasi-static compression tests. **Poultry Science**, v. 5, p.1282-1289, 1976.
- ALFORD, J.A., PALUMBO, S.A. Interaction of salt, pH and temperature on the growth and survival of salmonellae in ground pork. **Applied Microbiology**, v.17, P.528-532, 1969.
- ALLEONI, A.C.C. **Propriedades funcionais do albume e qualidade de ovos de galinha cobertos com concentrado proteico de soro de leite bovino**. 2003. 130p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- ANDRETTI FILHO, R.L., FERNANDES, S.A.; BORETTI, L.P.; BARROS, M.R.; DEL BEM, S.M.; FONTANA, A.; SAMPAIO, H.M.; SAVANO, E.N. Sorovares de Salmonella isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista de educação continuada. Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.4, p.90-101, 2001.
- ANGELOTTI, R., FOTER, M.J., LEWIS, K.H. Time-temperature effect on salmonellae and staphylococci in foods. I. Behavior in refrigerated foods. **American Journal of Public Health**, v.51, p. 76-83, 1961.
- ANON. Outbreaks of *Salmonella* serotype Enteritidis infection associated with consumption of raw shell eggs – United States, 1994-1995. **Journal American Medical Association**, v.276, p.1017-1019, 1996.

- ANON. Outbreaks of *Salmonella* serotype Enteritidis infection associated with eating shell eggs – United States, 1999-2001. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.51, p.1149-1152, 2003.
- AYDIN, N.; AKAN, M.; SAREYYÜPOGLU, B.; TEL, O. Y. Penetration of bacterial pathogens through the eggshell. In: World Poultry Congress, 24, 2004, Istanbul. **Anais**. Istanbul: WPSA, 2004. CD-ROM. Produzido por WPSA.
- BAKER, R.C.; BRUCE, C. Effects of processing on the microbiology of eggs. In: BOARD, R.G.; FULLER, R. (eds.). **Microbiology of the avian egg**. Chapman e Hall: London, cap. 8 p.153-173, 1994.
- BARON, F.; GAUTIER, M.; BRULE, G. Factors involved in the inhibition of growth of *Salmonella enteritidis* in liquid egg white. **Journal Food Protection**, v.60, p.1318-1323, 1997a.
- BARON, F.; GAUTIER, M.; BRULE, G. Growth inhibition of *Salmonella enteritidis* in liquid egg white. In: **Proceedings**. Salmonella and Salmonellosis. May20-22, 1997. Ploufragan, France. p. 347-350.b.
- BARON, F.; BRIANDET, R.; LESNE, J.; HUMBERT, F.; ABLAIN, W.; GAUTIER, M. Influence of a nonfavorable environment, egg white, on resistance to heat and disinfectant, adhesion, and virulence of *Salmonella* Enteritidis. **Journal Food Protection**, v.67, p.2269-2273, 2004.
- BARROS, M.R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; SAMPAIO, H.M.; CROCCI, A.J. Survival of *Salmonella enteritidis* in eggs artificially contaminated, after disinfection and stored at different temperatures. **Revista Brasileira Ciência Avícola**, Campinas, [online]. V.3, n.3, p.219-223, set-dez/2001. disponível na web: http://www.scielo.br/scielo.php?scriFT=sci_arttext&pid=S1515-635X2001000300003&lng=en&nmr=iso. Arquivo capturado em 9 de janeiro de 2003.
- BERNAOLA, O.A.; MURILLO, O.A.P.; MONTILLA, J.J. Estudio sobre un Nuevo metodo de conservacion de huevos de gallina a temperatura ambiente. **Archivos Latino Americanos de Nutrición**, v.29, p. 261-276, 1979.
- BERRANG, M.E.; COX, N.A.; FRANK, J.F.; BUHR, R.J. Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: a review. **Journal Applied Poultry Science**, v.8, p.499-504, 1999a.

- BERRANG, M.E.; FRANK, J.F.; BUHR, R.J.; BAILEY, J.S.; COX, N.A. Eggshell membrane structure and penetration by *Salmonella* Typhimurium. **Journal Food Protection**, v.62, p.73-76, 1999b.
- BEUCHAT, L.R.; WARD, T.E.; PETTIGREW, C.A. Comparison of chlorine and a prototype produce wash product for effectiveness in killing *Salmonella* and *Escherichia coli* 0157:H7 on alfalfa seeds. **Journal Food Protection**, v.64, p.152-158, 2001.
- BOARD, R.G. Review article: The course of microbial infection of the hen's egg. **Journal of Applied Bacteriology**, v.29, p.319-341, 1966.
- BOARD, R.G.; TRANTER, H.S. The microbiology of eggs. IN: STADELMAN, W.J.; COTTERGIL, O.J. (eds.). **Egg science and technology**. 4.ed. Haworth Press: New York, 1994, cap. 5, p.81-104.
- BRADSHAW, J.G.; SHAH, D.B.; FORNEY, E.; MADDEN, J.M. Growth of *Salmonella enteritidis* in yolk of shell eggs from normal and seropositive hens. **Journal Food Protection**, v.53, p.1033-1036, 1990.
- BRUCE, J.; DRYSDALE, E.M. Trans-shell transmission. In.: BOARD, R.G.; FULLER, R. **Microbiology of eggs**. Chapman e Hall: London, 1994, cap 4, p.63-91.
- CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I.; GAMA, N.M.S.Q. Pesquisa de *Salmonella* spp em ovos comerciais, analisados no laboratório de patologia avícola de Descalvado, SP. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, p. 76-79, 2002.
- CATALANO, C.R.; KNABEL, S.J. Incidence of *Salmonella* in Pennsylvania egg processing plants and destruction by high pH. **Journal Food Protection**, v.57, p.587-591, 1994.
- CHEN, J.; CLARKE, R.C.; GRIFFITHS, M.W. Use of luminescent strains of *Salmonella enteritidis* to monitor contamination and survival in eggs. **Journal Food Protection**, v.59, p.915-921, 1996.
- CIPERA, J.D. Effect of oviposition time and storage conditions on the specific gravity of eggs. **Poultry Science**, v.55, p.1132-1134, 1976.
- CLAY, C.E.; BOARD, R.G. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hens' shell eggs. **Epidemiology and Infection**, v.106, p.271-281. 1991.
- COGAN, T.A.; DOMINGUE, G.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; BENSON, C.E.; WOODWARD, M.J.; HUMPHREY, T.J. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. **Intern. Journal of Food Microbiology**, v.70, p.131-141, 2001.

- COX, N.A. BERRANG, M.E. CASON, J.A. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs – a review. **Poultry Science**, v. 79, p.1571-1574, 2000.
- D'AOUST, J.Y. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. **International Journal Food Microbiology**, v.13, p.207-216.1991.
- D'AOUST, J.Y., STOLTLAND, P., RANDALL, C.J. *Salmonella* in 'grade cracks' shell eggs. **Can. Inst. Food Sci. Technol. Journ**, v. 13, p.184-187, 1980.
- DAVIES, R.; BRESLIN, M. Environmental contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in laying flocks. **The Veterinary Records**, v.149, p.699-704, 2001.
- DAVIES, R.; LIEBANA, E.; BRESLIN, M. Investigation of the distribution and control of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT6 in layer breeding and egg production. **Avian Pathology**, v.32, p.327-337, 2003.
- DAVIES, R.H.; WRAY, C. Observations on disinfection regimens used on *Salmonella enteritidis* infected poultry units. **Poultry Science**, v.74, p.638-647, 1995.
- DE REU, K., GRIJSPEERDT, K., MESSENS, W., HEYNDRIKX, M., UYTENDAELE, M., HERMAN, L. Assessment of the eggshell penetration by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis, isolated from the egg content of consumption eggs. In: World Poultry Congress, 24, 2004, Istanbul. **Anais**. Istanbul: WPSA, 2004. CD-ROM. Produzido por WPSA.
- EBEL, E.; SCHLOESSER, W. Estimating the annual fraction of eggs contaminated with *Salmonella enteritidis* in the United States. **International Journal Food Microbiology**, v.61, p.51-62, 2000.
- EGG quality guide. [s.n.t.]. [on line] disponível na web: www.defra.gov.uk/foodin/poultry/pdfs/eggqual.pdf. Arquivo capturado em 24 de novembro de 2002.
- ESTADOS UNIDOS. United States Department of Agriculture. Egg-grading manual. **Agricultural Handbook n.75**. [s.n.t.]. [on line] disponível na web: www.ams.usda.gov/poultry/standards. Arquivo capturado em 24 de novembro de 2002.
- ERNST, R.A.; FUQUA, L.; RIEMANN, H.P.; HIMATHONGKHAN, S. Effect of sweating on shell penetration of *Salmonella enteritidis*. **Journal Applied Poultry Science**, v.7, p.81-84, 1998.

- FAJARDO, T.A.; ANANTHESWARAN,R.C.; PURI, V.M.; KNABEL, S.J. Penetration of *Salmonella enteritidis* into eggs subjected to rapid cooling. **Journal Food Protection**, v.58, p.473-477, 1995.
- FERRREIRA, A.J.P; ITO, N.M.K.; BENEZ, S.M. Infecção natural e experimental por *Salmonella enteritidis* em pintos. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1990, p. 171, Campinas, SP. **Anais**. Campinas: FACTA, 1990.
- FLEISS, J.L. **Statistical methods for rates and proportions**. Chichester: New York, 1981. 321p.
- GAMA, N.M.S.Q., BERCHIERI JR, A., FERNANDES, S.A. Occurrence of *Salmonella* sp. In laying hens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, p.15-21, 2003.
- GAST, R.; BEARD,C.W. Detection and enumeration of *Salmonella enteritidis* in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. **Journal Food Protection**, v.55, p 152-156, 1992.
- GAST, R.K.; HOLT, P.S. Experimental horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* strains (phage types 4, 8 e 13a) in chicks. **Avian Diseases**, v.43, p.774-778, 1999.
- GAST, R.K., HOLT, P.S. Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella enteritidis* strains in the egg yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens. **Avian Diseases**, v.44, p.706-710, 2000.
- GAST, R.K., HOLT, P.S. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella enteritidis* at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. **Poultry Science**, v. 79, 559-563, 2000.
- GAST, R.K., HOLT, P.S. Multiplication in egg yolk and survival in egg albumen of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains of phage types 4,8,13a and 14b. **Journal Food Protection**, v.64, p.865-868. 2001.
- GENTRY, R.F.; QUARLES, C.L. The measurement of bacterial contamination on egg shells. **Poultry Science**. v.51, p.930-933, 1972.
- GIBSON, A.M., BRATCHELL, N., ROBERTS, T.A. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. **International Journal Food Microbiology**, v.6, p.155-178, 1988.
- GRAVES, R.C., MACLAURY, D.W. The effect of temperature, vapor pressure, and absolute humidity on bacterial contamination of shell eggs. **Poultry Science**, v. 41, p.1219-1225, 1962.

- GREGORY, D.W. *Salmonella* infections of turkey eggs. **Poultry Science**, v.27, p.359-366, 1948.
- GRUNDER,A.A., THOMPSON,B.K., HOLLANDS,K.G., HAMILTON,R.M.G.
Shell strength changes by three hours after oviposition and influence of polyurethane foam covered cage floors. **Poultry Science**, v. 60, p.1140-1144, 1981.
- GUARD-PETER, J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. **Environmental Microbiology**, v.3, p.421-430, 2001.
- HAMILTON,R.M.G. Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality. **Poultry Science**, v. 61, p.2022-2039, 1982.
- HAMILTON, R.M.G., THOMPSON, B.K. The effects of storage duration on destructive deformation, quasi-static compression strength, impact fracture strength and specific gravity of eggs from white leghorn hens. **Poultry Science**, v. 60, p.517-522, 1981a.
- HAMILTON, R.M.G., THOMPSON, B.K. Effects of the sequence of measuring nondestructive deformation and specific gravity on the quasi-static compression and impact strength of eggs from white leghorn hens. **Poultry Science**, v.60, p.1798-1801, 1981b.
- HAMMACK, T.S., SHERROD, P.S., BRUCE, R.B., JUNE, G.A., SATCHELL, F.B., ANDREWS, W.H. Research Note – Growth of *Salmonella enteritidis* in grade A eggs during prolonged storage. **Poultry Science**, v.72, p. 373-377, 1993.
- HARA-KUDO, Y., SAKIBARA, Y., KONUMA, H., SAWADA, T., KUMAGAI, S. Laying season and egg shell cracks on the growth of *Salmonella* Enteritidis in the egg albumen during storage. **Journal Food Protection**, v.64, p.1134-1137, 2000.
- HENZLER, D.J.; KRADEL, D.C.; SISCHO, W.M. Management and environmental risk factors for *Salmonella enteritidis* contamination of eggs. **American Journal Veterinary Research**, v.59, p.824-829, 1998.
- HENZLER, D.J.; OPITZ, H.M. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* enteritidis infection on chicken layer farms. **Avian Diseases**, v.36, p.625-631, 1992.
- HOLLEY ,R.A.; PROULX, M. Use of egg washwater pH to prevent survival of *Salmonella* at moderate temperatures. **Poultry Science**, v.65, p.922-928, 1986.
- HUMPHREY, T.J.; GREENWOOD, M.; GILBERT, R.J.; CHAPMAN, P.A.; ROWE, B. The survival of salmonellas in shell eggs cooked under simulated domestic conditions. **Epidemiology and Infection**, v.103, p.34-45, 1989.

- HUMPHREY, T.J., WHITEHEAD, A.; GAWLER, A.H.L.; HENLEY, A.; ROWE, B. Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hens' eggs. **Epidemiology and Infection**, v.106, p.489-496, 1991.
- HUMPHREY, T.J. Contamination of eggshell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. **International Journal Food Microbiology**, v.21, p.31-40, 1994a.
- HUMPHREY, T.J. Contamination of eggs with potential human pathogens. In: BOARD, R.G.; FULLER, R. (ed.) **Microbiology of the avian egg**. Chapman e Hall: London. 1994. p. 93-116.b.
- HUNT, J.R., VOISEY, P.W., THOMPSON, B.K. Physical properties of eggshells: a comparison of the puncture and compression tests for estimating shell strength. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 57, p.329-338, 1977.
- HUTCHISON, M.L.; GITTINS, J.; WALKER, A.; MOORE, A.; BURTON, C.; SPARKS, N. Washing table eggs: a review of the scientific and engineering issues. **World's Poultry Science Journal**, v.59, p.233-248, 2003.
- IBRAHIM, H.R. Ovotransferrin. In: NAIDU, A.S.(ed.) **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC Press, 2000. cap. 7, p.211-225.
- JONES, F.T.; RIVES, D.V.; CAREY, J.B. *Salmonella* contamination in commercial eggs and an egg production facility. **Poultry Science**, v.74, p.753-757, 1995.
- KINNER, J.A.; MOATS, W.A. Effect of temperature, pH, and detergent on survival of bacteria associated with shell eggs. **Poultry Science**, v.60, p.761-767, 1981.
- LATIMER, H.K., JAYKUS, L.A.; MORALES, R.A.; COWEN, P.; CRAWFORD-BROWN, D. Sensitivity analysis of *Salmonella enteritidis* levels in contaminated shell eggs using a biphasic growth model. **International Journal Food Microbiology**, v. 75, p.71-87, 2000.
- LEACH JR., R.M. Biochemistry of the organic matrix of the eggshell. **Poultry Science**, v.61, p.2040-2047, 1982.
- LI-CHAN, E.C., POWRIE, W.D., NAKAI, S. The chemistry of eggs and egg products. In: STADELMAN, W.J.; COTTERGILL, O.J.(eds.). **Egg science and technology**. 4.ed. New York: Haworth Press, 1994. cap. 6, p.105-175.
- LIFSHITZ, A., BAKER, R.C., NAYLOR, H.B. The relative importance of chicken egg exterior structures in resisting bacterial penetration. **Journal Food Science**. v. 29, p.94-99, 1964.
- LOCK, J.L.; DOLMAN, J.; BOARD, R.G. Observation on the mode of bacterial infection of hens' eggs. **FEMS Microbiology Letters**, v. 100, p. 71-74, 1992.

- LOCK, J.L., BOARD, R.G. Persistence of contamination of hens' egg albumen *in vitro* with *Salmonella* serotypes. **Epidemiology and Infection**, v.108, p.389-396, 1992.
- LUCORE, L.A., JONES, F.T., ANDERSON, K.E., CURTIS, P.A. Internal and external bacterial counts from shells of eggs washed in a commercial-type processor at various wash-water temperatures. **Journal Food Protection**, v.60, p.1324-1328, 1997.
- MAHDI-SAEED, A.; KOONS, C.W. Growth and resistance of *Salmonella enteritidis* in refrigerated and abused eggs. **Journal Food Protection**, v.56, p.927-931, 1993.
- MATCHES, J.R., LISTON, J. Low temperature growth of *Salmonella*. **Journal Food Science**, v.33, p. 641-645, 1968.
- MAYES, F.J.; TAKEBALLI, M., A. Microbial contamination of the hen's egg: a review. **Journal Food Protection**, v.46, p.1092-1098, 1983.
- MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infect. Diseases**, v.5, p.607-625, 1999.
- MECKES, M.C.; JOHNSON, C.H.; RICE, E.W. Survival of *Salmonella* in waste egg wash water. **Journal Food Protection**, v.66, p.233-236, 2003.
- MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. **World's Poultry Science Journal**, v.61, p.71-85, 2005.
- MINE, Y., OBERLE, C., KASSAIFY, Z. Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p. 249-253, 2003.
- MIYAMOTO, T.; HORIE, T.; BABA, E.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. **Journal Food Protection**, v.61, p.350-353, 1998.
- MOATS, W.A. The effect of washing eggs under commercial conditions on bacterial loads on egg shells. **Poultry Science**, v.58, p.1228-1233, 1979.
- MOATS, W.A. Factors affecting bacterial loads on shells of commercially washed eggs. **Poultry Science**, v.60, p.2084-2090, 1981.
- MØLBAK, K.; NEIMANN, J. Risk factors for sporadic infection with *Salmonella* Enteritidis, Denmark, 1997-1999. **American Journal of Epidemiology**, v.156, p.654-661, 2002.
- MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 4. ed. J. Wiley: New York, 1997. 704p.
- MURASE, T.; SENJYU, K.; MAEDA, T.; TANAKA, M.; SAKAE, H.; MATSUMOTO, Y.; KANEDA, Y.; ITO, T.; OTSUKI, K. Monitoring of chicken houses and an attached egg-

- processing facility in a laying farm for *Salmonella* contamination between 1994 and 1998. **Journal Food Protection**, v.64, p.1912-1916, 2001.
- NASCIMENTO, V.P.; CRANSTOUN, S.; SOLOMON, S.E. Relationship between shell structure and movement of *Salmonella enteritidis* across the eggshell wall. **British Poultry Science**, v.33, p.37-48, 1992.
- NASCIMENTO, V.P.; SOLOMON, S.E. The transfer of bacteria (*Salmonella enteritidis*) across the eggshell wall of eggs classified as “poor” quality. **Animal Technology**, v.42, p.157-165, 1991.
- NORDSTROM, J.O., OUSTERHOUT, L.E. Estimation of shell weight and shell thickness from egg specific gravity and egg weight. **Poultry Science**, v. 61, p.1991-1995, 1982.
- NUNES, I.A.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MEAD, G.C.; SANTOS, M.A.A.; SOLARI, C.A.; SILVA, O.R.; FERREIRA, A.J.P. Phage typing of *Salmonella* Enteritidis from different sources in Brazil. **Journal Food Protection**, v.66, p.324-327. 2003.
- OLIVEIRA, D.D. **Salmonela em ovos: prevalência, influência das condições ambientais na penetração e multiplicação através da casca e efeito de sanificantes no controle da contaminação externa**. 1999. 82p. (Dissertação, Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2000.
- OLIVEIRA, D.D.; SILVA, E.N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arq. Bras. Med. Vet Zootec**, v.52, p. 655-661, 2000.
- PADRON, M. N. *Salmonella typhimurim* penetration through the eggshell of hatching eggs. – research note. **Avian Diseases**. v.34, p. 463-465, 1990.
- PAINTER, J.A.; MØLBAK, K.; SONNE-HANSEN, J.; BARRET, T.; WELLS, J.G.; TAUXE, R.V. *Salmonella*-based rodenticides and public health. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, 985-987, 2004.
- PALUMBO, S.A. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens?. **Journal Food Protection**, v.49, p. 1003-1009, 1986.
- PARSONS, A.H. Structure of eggshell. **Poultry Science**, v.61, p. 2013-2021, 1982.
- PEEBLES, E.D.; BRAKE, J. Eggshell quality and hatchability in broiler breeder eggs. **Poultry Science**, v.66, p.596-604, 1987.
- PEEBLES E.D., PUGH, C.R., BOYLE, C.R., LATOUR, M.A., PUGH, N.P., BRAKE, J.D. Ultrasonography as a tool for monitoring in ovo chicken development. 2. Effects of

eggshell alteration and ultrasonography on embryonic and posthatch development. **Poultry Science**, v.72, p.2247-2253, 1993.

PERALES, I., AUDICANA, A. The role of hen's eggs in outbreaks of salmonellosis in north Spain. **International Journal Food Microbiology**, v.8, p.175-180, 1989.

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; MARQUES, D.F.; RODRIGUES, E.C.A.; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v.32, p.477-483, 1998.

RABSCH, W.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A.J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v.3, p.237-247, 2001.

RADKOWSKI, M. Effect of moisture and temperature on survival of *Salmonella* Enteritidis on shell eggs. **Archiv für Geflügelkunde**, v.66, p. 119-123, 2002.

RODRIGUE, D.C., TAUXE, R.V., ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? **Epidemiology and Infection**, v.105, p.21-27, 1990.

RODRIGUES, K.R.M; SALAY, E. Atitudes de granjeiros, atacadistas, varejistas e consumidores em relação à qualidade sanitária do ovo de galinha *in natura*. **Revista Nutrição PUCCamp**, v.14, p.185-193, 2001.

ROSA, P.S., GUIDONI, A.L., LIMA, I.L., BERSCH, F.X.R. Influência da temperatura de incubação em ovos de matrizes de corte com diferentes idades e classificados por peso sobre os resultados de incubação. **Rev. Bras. Zootecnia**, v.31, p. 1011-1016, 2002. suplemento.

SABRANI, M.; PAYNE, C.G. Effect of oiling on internal quality of eggs stored at 28 and 12°C. **British Poultry Science**, v.19, p.567-571, 1978.

SAUTER, E.A.; PETERSEN, C.F. The effect of egg shell quality on penetration by various *Salmonellae*. **Poultry Science**, v.53, p.2159-2162, 1974.

SAUTER, E.A.; PETERSON, C.F.; PARKINSON, J.F.; STEELE, E.E. Effect of pH on egg shell penetration by salmonellae. **Poultry Science**, v. 56. p.1754-1755, 1979.

SCHOENI, J.L.; GLASS, K.A.; MCDERMOTT, J.L.; WONG, A.C.L. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. **Internac. Journal Food Microbiology**, v.24, p.385-396, 1995.

- SILVA, E.N., BOSQUIROLI, S.L. Epidemiological occurrence of *Salmonella* in a broiler integrated company. In: World Poultry Congress, 22, 1996, New Delhi. **Anais**. New Delhi.: WPSA, 1996. Produzido por WPSA.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2.ed. São Paulo:Varela. 317p. 2001.
- SIMONS, E.R., AYRES, J.C., KRAFT, A.A. Effect of moisture and temperature on ability of *Salmonella* to infect shell eggs. **Poultry Science**, v.49, p.761-768, 1970.
- SOLOMON, S.E. **Egg and eggshell quality**. London: Wolfe, 149p. 1991.
- SONCINI, R.A.; MORAES, M.A.S.; COSTA, J.L.A. Transmissão horizontal de *Salmonella* Enteritidis em pintos de um dia. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, p.94, 2000.
- SOONCHARENYING, S.; EDWARDS, H.M. Modelling the relationships of egg weight, specific gravity, shell calcium and shell thickness. **British Poultry Science**, v.30, p.623-631, 1989.
- STADELMAN, W.J. Egg-production practices. In: STADELMAN, W.J.; COTTERILL, P. (eds.). **Egg science and technology**. 4.ed. Haworth Press, New York, cap2, p.9-37, 1995.
- STEPANOVIĆ, S., ĆIRKOVIĆ, I.; RANIN, L.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, n.5, p.428-432, 2004.
- STOKES, J.L.; OSBORNE, W.W.; BAYNE, H.G. Penetration and growth of *Salmonella* in shell eggs. **Food Research**, v.21, p.510-518, 1956.
- SUMMERS, J. ed. **How much do eggs contribute to the *Salmonella* problem**. [on line] . disponível na web:<http://www.poultryindustrycouncil.ca/Factsheets/fact61.htm>. Arquivo capturado em 12 de janeiro de 2002.
- SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. **International Journal Food Microbiology**, v.21, p.89-105, 1994.
- TAUNAY, A.E., FERNANDES, S.A. TAVECHIO, A.T. The role of Public Health Laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto Tropical de São Paulo**, v.38, p.119-129, 1996.
- TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; PERESI, J.T.M.; FUZIHARA, T.O .; YONAMINE, E.K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal Food Protection**, v.65, p.1041-1044, 2002.

- THOMPSON, B.K.; HAMILTON, R.M.G. Comparison of the precision and accuracy of the flotation and Archimedes' methods for measuring the specific gravity of eggs. **Poultry Science**, v.61, 1599-1605, 1982.
- THOMPSON, B.K.; HAMILTON, R.M.G.; GRUNDER, A.A. The relationship between laboratory measures of shell quality and breakage in commercial egg washing and candling equipment. **Poultry Science**, v.64, p.901-909. 1985.
- TRANTER, H.S., BOARD, R.G. The antimicrobial defense of avian eggs: biological perspective and chemical basis. **Journal of Applied Biochemistry**, v.4, p.295-338, 1982.
- TRANTER, H.S., BOARD, R.G. The influence of incubation temperature and pH on the antimicrobial properties of hen egg albumen. **Journal of Applied Microbiology**, v.56, p.53-61, 1984.
- TOOD, E.C.D. Risk assessment of use of cracked eggs in Canada. **International Journal Food Microbiology**, v.30, p.125-143, 1996.
- VALANCONY, H.; FOURNIER, G.; DROUIN, P.; TOUX, J.Y.; COLIN, P. Disinfection of cage layer-houses contaminated with *Salmonella enteritidis*. **British Poultry Science**, v.42, p.539, supplement, 2001
- VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F.(ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.
- YADAV, N.K.; VADEHRA, D.V. Mechanism of egg white resistance to bacterial growth. **Journal Food Science**, v.42, p.97-99, 1977.
- WALDEN, C.C., ALLEN, I.V.F., TRUSSELL, P.C. The role of the egg shell and shell membranes in restraining the enter of microorganisms. **Poultry Science**, v.35, p.1190-1196, 1956.
- WALSH, T.J.; RIZK, R.E.; BRAKE, J. Effects of temperature and carbon dioxide on albumen characteristics, weight loss, and early embryonic mortality of long stored hatching eggs. **Poultry Science**, v.74, p.1402-1410, 1995.
- WANG, H.; SLAVIK, M.F. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. **Journal Food Protection**, v.61, p.276-279, 1998.
- WILKS, C.; PARKINSON, G.; YOUNG, P. International review of Salmonella Enteritidis(SE) epidemiology and control polices. **Rural Industries Research and**

Development Corporation. [on line]. disponível na web: [URL:http://www.rirdc.gov.au](http://www.rirdc.gov.au).

Arquivo capturado em 10 de janeiro de 2003.

WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens.** Rome:WHO, 2002. 302p. Microbiological Risk Assessment Series (2).