



FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRICOLA

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Salmonella*
EM GEMA NATURAL DE OVO E NA CLARA COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ÁGUA OXIGENADA.

TESE DE MESTRADO

César Abelino Ordorica Falomir
Engenheiro Bioquímico

Orientador:

Prof. Dr. Fumio Yokoya

- 1977 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Salmonella*
EM GEMA NATURAL DE OVO E NA CLARA COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ÁGUA OXIGENADA.

César Abelino Ordorica Falomir
Engenheiro Bioquímico

Orientador:

Prof. Dr. Fumio Yokoya

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e
Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção
do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Aos meus pais

Manuela e Abelardo.

Aos meus irmãos.

ÍNDICE

	página
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	iv
RESUMO	v
SUMMARY	vi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. Microbiologia dos Produtos de Ovo	4
2. Composição Química do Ovo	8
a). Composição da Clara	9
b). Composição da Gema	11
3. Pasteurização dos Produtos de Ovo	13
a). Pasteurização de Ovo Líquido Integral	14
b). Pasteurização da Gema Líquida	15
c). Pasteurização da Clara de Ovo	15
4. Fatores que Afetam a Resistência Térmica do Gênero <i>Salmonella</i> em Produtos de Ovo	18
5. Efeito da Água Oxigenada na Resistência Térmica de <i>Salmonella</i> e Usos na Pasteurização da Clara de Ovo	22
MATERIAL E MÉTODOS	25
1. Material	25
2. Métodos	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
1. Resistência Térmica de <i>Salmonella</i> na Gema de Ovo	30
2. Resistência Térmica de <i>Salmonella</i> na Clara de Ovo	30
3. Comparação dos Métodos Usados na Determinação da Resistência Térmica de <i>Salmonella</i>	35
4. Efeito da Concentração de Água Oxigenada na Resistência Térmica de <i>Salmonella</i> na Clara de Ovo	35
CONCLUSÕES	43
BIBLIOGRAFIA	44
AGRADECIMENTOS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA.1. Influência da Lavagem na Conservação do Ovo	6
FIGURA 2. Curva de Sobrevivência	19
FIGURA 3. Curva de Destruição Térmica	19
FIGURA 4. Número de Vezes na Redução do Valor D de <i>Salmonella</i> com a Adição de 0,05% de Água Oxigenada na Clara	32
FIGURA 5. Efeito da concentração de Água Oxigenada Sobre a Resistência Térmica de <i>Salmonella</i> (50°C).	40
FIGURA 6. Efeito da Concentração de Água Oxigenada Sobre a Resistência Térmica de <i>Salmonella</i> (53°C)	41
FIGURA 7. Curvas de Processamento Térmico da Clara com Diferentes Porcentagens de Água Oxigenada	42

ÍNDICE DE TABELAS

	página
TABELA 1. Composição da Clara, Gema e Ovo Integral	8
TABELA 2. Proteína na Clara de Ovo	9
TABELA 3. Distribuição de Aminoácidos na Proteína da Clara e Gema de Ovo	10
TABELA 4. Composição de Elementos Inorgânicos na Clara e Gema de Ovo	11
TABELA 5. Constantes Físico-químicas da Clara e da Gema	12
TABELA 6. Composição dos Ácidos Graxos da Gema	13
TABELA 7. Procedência das Linhagens de <i>Salmonella</i> Usadas neste Trabalho	29
TABELA 8. Parâmetros da Resistência Térmica, D e z, de Algumas Linhagens de <i>Salmonella</i> em Gema de Ovo	33
TABELA 9. Parâmetros da Resistência Térmica de Algumas Linhagens de <i>Salmonella</i> na Clara com pH 7,0 e na Clara Natural com 0,05% de Água Oxigenada	34
TABELA 10. Comparação dos Resultados dos Valores D e z Obtidos pelos dois Métodos Usados	35
TABELA 11. Efeito da Concentração de Água Oxigenada Sobre a Resistência Térmica de <i>Salmonella</i>	39

RESUMO

Os parâmetros da resistência térmica, D e z, de 21 linhagens de *Salmonella* foram determinados em gema de ovo, clara com pH ajustado a 7,0 e na clara natural com 0,05% de água oxigenada. Tais de terminações foram feitas pelo método do tubo TDT não selado e pelo método do frasco, usando temperaturas de 57, 53 e 50°C. Células de *Salmonella*, semeadas em TSB+2% YE e incubadas a 37°C durante 48 horas, foram inoculadas artificialmente nos produtos de ovo para dar uma contagem inicial de aproximadamente 10^7 células por grama de produto.

Foi estudado, também, o efeito da concentração de água oxigenada, adicionada na clara de ovo, sobre a resistência térmica de *Salmonella*. Este experimento foi conduzido com 4 espécies de *Salmonella* (*S. anatum*, *S. derby*, *S. enteritidis* e *S. typhimurium* Tm-1) e a concentrações de água oxigenada de 0,01, 0,03, 0,05, 0,07, e 0,1%.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a clara de ovo pode ser pasteurizada a baixas temperaturas, de modo que não afetem as suas propriedades funcionais, quando a H_2O_2 é usada como auxiliar desse processo. Condições de tempo-temperatura de pasteurização da clara de ovo são apresentadas, as quais foram calculadas - de modo a proporcionar um tratamento letal suficiente para produzir 99,99% de destruição de *Salmonella* presente.

SUMMARY

The heat resistance parameters of 21 strains of *Salmonella* were measured in egg yolk, egg white pH adjusted to 7.0 and in natural egg white with 0.05% of hydrogen peroxide. These measurements were carried out by unsealed TDT tube method and flask method, using temperatures of 57, 53 and 50°C. *Salmonella* cells, which were grown in TSB-YE medium and incubated at 37°C during 48 hours, were inoculated artificially in egg products giving an initial count of approximately 10^7 cells per gram of the product.

The effect of hydrogen peroxide concentration added egg white on heat resistance of *Salmonella* species (*S. anatum*, *S. derby*, *S. enteritidis* and *S. typhimurium* Tm-1) were determined by adding hydrogen peroxide at the concentrations of 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 and 0.1%.

The results obtained indicated that egg white may be pasteurized at low temperatures to minimize the effect on functional properties, when hydrogen peroxide was added as an auxiliary in this process. Temperature-time relationship of egg white pasteurization were determined and they were calculated to provide a sufficiently lethal effect to cause a 99.99% destruction of the *Salmonella* in the product.

INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* é um dos organismos mais distribuídos na natureza, afetando praticamente todos os animais, causando uma doença do tipo gastrointestinal. Tem-se observado que todas as linhagens de *Salmonella* apresentam certo grau de patogenicidade para o homem e animais (49). Esta patogenicidade tem sido estudada por inúmeros pesquisadores (1, 2), determinando que é necessário a eliminação desta bactéria de todos os produtos de ovo já que podem se encontrar nesses alimentos. A legislação sobre alimentação exige que os produtos de ovo, sejam líquidos, congelados ou desidratados apresentem *Salmonella* negativa, além do limite de tolerância quanto a quantidade total de microrganismos presentes (16).

A destruição térmica de microrganismos do gênero *Salmonella* é o principal objetivo da pasteurização dos produtos de ovo. Alguns processos de pasteurização, tais como ajustar o pH do produto de ovo a ser tratado, tratamento separado da clara e gema, uso de água oxigenada, adição de sal (NaCl) ou açúcar (sacarose), uso de radiações ultravioleta, tratamento com epóxidos (óxido de etileno e óxido de propileno), combinação de calor e vácuo e diferentes combinações de tempo-temperatura, tem sido propostos para obter a destruição de *Salmonella* e de afetar o menos possível as propriedades funcionais do ovo (9,54).

A pasteurização dos produtos de ovo é grandemente dificultada pelo elevado teor de proteínas na clara (albuminas e globulinas) altamente sensíveis as temperaturas elevadas. As proteínas da gema coagulam a temperaturas de 70°C, enquanto que as proteínas da clara são afetadas a temperaturas inferiores aos 60°C (16). Portanto, a clara de ovo não pode ser aquecida a uma temperatura suficientemente alta para garantir um produto razoavelmente seguro do ponto de vista bacteriológico sem evitar a coagulação das proteínas. O objetivo dos aditivos de tratamentos anteriormente mencionados, é debilitar as bactérias até o ponto que permitam a

sua destruição a temperaturas baixas ou de elevar a estabilidade das proteínas da clara (albuminas) para poder aumentar a temperatura de pasteurização.

Ayres e Slosberg (4) demonstraram o efeito da água oxigenada sobre a destruição de *Salmonella* em clara de ovo, e concluíram que a água oxigenada pode ser usada na pasteurização desse produto a temperaturas inferiores aos 54°C, não afetando nada sobre as propriedades funcionais da clara. Entretanto, as informações quanto a concentração adequada da água oxigenada a ser adicionada e o efeito dessa substância sobre as diferentes espécies e linhagens de *Salmonella* são escassas na literatura.

No cálculo do processo de pasteurização ou esterilização de alimentos por calor, deve-se considerar a resistência térmica microbiana, a fim de assegurar a destruição das diferentes espécies de microrganismos responsáveis pela deterioração de alimentos ou causadores de perigo à saúde pública. Neste ponto, é importante considerar, além das diferenças hereditárias ditadas pelas características das diferentes espécies ou linhagens, os fatores extrínsecos como meio de cultivo, meio de suspensão, idade das células e meio de sub-cultura, que influem na resistência térmica aparente. Assim, para ter certeza da condição adequada de pasteurização ou esterilização, é necessário analisar o comportamento dos microrganismos no alimento em questão e nas condições específicas de processamento.

O presente trabalho visa comparar os parâmetros de resistência térmica, D e z, de diversas linhagens de *Salmonella* tratadas na clara e gema de ovo obtidos pelos processos de pasteurização comercial e pela adição de água oxigenada na clara. Além disso pretende determinar a concentração adequada de H_2O_2 para obter o máximo de efeito auxiliar na destruição de *Salmonella* pelo calor sem afetar as propriedades funcionais do produto de ovo.

A fim de obter resultados prontamente aplicáveis no país, todas as linhagens de *Salmonella* testadas, exceto *S. typhimurium*

Tm-1, *S. typhimurium* 9148 e *S. oranienburg*, foram isoladas de diferentes alimentos no Brasil e que haviam sido constatados nos produtos de ovo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Microbiologia dos Produtos de Ovo.

O interior do ovo, logo após a postura, está geralmente livre de microrganismos. Este fato se deve a que ele está protegido por sua estrutura física (casca) e pela constituição química da clara. A clara contém alguns agentes anti-microbianos tais como a lisozima, conalbumina, ovomucóide, avidina e outros agentes anti-tripsina (17,39,46). A lisozima é uma enzima que produz lise da parede celular das bactérias Gram-positivas, conalbumina forma complexos com íons ferro, zinco, e cobre, ovomucóide é um inibidor da tripsina e a avidina se combina com biotina. Mesmo assim, ocasionalmente sucede uma contaminação no ovo antes e pouco tempo depois da postura. Existem somente duas possíveis maneiras de explicar a presença de microrganismos no interior do ovo. Organismos que são incorporados durante a formação, quer seja no ovário ou no oviducto, e microrganismos que penetram através da casca depois que o ovo é posto. Embora o primeiro tipo de contaminação se apresente em raras ocasiões, alguns trabalhos a respeito tem sido publicados. Sabe-se que *Salmonella pullorum* é o agente causador de uma doença de aves (diarréia), infectando o trato digestivo. O microrganismo é levado ao ovário pela corrente sanguínea e posteriormente esta bactéria entra na gema durante sua formação. Alguns outros organismos são encontrados, tanto no ovário da galinha como no ovo já formado. Estes são *Salmonella anatum*, *S. typhimurium*, e *S. enteritidis*. Este tipo de contaminação é mais frequente na gema do que na clara (1,39). Alder (1), numa revisão da literatura, relatou que em 1117 ovos de 29 galinhas, postos durante um período de 13 semanas, apresentavam 3% desses ovos contendo *S. typhimurium*. Este microrganismo foi encontrado no ovário de 4 dessas aves. Também relata que *S. pullorum* e *S. gallinarum* são as bactérias que comumente entram no ovo através do ovário.

Ainda que a maioria dos ovos, após postura, seja estéril internamente, a casca adquire sua primeira contaminação microbiana

proveniente da matéria fecal da galinha, do material do ninho e do manuseio. Nesse estágio, logo após postura, a casca se encontra úmida e a invasão microbiana ocorre com relativa rapidez.. O número de microrganismos viáveis sobre a casca é muito variável, indo de poucas centenas a dez milhões por unidade, tendo como média 10^5 microrganismos. A flora microbiana é notavelmente heterogênea. A microflora contaminante da casca é normalmente dominada pelas bactérias Gram-positivas, especialmente micrococos. Os gêneros que comumente se encontram na casca são: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Salmonella*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Cytophaga*, *Aeromonas*, *Serratia* e *Proteus* (17,24,46,54). Dentro desses gêneros, o que mais preocupa ao homem é *Salmonella*, pois apresenta espécies patogênicas que podem causar toxinfecções provocando gastro-enterite aguda (1,2,29,33,49,54). Nos ovos, logo após a postura, é possível encontrar espécies de *Salmonella*. Tal número pode aumentar durante o tratamento que recebem os ovos e alcançar cifras bastante elevadas (17).

A penetração pela casca é a forma mais comum pela qual os microrganismos entram no ovo. Potencialmente, os poros da casca encontram-se abertos permitindo a invasão de microrganismos no interior. Os fatores mais importantes a serem considerados na penetração de microrganismos são: (a) o grau de contaminação fecal na superfície da casca; (b) temperatura; (c) método e umidade de estocagem; (d) manipulação dos ovos; e (e) a qualidade da casca. Algumas linhagens de *Salmonella* penetram pela casca e posteriormente são encontradas multiplicando-se na clara apesar da presença dos compostos anti-microbianos aí presentes (1). Suater e Petersen (40) estudaram o efeito da qualidade da casca sobre a penetração de várias linhagens de *Salmonella*, demonstrando que a penetração varia grandemente com a linhagem e a qualidade da casca. A qualidade da casca foi definida pelo peso específico (p.e.). Usando 12 linhagens de *Salmonella* e determinando a porcentagem de penetração depois que os ovos estiveram submersos numa suspensão de células (10^4 células por ml) durante 3 minutos, concluíram que

a média de penetração em ovos com casca de má qualidade (p.e.1,07) foi de 47,5%, para ovos com casca de peso específico de 1,08 a média da penetração foi de 21,4% e para ovos com excelente qualidade da casca (p.e. 1,09) foi consideravelmente mais resistente à penetração, dando uma média de 10%. Além disso, *S. typhimurium* e *S. saint paul*, para qualquer qualidade de casca, apresentaram a mais alta proporção de penetração das espécies estudadas. March (29) - constatou que a contaminação por *Salmonella* em ovos com casca intacta não constituía sérios problemas de saúde. Antes da quebra dos ovos, estes geralmente são lavados para eliminar a carga microbiana da casca. O mesmo autor encontrou maior contaminação em ovos lavados do que em ovos sem lavar. A proporção de amostras contaminadas com bactérias, tendo uma média de 5×10^6 organismos por grama de ovo foi a seguinte: (a) nos ovos lavados, 21,8% e (b) nos ovos não lavados, 8,0%. Esse fato já tinha sido demonstrado experimentalmente por Mc Nelly (30), concluindo que quando o conteúdo de umidade da casca era incrementado, a porcentagem de infecção bacteriana também aumentava. Ele considerou que para ovos limpos não lavados, as rachaduras desses ovos eram provavelmente a causa mais importante da infecção. Yokoya (54) relatou o efeito da lavagem do ovo na fonte de produção, mostrando sua influência na conservação, ver Figura 1. Esses resultados dependem do processo de lavagem e

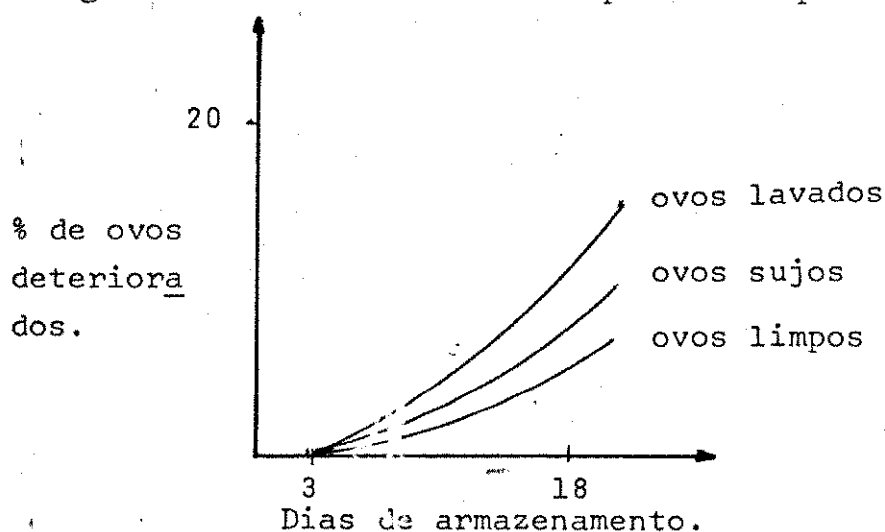


Figura 1. Influência da Lavagem na Conservação do Ovo.
do agente sanitizante usado. Tanto a água de lavagem como a solução desinfetante devem ter a mesma temperatura do ovo. A lavagem

convém que seja em forma de chuveiro sob pressão. Hipoclorito a 1% pode ser usado como desinfetante. Se usar solução clorada, esta deve conter de 100 a 200 ppm. É conveniente secar os ovos imediatamente depois da lavagem (27,46,54).

Quando o ovo é aberto e portanto desprotegido, na sala da quebra e separação pode haver maior contaminação e multiplicação dos microrganismos que passaram da casca para o interior do ovo - no ato da quebra. Esses microrganismos continuam a se desenvolver durante o processamento posterior. Aí, o crescimento mais intenso é observado com gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Serratia*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Sporotrichum*, *Thamnidium* e certos coliformes (54). É importante, portanto, considerar o fator assepsia e procedimento na quebra dos ovos, para ter uma menor contaminação no produto a ser pasteurizado. Sugihara (48), usando um procedimento automático de quebra e separação de gema e clara, observou uma contagem de 1×10^2 a 4×10^3 microrganismos por grama de clara. Paralelamente, Cotterill (9), Cotterill e Glauert (10) e Kohl (27) observaram uma contagem total de menos que 10 bactérias por grama de clara, usando para a quebra e separação um procedimento manual. Wilcox (51) observou uma contagem total de 1×10^4 bactérias por grama de clara para uma operação cuidadosa de separação e de 1×10^7 bactérias por grama de clara, numa péssima operação de separação.

O número de *Salmonella* presente no produto de ovo tem uma grande influência sobre a margem de segurança obtida pelo processo de pasteurização (20). Numa informação sobre o número de *Salmonella* encontrado em ovos recém quebrados, preparados em condições comerciais, Garibaldi et al (20) verificaram que uma em cem amostras analisadas, todas com reação "*Salmonella* positiva", continha 110 *Salmonella* por grama de ovo e que 96% dessas amostras continham menos que 3 *Salmonella* por grama. O número de *Salmonella* em ovos quebrados por procedimento comercial é muito importante - porque a probabilidade de não encontrar sobrevivência de *Salmonella* em qualquer quantidade dada de material pasteurizado, aumenta

a medida que a contaminação inicial decresce (20,49).

Normalmente, menos de 1% das bactérias presentes no ovo recém quebrado, sobrevive ao processo de pasteurização (2,9,10, 25, 26,52). Wrinkle et al (53) e Barnes (5) observaram que os principais gêneros encontrados em produtos de ovo pasteurizado foram; *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium* e cocos Gram-negativos. Shafi et al (43) observaram que os ovos líquidos, pasteurizados comercialmente, tinham uma contagem total de 500 bactérias por grama do produto. As contagens de psicrofílas, termófilas e anaeróbias foram menos de 25 células por grama. Kohl (27), estudando o efeito de polifosfato na pasteurização da clara, concluiu que este agente bactericida continua agindo como tal, eliminando as bactérias que sobreviveram ao processo de pasteurização, não permitindo, também, a recontaminação pós-pasteurização.

2. Composição Química do Ovo.

Em termos gerais, o ovo consiste de 11% de casca, 58% de clara e 31% de gema. O conteúdo de ovo consiste de 65% de clara e 35% de gema. Mas, quando os componentes do ovo são separados em condições comerciais, 12 a 15% de clara vai com a fração de gema, produzindo de 55 a 57% de clara e 43 a 45% de gema (49). A porcentagem de proteína, lipídeo, carboidrato e cinza da clara, gema e ovo integral foi estudado por Stadelman (46), e encontra-se transcrito na Tabela 1.

TABELA 1. Composição da Clara, Gema e Ovo Integral.

Componente do ovo	% de água	% de proteína	% de lipídeo	% de carboidrato	% de cinza
Clara	87,6	9,7-10,6	0,03	0,4-0,9	0,5-0,6
Gema	51,1	15,7-16,6	31,8-35,5	0,2-1,0	1,1
Ovo Integral	73,7	12,8-13,4	10,5-11,8	0,3-1,0	0,8-1,0

O peso médio dos ovos produzidos por linhagens comuns de galinha é de 58 gramas(46). Para uma linhagem dada de ave, a composição do ovo varia com a idade da galinha e o tamanho do ovo (49).

a). Composição da Clara.

A quantidade de sólidos totais da clara varia com a linhagem e idade da galinha, indo de 11 a 13%. Em geral, ao aumentar o peso do ovo e a idade da galinha, o teor de sólidos totais da clara decresce (49). O principal constituinte orgânico da clara é a proteína. O carboidrato encontra-se em forma livre e combinado sendo que 98% do carboidrato livre corresponde a glicose. A gordura só se encontra em pequeníssima quantidade na clara(39). A proteína da clara está classificada em dois grupos; proteína simples (ovalbumina, conalbumina e globulina) e glicoproteína (ovomucóide e ovomucina). Algumas características dessa proteína são mostradas na Tabela 2. A Tabela 3 mostra a distribuição de aminoácidos da proteína da clara e da gema.

TABELA 2. Proteína em Clara de Ovo.

Proteína	% de Proteína na Clara	Peso Molecular	Estabilidade ao Calor (60°C).
Ovalbumina	54,0	45.000	Instável a pH 9, mas muito estável a pH 7,0
Conalbumina	13,0	80.000	Muito instável. Estabiliza-se quando forma um complexo com metais(Fe,Zn,Cu,Al).
Ovomucóide	11,0	28.000	Idem que ovalbúmina.
Lisozima	3,5	14.600	Muito estável.
Globulina G2	0,0	30.000-45.000	Muito estável.
Globulina G3	0,0	?	Muito estável.
Ovomucina	1,5	?	Muito estável.

Dados obtidos de U.S. Department (49) e de Kline et al (14).

TABELA 3. Distribuição de Aminoácidos na Proteína da Clara e da Gema de Ovo.

Aminoácido	% de Proteína Total						
	Gema		Clara				
	Ovovitellina	Ovovitelina	Ovalbumina	Conalbumina	Globulina	Ovomucina	Ovomucóide
Alanina	0,7	6,0	8,3	-	-	-	-
Arginina	8,6	5,8	5,4	5,1	4,7	-	5,6
Ác. Aspártico	1,0	3,0	7,1	-	-	-	1,8
Cistina	1,2	3,2	1,2	3,4	-	4,6	6,2
Ác. Glutâmico	12,4	6,8	15,7	-	-	-	2,0
Glicina	0,8	-	2,0	-	-	-	-
Histidina	1,9	1,4	1,8	2,5	1,4	-	4,0
Leucina	10,0	10,6	12,5	-	-	-	4,0
Lisina	5,9	5,5	6,4	5,1	5,7	-	1,6
Metionina	2,9	2,4	5,0	-	-	-	1,7
Fenilalanina	1,5	2,0	5,2	-	-	-	2,4
Prolina	3,3	2,2	4,8	-	-	-	2,4
Serina	0,5	-	1,2	-	-	-	-
Treonina	4,9	-	3,9	-	-	-	-
Triptofano	1,4	1,7	1,7	5,7	4,1	-	2,2
Tirosina	5,1	5,1	4,3	4,2	4,9	-	4,7
Valina	2,1	9,8	5,5	-	-	-	-

Dados obtidos de Romanoff e Romanoff (39).

Os elementos inorgânicos da clara encontram-se dissociados e combinados. Sua composição é muito variável, sendo a dieta da galinha o principal fator dessa variação. A quantidade de alguns elementos inorgânicos mais importantes, que se encontram na clara e na gema, é mostrado na tabela 4.

TABELA 4. Composição dos Elementos Inorgânicos na Clara e na Gema

Elemento	% na Clara	% na Gema
Enxôfre	0,195	0,016
Potássio	0,145-0,167	0,112-0,360
Sódio	0,161-0,169	0,070-0,093
Fósforo	0,018	0,543- 0,980
Cálcio	0,008-0,020	0,121-0,262
Magnésio	0,009	0,032-0,128
Ferro	0,0009	0,005-0,011

Dados obtidos de Stadelman e Cotterill (46).

O pH da clara, logo após a postura, varia de 7,6 a 7,9. Durante o armazenamento do ovo em casca, o pH da clara eleva dependendo da temperatura de estocagem, tendo um máximo de 9,7. Depois de 3 dias de estocagem a temperatura ambiente, a clara apresenta um pH de 9,1. Este aumento do pH da clara é devido a perda de dióxido de carbono do ovo através dos poros da casca. O pH da clara depende do equilíbrio entre o dióxido de carbono, o íon bicarbonato, íon carbonato e proteínas (46,49). A Tabela 5 apresenta algumas constantes das propriedades físico-químicas da clara e da gema de ovo.

b). Composição da Gema.

A composição da gema é muito mais complexa que qualquer parte do ovo. A grande parte do material orgânico é constituída por gorduras. O restante é constituída de proteínas e pequenas quantidades de carboidratos (39). A quantidade total de sólidos da gema é geralmente 50%. Este valor está influenciado pela idade da gali

nha e do tamanho do ovo. A porcentagem de sólidos totais tende a aumentar quando a idade da galinha aumenta. Para qualquer idade da ave, o teor de sólidos totais da gema diminui ao aumentar o tamanho do ovo.

TABELA 5. Constantes Fisico-químicos da Clara e da Gema.

Constante	Clara	Gema
Água de enlace (%)	25	15
Temperatura de coagulação (°C)	61,0	65,0
Densidade (g/cm ³)	1,035	1,035
Ponto de congelamento (°C)	-0,424	-0,587
Viscosidade(poises a 0°C)	25,0	200,0

Dados obtidos de Romanoff e Romanoff (39).

Somente duas proteínas, ovovitelina e ovolivetina, tem sido isoladas da gema, encontrando-se uma relação de 4:1 respectivamente. Ovovitelina é uma fosfoproteína que contém a terça parte do fósforo presente na gema e a ovolivetina, contém pouco fósforo, mas a terça parte do enxofre da gema vem dessa proteína. A distribuição de aminoácidos das proteínas da gema estão indicadas na Tabela 3 onde se observa que tal proteína contém todos os aminoácidos presente no ovo. As gorduras da gema, que constituem 31,8 a 35,5% em peso, são muito complexas em estrutura. Elas não só se constituem de glicerídeos mas também, de fosfolipídeos e de esteróides (39). De acordo com Privett *et al* (36), a composição dos lipídeos da gema é de 65% de glicerídeos, 28,3% de fosfolipídeos e 5,2% de colesterol. A composição dos ácidos graxos da gema está influenciada pelo tipo de dieta ministrada à galinha. Somente os ácidos palmítico e esteárico não mudam com uma alteração da dieta, mas, o teor de ácido linoleico aumenta quando a dieta é aumentada com ácidos graxos poli-insaturados, e o ácido oleico diminui(46). A distribuição dos ácidos graxos da gema encontram-se na Tabela 6.

TABELA 6. Composição dos Ácidos Graxos da Gema.

Ác. graxo	%	Ác. graxo	%
16:0	23,5	18:3	1,4
16:1	3,8	20:4	1,3
18:0	14,0	20:5	0,4
18:1	38,4	22:5	
18:2	16,4	22:6	0,6

Dados obtidos de Stadelman e Cotterill (46).

A quantidade de carboidratos na gema é de 1%. O conteúdo de carboidratos livres foi estimado a ser de 0,2% como glicose. Romanoff e Romanoff (39) relataram que os carboidratos livres e combinados (geralmente com proteínas) estão presentes na gema em 0,7 e 0,3% respectivamente.

O teor de elementos inorgânicos na gema são listados na Tabela 4 os quais são: enxôfre, potássio, sódio, fósforo, cálcio, magnésio e ferro.

O pH da gema de ovos frescos é geralmente de 6,0, mas, durante o armazenamento do ovo em casca, o pH aumenta gradualmente indo de 6,4 a 6,9. Em temperaturas de armazenamento de 2 e 37°C, o pH da gema alcança valores de 6,4 em 50 e 18 dias respectivamente (46).

3. Pasteurização dos Produtos de Ovo.

A pasteurização do ovo integral líquido e gema líquida foi primeiramente praticada pela indústria nos anos de 1930. Acredita-se que Henningsen Bros, em 1938, foi a primeira indústria que utilizou a pasteurização desses produtos de ovo. Uma limitada prática da pasteurização do ovo, foi usada no período de 1940 até 1950. Esta indústria era principalmente desenvolvida na China e nos Estados Unidos. Recentemente, a pasteurização dos produtos de ovo tem sido desenvolvida no Canadá, a maioria dos países Europeus e alguns países da América Latina (46). Na primeira operação, foi

usado o método intermitente (batch), utilizando um pasteurizador tipo intermitente para produtos lácteos, operando a temperaturas superiores de 60°C. Posteriormente foi usado o método de HTST (altas temperaturas, tempos curtos) num pasteurizador de placas. Em 1943, o ovo integral líquido foi pasteurizado numa instalação comercial para processo contínuo, usando 61,1°C durante um tempo de retenção de 3 minutos (3). Ainda que o objetivo principal desse processo não tinha sido a eliminação de *Salmonella*, as condições de tempo-temperatura usadas eram satisfatórias para a destruição de *Salmonella*.

Todos os processos de pasteurização do ovo usados atualmente apresentam dois objetivos; um que seria a eliminação de micro-organismos patogênicos, principalmente do gênero *Salmonella* e o outro seria a conservação das propriedades físico-químicas do produto (16,27,46,49). Alguns métodos de pasteurização do ovo tem sido propostos visando cumprir estes dois objetivos (19,21).

a). Pasteurização de Ovo Líquido Integral (OLI).

As alterações físico-químicas em ovo líquido integral, na sua pasteurização, são determinadas com os testes de viscosidade, estabilidade do suspiro, volume da camada e bolo esponjoso, coagulação e a capacidade de formação de espuma (46). OLI pasteurizado a 60°C dão um valor de bolo esponjoso com 4% menos de volume que com ovos não pasteurizados. Aumento da viscosidade do OLI foi notado com a pasteurização a 61,1°C durante 3 minutos. Uma combinação de pasteurização e congelamento reduz a viscosidade do ovo depois de descongelado. Esse processo aumenta o tempo necessário na operação de batidura, mas, ajuda à estabilidade da espuma (46). Sugihara et al (48) encontraram que não ocasionam prejuízos significativos nas propriedades funcionais do OLI, quando aquecido a 63°C durante 3,5 minutos ou a 72°C durante 2 a 3 segundos. Também, verificaram que o tratamento convencional de 60°C durante 3,5 minutos é mais que suficiente para destruir linhagens de *Salmonella* com resistência térmica normal. Eles determinaram uma destruição de 3×10^6 células de *Salmonella* por grama de produto com um trata-

mento de 60°C durante 2 minutos.

b). Pasteurização da Gema Líquida (GL).

A estabilidade da maionese e molho para salada, é uma indicação do poder emulsificante da gema do ovo, e a rigidez dos pudins reflete a habilidade de coagulação. O poder emulsificante da gema é um teste crítico para a determinação dos danos sofridos pelo processo de pasteurização (34). A propriedade de emulsificação da gema é pouco afetada pelo calor (46). Palmer et al (34,35) verificaram que a pasteurização a 62,2 até 64,4°C durante 3,5 minutos não teve efeito sobre a qualidade da gema salgada (10% de NaCl) não congelada, em maionese. Gema salgada acidificada (pH 5,0 a 6,2) e então pasteurizada a 60°C durante 3,5 minutos sofria a perda da capacidade de emulsificação. O congelamento pode aumentar este dano. Gema com 10% de açúcar (sacarose) pasteurizada a temperatura de 64,4°C durante 3,5 minutos, apresentavam uma boa qualidade das suas propriedades funcionais. A resistência térmica de linhagens de *Salmonella* é muito maior na gema do que no ovo líquido integral e na clara. Com um processo de pasteurização da gema natural a 60°C durante 3,5 minutos, obtem-se uma redução de 10^{12} células por grama de *Salmonella typhimurium* m-1 (21).

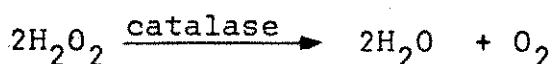
c). Pasteurização da Clara de Ovo (CO).

Viscosidade, tempo de batadura, estabilidade do suspiro e volume do bolo esponjoso, são os testes clássicos para a determinação da qualidade da clara de ovo pasteurizada (46). Tem sido apresentado na literatura que o tratamento de pasteurização da clara natural, causa danos na suas propriedades funcionais. Wilken e Winter (52) foram provavelmente os primeiros pesquisadores que relataram esse efeito. Kline et al (25) estudaram o efeito do calor sobre a clara natural (pH 9,0) entre 51,1 a 60°C usando um trocador de calor de placas e tubos de retenção, tipo comercial. Eles observaram mudanças nas propriedades funcionais da clara, problemas mecânicos de operação e destruição de *Salmonella*. A 60°C durante 2 minutos, observaram um grande efeito nas propriedades funcionais, apresentando-se, também, alguns problemas de operação. A 57,2°C durante 2 minutos, apresentava-se um aumento na viscosi-

dade na clara, mas não houve problemas mecânicos de operação. Com temperaturas de 56,1 a 56,7°C durante 2 minutos, não houve mudanças significativas nas propriedades funcionais nem problemas mecânicos, necessitando somente um tempo de batidura quase o dobro - comparado com clara não tratada. No tocante à destruição de *Salmonella*, os autores relataram que havia uma destruição de *Salmonella typhimurium*, previamente inoculada, de 10^4 células por grama de clara a 56,4°C durante 2 minutos. Kline et al (26) constataram que com um processo de pasteurização da clara natural a 56,7°C durante 4 minutos, ocorre sem problemas mecânicos e a destruição de *S. typhimurium* que nessas condições foi de 10^5 células por grama de clara.

A clara de ovo não pode ser aquecida a uma temperatura que seja o suficientemente alta para garantir um produto razoavelmente seguro do ponto de vista bacteriológico sem causar a coagulação das suas proteínas. A clara deve ser submetida a um tratamento prévio a sua pasteurização. O objetivo desse tratamento prévio é de debilitar as bactérias a um grau tal que possam ser destruídas a baixas temperaturas e/ou estabilizar as proteínas, de modo a permitir o aumento da temperatura durante o processo de pasteurização (16). Os tratamentos prévios que tem sido apresentados para a pasteurização da clara são: (i) ajuste do pH (7,0) da clara; (ii) tratamento térmico mais água oxigenada; (iii) processo com aplicação de calor e vácuo; (iv) aplicação de calor mais polifosfato; e outros agentes auxiliares de pasteurização da clara. O processo de pasteurização da clara com ajuste do pH foi desenvolvido por Cunningham et al (15). O uso desse método permite a pasteurização da clara de maneira idêntica à usada para OLI (60°C durante 3,5 minutos). Quando um ácido, preferentemente ácido láctico, é usado para abaixar o pH da clara a nível de 6,8 a 7,3 a estabilidade das proteínas da clara é aumentada e as mudanças de viscosidade, devido ao aquecimento, são reduzidas. A estes valores de pH as proteínas da clara são bem estáveis a 60°C por vários minutos, exceto a conalbumina que não é estável nestas condições. Esta proteína pode ser estabilizada pela adição de sais

de ferro ou de alumínio (46,49). Ayres e Slosberg (4) demonstraram que a água oxigenada pode ser usada para a destruição de *Salmonella* em clara de ovo a temperatura ambiente. Este processo não foi comercialmente praticável devido a formação de espuma produzida pela liberação de oxigênio. Recentemente, a Armour Company patenteou o processo para a pasteurização da clara, combinando o efeito do tratamento térmico e a ação bactericida da água oxigenada sobre a destruição de *Salmonella*. A clara líquida com pH natural é aquecida durante 1,5 minutos a 51,7°C, eliminando com o processo o problema da formação de espuma. Nesse ponto do processo, adicionava-se água oxigenada, solução a 10%, para dar uma concentração de 0,075% a 0,1% (v/v) na clara e posteriormente aquecida durante 2 minutos a mesma temperatura. A clara era, então, resfriada a 7,2°C e adicionava-se catalase para eliminar a H₂O₂ residual, de acordo com a seguinte reação (46,49).



Como indicado por Ayres e Slosberg (4), a H₂O₂ pode ser usada para a destruição de *Salmonella* na clara de ovo a temperaturas tão baixas onde não ocorre danos nas propriedades funcionais do produto. Este processo tem sido usado por muitas firmas comerciais e é grandemente aceito na indústria de processamento de ovos (46). Em 1967, testes feitos pela Ball's Eggs Products Co, teve como resultado um novo método para a pasteurização da clara de ovo a 56,7°C com um tempo de retenção de 3,5 minutos. Este sistema utiliza o pasteurizador comum de placas HTST equipado com um trocador de vácuo na qual 17 a 20 polegadas de mercúrio de vácuo é aplicado à clara líquida, antes de ser tratada termicamente. O objetivo do vácuo é a remoção do ar da clara, permitindo a utilização de baixas temperaturas para atingir bons resultados microbiológicos. Também foi divulgado que a inclusão do trocador a vácuo, reduzia o problema de incrustação da clara sobre as paredes durante o aquecimento (46). Ainda que a ação inibidora do polifosfato sobre as bactérias não seja muito conhecida, sabe-se que este agente químico tende a sensibilizar as bactérias à ação letal

do calor. Assume-se que o princípio dessa ação é que os polifosfatos reagem com o cálcio e com o magnésio da parede celular das bactérias, diminuindo sua resistência térmica. Kohl (27) recomendou um processo de pasteurização da clara de ovo (pH 9,0 a 9,5) com 0,5 a 0,75% de polifosfato a temperatura de 52,2 a 55,0°C durante 3,5 minutos. Estas condições permitem uma destruição efetiva de *Salmonella*, mantendo intactas as propriedades funcionais da clara. Uma outra vantagem desse processo, relata o autor, é a inibição residual do polifosfato ao crescimento de bactérias após pasteurização. Outros processos de pasteurização da clara de ovo tais como o uso de radiações de luz ultravioleta, radiações beta e gama e o uso de epóxidos, não tem sido aplicados comercialmente (49).

4. Fatores que Afetam a Resistência Térmica do Gênero *Salmonella* em Produtos de Ovo.

A destruição pelo calor de microrganismos do gênero *Salmonella*, os quais estão comumente presentes nos produtos de ovo, é o principal objetivo da pasteurização desse produto (2). A resistência térmica de *Salmonella* é um assunto de grande interesse para todas as pessoas que trabalham nas áreas de saúde pública e em manuseio e processamento de alimentos (32). As características de resistência térmica representam-se geralmente pelas chamadas curvas de sobrevivência e curvas de destruição térmica (Stumbo (47)), as quais estão apresentadas nas Figuras 2 e 3 respectivamente. A curva de sobrevivência representa o número de sobreviventes, quando as amostras são tratadas termicamente a uma temperatura letal constante. Dessas curvas obtem-se o valor D, chamado também, tempo de redução decimal e que representa o tempo em minutos necessários para destruir 90% de uma população microbiana. A curva de destruição térmica, construída com os valores D e suas temperaturas correspondentes, é definida por índice de declive ou valor z e um valor D de referência, sendo z o número de graus (Centígrados ou Fahrenheit), necessários para diminuir 90% do valor D. Assim, uma boa prática de pasteurização dos produtos de ovo depende, ob

viamente, dos dados de resistência térmica das linhagens de *Salmonella* obtidos experimentalmente nos produtos de ovo (23).

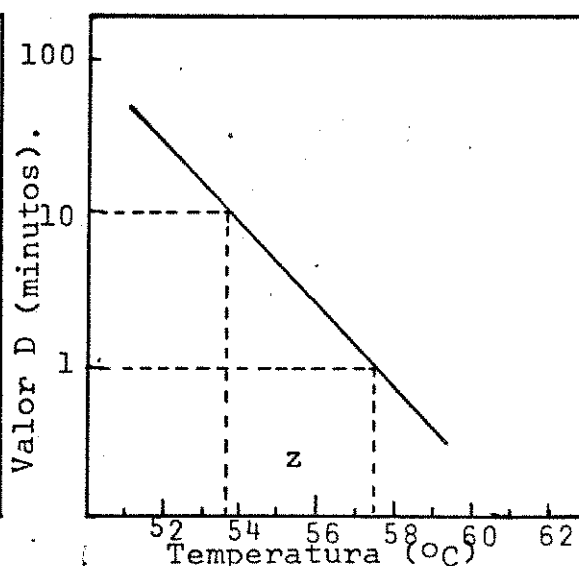
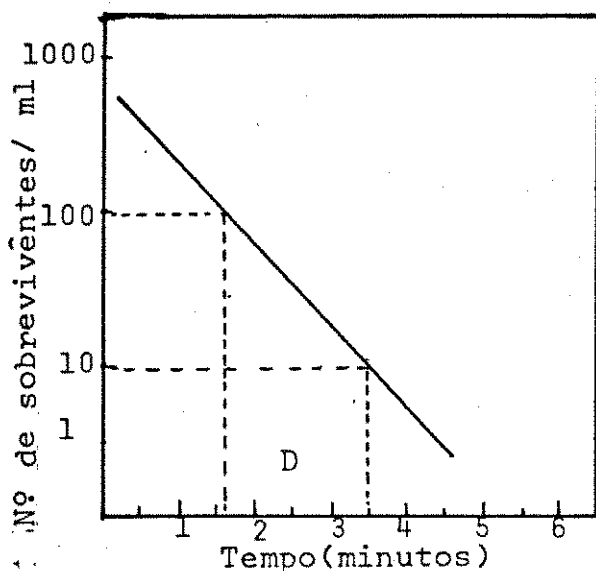


Figura 2. Curva de sobrevivência Figura 3. Curva de destruição térmica.

Os fatores que afetam a resistência térmica de *Salmonella* nos produtos de ovo, são: a). número inicial e linhagem de *Salmonella*; as condições para os testes de determinação da resistência térmica para conseguir um processo adequado de pasteurização de ovos não tem sido padronizadas. Em particular, o número inicial e linhagem de *Salmonella* não tem sido definidos, sendo selecionados arbitrariamente (9). Wilkin e Winter (52), Ayres e Slosberg (4) consideraram no seu trabalho, a microflora natural como inóculo. Anellis et al (2) usaram *S. pullorum*, *S. oranienburg*, *S. montevideo*, *S. typhimurium* e *S. senftenberg* em quantidades de 10^5 células por grama; Osborne et al (33) usaram 10^5 células de *S. derby*, *S. bareilly*, *S. newport*, *S. pullorum*, *S. anatis* e *S. senftenberg* por grama; Lategam et al (28) usaram 2×10^5 e $1,6 \times 10^6$ células de *S. typhimurium* por grama; Kline et al (25) usaram 150 e $1,6 \times 10^6$ células de *S. typhimurium* por grama; Cunningham et al (13) 6×10^5 e 5×10^6 células de uma mistura de *S. typhimurium*, *S. derby*, *S. oranienburg* e *S. worthington* por grama. Todos estes pesquisadores encontraram diferentes valores de D para cada linhagem testada. Tem sido observado, também, diferentes valores D para uma mesma linhagem, quando variava o número

inicial de células inoculadas por grama (52). Ainda que a maioria das linhagens de *Salmonella* apresentem uma resistência térmica muito semelhante aos microrganismos testes (*S. typhimurium* Tm-1, segundo Garibaldi et al (21) e *S. oranienburg* segundo Cotterill (9)), algumas linhagens figuram como exceção. *S. senftenberg* 775W é 31 vezes mais resistente que *S. typhimurium* Tm-1 e *S. brockley*, 4,8 vezes mais termorresistente (32). b) efeito do pH e ácidos; o pH tem um efeito marcante sobre a resistência térmica de *Salmonella* (2,28,33). A importância do pH como fator da resistência térmica bacteriana, tem sido muito estudado. Alguns autores tem demonstrado que a pH perto da neutralidade, as bactérias apresentam sua maior resistência ao calor e que essa resistência diminui no pH ácido ou alcalino (2). Wilkin et al (52), usando linhagens de *Salmonella* observaram que a resistência térmica é maior a pH de 5,5 do que a pH de 7,2 em ovo líquido integral. Anellis et al (2), estudando o comportamento da resistência térmica de 7 linhagens de *Salmonella* em ovo integral a pH de 5,5, 6,2, 6,7, 8,0 e 8,5, relataram que para todas as linhagens, a resistência térmica aumentava a medida que o valor do pH diminuía. Dos organismos testados, *S. oranienburg* e *S. heidelberg* apresentaram um alto grau de resistência e *S. anatum* foi a mais sensível nessas condições. Osborne et al (33) relataram resultados semelhantes para níveis de pH de 5,3 até 9,0, observando, também, que a pH mais baixos que 5,3 a resistência térmica de *Salmonella* começava a diminuir. Quando o ovo líquido acidificado (pH 5,0 ou mais baixo) com ácido láctico ou ácido acético, a termorresistência era menor que quando acidificado com HCl (18,28,33). Esta é a base para o uso de ovos não pasteurizados em saladas e maionese (18). O efeito do pH é uma das razões pela qual a resistência térmica de *Salmonella* é maior na gema do que na clara (46); c) efeito da actividade de água (a_w). A resistência térmica é incrementada quando se reduz a a_w do meio aquecido. Goepfert et al (22) estudando esse efeito em oito linhagens de *Salmonella* e nos valores de a_w de 0,99, 0,96, 0,93, 0,90 e 0,87, constataram que variava com a linhagem. Entre as linhagens testadas *S. anatum* foi a linhagem que apresentou maior aumento na sua termorresistência,

quando a a_w passava de 0,99 a 0,96 (D=1,1 e D=35,5 minutos respectivamente). Riemann (38) e Barriale (6), observaram um efeito similar trabalhando com carne e chocolate, respectivamente; d) efeito da adição de sal ou açúcar. Ambos, sal e açúcar, aumentam de modo geral a resistência térmica de *Salmonella* em produtos de ovo. O efeito de sais sobre a resistência térmica de microrganismos é um efeito protetor e varia dependendo do tipo de sal, concentração, organismo testado e meio suplementado. O efeito protetor se deve a diminuição da a_w e, em consequência, aumenta a termorresistência. O efeito de açúcares provavelmente se deve, também, à diminuição da a_w (24). Cotterill e Glauert (10) relataram que adicionando 10% de sal (NaCl) ou sacarose causavam a necessidade do aumento da temperatura para a destruição de *S. oranienburg* em gema de ovo. Gema salgada requer temperaturas mais altas que gema açucarada. Garibaldi et al (20) observaram os seguintes valores de D a 60°C de *S. typhimurium* Tm-1 para diferentes produtos de ovo; gema natural, 0,4 minutos; gema com 10% de NaCl, 5,1; gema com 10% de sacarose, 4,0; ovo integral, 0,27; ovo integral com 10% de sacarose, 0,60. Valores D a 55°C na clara de ovo natural foi de 0,55 minutos e clara com 10% de sacarose, 1,2 minutos; e) efeito de aditivos químicos - em geral. A possibilidade de reduzir a resistência térmica de bactérias por aditivos químicos tem sido bastante estudada. Laterham et al (28) observaram uma grande variedade de aditivos químicos reduzir a resistência ao calor de *S. typhimurium* em ovo líquido integral. Dos 18 aditivos usados β -propiolactona, óxido de etileno e dióxido de butadieno foram os mais efetivos. Numa outra pesquisa, foi relatado que uma redução de 2 a 6 minutos do valor D a 52,5°C, em clara, quando suplementada com 7,0 mg/ml de etilenodiamina tetracetato de sódio (EDTA) ou com 10mg/ml de Kena (75% $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ e 25% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) (19). Bruch et al (7) observaram que a clara contendo 10^5 células de *S. senftenberg* ATCC8400 por ml foi "esterilizada" em 12 horas a 10°C com 0,1% de β -propiolactona, 2 a 3 horas com 0,3% à mesma temperatura. Os valores D a 56,7°C de *S. senftenberg* e de uma mistura de três linhagens de *Salmonella* (*S. typhimurium* 13311, *S. derby* 6960 e *S. oranienburg* 9239), os quais eram 3,14 e 0,64 mi

nutos respectivamente na clara natural (pH 9,0), foram obtidos a 52,8°C quando esse produto era suplementado com 0,75% de polifosfato (16).

5. Efeito da Água Oxigenada na Resistência Térmica de *Salmonella* e Usos na Pasteurização da Clara de Ovo.

Presume-se que um dos produtos finais do metabolismo das bactérias aeróbicas é a H_2O_2 , a qual é convertida em água pela adição de catalase. No entanto, concentrações altas de H_2O_2 apresenta um efeito bactericida. O mecanismo da ação sobre as bactérias da água oxigenada não é muito conhecido, mas, sabe-se que quantidade excessiva oxida alguns constituintes vitais das células. Um outro mecanismo pela qual a H_2O_2 exerce seu efeito sobre o crescimento das células bacterianas tem sido atribuído a um tipo de inibição totalmente reversível, exercido sobre a divisão celular. Esta ação é demonstrada como um aumento da fase de latência do crescimento bacteriano. Terminado o efeito da H_2O_2 , que pode ser pela ação da catalase presente nas células ou pela adição desta enzima, a fase exponencial de crescimento ocorre normalmente. Portanto, a atividade da catalase presente naturalmente na célula tem um efeito protetor contra a ação bactericida da H_2O_2 (8). Watson (50) constatou esse efeito trabalhando com *S. typhimurium* LT2 e observou que a fase de latência era aumentada até 5 horas e que ainda mais produzia uma diminuição da contagem inicial com a adição de 0,06% de água oxigenada num meio mineral contendo 0,05% de glicose. Com uma quantidade de 0,03% de H_2O_2 a fase de latência foi aumentada por 2 horas. Depois desses tempos, a fase exponencial de crescimento continuava normalmente. Esses resultados foram quantitativamente similares aos observados por Campbell (8) que trabalhou com *Serratia marcescens* e 3% de H_2O_2 . Os mesmos efeitos tem sido observados em bactérias formadoras de esporos (23). Baixas concentrações de H_2O_2 são usadas para o processamento da clara de ovo. A adição de água oxigenada reduz as condições de tempo-temperatura requeridas na pasteurização desse produto (45).

A H_2O_2 tem sido usada há muito tempo na esterilização de equipamento, material de embalagem e em alguns alimentos. Um dos

primeiros usos na indústria de alimentos foi em 1883, aplicado como método de preservação do leite (13). Ayres e Slosberg (4) foram os primeiros a usar a H_2O_2 na pasteurização da clara de ovo. Usando - uma concentração de 0,2% de H_2O_2 e temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos, observaram uma eliminação total dos microrganismos contaminantes da clara. Notaram, também, que nesse processo apresentava-se o problema de formação de espuma devido à liberação de oxigênio. Concluíram, então, que era possível o uso de pequenas quantidades de H_2O_2 (0,05%) durante um longo período de exposição como uma maneira de eliminar o problema da formação de espuma e principalmente a eliminação de microrganismos patogênicos da clara. O problema da formação de espuma foi posteriormente resolvido aplicando um tratamento térmico (1,5 minutos a $51.7^{\circ}C$) antes da adição da H_2O_2 . Isto pode ser explicado pela inativação térmica da catalase presente na clara e nas células bacterianas. Pesquisas prévias tem indicado que a H_2O_2 oxida, coagula e modifica as propriedades funcionais da clara. Snider (45) estudou os efeitos de altas concentrações de H_2O_2 sobre a coagulação, oxidação e modificações da clara, observando que a concentração mínima necessária para produzir coagulação e oxidação da proteína da clara era 1,2%. Com 6%, observou que a temperatura máxima a ser usada para não ter problemas de coagulação foi de $50^{\circ}C$. Cunningham e Cotterill (12), usando dez diferentes tipos de aditivos químicos no processamento da clara, observaram que todos os aditivos que tinham H_2O_2 apresentavam algum benefício nas propriedades funcionais da clara. O aditivo que proporcionou maiores benefícios foi o tratamento da clara natural com baixas concentração de H_2O_2 (0,008 a 0,03%). Por exemplo; o tempo de batadura foi diminuído a 50% e o volume do bolo esponjoso foi aumentado consideravelmente. Quando 10% de clara alcalinizada mais H_2O_2 foi adicionada como aditivo, era necessário 3% de H_2O_2 para produzir o mesmo efeito favorável sobre as propriedades funcionais da clara. Isto, segundo Snider (45), proporcionaria o problema de coagulação, oxidação e modificação das proteínas da clara devido à alta concentração de H_2O_2 . Nenhum resultado sobre a destruição de *Salmonella* foi relatado. Mink e Sillicker (31) encontraram que era

possível obter uma esterilização comercial da clara quando era tratada com H_2O_2 a concentrações e temperatura que produza o mínimo de espuma e que tenha um efeito bactericida sobre a população microbiana do material de ovo. Quando esse tratamento era aplicado na clara e posteriormente secado, testes bacteriológicos do material seco revelaram 99,99% de destruição da carga microbiana inicial, produzindo, um produto o qual é classificado como comercialmente estéril. As concentrações e temperaturas ótimas para o processo são 0,2 a 0,8% e 4,5 a 8,3°C respectivamente. Sebring et al (42), pesquisaram o efeito da H_2O_2 sobre as bactérias e as propriedades funcionais da clara de ovo, usando o processo de pasteurização num equipamento HTST (alta temperatura curto tempo) tipo comercial. Uma mistura de 5 linhagens de *Salmonella* inoculadas a nível de 10^7 células por grama de produto. A clara inoculada foi tratada termicamente durante 1,5 minutos a 51,7°C. Neste momento a H_2O_2 foi adicionada para dar uma concentração de 0,075% (v/v) e depois o processo se prolongou por 2 minutos à mesma temperatura. Foi adicionada a catalase imediatamente depois a clara ser resfriada. Os resultados indicaram uma eliminação total de *Salmonella* sem causar danos nas propriedades funcionais da clara.

MATERIAL E MÉTODOS.

1. Material..

a). Microrganismos. As linhagens de *Salmonella* usadas neste trabalho foram obtidas de; (i) Coleção de microrganismos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, S.P., (ii) Coleção de microrganismos do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas S.P., (iii) Coleção de microrganismos do Departamento de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo S.P., (iv) Western Regional Laboratory, ARS, Albany, California (WRLARS), U.S.A., (v) Department of Food Science and Nutrition, University of Missouri (DFSNUM), Columbia, U.S.A. (ver Tabela 7).

b). Meios de Cultura. As linhagens de *Salmonella* obtidas dos diferentes laboratórios foram conservados em tubo inclinado de TSA (Tryptic Soy Agar), Difco. A produção de células foi feita cultivando-se em TSB-YE (Tryptic Soy Broth suplementado com 2% de Extrato de Levedura), BBL. Para a contagem dos microrganismos sobreviventes usou-se TSA-YE (Tryptic Soy Agar suplementado com 2% de Extrato de Levedura), Difco.

c). Incubador Agitador. Para produção de células bacterianas usou-se um incubador agitador de temperatura controlada, modelo G-25, da New Brunswick Scientific, U.S.A.

d). Centrífuga. Para a colheita das células produzidas foi usada uma centrífuga com sistema de refrigeração, de alta velocidade, modelo B20-A da International Equipment Co., U.S.A.

e). Banho de Temperatura Constante. Para o tratamento térmico usou-se um banho UNITEMP de FANEM Ltda, com controle automático de temperatura provido de aquecimento por resistência elétrica e de um motor para a agitação do meio de aquecimento. A precisão deste aparelho é de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e a temperatura máxima de aquecimento é de 100°C . Quando usou-se o método do frasco foi necessário adicionar

ao frasco um motor com palhetas para a agitação mecânica do produto a ser tratado termicamente.

f). Material para o Tratamento Térmico. No método do tubo TDT não selado foram usados tubos de ensaio pequenos de 5 mm de diâmetro externo por 100 mm de comprimento e com parede de 1 mm de espessura, fechados com algodão. Para o outro método foram usados frascos de destilação, Pyrex, de fundo redondo de três bocas e 1000 ml de capacidade.

g). Agitador de Tubos. Os tubos de diluição foram homogeneizados com um agitador Cyclo Mixer modelo 1100, Clay Adams, U.S.A.

h). Água tamponada. Usou-se tampão fosfato (NaH_2PO_4) pH 7,0.

i). Ovos. Os ovos foram obtidos do mercado, mantidos a temperaturas de refrigeração.

j). Água Oxigenada. Foi usada uma solução a 10%.

2. Métodos.

a). Preparação da Suspensão de Células Bacterianas. (i) Produção de células; Num frasco Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio, esterilizado a 121°C por 15 minutos, inoculou-se com uma alçada da cultura, mantida em tubo inclinado. O frasco inoculado foi incubado a 37°C durante 48 horas com agitação a 150 rpm no Incubador-Agitador., (ii) Colheita das células; Depois do tempo de incubação as células bacterianas foram colhidas por centrifugação a 7.000 rpm (8.000 g aprox.) durante 5 minutos, eliminando-se o sobrenadante. O precipitado foi resuspenso na mesma quantidade de água tamponada estéril. O processo de centrifugação foi repetido por mais duas vezes para a lavagem das células. Finalmente, as células foram suspensas em água tamponada estéril.

b). Preparação dos Produtos de Ovo. Os ovos foram quebrados manualmente em condições assépticas colocando a clara e a gema separadamente em frascos Erlenmeyer de 1000 ml previamente esterilizados ou diretamente nos frascos de três bocas também estéreis ,

quando usado o método do frasco. Os ovos antes de serem quebrados foram lavados com água e posteriormente submersos em álcool a 70% por 20 a 30 minutos. A superfície da casca era secada passando-se pela chama do bico de Bunsen.

c). Tratamento Térmico. (i) Método do tubo TDT não selado. Para determinar a resistência térmica das linhagens de *Salmonella* em gema e clara com pH ajustado a 7,0, usou-se o método do tubo - TDT não selado. O ajuste do pH da clara foi feito adicionando-se lentamente HCl a 1% (v/v) sob agitação. Os frascos contendo aproximadamente 300 gramas de gema ou clara neutralizada foram inoculados com 1 ml da suspensão de células para dar uma população de 10^7 células por grama. Aproximadamente 3 ml do material inoculado foi distribuído assepticamente, com uma pipeta, aos tubos de ensaio - pequenos estéreis. Estes foram colocados num suporte para tubos e submersos no banho de temperatura constante (precisão de $\pm 0,1^\circ\text{C}$). Depois de um tempo determinado de aquecimento os tubos foram removidos e imediatamente colocados num banho de gelo para o resfriamento e posteriormente se fez a contagem de sobreviventes. (ii) Método do frasco. Este método foi usado para a determinação de resistência térmica na clara com diferentes porcentagens de água oxigenada. A clara foi colocada assepticamente nos frascos de tres bocas (aproximadamente 175 gramas) adicionando-se 0,04% de sulfato de aluminio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$). Posteriormente o frasco foi colocado no banho de temperatura constante. Durante todo o período de aquecimento a clara foi agitada mecanicamente por palheta animada por - um motor colocado na boca central do frasco. Um termômetro foi colocado numa outra boca para registrar a temperatura da clara. Quando atingida a temperatura desejada para o tratamento térmico foram adicionados, pela terceira boca, o inóculo (aprox. 10^7 células por grama) e a H_2O_2 . Depois de um tempo determinado foi removido 1 ml do material e transferido para um tubo de diluição com 9 ml de água tamponada estéril, onde se deu o resfriamento e ao mesmo tempo se obtinha a diluição 10^{-1} para fazer a contagem de sobreviventes.

d). Contagem de Sobreviventes. As amostras tratadas termicamente e resfriadas, pelos dois métodos acima descritos, após feitas as diluições adequadas com água tamponada, semeou-se um ml de cada uma das três últimas diluições em placas Petri com TSA-YE derretido e resfriado a 45°C (em duplicata). Após a solidificação, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e posteriormente se fez a contagem do número de sobreviventes. O mesmo procedimento - foi usado para a contagem do número inicial de microrganismos inoculados nos frasco e nos tubos.

e). Cálculo dos Parâmetros de Resistência Térmica. O valor D foi calculado pela seguinte equação:

$$D = \frac{t}{\log(a) - \log(b)} \quad \text{equação 1.}$$

onde; a = número de microrganismos presentes inicialmente

b = número de microrganismos sobreviventes depois de um tempo t de tratamento térmico.

t = tempo de tratamento a temperatura constante

O valor de z foi calculado pela equação 2.

$$z = \frac{T_1 - T_2}{\log(D_1) - \log(D_2)} \quad \text{equação 2.}$$

onde; D₁ = valor D correspondente à temperatura T₁

D₂ = Valor D correspondente à temperatura T₂

TABELA 7. Procedência das Linhagens de *Salmonella* usadas neste trabalho.

Linhagem de <i>Salmonella</i>	Isoladas de	Procedência
<i>S. anatum</i> ¹	Carne de suíno	ITAL
<i>S. derby</i> ¹	Carne de suíno	ITAL
<i>S. gallinarum</i> ¹	Galináceos doentes	ITAL
<i>S. bredeney</i> ¹	Carne bovina	ITAL
<i>S. stanley</i>	Sem referência	ITAL
<i>S. pullorum</i>	Sem referência	ITAL
<i>S. derby</i> 15145	Sem referência	UNICAMP
<i>S. typhimurium</i>	Sem referência	UNICAMP
<i>S. oranienburg</i> 42	Sem referência	UNICAMP
<i>S. newington</i>	Sem referência	UNICAMP
<i>S. enteriditis</i> ²	Carne de frango	IAL
<i>S. paratyphi</i> B ²	Carne bovina	IAL
<i>S. paratyphi</i> C ²	Embutidos	IAL
<i>S. infantis</i> ²	Embutidos	IAL
<i>S. thompson</i> ²	Embutidos	IAL
<i>S. chester</i> ²	Embutidos	IAL
<i>S. reading</i> ²	Embutidos	IAL
<i>S. typhimurium</i> Tm-1 ³	Sem referência	WRLARS
<i>S. typhimurium</i> 9148 ⁴	Sem referência	DFSNUM
<i>S. oranienburg</i> ⁴	Sem referência	DFSNUM
<i>S. newport</i> ¹	Carne de suíno	ITAL

1 Isolada pelo Dr. M.F.F. Leitão.

2 Isolada pela Dra.D.S. Gelli.

3 Enviada pelo Dr. J.A. Garibaldi.

4 Enviada pelo Dr. O.J. Cotterill.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Resistência Térmica de *Salmonella* na Gema de Ovo.

Em gema de ovo, a resistência térmica de *Salmonella* é maior que em qualquer outro produto de ovo. Isto, aparentemente se deve a seu pH que é 6,2, portanto bastante próximo à neutralidade (33).

Os parâmetros da resistência térmica, D e z, de 15 linhagens de *Salmonella*, correspondentes a 12 sorótipos, determinados na gema natural, são listados na Tabela 8. Os valores obtidos no presente trabalho indicam que há uma variação do valor D nas diferentes linhagens de *Salmonella*, apresentando um valor $D_{57^{\circ}\text{C}}$ máximo de 4,9 minutos (*S. stanley*) e um valor mínimo de 2,1 minutos (*S. derby* 15145), tendo um valor médio de 3,3 minutos. Os valores $D_{53^{\circ}\text{C}}$ apresentam uma variação de 31,1 minutos (*S. derby*) a 13,9 minutos (*S. derby* 15145), tendo como valor médio 21,0 minutos.

Os valores de z determinados variaram de 5,9 como valor máximo e um valor mínimo de $4,1^{\circ}\text{C}$, tendo uma média de $5,0^{\circ}\text{C}$. Todos esses valores obtidos, foram similares aos observados por outros pesquisadores (21,33).

O processo recomendado para a pasteurização da gema é de 60°C durante 3,5 minutos. Nestas condições, considerando os valores médios dos parâmetros D e z obtidos neste trabalho, a redução de *Salmonella* foi de 99,99%. Tal valor de redução satisfaz as exigências requeridas na pasteurização desse produto (9,10). Sendo as proteínas da gema relativamente estáveis, esse tratamento causa pouco prejuízo as propriedades funcionais. Portanto, a gema de ovo é um produto de pasteurização relativamente fácil.

2. Resistência Térmica de *Salmonella* na Clara de Ovo.

Os parâmetros da resistência térmica, D e z, de 21 linhagens de *Salmonella*, correspondentes a 18 sorótipos, determinados na clara de ovo natural (pH 9,2) mais 0,05% de água oxigenada e na

clara com pH ajustado a 7,0, são listados na Tabela 9.

A variação do valor D das linhagens de *Salmonella* testadas não foi muito grande. Em clara natural com 0,05% de água oxigenada observou-se uma variação do valor D a 53°C de 2,3 minutos como valor máximo (*S. derby*) e um mínimo de 1,4 minutos (*S. enteriditis*), apresentando uma média de 1,7 minutos. O valor D a 50°C variou de 9,0 minutos (*S. infantis*) a 4 minutos (*S. enteriditis*), tendo um valor médio de 5,8 minutos.

A variação do valor D, determinados em clara com pH ajustado a 7,0 foi: D a 57°C, de 2,7 minutos como máximo (*S. anatum*) a 1,0 minutos (*S. newington*), apresentando um valor médio de 1,8 minutos; D a 53°C foi de 18,3 minutos como máximo (*S. paratyphi* B) a um mínimo de 8,8 minutos (*S. newington*), tendo a média de 12,0 minutos.

Os valores z foram calculados com os valores D a 53 e 50°C para o caso de clara natural com 0,05% de H_2O_2 e a 57°C e 53°C para clara ajustada a pH 7,0 usando a equação 2 (ver página 28). observou-se um valor ligeiramente superior nos valores z (aproximadamente 20%) em clara natural com 0,05% de H_2O_2 quando comparados com aqueles na clara de ovo com pH ajustado a 7,0. Os valores z na clara com 0,05% de água oxigenada variou de 4,1°C a 8,5°C, apresentando um valor médio de 6,2°C. Os valores z na clara com pH ajustado foi de 4,1°C a 5,7°C com uma média de 4,9°C.

Na mesma Tabela 9 apresenta-se a relação entre os valores D a 53°C determinados na clara a pH 7,0 e os determinados na clara natural com 0,05% de H_2O_2 à mesma temperatura, sendo definida esta relação como o número de vezes na diminuição do valor D pela adição de 0,05% de H_2O_2 . Observou-se, neste caso, que as linhagens de *Salmonella* que apresentaram maior termorresistência em clara com pH ajustado a 7,0, mostraram maior diminuição no seu valor D com a adição de água oxigenada. Estes resultados são apresentados graficamente na Figura 4 na qual a reta traçada foi calculada por regressão linear. O coeficiente de correlação r foi de 0,7462 sendo significativo estatisticamente a nível de 99%.

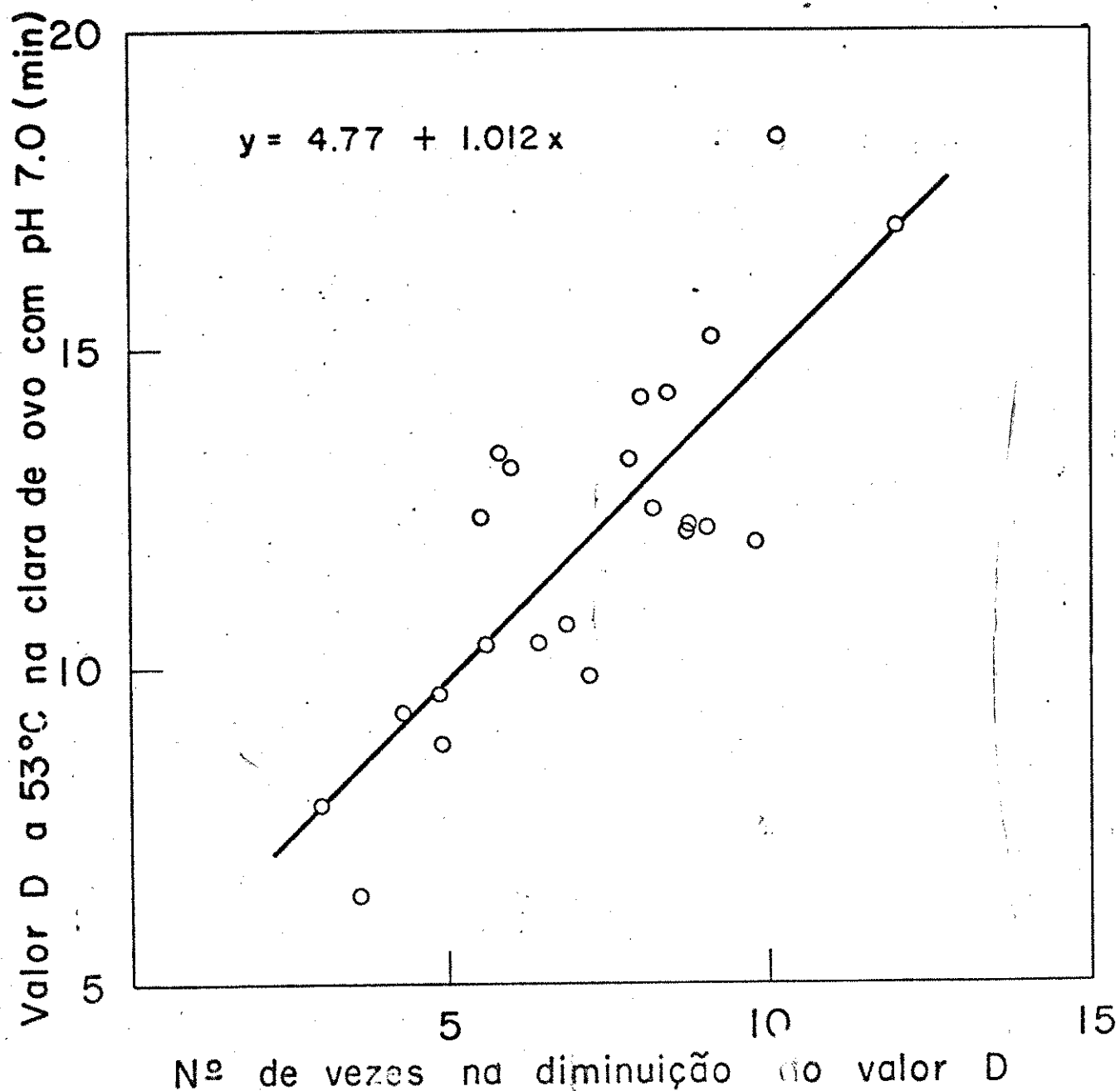


FIGURA 4. Número de vezes na redução do valor D de *Salmonella* com a adição de 0,05% de água oxigenada.

TABELA 8. Parâmetros da Resistência Térmica, D e z, de Algumas Linhagens de *Salmonella* em Gema de Ovo.

Linhagem de <i>Salmonella</i> .	Valores D (minutos) em Gema		Valores z (°C)
	57°C	53°C	
<i>S. anatum</i>	4,7	28,4	5,1
<i>S. derby</i> 15145	2,1	13,9	4,9
<i>S. derby</i>	3,4	31,1	4,2
<i>S. typhimurium</i> Tm-1	2,4	16,6	4,8
<i>S. typhimurium</i> 9148	3,1	14,7	5,9
<i>S. typhimurium</i>	2,9	17,7	5,1
<i>S. oranienburg</i> 42	4,2	21,0	5,7
<i>S. oranienburg</i>	2,8	22,5	4,4
<i>S. stanley</i>	4,9	26,2	5,8
<i>S. enteriditis</i>	2,4	18,3	4,5
<i>S. paratyphi</i> B	2,4	15,4	5,0
<i>S. newington</i>	2,8	17,8	5,0
<i>S. newport</i>	3,7	25,5	4,7
<i>S. gallinarum</i>	3,4	22,0	4,9
<i>S. pullorum</i>	3,7	22,4	5,1
Valores medios	3,3	21,0	5,0

TABELA 9. Parâmetros da Resistência Térmica de Algumas Linhagens de *Salmonella*
na Clara com pH 7,0 e na Clara Natural com 0,05% de Água Oxigenada.

Linhagem de	Valor D na clara		Valor z	Valor D na clara natural		Valor z	Número de vezes que diminui o valor D com 0,05% de H ₂ O ₂ .
	57°C	53°C		53°C	50°C		
<i>Salmonella</i>							
<i>S. anatum</i>	2,7	14,4	5,5	1,7	6,5	5,2	8,47
<i>S. derby</i> 15145	1,1	10,4	4,1	1,6	5,8	5,5	6,5
<i>S. derby</i>	2,1	13,4	5,0	2,3	6,7	6,5	5,82
<i>S. typhimurium</i> Tm-1	1,3	12,0	4,1	1,2	5,9	4,4	10,00
<i>S. typhimurium</i> 9148	1,8	9,3	5,7	2,2	5,2	7,9	4,22
<i>S. typhimurium</i>	1,9	9,9	5,6	1,4	5,6	4,9	7,07
<i>S. oranienburg</i> 47	2,3	13,2	5,2	2,2	5,3	7,8	6,00
<i>S. oranienburg</i>	1,5	12,2	4,5	1,4	5,3	5,1	8,71
<i>S. stanley</i>	1,4	10,7	4,5	1,6	5,2	5,7	6,68
<i>S. enteritidis</i>	2,2	12,2	5,3	1,4	4,0	5,4	8,71
<i>S. paratyphi</i> B	2,3	18,3	4,4	1,8	6,2	5,6	10,16
<i>S. newington</i>	1,0	8,8	4,3	1,8	7,0	5,1	4,89
<i>S. newport</i>	1,3	6,4	5,7	1,8	4,0	8,5	3,55
<i>S. gallinarum</i>	2,1	12,2	5,2	1,4	4,3	6,2	8,71
<i>S. pullorum</i>	2,2	12,4	5,4	2,2	5,8	7,3	5,63
<i>S. bredeney</i>	1,8	12,5	4,7	1,5	6,7	4,7	8,33
<i>S. paratyphi</i> C	2,2	14,3	4,9	1,8	5,0	6,7	7,94
<i>S. infantis</i>	2,1	13,3	4,9	1,7	9,0	4,1	7,82
<i>S. thompson</i>	2,1	15,2	4,6	1,7	6,4	5,1	8,94
<i>S. chester</i>	1,7	9,6	5,3	1,9	5,6	6,5	5,05
<i>S. reading</i>	1,4	10,4	4,5	1,9	6,3	5,6	5,47

A variação da diminuição do valor D foi de 10,2 a 3,6 vezes, tendo como valor médio de 7,1 vezes.

3. Comparação dos Métodos Usados na Determinação da Resistência Térmica de Salmonella.

Para todas as experiências feitas em clara de ovo com H_2O_2 foi necessário o uso do método do frasco para a determinação dos parâmetros D e z. Esse método permite controlar o tempo inicial de ação da água oxigenada sobre os microrganismos, uma vez que a adição desse componente é feita após a obtenção da temperatura de operação. O método do tubo TDT não selado não permite tal procedimento. Para poder efetuar a comparação dos resultados obtidos por um e outro método, foram feitas algumas experiências determinando o valor D na clara com pH ajustado a 7,0 pelo método do frasco. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos pelos dois métodos. Tais resultados indicam que pode ser comparados já que não apresentaram diferenças significativas. Em geral, os valores D obtidos pelo método do frasco é ligeiramente inferior ao do método do tubo TDT não selado, porém a diferença é muito pequena (cerca de 2%).

TABELA 10. Comparação dos Resultados dos Valores D e z Obtidos pelos Dois Métodos Usados.

Linhagem de	Método tubo TDT não selado			Método do frasco		
	Valor D na clara pH 7,0 (minutos)		Valor z (°C)	Valor D na clara pH 7,0 (minutos)		Valor z (°C)
	57°C	53°C		57°C	53°C	
<i>Salmonella</i>						
<i>S. anatum</i>	2,7	14,4	5,5	2,4	13,9	5,2
<i>S. derby</i>	2,1	13,4	5,0	2,1	14,0	4,9
<i>S. enteriditis</i>	2,2	12,2	5,3	2,1	11,7	5,4

4. Efeito da Concentração da Água Oxigenada na Resistência Térmica de Salmonella na Clara de Ovo.

Vários pesquisadores tem estudado a influência da concentração da H_2O_2 sobre a resistência térmica e crescimento de *Salmonella*

(4,42,50,51). Na maioria dos resultados dessas pesquisas, os parâmetros da resistência térmica tem sido indicados em forma de valor F (tempo em minutos, a uma temperatura letal definida, necessários para eliminar todos os microrganismos presentes), mas, poucas são as pesquisas feitas para determinar os parâmetros da termorresistência, D e z, de *Salmonella* na clara natural com a adição de H_2O_2 .

Neste trabalho, para a determinação do efeito de H_2O_2 sobre a resistência térmica de *Salmonella* na clara natural foram usadas 4 linhagens, das quais 3 dessas linhagens foram escolhidas pelo seu comportamento (valor D a $53^{\circ}C$) na clara natural com 0,05% de H_2O_2 . Por exemplo; a *S. derby* que nessas condições foi a que apresentou a maior termorresistência (D=2,3 minutos), *S. anatum* com um valor intermediário (D=1,7 minutos) e *S. enteritidis* que apresentou ser a mais sensível ao calor nessas condições. (D=1,4 minutos). A *S. typhimurium* Tm-1 foi escolhida como linhagem teste, já que é a linhagem usada na maioria das pesquisas feitas para a determinação dos parâmetros da resistência térmica de *Salmonella* em produtos de ovo.

Os resultados dos valores D e z das 4 linhagens de *Salmonella* determinados na clara natural com adição de 0,01, 0,03, 0,05, 0,07 e 0,1% de água oxigenada a 53 e $50^{\circ}C$, são relacionados na Tabela 11.

Os valores z determinados nesse experimento, não apresentaram muita variação, tendo como valores médios de 5,6, 5,3, 5,5, 5,4 e $5,8^{\circ}C$ para as diferentes concentrações de H_2O_2 respectivamente.

As figuras 5 e 6 mostram graficamente os valores D relacionados na Tabela 11. Observe-se que a diminuição do valor D de todas as linhagens de *Salmonella*, determinados na clara de ovo natural e com 0,03% de H_2O_2 foi muito pequena comparado com aquele obtido na clara natural com 0,01% de H_2O_2 . Nestas condições, a variação do valor D a $53^{\circ}C$ médio foi de 2,6 a 2,4 minutos e a variação do valor médio de D a $50^{\circ}C$ foi de 9,0 a 9,1 minutos. Com 0,05% de H_2O_2 a variação na diminuição do valor D foi mais notório, apresentando um valor D a $53^{\circ}C$ médio de 1,6 minutos e o valor D a $50^{\circ}C$ médio de 5,8 minutos. Esta variação foi maior quando adicionou-se 0,07% de H_2O_2 , sendo o valor médio de D a $53^{\circ}C$, 0,94 minutos e o valor médio de D a $50^{\circ}C$ de

3,4 minutos. Quando adicionado 0,1% de H_2O_2 , a diminuição do valor D comparado com aquele determinado na clara natural com 0,07% de H_2O_2 , foi novamente pequena apresentando como valor médio de D a $53^{\circ}C$ 0,69 minutos e o valor médio de D a $50^{\circ}C$ foi de 2,5 minutos.

Watson et al (50) estudaram o efeito da concentração da H_2O_2 no meio sobre o crescimento bacteriano. As figuras 5 e 6 podem ser relacionados com os resultados obtidos nesse estudo. Esses pesquisadores observaram que a fase de latência do crescimento de *Staphylococcus aureus* aumentava a medida que aumentava a concentração de H_2O_2 adicionada ao meio. O efeito da adição de 0,03% de H_2O_2 sobre a fase de latência do crescimento não teve grande diferença comparado com o efeito provocado pela adição de 0,01% de H_2O_2 . A concentrações de 0,03 a 0,05% de H_2O_2 , tal efeito foi aumentado consideravelmente, passando de uma fase de latência de 1,5 horas para 6,0 horas. A concentração maior que 0,05% de H_2O_2 , apresentava, além do aumento da fase de latência do crescimento bacteriano, um outro efeito que era uma diminuição do número de células presentes inicialmente. Este último efeito foi observado depois de 1,5 horas de ação da água oxigenada.

Em processos comerciais de pasteurização da clara de ovo, usando a H_2O_2 como auxiliar, recomenda-se a adição de 0,05% (4,49, 51). Note-se, entretanto, que sob o ponto de vista da destruição de *Salmonella*, os efeitos mais pronunciados da água oxigenada foram em concentrações de 0,07 a 0,1% de H_2O_2 . A adição de H_2O_2 a tais níveis de concentração não afetam as propriedades funcionais da clara, pelo contrário, exercem um efeito benéfico no tempo de batadura e no volume do bolo esponjoso (12).

Os processos recomendados para a pasteurização da clara de ovo com diferentes porcentagens de água oxigenada, são mostrados na Figura 7. As curvas foram calculadas com base no tratamento térmico de 4D, ou seja, uma destruição de 99,99% de *Salmonella* presente. Os valores D e z, considerados neste cálculo foi o valor médio das 4 linhagens de *Salmonella* testadas. Para clara natural com 0,1% de H_2O_2 foi necessário um tratamento a $53^{\circ}C$ durante 2,8 minutos ou um trata

mento equivalente de letalidade, por exemplo; 10 minutos a 50°C. Na clara natural com 0,07% de água oxigenada foi necessário um tratamento a 53°C durante 3,8 minutos ou seu equivalente de letalidade. Para clara de ovo natural com 0,05% de água oxigenada, recomenda-se um tratamento a 53°C durante 6,5 minutos ou seu equivalente de letalidade. Na clara com 0,03 ou 0,01% de água oxigenada o tratamento deve ser a 53°C durante 10 minutos ou a 50°C durante 36,3 minutos.

TABELA 11. Efeito da Concentração de Água Oxigenada Sobre a Resistência Térmica de *Salmonella*.

Linhagem de	0,01% H ₂ O ₂			0,03% H ₂ O ₂			0,05% H ₂ O ₂			0,07% H ₂ O ₂			0,1% H ₂ O ₂		
	D (min)		z	D (min)		z	D (min)		z	D (min)		z	D (min)		z
	53°C	50°C		53°C	50°C		53°C	50°C		53°C	50°C		53°C	50°C	
<i>Salmonella</i>															
<i>S. anatum</i>	2,4	7,7	5,9	2,1	7,9	5,2	1,7	6,5	5,2	0,93	2,8	6,3	0,69	2,7	6,6
<i>S. derby</i>	2,7	8,3	6,2	2,6	7,9	6,2	2,3	6,7	6,5	0,97	4,2	4,7	0,86	2,6	6,1
<i>S. typhimurium</i> Tm-1	2,3	10,2	4,6	2,8	10,4	5,2	1,2	5,9	4,3	0,94	3,5	5,3	0,57	2,0	5,5
<i>S. enteriditis</i>	2,9	9,9	5,6	2,3	10,1	4,7	1,3	4,0	6,1	0,92	3,3	5,4	0,67	2,8	4,8

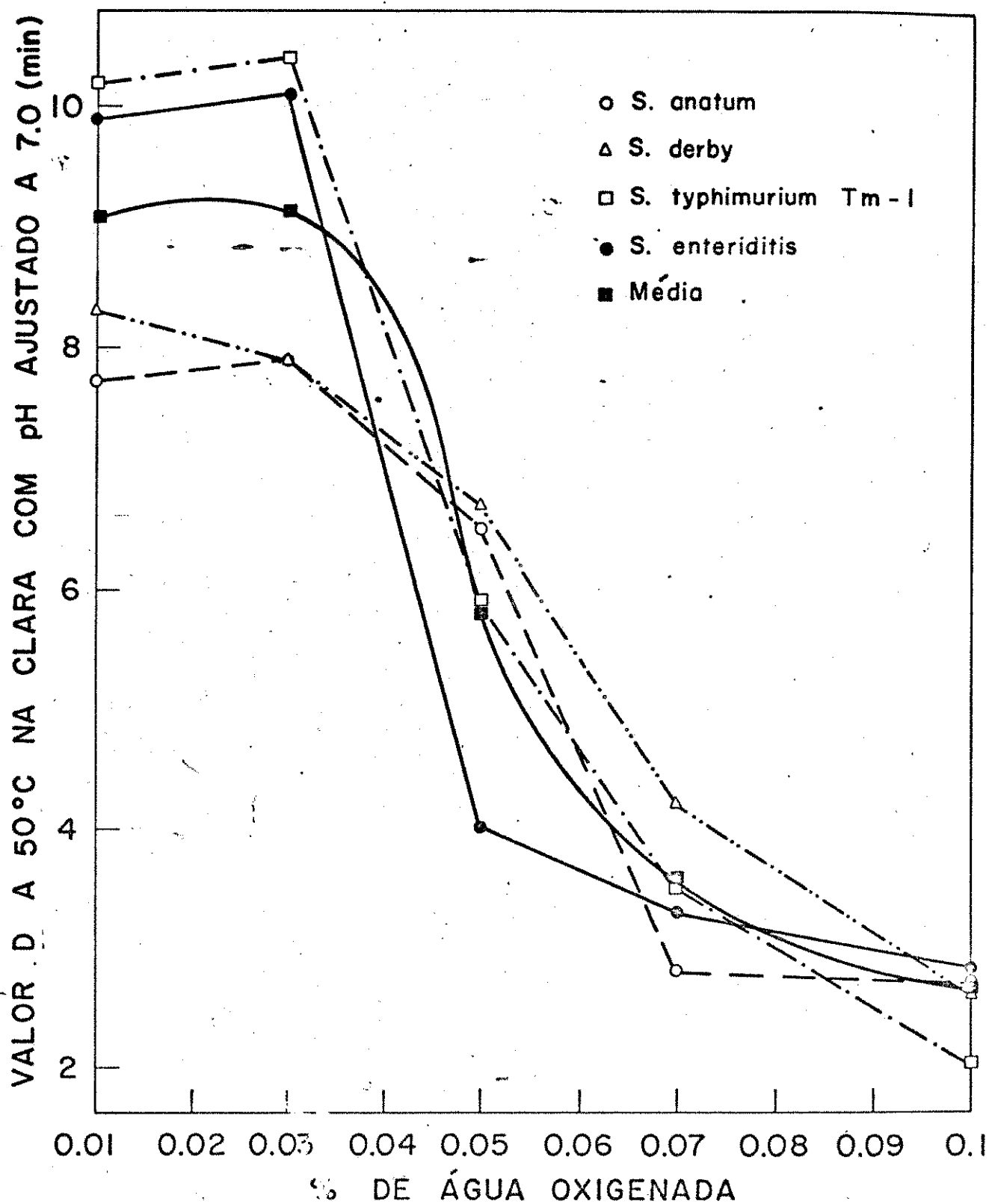


FIGURA 5. Efeito da concentração de água oxigenada sobre a resistência térmica de *Salmonella* (50°C).

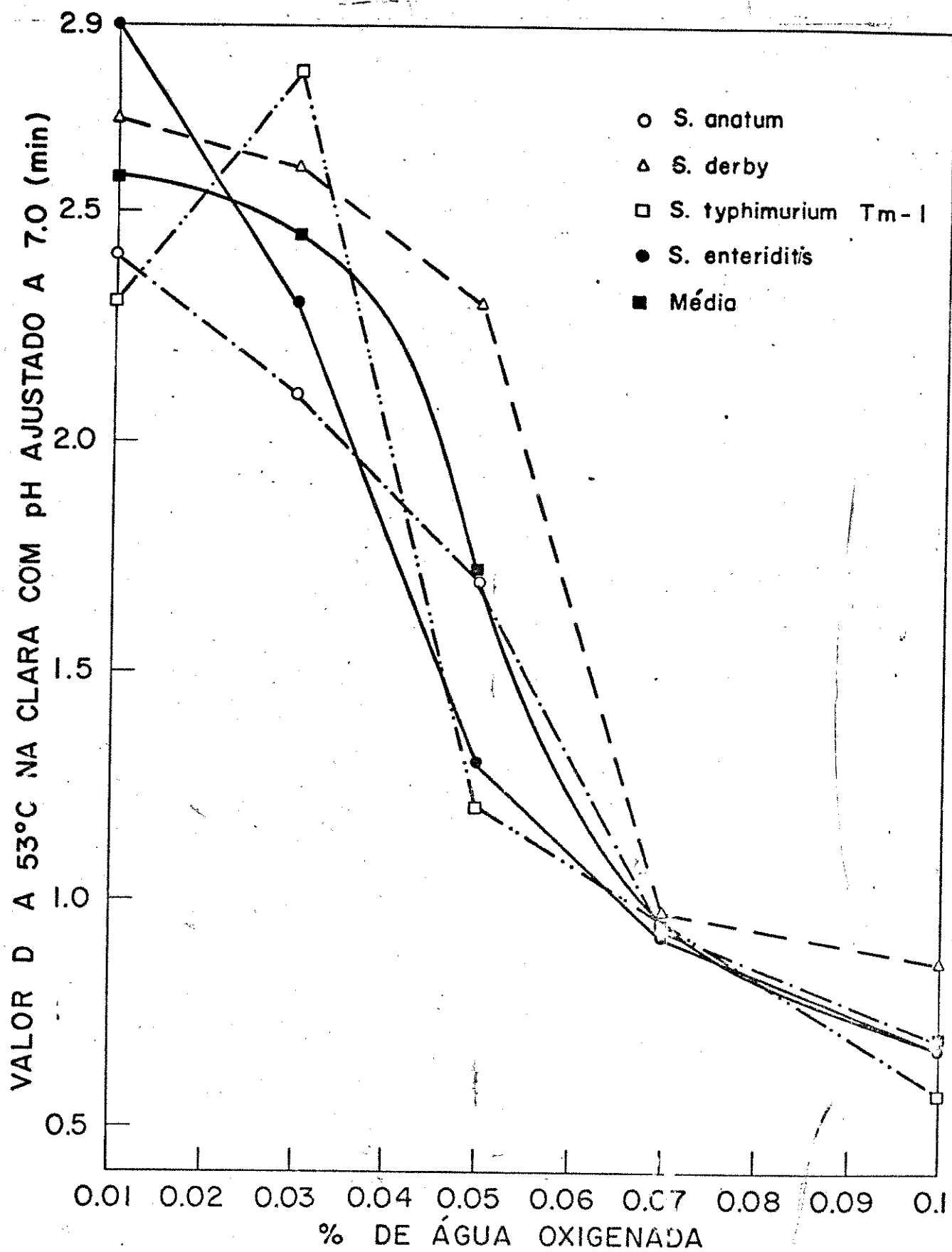


FIGURA 6. Efeito da concentração de água oxigenada sobre a resistência térmica de *Salmonella* (53°)

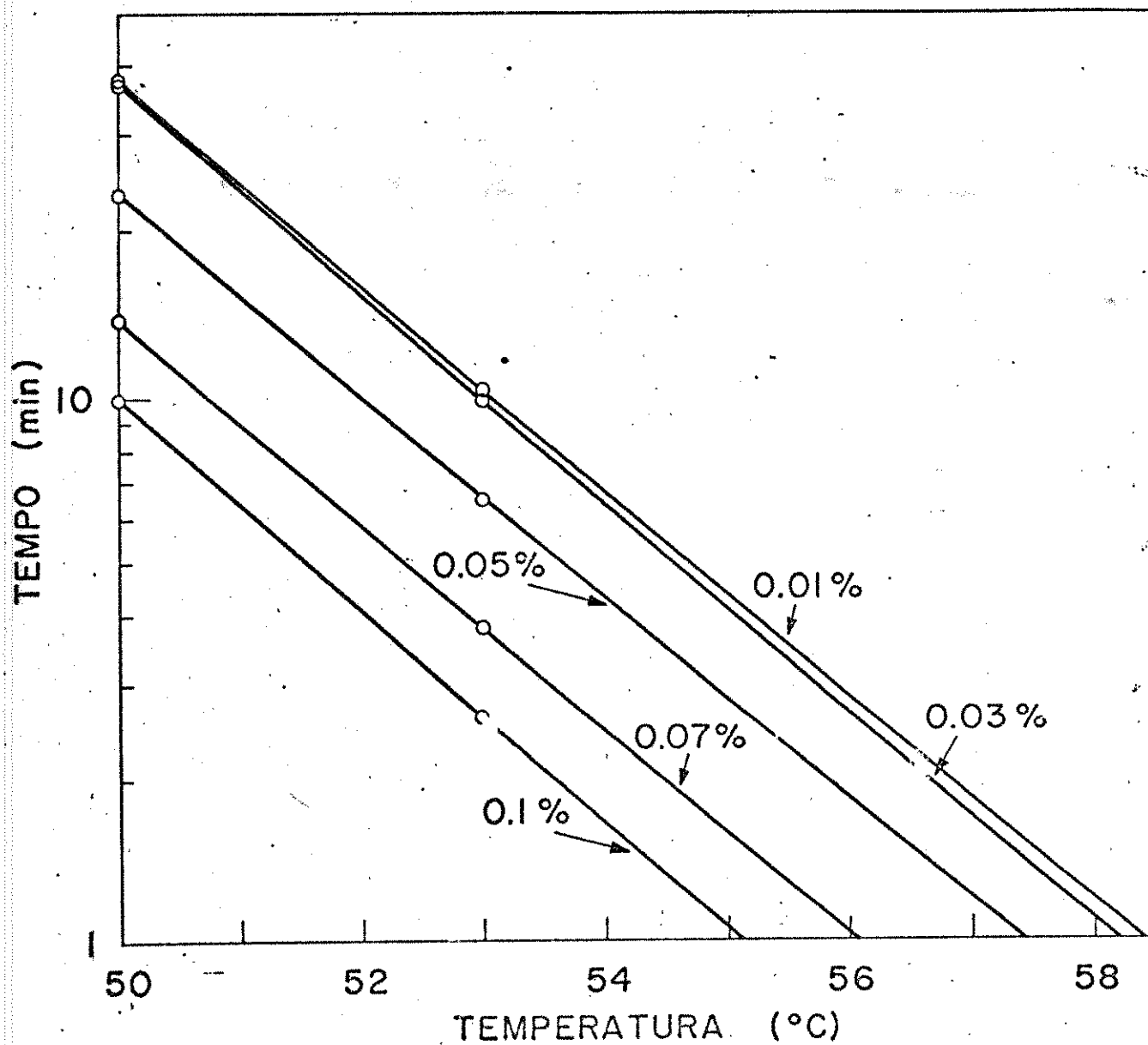


FIGURA 7. Curvas de processamento térmico da clara com diferentes porcentagens de água oxigenada.

CONCLUSÕES

1. Os resultados dos parâmetros D e z obtidos na gema de ovo são similares aos obtidos por outros pesquisadores de modo que o processo recomendado para a pasteurização a 60°C durante um tempo mínimo de 3,5 minutos é suficiente para destruir as bactérias estudadas neste trabalho.
2. Na clara de ovo, observou-se que a redução da resistência térmica pela adição de 0,5% de água oxigenada foi maior nas linhagens de *Salmonella* que apresentaram maior resistência térmica na clara com pH ajustado a 7,0.
3. As concentrações de pelo menos 0,07% de água oxigenada é desejável para se obter um efeito satisfatório na aplicação em combinação com o tratamento térmico na pasteurização da clara de ovo.
4. Como resultado da conclusão 3, o processo mais recomendado para a pasteurização da clara de ovo com adição de água oxigenada seria utilizando 0,07% de água oxigenada e tratada a 51°C durante 9 minutos ou de equivalente letalidade sempre e quando não sejam afetadas as propriedades funcionais do produto.

BIBLIOGRAFIA

1. Alder, H.E.; *Salmonella* in eggs - An apraisal. Food Technology 19:4 191-193 (1965).
2. Anellis, A., Lubas, J, e Rayman, M.N.. Heat resistance in liquid eggs of some strains of the genus *Salmonella*. Food Research 19:377-95 (1954).
3. Anon, H.. The pasteurization of liquid egg. Food Manufacturing 25:283-86 (1950).
4. Ayres, J.C. e Slosberg, . Destruction of *Salmonella* in egg albumen. Food Technology 3:6 180-83 (1949).
5. Barnes, E.M. e Corry, J.E.L.. Microbial flora of raw and pasteurized egg albumen. Jour. Appl. Bacteriology 32:2 193-205 (1969).
6. Barriele, J.C. e Cone, F.J.. Effect of added moisture on the heat resistance of *Salmonella anatum* in milk chocolate. Appl. Microbiology 19:1 177-78 (1970).
7. Bruch, C.W. e Koesterer, M.G.. Destruction of enteric bacteria in liquid egg with propiolactone. Appl. Microbiology 10-123 (1962).
8. Campbell, J.E. e Dimmick, R.L.. Effect of 3% hydrogen peroxide on the viability of *Serratia marcescens*. Jour. Bacteriology 91:3 925-29 (1968).
9. Cotterill, O.J., Equivalent pasteurization temperatures to kill *Salmonellae* in liquid egg white a various pH levels. Poultry Science 47:354-65 (1968).
10. Cotterill, O.J., e Glauert, J.. Thermal resistance of *Salmonellae* in egg yolk products containing sugar or salt. Poultry Science 47:1156 (1968).

11. Cotterill, O.J., Glauert, J. e Krause, G:F.. Thermal destruction curves for *Salmonella oranienburg* in egg products. Poultry Science 52:2 568-77 (1973).
12. Cunningham, F.E. e Cotterill, O.J.. Factors affecting alkaline coagulation of egg white. Poultry Science 41:1453-61 (1962).
13. _____, Garibaldi, J.A., Ijichi, K. e Lineweaver, H.. Pasteurization of liquid egg white. World's Poultry Science 21:365-69 (1965).
14. _____ e Lineweaver, H.. Stabilization of egg-white proteins to pasteurizing temperatures above 60°C. Food Technology 19:9 1442-46 (1965).
15. _____, _____, Ijichi, K. e Garibaldi, J.J.. Pasteurization of liquid egg white above 140°F. Poultry Science 43:1311 (1964).
16. FAO. Lecheria Latinoamericana. Centro Regional de Capacitación en Lecheria de FAO. Vol 5:2 54-58 Santiago, Chile. (1962).
17. Frazier W.C.. Microbiología de los alimentos. Ed Acribia, Zaragoza, España. pag 89 (1972).
18. Garibaldi, J.A.. Acetic acid as a means of lowering the heat resistance of *Salmonella* in yolk products. Food Technology 22:8 1031-33 (1968).
19. _____, Ijichi, K. e Bayne, H.G.. Effect of pH and chelating agents on the heat resistance and viability of *Salmonella typhimurium* Tm-1 and *Salmonella senftenberg* 775W in egg white. Appl. Microbiology 18:3 318-22 (1969).
20. _____, Lineweaver, H. e Ijichi, K.. Number of *Salmonellae* in commercially broken egg before pasteurization. Poultry Science 48:3 1096-101 (1969).

21. Garibaldi, J.A., Straka, R.P. e Ijichi, K.. Heat resistance of *Salmonella* in various egg products. Appl. Microbiology 17:4 491-96. (1969).
22. Goepfert, J.M., Iskander, I.K. e Amundson, C.H.. Relation of the heat resistance of *Salmonella* to the water activity on the environment. Appl. Microbiology 19:3 429-33 (1970).
23. Ito, K.A., Denny, C.B., Brown, C.K., Yao, M. e Seeger, M.L.. Resistance of bacterial spores to the hydrogen peroxide. Food Technology 27:11 58-66 (1973).
24. Jay, J.M., Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España. página 148 (1973).
25. Kline, L., Sugihara, T.F., Bean, M.L. e Ijichi, K.. Heat pasteurization of raw liquid egg white. Food Technology 19:11 1709-18 (1965).
26. _____, _____ e Ijichi, K.. Further studies on heat pasteurization of raw liquid egg white. Food Technology 20:1 1604-06 (1966).
27. Kohl, F.W.. A new process for pasteurizing egg white. Food Technology 25:11 1176-84 (1971).
28. Latergan, P.M. e Vaughn, R.H.. The influence of chemical additives on the heat resistance of *Salmonella typhimurium* in liquid whole egg. Journal of Food Science 29: 339-344 (1964).
29. March, B.E.. Bacterial infection of washed and unwashed egg with reference to *Salmonella*. Appl. Microbiology 17:1 98-101 (1969).
30. Mc Nelly, E.H.. Some factors related to the incidence of bacterial infection of shell egg. Poultry Science 32: 915 (1953).

31. Mink, L.D. e Sillicker, J.H.. Treatment of egg material U.P. patent 3,028,245; Abril 3, (1962).
32. Ng, H., Bayne, H, e Garibaldi, J.A.. Heat resistance of *Salmonella*: The uniqueness of *Salmonella senftenberg* 775W. Appl. Microbiology 17:1 78-82 (1969).
33. Osborne; W.M., Straka, R.P. e Lineweaver, H.. Heat resistance of *Salmonella* in liquid whole egg, egg yolk and egg white. Food Research 19: 451-63 (1954).
34. Palmer, H.H., Ijichi, K., Cimino, S.L. e Roff, H.. Salted egg yolk. 2- Viscosity and performance of acidified pasteurized and frozen samples. Food Technology 23:11 486-88 (1969).
35. _____ , _____ e Roff, H.. Sugared egg yolk: Effect of pasteurization and freezing on performance and viscosity. Food Technology 23:12 1581-85 (1969).
36. Privett, O.S., Bland, M.L. e Schmit, J.A.. Studies of the composition of egg lipid. Journal of Food Science 24: 463-68 (1962).
37. Riemann, H.. Food-borne infections and intoxications. Academic Press, New York, N.Y. pag. 52 (1969).
38. _____ . Effect of water activity on the heat resistance of *Salmonella* in dry materials. Appl. Microbiology 16:10 1621-22 (1968).
39. Romanoff, A.L. e Romanoff, A.J.. The avian egg. JONH, WILEY & SONS, INC, New York, N.Y. Cap 8 (1949).
40. Sauter, E.A. e Petersen, C.F.. The effect of shell egg quality on penetration by various *Salmonellas*. Poultry Science 53:6 2159-62 (1974).

41. Scalzo, A.M., Dickerson, R.W., Read, R.B. e Parker, R.W.. Resi-
dence time of egg products in holding tubes of egg
pasteurizers. Food Technology 23:5 678-83 (1969).
42. Sebring, M., Rogers, A.B. e Pankey, G.. Low twmperature paste-
zation of egg products. 1. Effect of heat and hy-
drogen peroxide on functinal and bacteriological
proprieties of liquid egg white. Poultry Science 44:
1414 (1965).
43. Shafi, R., Cotterill, O.J. e Nichols, M.L.. Microbial flora of
comercially pasteurized egg products. Poultry Scin-
ce 49:2 578-85 (1970).
44. Slosberg, H.M., Hanson, H.L., Stewart, G.F. e Lawe, B.. Factors
influencing the effects of heat tratament on the
leavening power of egg white. Poultry Science 27:
294 (1948).
45. Snider, D.W. e Cotterill, O.J.. Hydrogen peroxide oxidation and
coagulation of egg white. Journal of Food Science
37: 558-61 (1972).
46. Stadelman, W.J. e Cotterill, O.J.. Egg science and technology.
The A'I PUBLISHING COMPANY, INC, New York, N.Y.
Cap. o (1973).
47. Stumbo, S.R.. Thermo-bacteriology in food processing. Academic
Press, New York, N.Y. (1973).
48. Sugihara, T.F., Michi, J.C. e Kline, L.. Heat pasteurization of
liquid whole egg. Food Technology 20:8 1078-83
(1966).
49. U.S. Departament of Agriculture, A.R.S.. Egg pasteurization ma-
nual. A.R.S. 74-48 (1969).
50. Waston, J.A. e Schubert, J.. Action of hydrogen peroxide on
growth inhibition of *Salmonella typhimurium*. Jour.

of General Microbiology. 57: 25-34 (1969).

51. Wilcox, G.. Eggs, cheese and yogurt processing. Food Processing Review Nº 17 (1971).
52. Wilkin, M. e Winter, A.R.. Pateurizarion of egg yolk and white Poultry Science 26: 136 (1947).
53. Wrinkle, C., Weiser, H.H. e Winter, A.R.. Bacterial flora of frozen egg products. Food Research 15: 91-98 (1950).
54. Yokoya, F.. Microbiologia de processos e produtos alimenticios. Publicadø pela Fundação Centro Trapical de Pesquisas e Tecnología de Alimentos. Campinas, S.P. pág. 184 (1974).

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Fumio Yokoya, pela orientação e dedicação durante a realização deste trabalho.

À Direção da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, pelas facilidades oferecidas para o desenvolvimento desta tese.

Ao Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (MÉXICO), pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidad Autónoma de Sinaloa (MÉXICO).

Ao Doutor Mauro Farber de Freitas Leitão, pela sua amizade, apoio e colaboração oferecida durante a minha estadia no Brasil.

À Doutora Dilma Scalla Gelli, pelo fornecimento de material usado neste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Sra. Rosa Maria Tavares Andrasso Tosello e Fernando Leite Hoffmann, pela colaboração nas experiências realizadas.

Aos professores, companheiros e colegas, e a todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese.