Tadeu Chaves de Figueiredo

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES E DO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E NOS NÍVEIS DE AMINAS BIOATIVAS EM OVOS PARA EXPORTAÇÃO

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.
Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.
Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado.

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2012

F475i Figueiredo, Tadeu Chaves de, 1981-
Influência das condições e do período de armazenamento nas características físico-químicas, microbiológicas e nos níveis de aminas bioativas em ovos para exportação/ Tadeu Chaves de Figueiredo. – 2012.
113 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Ovos – Qualidade – Teses. 2. Ovos – Armazenamento – Teses. 3. Ovos – Embalagem – Teses. 4. Ovos – Microbiologia – Teses. I. Cançado, Silvana de Vasconcelos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637.5

Tese defendida e aprovada em 25 de maio de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profª. Silvana de Vasconcelos Cançado
Presidente

Prof. Luiz Guilherme Dias Heneine

Profª. Daniela Duarte de Oliveira

Prof. Marcelo Resende de Souza

Prof. Leonardo José Camargos Lara

Profª. Lilian Viana Teixeira

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA.

À Fundação Ezequiel Dias – Funed.

Ao Aviário Santo Antônio –ASA.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

A Deus, pela oportunidade e por ter colocado em meu caminho pessoas especiais.

À Roane pelo amor, carinho, paciência, compreensão e companheirismo durante todo esse tempo.

A meus pais, pelos ensinamentos, por valorizar a educação, pelo incentivo, por acreditar em mim e ter orgulho das minhas conquistas.

A todos meus familiares que estiveram ao meu lado durante este tempo, pelo incentivo constante e apoio, em especial ao Lucas, Samanta, Clara, Miguel, tios (Max, Má, Ana, Raquel e Tilois), primas (Virgínia, Cecília, Isabel) e também ao Márcio, Célia, Fabrícia e Paulo.

À Profª Silvana pela oportunidade, amizade, conselhos, por confiar, me apoiar e orientar este trabalho.

À Liliane, pela ajuda e apoio para realização da parte experimental no IMA e principalmente pela amizade.

Ao Luiz Guilherme pela colaboração, ensinamentos, disponibilidade e paciência durante a parte experimental na Funed.

Aos amigos que auxiliaram na execução deste trabalho, Daniela Oliveira, Débora, Arina, Eronilda, Roger, José Marques, Ilka, Rodrigo, Letícia, Isabela Rêgo, Lídia, Julieta, Carla, Isabela Canhas, Guilherme e Ricardo.

Aos Professores Marcelo e Leonardo pela amizade, conselhos, ensinamentos e exemplo profissional.

Ao Prof. Afonso pelo apoio e por ter compartilhado comigo sua experiência docente durante o tempo em que fui professor substituto.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, em especial ao Miltinho e Profª Lílian.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Zootecnia, em especial ao Prof. Baião, Profª.Ângela e Júlia.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO 15
ABSTRACT 16
1. INTRODUÇÃO 17
2. REVISÃO DE LITERATURA 18
2.1. Qualidade Interna dos Ovos 18
2.2. Parâmetros de avaliação da qualidade interna de ovos 19
2.3. Efeitos do tempo e temperatura de armazenamento sobre a qualidade dos ovos 20
2.4. Efeitos da aplicação de óleo mineral sobre a casca na qualidade interna de ovos 24
2.5. Efeito da utilização de embalagem sobre a qualidade interna de ovos 27
2.6. Defesas do ovo contra a contaminação microbiana 29
2.6.1. Barreiras físicas do ovo 29
2.6.2. Defesas químicas do ovo 31
2.7. Modo de contaminação do ovo 33
2.8. Micro-organismos envolvidos na contaminação de ovos 34
2.9. Aminas bioativas 41
2.9.1. Poliaminas 42
2.9.2. Aminas em alimentos 45
2.9.3. Efeitos tóxicos das aminas 46
2.9.4. Aminas bioativas em ovos 48
2.10. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE-UV para quantificação de aminas bioativas em gema e albúmen de ovos 49
2.10.1. Linearidade 50
2.10.2. Seletividade 51
2.10.3. Precisão 51
2.10.4. Exatidão 52
2.10.5. Limite de detecção 52
2.10.6. Limite de quantificação 53
3. MATERIAL E MÉTODOS 53
3.1. Validação do método analítico por CLAE-UV para quantificação de aminas bioativas em gema e albúmen de ovos 53
3.1.1. Método de determinação de aminas bioativas 53
3.1.2. Reagentes e padrões 53
3.1.3. Preparo dos reagentes e padrões 54
3.1.4. Preparo das amostras 54
3.1.5. Condições cromatográficas 55
3.1.6. Procedimentos de validação 55
3.1.6.1. Linearidade 55
3.1.6.2. Seletividade 55
3.1.6.3. Limites de detecção e quantificação 55
3.1.6.4. Precisão 56
3.1.6.5. Exatidão 56
3.2. Análises físico-químicas, microbiológicas e aminas bioativas 56
3.2.1. Ovos 56
3.2.2. Variáveis avaliadas 57
3.2.2.1. Determinação do peso do ovo 58

3.2.2.2. Altura do albúmen e Unidade Haugh (UH) 58
3.2.2.3. pH do albúmen 58
3.2.2.4. Análises microbiológicas 58
3.2.2.5. Determinação dos teores de aminas bioativas 59
3.3. Delineamento Experimental 59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 59
4.1. Validação da metodologia para quantificação de aminas em gema e albúmen de ovos 59
4.1.1. Linearidade 59
4.1.2. Seletividade 63
4.1.3. Limite de detecção e quantificação 65
4.1.4. Exatidão e precisão 66
4.2. Análises físico-químicas 68
4.2.1. Unidades Haugh (UH) 68
4.2.1.1. UH dos ovos com ou sem aplicação de óleo mineral 69
4.2.1.2. UH dos ovos com ou sem utilização de embalagem 71
4.2.1.3. UH dos ovos com aplicação de óleo mineral e com embalagem 72
4.2.2. pH do albúmen 74
4.2.2.1. pH do albúmen dos ovos com ou sem aplicação de óleo mineral 76
4.2.2.2. pH do albúmen dos ovos com ou sem embalagem 77
4.2.2.3. pH do albúmen de ovos com aplicação de óleo mineral e com embalagem 78
4.2.3. Perda de peso dos ovos 78
4.2.3.1. Peso dos ovos com ou sem aplicação de óleo 79
4.2.3.2. Peso dos ovos com ou sem utilização de embalagem 79
4.2.3.3. Peso dos ovos com aplicação de óleo mineral e com embalagem 79
4.3. Análises microbiológicas 81
4.3.1. *Salmonella* spp. 82
4.3.2. *Staphylococcus* spp. 84
4.3.3. Bolores e leveduras 86
4.3.4. Coliformes totais e termotolerantes 87
4.3.5. Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis 88
4.3.6.Micro-organismos psicrotróficos 91
4.4. Aminas bioativas em gema e albúmen de ovos 92
4.4.1. Correlação entre aminas bioativas, resultados físico-químicos e microbiológicos 99
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 100
6. CONCLUSÃO 100
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proteínas do albúmen do ovo	32
Tabela 2	Micro-organismos mais comuns que podem ser encontrados em ovos.	35
Tabela 3	Composição aminoacídica das proteínas do ovo	42
Tabela 4	Valores de recuperação e coeficiente de variação considerados aceitáveis para resultados quantitativos	52
Tabela 5	Gradiente de eluição para as fases móveis água e acetonitrila utilizadas na determinação de aminas	55
Tabela 6	Equações de regressão linear, coeficientes de determinação e de correlação das curvas analíticas para cada amina adicionada a matriz gema e albúmen	63
Tabela 7	Limites de detecção e de quantificação do método para matriz gema e albúmen	66
Tabela 8	Recuperações médias e coeficientes de variação de aminas nas matrizes gema e albúmen	67
Tabela 9	Médias dos valores de UH de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração	68
Tabela 10	Médias dos valores de UH de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração	69
Tabela 11	Equações de regressão dos valores de UH de ovos armazenados durante 125 dias sob refrigeração	73
Tabela 12	Médias dos valores de pH do albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração	74
Tabela 13	Valores do pH do albúmen, equações de regressão e coeficientes de determinação obtidos para o efeito do tempo de armazenamento e aplicação ou não de óleo mineral e utilização ou não de embalagem durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração	75
Tabela 14	Médias dos pesos dos ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração	78

Tabela 15 Valores dos pesos dos ovos, equações de regressão e coeficientes de determinação obtidos para o efeito do tempo de armazenamento em ovos durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração 80

Tabela 16 Contagens médias (UFC/g x 10^0) de *Staphylococcus* spp. no conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 124 dias de armazenamento sob refrigeração 85

Tabela 17 Contagens médias (UFC/g) de coliformes totais no conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 124 dias de armazenamento sob refrigeração 87

Tabela 18 Contagens médias (UFC/g) de micro-organismos mesófilos aeróbios no conteúdo interno de ovos, com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 124 dias de armazenamento sob refrigeração 89

Tabela 19 Contagens médias (UFC/g) de micro-organismos psicrotróficos no conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 124 dias de armazenamento sob refrigeração 91

Tabela 20 Médias dos teores de putrescina (mg/100g) na gema e albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração 93

Tabela 21 Médias dos teores de cadaverina (mg/100g) na gema e albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração 94

Tabela 22 Médias dos teores de feniletilamina (mg/100g) no albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração 96

Tabela 23 Médias dos teores de espermidina (mg/100g) na gema de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração 98

Tabela 24 Médias dos teores de espermina (mg/100g) na gema de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração 98

Tabela 25 Correlação entre níveis de aminas, micro-organismos mesófilos e pH do albúmen de ovos armazenados sob refrigeração por 125 dias 100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química de algumas aminas biogênicas	43
Figura 2	Síntese e interconversão das poliaminas	44
Figura 3	Curvas de linearidade das aminas adicionadas a matriz gema na faixa de 0,07 a 2,24mg/100g	61
Figura 4	Curvas de linearidade das aminas adicionadas a matriz albúmen na faixa de 0,07 a 2,24mg/100g	62
Figura 5	Cromatogramas com adição da solução padrão de 2,24mg/100g das sete aminas ao solvente (água) (A), as matrizes gema (D) e albúmen (B) e sem a adição da solução padrão a gema (E) e albúmen (C)	65
Figura 6	Gráfico de regressão dos valores de UH de ovos armazenados durante 125 dias sob refrigeração	73
Figura 7	Gráfico de regressão de pH do albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração	76
Figura 8	Gráfico de regressão do peso de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e com e sem embalagem durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração	81

LISTA DE ABREVIATURAS

A ..……..	Qualidade interna alta
AA …….....	Qualidade interna excelente
B ……...	Qualidade interna média
CadA	Cadaverina no albúmen
CadG	Cadaverina na gema
CO_2 ..……..	Dióxido de carbono
CV	Coeficiente de variação
g	Grama
EC	Comunidade Européia
H_2CO_3	Ácido carbônico
mg.....	Miligrama
mL.....	Mililitro
N_2.....	Nitrogênio
nm	Nanômetro
ppb.....	Partes por bilhão
PutA	Putrescina no albúmen
PutG	Putrescina na gema
sp.	Espécie
spp.	Gênero
UBA	União Brasileira de Avicultura
UBABEF	União Brasileira de Avicultura e Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos
UFC.....	Unidade formadora de colônia
UH	Unidades Haugh
UR.....	Umidade relativa
USA.....	United States of America
USDA.....	United States Departament of Agriculture

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito da aplicação de óleo mineral sobre a casca de ovos e a utilização de embalagem plástica com tampa na qualidade físico-química, microbiológica e nos teores de aminas bioativas de ovos de consumo foram analisados 1920 ovos armazenados por até 125 dias sob refrigeração. Foi observado a diminuição da qualidade interna dos ovos durante o armazenamento e, ao contrário da aplicação de óleo mineral, a utilização de embalagem não influenciou significativamente na qualidade interna dos ovos. A aplicação de óleo e a utilização de embalagem não influenciaram nos resultados microbiológicos. As análises microbiológicas indicaram ausência de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, coliformes termotolerantes e bolores e leveduras, entretanto, foi observada uma alta contagem de micro-organismos mesófilos e psicotróficos. Foram encontrados putrescina, cadaverina, espermidina e espermina na gema e putrescina, cadaverina e feniletilamina no albúmen dos ovos. Não foi possível estabelecer um critério de qualidade de ovos levando em consideração a presença ou quantidade de aminas bioativas na gema e albúmen de ovos

Palavras-chave: ovos, armazenamento, óleo mineral, embalagem, Unidades Haugh, físico-química, aminas bioativas, microbiologia

ABSTRACT

Physical-chemical and microbiological qualities of 1920 commercial eggs submitted to packaging and mineral oil coating were evaluated during storage under refrigeration up to 125 days. Decrease of inner quality of the eggs was observed during the experiment. In contrast to application of mineral oil, the use of packaging had no influence ($p<0.05$) on the internal quality of the eggs. The application of oil and use of packaging had no effects on microbiological results. Microbiological analyses showed absence of *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, thermal-tolerant coliforms, and fungi. However, high counts of mesophilic aerobic and psychrotrophic were recorded. The bioactive amines detected and quantified were putrescine, cadaverine, spermidine and spermine in egg yolk and putrescine, cadaverine and phenylethylamine in albumen. It was not possible to establish index of quality of egg using bioactive amines present in the yolk and albumen of eggs.

Key-words: eggs, storage, mineral oil, packaging, Haugh Unities, physical-chemical, bioactive amines, microbiology

1. INTRODUÇÃO

A produção de ovos para consumo no Brasil, em 2011, foi superior a 31,5 bilhões de unidades e o consumo per capita de ovos pelo brasileiro passou de 148,8 ovos por pessoa em 2010 para 162,5 ovos em 2011. Mesmo assim, esse valor é considerado baixo quando comparado com outros países como o México com 375 ovos *per capita*, Japão com 347 e Estados Unidos com 258 ovos. Em 2010, a exportação de ovos *in natura*, industrializados e para incubação ultrapassou 27 mil toneladas, gerando uma receita de US$ 41 milhões de dólares, representando apenas 2% da produção nacional. Desse total, 90,5% foram em ovos em casca, exportados especialmente para Emirados Árabes Unidos e Angola. Minas Gerais é segundo maior estado produtor de ovos atrás de São Paulo e o maior exportador em volume, seguido pelo Rio Grande do Sul e São Paulo (UBA, 2009 e UBABEF, 2011).

O ovo é um dos alimentos mais completos para a alimentação humana, apresentando uma composição rica em vitaminas, minerais, ácidos graxos e proteínas que reúnem vários aminoácidos essenciais de excelente valor biológico. Além disso, é considerado uma fonte protéica de baixo valor econômico, podendo contribuir para melhorar a dieta de famílias de baixa renda.

O ovo é um importante produto de origem avícola e, por ser rico em nutrientes e ser de alta digestibilidade, exige alguns cuidados para que não se transforme em fonte de intoxicação alimentar e para que chegue ao consumidor com um bom padrão de qualidade. Por ser um produto perecível, deveria ser mantido sob refrigeração da produção ao consumo. Entretanto, este procedimento resulta em aumento do custo de produção e conseqüentemente aumento do custo para os consumidores.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1990), ovo fresco é aquele em casca que não foi conservado por qualquer processo industrial e perderá a sua denominação de fresco, se for submetido intencionalmente a temperaturas inferiores a 8ºC. De acordo com a legislação, a temperatura recomendada para armazenamento do ovo fresco está entre 8ºC e 15ºC com uma umidade relativa do ar entre 70% e 90%. Se o ovo for conservado a uma temperatura inferior a 8ºC, passa a receber a denominação de ovo frigorificado.

Embora a legislação brasileira (Brasil, 1997) determine condições mínimas internas como câmaras de ar variando de quatro a 10mm de altura; gemas translúcidas, firmes, consistentes e sem germe desenvolvido; claras transparentes, consistentes, límpidas, sem manchas e com as chalazas intactas. Na prática, somente o peso e características da casca têm sido considerados. Dessa maneira, existe em nosso país a necessidade do desenvolvimento de um padrão de qualidade interna do ovo mais adequado e de fácil aplicação como o adotado pelos americanos, que se baseia na Unidade Haugh (UH). A UH é a relação entre peso do ovo e qualidade do albúmen, que é avaliada pela altura do albúmen altura do albúmen. Os fatores que mais influenciam a altura do albúmen são linhagem e idade das poedeiras, além da temperatura e demais condições de armazenamento (Williams, 1992).

São cada vez mais crescentes as preocupações referentes à qualidade dos alimentos em toda cadeia produtiva e, paralelamente, aumentam a capacidade crítica dos consumidores, tornando-os mais seletivos com relação as suas escolhas, inclusive de alimentos (Pinto et al., 2004). No mercado interno, por não existir obrigatoriedade de refrigeração, os ovos são acondicionados, desde o momento da

postura até a distribuição final, em temperaturas ambientes, sendo, em alguns casos, refrigerados apenas nas casas dos consumidores.

O prazo de validade de ovos com relação a qualidade físico-química e microbiológica irá depender de fatores extrínsecos como condições ambientais de produção e armazenamento; e intrínsecos como seus nutrientes, principalmente as proteínas, pH e atividade de água.

As aminas bioativas são compostos orgânicos nitrogenados em que um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia são substituídos por radicais alquilo ou arilo. A ingestão de alimentos com elevados teores de aminas ou mesmo em pequenas quantidades por indivíduos com deficiência genética ou em tratamento com drogas inibidores da monoaminoxidase, pode causar danos à saúde, podendo ocorrer intoxicação histamínica, enxaqueca ou crise hipertensiva. As aminas bioativas são encontradas em diversos alimentos como peixes, carnes, ovos, queijos, frutas, legumes, cervejas e vinhos (Shalaby, 1996; Lima e Glória, 1999; Kalac e Krausová, 2005). Deste modo, a pesquisa de aminas biogênicas é importante não só pela sua toxidade, mas também pelo fato de elas poderem ser usadas como indicadores de qualidade dos alimentos (Halász et al., 1994).

A validação de métodos analíticos, principalmente na área de análises de alimentos, tem recebido muita atenção devido à preocupação com a segurança alimentar e o comércio internacional. Os resultados de análises obtidos através de métodos validados e, portanto confiáveis, subsidiam a formulação de políticas de saúde publica, visando à melhoria da qualidade dos alimentos destinados a população e possibilitando ao País, do ponto de vista sanitário, atender as exigências do comercio internacional (Souza, 2007).

Com base nestes aspectos, este trabalho teve como objetivo verificar a influência da utilização de embalagem e aplicação de óleo mineral sobre a casca dos ovos nas características físico-químicas, microbiológicas e nos teores de aminas bioativas em ovos de consumo armazenados por longo período sob refrigeração e avaliar a utilização de aminas bioativas como critério de qualidade em ovos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Qualidade Interna dos Ovos

A liquefação do albúmen denso é um sinal perceptível da perda de qualidade dos ovos. Quando um ovo fresco é cuidadosamente quebrado em uma superfície plana e lisa, a gema é redonda e está em uma posição central, cercada pelo albúmen denso. Quando é quebrado um ovo velho, a gema é achatada, muitas vezes deslocada para o lado e o albúmen denso torna-se mais fino e mais fluído, espalhando-se por uma grande área e produzindo um amplo arco de líquido (Karoui et al., 2006).

Desde o momento da postura, à medida que o ovo envelhece, o albúmen denso torna-se líquido devido a inúmeras reações químicas que ocorrem em seu interior, que possivelmente envolvem ácido carbônico (H_2CO_3) e o aumento do pH do albúmen (pH). O ácido carbônico, um dos componentes do sistema tampão do albúmen, dissocia-se formando água e gás carbônico. Sob condições naturais, este gás se difunde através da casca e se perde no ambiente. Devido a essa liberação, o pH do albúmen aumenta, diminuindo sua acidez e provocando a dissociação química do complexo protéico. Observa-se também a perda do peso do ovo e o movimento de

líquido do albúmen para a gema. Desta maneira, a qualidade interna do ovo é intensamente afetada pela estocagem (Romanoff e Romanoff, 1963; Koehler, 1974).

No momento da postura, o albúmen contém aproximadamente de 4 a 5mg de CO_2 dissolvido e, em torno de 100mg de CO_2 em forma de bicarbonato. A concentração de CO_2 na gema de ovos frescos é de apenas 0,076mg/g. O aumento no pH do albúmen causado pela perda de CO_2 através dos poros da casca depende do equilíbrio entre o dióxido de carbono dissolvido, íons bicarbonatos, íons carbonato e proteínas. Quanto mais elevada a temperatura de estocagem dos ovos, menor é a solubilidade do CO_2 no albúmen e mais rápida sua perda para o ambiente. A perda de CO_2 provoca aumento do pH ocasionando a liquefação do albúmen, que se acentua rapidamente em função do aumento da temperatura ambiente (Keener et al., 2001; Santos, 2005; Karoui et al., 2006). Segundo Brake et al. (1997) e Alleoni e Antunes (2001), o pH do albúmen de ovos frescos é de aproximadamente 7,8, podendo chegar a 9,5 durante o seu armazenamento.

O conteúdo e a natureza das ovomucinas (glicoproteínas que contribuem na estrutura gelatinosa do albúmen denso) parecem ser primariamente responsáveis pela determinação da altura do albúmen, mas as mudanças químicas durante a estocagem, que causam a redução da altura do albúmen, são pouco claras. Além das frações da ovomucina que contribuem para uma maior gelatinização e viscosidade do albúmen denso, a formação de pontes dissulfito entre vários co-polímeros de α e β ovomucinas também colaboram para esse fato. Assim, a redução da altura do albúmen pode ter várias causas e algumas são atribuídas à proteólise da ovomucina, à clivagem das pontes de dissulfitos e às interações entre α e β ovomucinas (Robinson e Monsey, 1971; Stevens, 1996). Segundo Toussant e Latshaw (1999), a quantidade de ovomucina encontrada no albúmen denso de ovos frescos com baixos valores de UH foi menor do que a encontrada no albúmen denso de ovos frescos com altos valores de UH. Não foi observada diferença na quantidade de ovomucina do albúmen fluído de ovos frescos com altos e baixos valores de UH.

Durante o armazenamento de ovos, ocorre a transformação de ovoalbumina em S-ovoalbumina alterando algumas características do albúmen, como a estabilidade de espuma (albúmen batido) e, consequentemente, interferindo no processamento de alguns alimentos como bolos, pães, merengues e sorvetes. Com o aumento do pH durante a estocagem de ovos, parte do albúmen é transformado em S-ovoalbumina e com o aumento desta, aumenta o volume de líquido drenado após 30 minutos do processamento (bateção) e diminui a estabilidade do albúmen batido (Alleoni e Antunes, 2004b).

2.2. Parâmetros de avaliação da qualidade interna de ovos

Para estimar a qualidade interna de ovos existem cinco métodos: a altura do albúmen denso, que é medida em milímetros (Wilgus e Wagenen, 1936); o índice de albúmen, que é a medida da razão entre a altura do albúmen e o diâmetro deste (Heiman e Caver, 1936); o índice da gema, que é a medida da razão entre a altura da gema e o diâmetro desta (Parsons e Mink, 1937); a percentagem de albúmen denso e fluido, sendo que os ovos velhos têm maior proporção de albúmen fluido (Holts e Almiquist, 1932); e o valor da UH, idealizada por Haymond Haugh em 1937, que é a altura do albúmen corrigido para o peso do ovo (Brant et al., 1951).

O uso da UH como avaliação da qualidade interna é universal devido à sua fácil aplicação e à alta correlação com a

aparência do ovo ao ser quebrado em uma superfície plana, sendo definido como um importante parâmetro na avaliação da qualidade interna do ovo (Williams, 1992). De acordo com Silversides et al. (1993), a UH têm sido utilizada pela indústria desde sua introdução em 1937, e a sua análise fornece uma indicação da duração e das condições de armazenamento dos ovos.

O Programa de Controle da Qualidade preconizado pelo "United States Departament of Agriculture" (USDA) define as condições que devem ser encontradas desde a produção até o consumo do ovo pela população. Para tal, ovos considerados de qualidade excelente (AA) devem apresentar valores de UH superiores a 72; ovos de qualidade alta (A), entre 60 e 72 UH e ovos de qualidade inferior (B), com valores de UH inferiores a 60 (USDA, 2000).

A fórmula para calcular a UH é inadequada quando são comparados ovos frescos de aves de diferentes idades (ovos com pesos diferentes), pois a UH é baseada na relação entre peso do ovo e altura do albúmen; seria mais correto se essa relação fosse baseada na razão entre peso do ovo e peso do albúmen, e peso do albúmen e altura do albúmen. Além disso, as UH têm sido criticadas pela falta de correlação com qualquer medida nutricional ou de qualidade química. O alto coeficiente de determinação entre a altura do albúmen e UH, ao contrário do baixo coeficiente de determinação entre UH e peso do ovo, sugere que a medida da qualidade interna seja feita simplesmente pela altura do albúmen (Eisen et al., 1962; Kidwell et al., 1964; Silversides et al., 1993).

A ovoscopia, que consiste na observação dos ovos inteiros, em movimento, em contraste de luz fluorescente, é um método utilizado para classificação e verificação da qualidade de ovos. Este procedimento permite a identificação de ovos trincados, falhas na calcificação, além de manchas internas de sangue. A observação da posição da gema durante a ovoscopia é um processo que está indiretamente relacionado com a qualidade interna dos ovos de consumo, pois o ovo fresco possui a gema centralizada que é sustentada pelo albúmen denso. Este, ao se liquefazer, leva à descentralização da gema no ovo mais velho (Oliveira, 1991).

Segundo Silversides e Scott (2001), o pH é a medida mais adequada para a verificação da qualidade de ovos frescos do que a altura do albúmen. A menor influência da idade e da linhagem da poedeira no pH do albúmen e o maior efeito do tempo de estocagem sustentam esta conclusão. Neste mesmo trabalho, os autores mostraram que existe correlação alta e negativa entre altura do albúmen e o tempo de estocagem e correlação positiva entre pH e tempo de estocagem, pois à medida que aumenta o tempo de estocagem, a altura do albúmen diminui e o pH aumenta.

Com o aumento do processamento industrial de ovos originando produtos como albúmen, gema e ovo líquido e em pó, a indústria está cada vez mais interessada na proporção relativa dos constituintes do ovo. Desse modo, o conteúdo de sólidos totais dos ovos tem se demonstrado um importante parâmetro, uma vez que essa variável determina o rendimento de produtos originados da desidratação de ovos (Ahn et al., 1997).

2.3. Efeitos do tempo e temperatura de armazenamento sobre a qualidade dos ovos

Segundo Parnell e Jaska (1958), os ovos de consumo deveriam ser armazenados em temperaturas abaixo de 13ºC, para que sua qualidade interna seja preservada. Em climas tropicais a qualidade de ovos declina rapidamente quando mantidos em temperatura ambiente, sendo que sob

refrigeração os ovos podem manter por 10 dias a qualidade semelhante àquela encontrada em ovos recentemente postos.

Em local onde a temperatura ambiente é alta, os ovos devem ser consumidos em até uma semana após a postura. Estudos sobre os efeitos do clima tropical sobre a qualidade dos ovos mostraram que os dois fatores mais importantes que afetam a qualidade dos ovos durante a estocagem são a temperatura e a umidade relativa do ar. Por suas peculiares qualidades, o ovo é um produto de difícil armazenamento, sendo frágil, sujeito à alterações de sabor e exige, por seu conteúdo biologicamente ativo, temperaturas baixas para sua conservação (Essein, 1990; Davis e Stephenson, 1991; Oliveira, 1991).

O armazenamento do ovo sobre refrigeração deve ser realizado com a temperatura variando de 0 a 1,5ºC e 85 a 90% de umidade relativa. Nessas condições, os ovos podem ser conservados durante seis a nove meses com perdas de peso variando entre 3 a 6,5% (Ordónez, 2005).

Rodrigues e Salay (2001) pesquisaram o grau de conhecimento de consumidores, varejistas e atacadistas com relação a qualidade sanitária do ovo e sugeriram a necessidade de campanhas educativas para maior esclarecimento da população em geral. Segundo esses autores, a refrigeração foi reconhecida, respectivamente, como muitíssimo importante e muito importante para a qualidade sanitária do ovo por 51,3% dos varejistas e 51,3% dos consumidores. Do mesmo modo, uma parcela substancial tanto de comerciantes quanto de consumidores, a consideravam pouco importante ou indiferente (38,5% e 37,8%, respectivamente). No caso dos atacadistas, nenhum apontou esse procedimento como muitíssimo importante. Nesta mesma categoria, 28,6% dos entrevistados classificaram a refrigeração como de importância regular, 14,2% como pouco importante e 28,6% como indiferente. Com relação ao prazo de validade, 92,3% dos varejistas o apontaram como muitíssimo importante ou muito importante para a qualidade sanitária do ovo, assim como 92,8% dos consumidores. É importante ressaltar que 28,6% e 71,4% dos atacadistas entrevistados classificaram esse item como muito importante e de importância regular, respectivamente. Os varejistas atribuíram maior relevância para a embalagem do ovo, em relação aos consumidores, uma vez que 46,1% dos comerciantes julgaram ser esse fator muitíssimo importante ou muito importante, enquanto entre os consumidores, esse total foi de apenas 38,6%. Muitos consumidores (44,7%) também consideram que a embalagem é indiferente para a qualidade sanitária do ovo. No caso dos atacadistas, 85,7% registraram esse elemento como muitíssimo importante e muito importante.

Uma diminuição mais lenta nos valores de UH foi observada em ovos armazenados a 5ºC em comparação aos armazenados à 25ºC. Os valores de UH no dia da postura passaram de 92,06 para 79,41 e 45,29 após 14 dias de armazenamento à 5º e 25ºC, respectivamente. Nos ovos mantidos sob refrigeração, o pH do albúmen aumentou até o terceiro dia, mantendo-se estabilizado nos demais períodos, enquanto os mantidos em temperatura ambiente, o pH aumentou até o sétimo dia (Fernandes et al., 1983).

Morais et al. (1997) realizaram um estudo utilizando 864 ovos produzidos por galinhas Lohmann LSL com 45 semanas de idade. Os ovos frescos foram distribuídos aleatoriamente, em três diferentes tipos de mercados (hipermercados, supermercados atacadistas e supermercados populares) e foram submetidos a quatro diferentes períodos de armazenamento (zero, um, cinco e sete dias). Os autores concluíram que o valor médio de UH encontrado para os ovos frescos na fonte produtora foi de

77,22, que corresponde ao índice excelente segundo padrão de qualidade americano. Porém, com o decorrer do armazenamento, estes valores apresentaram significativa redução, independentemente do tipo de estabelecimento, passando de uma média de 77,22 UH no dia da postura para 53,51 UH aos sete dias de armazenamento. Dentre os estabelecimentos comerciais, houve variação significativa dos valores de UH, sendo as maiores médias encontradas nos ovos provenientes dos estabelecimentos do tipo hipermercados, seguido do tipo atacadista e, por último, pelo tipo popular. Essa diferença foi atribuída principalmente à maior temperatura ambiente e menor umidade do ar dos estabelecimentos populares, que possivelmente aceleraram o processo de perda de qualidade dos ovos armazenados.

O conteúdo de sólidos totais da gema pode ser influenciado pela idade, linhagem e condições de estocagem dos ovos. A perda de CO_2 e água do albúmen após a postura e durante a estocagem pode aumentar a proporção de sólidos do albúmen e a proporção dos principais constituintes da gema como lipídios e proteínas. O conteúdo de sólidos da gema também pode ser afetado pela mobilização de água do albúmen; entretanto o efeito da idade, dieta e das proteínas e lipídeos da gema não estão totalmente esclarecidos (Ahn et al., 1997).

Scott e Silversides (2000), após experimento com ovos armazenados por diferentes períodos à temperatura de 20,2ºC, concluíram que durante a estocagem o peso do albúmen diminuiu, causando diminuição no peso do ovo. Os pesos da gema e da casca não sofreram mudança com a estocagem. Porém, a altura do albúmen diminuiu de 9,16mm nos ovos frescos para 4,75mm nos ovos estocados por 10 dias, e o pH do albúmen aumentou, passando de 7,34 em ovos frescos para 9,37 em ovos armazenados por 10 dias.

Alleoni e Antunes (2001) realizaram um experimento em que foi avaliada a qualidade interna de ovos que foram coletados logo após a postura e armazenados à temperatura ambiente (25ºC e UR 75%) e sob refrigeração (8ºC e UR 70%), durante os períodos de sete, 14 e 21 dias. No dia da coleta dos ovos, o valor médio de UH encontrado foi igual a 83,66. Com o aumento do período de armazenamento à temperatura ambiente, o índice de qualidade dos ovos diminuiu consideravelmente, sendo que o valor médio da UH com sete dias de armazenamento foi igual a 41,71 (diminuindo 53,3%), e com 14 dias foi igual à zero. No ambiente refrigerado, a queda nos valores de UH dos ovos foi bem menor do que a verificada nos ovos mantidos em temperatura ambiente, e com o decorrer do armazenamento não foram verificadas diferenças significativas entre os valores de UH com sete, 14 e 21 dias de armazenamento. Na primeira semana de armazenamento, os valores da UH dos ovos mantidos em temperatura ambiente foram 44% menores do que os obtidos dos ovos armazenados sob refrigeração. O pH dos ovos passou de 7,78 nos ovos frescos para 9,34 com sete dias e 9,46 com 14 dias de armazenamento em temperatura ambiente, demonstrando a perda da qualidade interna dos ovos. Na temperatura de refrigeração não houve diferença entre os valores de pH.

A qualidade interna de ovos armazenados em temperatura ambiente (25ºC e 60% UR) e sob refrigeração (5ºC e 57% UR) por diferentes períodos (cinco, nove, 13 e 16 dias) foi avaliada por Carvalho et al. (2002). A temperatura de armazenamento não influenciou o peso dos ovos, mas a altura do albúmen e a UH apresentaram um pior resultado médio para os ovos mantidos em temperatura ambiente (4,83mm de altura do albúmen e 62,66 UH), quando comparado ao resultado dos ovos armazenados sob refrigeração (7,05mm de altura do albúmen e 82,76 UH). Os autores

observaram ainda que os ovos com cinco dias de armazenamento em temperatura ambiente, para todas as variáveis analisadas, apresentaram resultados semelhantes aos dos ovos armazenados com 16 dias sob refrigeração.

Leandro et al. (2005), avaliando a qualidade de ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na região de Goiânia (supermercados, mercados populares, feiras e granjas), observaram que a altura do albúmen e UH dos ovos coletados na granja (ovos do dia) apresentaram os maiores valores (10,17mm; 99,28 UH), enquanto que a altura do albúmen e UH dos ovos obtidos dos supermercados (4,46mm; 64,04 UH) foram superiores aos adquiridos das feiras (3,13mm; 44,91 UH), demonstrando que a qualidade interna dos ovos comercializados nos grandes supermercados é melhor, o que pode estar associado a maior rotatividade do produto nas prateleiras ou a uma tempetatura ambiente mais estável. O pH do albúmen foi maior nos ovos comercializados nas feiras (9,48) em relação aos coletados nas granjas (8,04), no entanto, não diferiram estatisticamente dos ovos dos outros estabelecimentos.

Samli et al. (2005), avaliando a qualidade interna de ovos de poedeiras com 50 semanas de idade, no dia da postura, com dois, cinco e 10 dias, nas temperaturas cinco, 21 e 29ºC e umidade relativa variando entre 55 e 60%, não observaram diminuição do peso do ovo à 5ºC durante o armazenamento por 10 dias. Entretanto, durante a estocagem a 21ºC, houve perda de peso de 0,65g e 1,03g com cinco e 10 dias de estocagem e a 29ºC a perda foi de 1,30 e 1,94g, respectivamente. Não houve diferença no peso da gema com tempo de estocagem, independentemente da temperatura utilizada no armazenamento. O valor de UH passou de 91,4 para 76,3 a 5ºC com 10 dias de estocagem, enquanto que à temperatura de 21 e 29ºC, apresentaram valores de UH de 53,7 e 40,6, respectivamente. Foi observado, independentemente da temperatura, um rápido aumento do pH do albúmen, mesmo com apenas dois dias de armazenamento à 29°C, elevando-se de 7,47 para 8,70.

Jones e Musgrove (2005a), avaliando a qualidade interna de ovos armazenados à 4ºC e 80% de umidade relativa por 10 semanas, observaram a diminuição da altura do albúmen de 7,05mm na primeira semana para 4,85mm após 10 semanas. O valor de UH na primeira semana foi 82,59, reduzindo para 67,43 UH ao final do período de armazenamento. Segundo os autores, ovos refrigerados podem ser armazenados acima de 30 dias sem comprometer a qualidade ou diminuir a satisfação do consumidor.

Ao usar diferentes métodos de análise da qualidade interna de ovos como índice de albúmen, altura e largura de albúmen; índice de gema, altura e largura de gema; UH e resistência da membrana vitelina, em ovos estocados a cinco, 13 e 23ºC, Keener et al. (2006) observaram que em todos os parâmetros analisados houve perda da qualidade interna dos ovos com o aumento da temperatura e tempo de estocagem

Xavier (2006) avaliou os efeitos da temperatura e do tempo de estocagem sobre os valores de UH, altura do albúmen, pH do albúmen e teores de sólidos totais do albúmen de 768 ovos brancos estocados em temperatura ambiente e sob refrigeração e concluiu que a temperatura e o período de estocagem foram relevantes na manutenção da qualidade interna dos ovos, sendo que os valores da altura do albúmen e UH diminuíram significativamente ($p<0,05$) com a estocagem e, de forma mais acentuada em temperatura ambiente. O pH aumentou com o período de armazenamento dos ovos ($p<0,05$) e os teores de sólidos totais do albúmen dos ovos armazenados em temperatura

ambiente por cinco, 10 e 15 dias foram maiores ($p<0,05$) que os teores de sólidos totais do albúmen dos ovos avaliados no dia da postura.

Após armazenar ovos em duas diferentes temperaturas e umidades relativa do ar, Barbosa et al. (2008) observaram maior perda de peso e também da qualidade interna nos ovos armazenados em temperatura ambiente mais alta e umidade mais baixa. Após 35 dias de armazenamento, os ovos submetidos a temperatura média de 20,7ºC e UR de 78,75% haviam perdido em média 3,63% do peso inicial, enquanto, os ovos armazenados em temperatura de 26,8ºC e UR de 39,05% perderam em média 9,20%.

Segundo Santos et al. (2009), o aumento do período de estocagem dos ovos, tanto em temperatura ambiente quanto sob refrigeração, ocasionou perda de peso dos ovos e nas UH. Os ovos mantidos em temperatura de refrigeração (4,65°C e UR de 78,5%) apresentaram menor perda de peso e melhores valores de UH quando comparados aos ovos conservados em temperatura ambiente (27,84 °C e UR de 71,14%).

Klein (2010) analisou ovos provenientes das três principais distribuidoras do estado de Minas Gerais e também observou maior redução da qualidade de ovos armazenados em temperatura ambiente comparado aos armazenados sob refrigeração por até 21 dias. Os ovos das três distribuidoras possuíam o mesmo padrão de qualidade interna.

Figueiredo et al. (2011) armazenaram ovos sob refrigeração (2,6ºC) e em temperatura ambiente (25,6ºC) durante 15 dias e observaram que os ovos armazenados sob refrigeração apresentaram menor perda de peso que os ovos mantidos em temperatura ambiente. Os ovos armazenados em temperatura ambiente também apresentaram redução dos valores de UH mais rápida que os mantidos sob refrigeração, passando de 91,2 UH no primeiro dia de armazenamento para 58,3 UH, enquanto os ovos armazenados sob refrigeração apresentaram o valor de 87,4 UH após o período de armazenamento. Os valores médios de pH do albúmen dos ovos armazenado sob refrigeração foi inferior aos valores de pH do albúmen dos ovos armazenados em temperatura ambiente.

2.4. Efeitos da aplicação de óleo mineral sobre a casca na qualidade interna de ovos

Como a perda de qualidade dos ovos durante seu armazenamento está intimamente relacionada com a perda de CO_2 ocasionando o aumento do pH do albúmen, várias pesquisas têm sido feitas para impedir ou minimizar a perda de CO_2 do albúmen para o ambiente. Uma das alternativas estudadas é a aplicação de diversos tipos de substâncias sobre a casca dos ovos com o objetivo de obstruir seus poros, evitando a saída não somente a de CO_2 como também perda de água, que resulta na redução de peso dos ovos. Diversos tipos de substâncias têm sido utilizados como, por exemplo: óleos mineral (Campos e Brant, 1965; Jirangrat et al., 2010) e vegetais (Sabrani e Payne, 1978; Imai, 1981), polímeros sintéticos (Myers et al., 1963; Campos e Brant, 1965), polissacarídeos (Torrico et al., 2010) e proteínas (Alleoni e Antunes, 2004; Alleoni e Antunes, 2005, Caner, 2005). Dentre todas as substâncias utilizadas, o óleo mineral é amplamente utilizado na indústria avícola em todo o mundo devido sua eficiência, custo e facilidade de aplicação.

A superfície da casca do ovo possui de 7000 a 17000 poros que permitem que o CO_2 e umidade possam passar para o ambiente (Ordónez, 2005). Desse modo, a aplicação do óleo sobre a casca dos ovos pode selar esses poros, resultando na

redução da perda de CO_2, umidade e menor contaminação de micro-organismos (Waimaleongora-ek et al., 2009).

Outra alternativa para impedir a perda de água através da casca e assim evitar a perda de peso é armazenar os ovos em um ambiente com alta umidade relativa ou aumentar a resistência da casca ao fluxo de vapor d'água. Entretanto, o armazenamento de ovos em ambientes com alta umidade pode promover o crescimento de bolores na superfície da casca, favorecendo sua penetração através dos poros. Desse modo, além do controle da umidade a ser utilizada no local de armazenamento, a aplicação de óleos ou outras substâncias para selar a superfície da casca tem sido aplicado para evitar a perda de água pelo ovo (Stadelman e Cotterill, 1995).

A utilização de óleo mineral sobre a casca dos ovos foi mais eficiente na preservação da qualidade dos ovos do que a utilização de embalagem de celofane após três semanas de armazenamento (Davis e Brunson, 1962). Não foi observada diferença na qualidade (utilizando UH como parâmetro) entre os ovos não embalados e sem aplicação de óleo armazenados a 10ºC, dos ovos com aplicação de óleo e armazenados em temperatura ambiente. Do mesmo modo, os ovos com aplicação de óleo e armazenados em temperatura ambiente apresentaram a mesma qualidade que os ovos embalados e mantidos a 10ºC. A utilização da embalagem de celofane manteve os valores de UH mais altos que os ovos sem embalagem e sem óleo tanto sob refrigeração quanto em temperatura ambiente.

A aplicação de óleo vegetal não melhorou a qualidade microbiológica de ovos armazenados por quatro semanas em temperatura ambiente e quatro meses sob refrigeração. Entretanto, a aplicação de óleo diminuiu a perda de peso e auxiliou na manutenção da qualidade interna avaliados pela UH, pH do albúmen e altura da câmara de ar (Imai, 1981). Segundo o autor, os efeitos provocados pela aplicação do óleo foram pequenos comparados com a melhoria proporcionada pelo armazenamento de ovos sob refrigeração.

Souza et al. (1983) observaram que ovos com aplicação de óleo mineral apresentaram melhor qualidade interna e perfeitas condições de utilização até o 35º dia de armazenamento mesmo quando em temperatura ambiente, enquanto os ovos que não receberam aplicação de óleo perderam rapidamente sua qualidade interna, ficando praticamente inviável sua utilização a partir do 14º dia. Não houve diferença entre os ovos com e sem aplicação de óleo quando armazenados em temperaturas mais baixas, como 2,6ºC e 8ºC.

Resultado semelhante foi encontrado por Bacurau et al. (1994) que também observaram manutenção da qualidade interna dos ovos, menor perda de peso e menor aumento do pH do albúmen em ovos com aplicação de óleo mineral e mantidos em temperatura ambiente ou sob refrigeração durante 28 dias. Esses resultados contrastam com os observados por Wong et al. (1996) que ao armazenarem ovos cobertos com óleo por 28 dias em temperatura ambiente não observaram diferença comparado aos ovos sem esse tratamento em relação a perda de peso, UH e pH. A perda de peso foi de 11,1% nos ovos sem aplicação de óleo e 9,2% para os ovos com aplicação de óleo. Os valores de UH reduziram de 67,7 nos ovos sem aplicação de óleo para 32,4 UH e nos ovos com aplicação de óleo de 65,4 UH para 34,6 UH. O pH final foi 7,79 e 7,87 para ovos sem aplicação e com aplicação de óleo, respectivamente.

Após a aplicação de óleo mineral sobre a casca de ovos, Waimaleongora-ek et al.

(2009) observaram que a perda de peso dos ovos variou de 0,85% em ovos com aplicação de óleo a 8,78% em ovos sem aplicação de óleo após cinco semanas de armazenamento a 25ºC, demonstrando que a aplicação de óleo oferece uma barreira protetora contra a transferência de CO_2 e umidade através da casca dos ovos, reduzindo assim a perda de peso durante o armazenamento. Comparado aos ovos sem a aplicação de óleo, a UH dos ovos com aplicação de óleo foi maior após as cinco semanas de estocagem e que a aplicação de óleo pode preservar a qualidade do albúmen dos ovos revestidos por pelo menos três semanas a mais em comparação com os ovos sem aplicação de óleo. Do mesmo modo, a aplicação de óleo evitou a perda de CO_2 através dos poros, mantendo o pH em valores mais baixos durante as cinco semanas.

Biladeau e Keener (2009) armazenaram ovos durante 12 semanas sob refrigeração para avaliar a influência da aplicação sobre a casca dos ovos de diversas substâncias como cera de parafina, óleo mineral, proteína isolada de soja e concentrado proteíco de soro. Somente após a sexta semana de armazenamento houve diminuição nos valores de UH dos ovos com aplicação de óleo mineral e, já na primeira semana, as UH dos ovos com aplicação de óleo eram superiores do que em ovos sem aplicação de nenhuma substância (controle). Todos os revestimentos avaliados foram capazes de estender o prazo de validade dos ovos em relação ao pH do albúmen. Depois de uma semana, o pH do albúmen para todos os ovos com aplicação de alguma cobertura foi inferior ao controle, sendo que o revestimento de ovos manteve o pH mais baixo durante as 12 semanas de armazenamento. O pH dos ovos com aplicação de óleo apresentaram ligeiro decréscimo ao longo do tempo, sendo que na 12ª semana o pH foi inferior ao do primeiro dia de análise. Segundo os autores, suspeita-se que, possivelmente, ocorra uma oxidação dos ácidos graxos livres do óleo, que migrariam para o albúmen, reduzindo o seu pH. A aplicação de óleo reduziu a perda de CO_2 do albúmen até a oitava semana de armazenamento, auxiliando na manutenção do pH em níveis mais baixos e favorecendo a qualidade interna dos ovos.

Jirangrat et al. (2010) avaliaram o efeito da aplicação de óleo mineral na qualidade interna de ovos armazenados durante 15 semanas sob refrigeração a 4ºC e durante cinco semanas em temperatura ambiente (25ºC). Após 15 semanas de armazenamento, a perda de peso dos ovos com e sem óleo foi de 1,19% e 12,44% respectivamente. Os valores de UH diminuiram com o armazenamento, no entanto, esta diminuição apresentou um ritmo mais lento para os ovos com óleo mineral. Após 15 semanas de armazenamento a 4°C, a UH dos ovos sem óleo e com óleo diminuiram, passando de inicialmente 84,12 UH para 62,90 e 74,44, respectivamente. A diminuição média dos valores de UH foram 1,41 e 0,64 por semana para ovos sem e com aplicação de óleo, respectivamente. O pH do albúmen de ovos sem óleo aumentou a partir do valor inicial de 8,71 para 9,33 após cinco semanas e então decresceram continuamente para 8,53 após 15 semanas de armazenamento. Por outro lado, o pH do albúmen de ovos com óleo diminuiu, gradualmente, de 8,71 para 7,96 após 15 semanas de armazenamento.

A aplicação de óleo mineral foi mais eficiente na redução da perda de peso de ovos armazenados a 25ºC durante cinco semanas comparado aos ovos com aplicação de quitosana e ovos sem nenhuma aplicação. A perda de peso dos ovos sem nenhuma aplicação e os com quitosana foram 7,14% e 6,82, respectivamente, enquanto os ovos com aplicação de óleo perderam apenas 0,89%. Os valores de UH passaram de 83,79 para 24,06; 30,12 e

58,05 nos ovos sem aplicação de cobertura, cobertos com quitosana e com óleo mineral, respectivamente. O pH dos ovos sem aplicação de cobertura e com quitosana aumentaram de 8,28 para 8,66 e 8,63, enquanto houve redução do valor de pH dos ovos com aplicação de óleo para 7,95 (Torrico et al., 2010)

Wardy et al. (2010) observaram maior redução dos valores de UH em ovos que não receberam a aplicação de óleo mineral sobre a casca do que ovos que receberam a aplicação após 20 semanas de armazenamento a 4ºC. Inicialmente, os valores de UH dos ovos eram de 86,50 UH e diminuiram para 54,65 UH em ovos sem a aplicação de óleo e para 73,51UH em ovos com aplicação de óleo. Em ovos armazenados a 25ºC, os valores de UH dos ovos diminuiram de 86,50 para 27,04 UH nos ovos sem aplicação de óleo e para 58,43 nos ovos com aplicação de óleo mineral após cinco semanas de armazenamento. Durante todo o período de armazenamento sob refrigeração, os ovos com aplicação de óleo perderam apenas 12,99 UH, enquanto os ovos sem aplicação de óleo perderam 31,85 UH. Nos ovos armazendos a 25ºC, essa perda foi de 59,46 UH e 28,07 UH para ovos sem e com aplicação de óleo, respectivamente. Após 20 semanas sob refrigeração, a perda de peso de ovos sem aplicação de óleo foi de 11,77% e nos ovos com aplicação de óleo foi de apenas 1,06%. Em ambas as temperaturas de armazenamento observou-se aumento do pH do albúmen dos ovos sem aplicação de óleo mineral e diminuição do pH do albúmen dos ovos com aplicação de óleo mineral.

2.5. Efeito da utilização de embalagem sobre a qualidade interna de ovos

Desde longo tempo, já se sabe que a perda do gás carbônico através da casca do ovo é a principal causa da deterioração do albúmen, e que a velocidade de formação de CO_2 está diretamente relacionada com a temperatura de armazenagem do produto. De acordo com Romanoff e Romanoff (1963), a qualidade dos ovos, mesmo quando armazenados à temperatura ambiente ou superior, poderá ser preservada desde que a casca se torne impermeável à perda de gás carbônico.

Campos et al. (1973) concluíram que a embalagem teve efeito benéfico na preservação da qualidade interna de ovos de consumo mantidos à temperatura ambiente, por prevenir a perda de gás carbônico através do aumento da pressão parcial do gás no ambiente criado dentro da embalagem.

O armazenamento de ovos em recipientes herméticos ou o uso de um filme plástico sobre as bandejas de ovos auxiliam na diminuição da fluidez do albúmen denso pela manutenção dos CO_2 ao redor dos ovos, mas aumenta o risco de desenvolvimento de bactérias e fungos na superfície dos ovos (Coterril e Gardner, 1957). O desenvolvimento desses micro-organismos pode ser controlado através da adição de substâncias dessecantes às embalagens para auxiliar no controle da umidade nesse ambiente. O armazenamento de ovos em recipientes herméticos resultou em valores de pH relativamente constante durante o armazenamento por oito dias a 14, 23 e 34ºC, enquanto que nos ovos sem embalagem ocorreu aumento do pH. Nos ovos sem embalagem e em temperaturas mais elevadas, o aumento do pH ocorreu de maneira mais rápida do que nos ovos armazenados a 14ºC.

Ao comparar o uso de embalagens de cloreto de vinilideno e aplicação de óleo mineral, Myers et al. (1963) não observaram diferença nos valores de UH e pH até a quarta semana de armazenamento a 10ºC. Após esse período, na sexta e oitava semana, os ovos com óleo apresentaram um

maior aumento de pH comparado aos ovos embalados.

Mellor et al. (1975) avaliaram o efeito da embalagem na preservação da qualidade interna de ovos armazenados em temperatura ambiente (22ºC) e sob refrigeração (12ºC) por duas semanas. Nos ovos armazenados sob refrigeração, a embalagem apresentou pouca influência na melhoria da qualidade interna dos ovos, enquanto nos ovos armazenados a 22ºC, a embalagem teve papel muito importante na manutenção da qualidade interna por maior período de tempo. O tipo de embalagem que demonstrou ser mais eficiente na manutenção da qualidade foi a bandeja de papelão envolvido com plástico selado. A utilização somente da bandeja de papelão demonstrou ser ineficiente para manutenção da qualidade de ovos armazenados em temperatura ambiente por tempo superior a sete dias.

Souza et al. (1983) armazenaram ovos em bandejas de celulose, estojo de celulose com aberturas na parte superior e estojo de isopor sem aberturas em temperaturas de 2,6ºC, 8ºC e 25ºC e observaram que o estojo de isopor foi o mais eficiente na manutenção da qualidade interna durante os primeiros sete dias de armazenamento quando mantidos em temperatura ambiente. Nos ovos mantidos sob refrigeração não foi observada diferença entre as embalagens durante os 35 dias de armazenamento.

A utilização de embalagem em ovos como em qualquer outro tipo de produto tem a função básica de proteger e garantir a manutenção de sua qualidade. No caso de ovos, ela protege contra contaminação por micro-organismos, perda de umidade, temperaturas elevadas que podem levar a sua deterioração e quebra das cascas ao ser manuseado, armazenado ou transportado. Muitos fatores devem ser levados em consideração na escolha do tipo de embalagens utilizadas em ovos, sendo importante obter informações sobre as exigências e condições de determinado mercado, tais como: manutenção da qualidade; instalações do local de armazenamento; tipo de transporte; distância a ser percorrida; condições climáticas; tempo envolvido e custos (FAO, 2003).

As embalagens assumem um papel muito importante durante a comercialização nas gôndolas de supermercados e também na manutenção da qualidade dos ovos. De certa forma, todos os ovos comercializados são praticamente idênticos um aos outros, independentemente das granjas que os produziram, logo, a embalagem assume o importante papel de diferenciar ovos de diferentes granjas e também atrair o consumidor para determinadas marcas. Diante disto, diversas empresas têm modernizado suas embalagens, deixando-as mais atraentes, práticas e funcionais como forma de chamar a atenção dos consumidores e auxiliar na manutenção da qualidade dos ovos (Ramos et al., 2010).

Magalhães (2007) não observou diferença nos valores de pH de ovos embalados em filme plástico e armazenados até os 14 dias em temperatura ambiente, entretanto, os ovos embalados apresentaram valores de UH superiores aos ovos não embalados.

Xavier et al. (2008) observaram uma melhor qualidade interna de ovos quando as bandejas em que estavam acondicionados foram embaladas em filme plástico devido a manutenção dos valores de UH mais altos durante o período de armazenamento. Após 35 dias de armazenamento sob refrigeração, os ovos embalados apresentaram valores de UH superiores aos dos ovos não embalados. O efeito benéfico da utilização do filme plástico também foi observado nos ovos armazenados em temperatura ambiente durante 15 dias, sendo que, os ovos com embalagem apresentaram valores de UH de 71,58, enquanto os ovos sem embalagem

apresentaram valores de UH de 58,93 ao término do período de armazenamento.

Há uma grande discussão no setor avícola envolvendo os diversos tipos de embalagens. A indústria defende a idéia de que sob o aspecto do *marketing* e aparência do produto, a embalagem plástica é a mais recomendada, enquanto que a embalagem de isopor é mais eficiente quando se trata de isolamento térmico e manutenção da integridade da casca durante o transporte. Já a embalagem de papel é a de menor custo, garante boa proteção aos ovos, porém, na maioria dos casos é proveniente de papel reciclado (*card board*) e sem nenhuma garantia sanitária, o que pode elevar o índice de contaminação por micro-organismos (Moura et al., 2008).

Oliveira et al. (2009b) não observaram diferença na qualidade interna (peso do ovo, altura de albúmen, unidades Haugh, pH do albúmen e pH da gema) de ovos comercializados em diferentes embalagens (filme plástico, isopor e papel) no município de Marechal Cândido Rondon-PR. Entretanto, não foi avaliado o período de armazenamento dos ovos, sendo as amostras coletadas no comércio local (supermercados, mini-mercados, feira e uma granja) e não foi levado em conta a data de validade do produto visando simular a situação normal de compra do consumidor.

Rocculi et al. (2009) avaliaram a qualidade de ovos embalados em atmosfera modificada com 100% de nitrogênio (N_2), 100% de dióxido de carbono (CO_2), ar ambiente e sem embalagem durante 28 dias de armazenamento a 25 ºC e observaram maior perda de peso nos ovos sem embalagem (2,12%) comparados aos ovos embalados (0,37; 0,22% e 0,23, respectivamente). Os ovos não embalados apresentaram os maiores valores de pH com 9,62, enquanto que nos ovos embalados com CO_2, houve redução do pH para 7,70, devido a solubilização do CO_2 no albúmen ao longo do tempo. Do mesmo modo, a presença da embalagem auxiliou na manutenção dos valores de UH mais altos, enquanto que nos ovos sem embalagem ocorreu maior redução de UH, atingindo valores de 48,60 UH. No início do período de armazenamento, os ovos apresentaram valores de 74 UH, e ao final do período de armazenamento apresentaram valores de 62,59 UH e 73,87 UH para ovos embalados com ar ambiente e com CO_2, respectivamente. Desse modo, não se observou redução nos valores de UH nos ovos embalados com CO_2 em comparação aos valores observados no início do período de armazenamento.

Após armazenar ovos por 15 dias em temperatura ambiente e sob refrigeração, Ramos et al. (2010) observaram que a utilização de filme plástico para embalar ovos não influenciaram no peso do ovo e porcentagem de casca em comparação aos ovos que não foram embalados em filme plástico. No entanto, quando armazenados em temperatura ambiente, a embalagem com filme plástico demonstrou ser importante na preservação da integridade do albúmen avaliadas através da unidade Haugh e altura do albúmen denso. Nos ovos armazenados sob refrigeração, a utilização da embalagem não resultou em valores de UH e altura do albúmen maiores do que as observadas nos ovos sem a presença de embalagem.

2.6. Defesas do ovo contra a contaminação microbiana

2.6.1. Barreiras físicas do ovo

A casca é a primeira barreira física do ovo contra a entrada de micro-organismos do ambiente. As membranas da casca também funcionam como um filtro, não permitindo que os micro-organismos que passarem pelos poros atinjam o albúmen (Romanoff e Romanoff, 1963; Board et al., 1964;

Stadelman e Cotterill, 1995). O ovo possui uma fina rede de fibras de queratina, particularmente na membrana interna, que forma excelente barreira contra a invasão de micro-organismos (Overfield, 1974).

A superfície do ovo é coberta por uma camada protéica de 10 a 30μm de espessura, denominada cutícula ou mucina; ela é composta de mucoproteína cujos polissacarídeos são constituídos basicamente de glicose, manose, frutose e galactose. (Ordónez, 2005). A cutícula, quando seca, obstrui os poros da casca não permitindo a entrada de bactéria e fungos.

Sauter e Petersen (1974) avaliando a contaminação dos ovos por *Salmonella* spp., observaram que 47,5% dos ovos com qualidade de casca ruim (densidade específica de 1,070), apresentavam alguma espécie de salmonela, enquanto que ovos com média qualidade de casca (densidade específica de 1,080), apresentaram 21,4% de contaminação. Em ovos de excelente qualidade de casca (densidade específica de 1,090), apenas 10% dos ovos haviam sofrido penetração de *Salmonella* spp.

Yukiko et al. (2001), ao estudar o crescimento de *S. enteritidis* no ovo em diferentes épocas do ano e submetidas a diferentes temperaturas de estocagem, observaram que houve maior crescimento de *S. enteritidis* no albúmen de ovos com as cascas trincadas do que em ovos com as cascas intactas.

Jones et al. (2002) avaliando a influência da idade da poedeira na capacidade de contaminação dos ovos por *Pseudomonas fluorescens* e *S. enteritidis* observaram maior contaminação do conteúdo interno, da câmara de ar e da casca dos ovos de poedeiras velhas, devido a perda da qualidade da casca com o aumento da idade.

Após imergir ovos em solução contendo *S. enteritidis*, Chen et al. (2002) observaram a presença desta bacteria em 3,3% dos conteúdos internos dos ovos, enquanto 60,7% das cascas e membranas foram positivas. Como os ovos haviam sido desinfectados após a imersão e não foi encontrada *S. enteritidis* na superfície da casca, estes resultados indicaram que na maioria dos casos, *S. enteritidis* fica retida nos poros e membranas da casca e não consegue penetrar através das membranas da casca e atingir o albúmen.

Jones e Musgrove (2005b) com objetivo de avaliar a importância da resistência da casca para evitar a penetração de *S. enteritidis* em ovos, contaminaram a superfície da casca através de sua imersão em solução contendo essa bactéria e armazenou os ovos durante sete dias a 25ºC. A presença da *S. enteritidis* foi observada na superfície da casca de todos os ovos e também no conteúdo interno de 5,2% dos ovos. As análises de correlação não indicaram correlação significativa entre a resistência da casca e a contaminação do conteúdo dos ovos pela *S. enteritidis*, sugerindo que a resistência da casca não desempenha um papel tão importante na contaminação dos ovos por esta bactéria.

O albúmen também é uma barreira de proteção física do ovo, provavelmente devido à viscosidade do albúmen denso. Micro-organismos de origem extragenital, que conseguem passar através da casca e membranas, são freqüentemente mortos no albúmen antes de atingirem a gema. Com uma maior quantidade do albúmen denso, a gema também fica mais centralizada, mantendo maior distância da casca e suas membranas e de possíveis micro-organismos que consigam atravessá-las. De acordo com Pardi (1977), ovos que permanecem estocados por longos períodos de tempo, têm sua qualidade interna alterada favorecendo a multiplicação

bacteriana, devido a perda da viscosidade do albúmen.

O aumento do tempo de estocagem dos ovos, sobretudo em temperaturas mais elevadas, reduz a resistência da membrana vitelina podendo favorecer a passagem de bactérias do albúmen para a gema, que além de não apresentar substâncias inibidoras à multiplicação dessas bactérias, é um excelente meio nutritivo (Jones e Musgrove, 2005b; Keener et al., 2006).

2.6.2. Defesas químicas do ovo

O albúmen é uma barreira biológica que contém substâncias que podem inibir a invasão de micro-organismos que passaram pelas defesas da casca (Overfield, 1974). O albúmen contém uma complexa mistura de proteínas, que além da função nutricional, protegem a gema contra injúrias mecânicas e têm ação bactericida (Solomon, 1991).

O pH do albúmen de ovo recém-posto, normalmente, varia de 7,6 a 7,9. A maioria dos micro-organismos cresce neste pH, apesar desse valor estar acima do ideal. Entretanto, o pH do albúmen aumenta de acordo com o aumento do período de armazenamento do ovo, e pode chegar a 9,5, o qual, em geral, possui efeito inibidor no crescimento de bactérias (Romanoff e Romanoff, 1963; Alleoni e Antunes, 2001).

O efeito do pH do albúmen sobre o crescimento e multiplicação de *Salmonella* spp. foi estudado por Messens et al. (2004). Após inocular várias espécies de salmonelas (*S. enterica* Enteritidis, *S. enterica* Typhimurium, *S. enterica* Senftenberg, *S. enterica* Mbandaka, *S. enterica* Blockley e *S. enterica* Stanleyville) no albúmen de ovos e armazenar por até três semanas a 20ºC, foi observado que no albúmen de ovos frescos ocorreu maior crescimento de *Salmonella* do que em albúmen de ovos armazenados por até três semanas.

Além de possuir valor de pH mais alto, o albúmen possui substâncias que atuam como barreiras ao crescimento de micro-organismos, entre elas estão a lisozima, a coanalbumina, a ovomucóide, a avidina e a ovoflavoproteína (Tab. 1). Outros componentes não bem caracterizados também atuam como barreiras químicas à invasão microbiana do ovo (Pardi, 1977; Alleoni, 2006). A avidina e a ovoflavoproteína, ligam-se a biotina e a riboflavina, respectivamente, indisponibilizando-a para as bactérias. A ovomucóide é um inibidor da tripsina e de proteases fúngicas. A ovotransferrina ou conalbumina é capaz de se ligar aos íons ferro, que seriam usados para sobrevivência das bactérias (Stadelman e Cotterill, 1995). Além do alto pH ser desfavorável ao crescimento de micro-organismos, ele acentua a quelação dos íons ferro pela ovotransferrina, indisponibilizando-o para o crescimento bacteriano (Chen et al., 2002). O ovoinibidor é capaz de inibir a tripsina, quimiotripsina e enzimas microbianas (Ordónez, 2005).

A lisozima é uma enzima abundante em ovos que catalisa a hidrólise de polissacarídeos protetores das paredes das células de algumas famílias de bactérias. A lisozima mata as bactérias por hidrolisar a ligação glicosídica denominada ($\beta 1 \rightarrow 4$) entre a N-acetilglicosamina e o ácido N-acetilmurâmico. Esta ligação é importante, pois é a estrutura que confere rigidez à parede celular de bactérias evitando o inchaço celular e lise devido à entrada osmótica de água. Dessa forma, essa enzima pode causar lise ou degradar as paredes celulares de bactérias e serve como um agente bactericida (Lehninger, 2004).

Tabela 1: Proteínas do albúmen do ovo

Proteína	% do albúmen	Características
Ovoalbumina	54	Fosfoglicoproteína
Ovotransferrina	12	Liga-se a íons metálicos
Ovomucóide	11	Inibição da tripsina
Ovomucina	3,5	Sialoproteína, viscosidade
Lisozima	3,4	Lise de algumas bactérias
G2 globulina	4	-
G3 globulina	4	-
Ovoinibidor	1,5	Inibe a serina protease
Ovoglicoproteína	1	Sialoproteína
Ovoflavoproteína	0,8	Liga-se a riboflavina
Ovomacroglobulina	0,5	Alta atividade antigênica
Cistatina	0,05	Inibe a tiol proteinase
Avidina	0,05	Liga-se a biotina

Fonte: Adaptado de Stadelman e Cotterill, (1995).

A lisozima também é uma proteína abundante nas membranas que circunscrevem o albúmen e que estão intimamente próximas às membranas da casca. Além das membranas da casca, ela também está presente na matriz calcificada da casca auxiliando em suas propriedades antimicrobianas e ajudando a casca a exercer sua função protetora do ovo (Hincke et al., 2000; Ahlborn e Sheldon, 2005). Além de sua conhecida propriedades anti-microbianas a lisozima da matriz da casca também pode ser uma proteína estrutural, que na forma solúvel, influencia a deposição de carbonato de cálcio durante a calcificação. Hincke et al. (2000) chegaram a essa conclusão depois que cultivaram cristais de calcita na presença de lisozima purificada e observaram que ocorreu alteração da morfologia desse cristal.

Mine et al. (2003) estudaram o efeito antibacteriano da casca de ovos através da inoculação de bactérias em um extrato de proteínas da casca, preparado pela extração com ácido acético. *Pseudomonas aureginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* foram inibidas na presença das proteínas da matriz da casca, enquanto *Escherichia coli* e *S. enteritidis* foram levemente inibidas em um estágio inicial de incubação (até 4h) e depois conseguiram se multiplicar. A inoculação do extrato de proteínas da casca com *S. aureus* revelou à microscopia eletrônica de varredura que a proteínas da matriz da casca podem interagir e romper a integridade da membrana das bactérias.

Barros et al. (2001) imergiram ovos em cultura de *S. enteritidis* e não detectaram a presença dessa bactéria no conteúdo interno dos ovos. Esses autores justificaram essa ausência a fatores antimicrobianos encontrados no albúmen, como a ação de enzimas e a deficiência do íon ferro. Eles também observaram que após a contaminação das cascas dos ovos com *S. enteritidis*, a temperatura de armazenamento teve papel essencial na sobrevivência dessa bactéria na casca. O armazenamento dos ovos a 8ºC demonstrou ser eficiente na redução dessa bactéria após 24h e em sua ausência na casca após 96 e 168h. O armazenamento a 25ºC permitiu a permanência da *S. enteritidis* nas cascas até 168h após o seu armazenamento.

Jones et al. (2004a), após inocular *S. enteritidis* e *Pseudomonas fluorescens* em conteúdo de ovos de diferentes linhagens,

observaram uma multiplicação dessas bactérias durante cinco semanas de estocagem. Segundo os autores, os diferentes resultados encontrados entre as linhagens indicam que a seleção genética tem alterado a habilidade do ovo em resistir a contaminação microbiana.

2.7. Modo de contaminação do ovo

Há apenas duas explicações para a presença de micro-organismos em ovos considerados frescos e que não tenham sido expostos a condições ambientais adversas. A primeira ocorre devido à incorporação de bactérias durante a formação do ovo no ovário ou oviduto, podendo ser considerada de origem congênita (vertical) e a segunda, quando há penetração através da casca do ovo, após a sua postura, sendo chamada de contaminação extragenital ou horizontal (Romanoff e Romanoff, 1963; Stadelman e Cotterill, 1995).

Gast e Beard (1992) inocularam *S. enteritidis* por via oral em poedeiras e observaram que mesmos em poedeiras soropositivas para *S. enteritidis*, o número de ovos contaminados com essa bactéria era baixo. Nos ovos analisados imediatamente após a postura foi observada a presença dessa bactéria em 3% das amostras analisadas, enquanto nos ovos analisados após sete dias de armazenamento a 7,2ºC foram observadas 4% de amostras positivas. Os ovos armazenados a 25ºC por sete dias, além de apresentarem 16% de suas amostras positivas também apresentaram um maior número de células de *S. enteritidis* em comparação aos ovos armazenados a 7,2ºC.

S. enteritidis tem a capacidade de colonizar o canal ovopositor da ave podendo se instalar no folículo ovariano e oviduto. Essa colonização pode causar contaminação da membrana que envolve a gema durante a formação do ovo (contaminação congênita). Também pode ocorrer a colonização da cloaca em animais com infecções inaparentes, acarretando a contaminação do ovo através das fezes com presença deste patógeno (Humphrey, 1994). Keller et al. (1995) observaram que a produção de ovos contaminados com *S. enteritidis* coincidiu com a intensa contaminação cloacal, sendo que poedeiras com baixa colonização cloacal não produziram ovos contaminados.

Segundo Thiagarajan et al. (1994), para ocorrer a transmissão trans-ovariana, *S. enteritidis* invade as células da granulosa no ovário, e permanece neste lugar até a ruptura do estigma do folículo, durante a ovulação. Porém, para estes autores, o isolamento de *S. enteritidis* no albúmen sugere que a contaminação do ovo pode ocorrer também após o processo de ovulação. Portanto, a possibilidade da bactéria contaminar o ovo no oviduto não pode ser descartada.

Keller et al. (1995) observaram em dois diferentes experimentos que 27,1% e 31,4% dos ovos em formação no oviduto de poedeiras infectadas com *S. enteritidis* (inoculação oral com 10^8UFC) apresentavam-se contaminados. No entanto, nos ovos recém-postos, a taxa de contaminação variou entre zero e 0,6%, sugerindo que fatores como anticorpos, enzimas antibacterianas, seqüestro de ferro e proteínas inibidores de proteases bacterianas presente na gema e albúmen são capazes de controlar a contaminação dos ovos por *S. enteritidis* antes da completa formação da casca e da postura dos ovos.

O albúmen, em geral, apresenta-se com baixa contaminação microbiana, pois contém elementos naturais que dificultam o desenvolvimento bacteriano, como a presença de enzimas anti-bacterianas (lisozima) e a deficiência em ferro, elemento essencial para a multiplicação bacteriana. Contudo, a manipulação do albúmen no preparo de determinados pratos pode romper esse equilíbrio e favorecer a

multiplicação bacteriana (Oliveira e Silva, 2000).

2.8. Micro-organismos envolvidos na contaminação de ovos

O interior dos ovos recém postos é geralmente livre de micro-organismos, devido à proteção natural proveniente das estruturas físicas do ovo e da constituição química do albúmen. Porém, a contaminação do ovo pode ocorrer antes da postura ou imediatamente após esta, resultando na perda da qualidade do ovo ou na disseminação de doenças entre as aves e o homem. Os micro-organismos presentes na casca de ovos são provenientes do ambiente ou da contaminação do ovo ao passar pela cloaca das aves (Romanoff e Romanoff, 1963).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1990), o ovo integral líquido deve apresentar contagem padrão máxima de $5x10^4$UFC/g, ausência de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus aureus* em 1g de ovo e ausência de *Salmonella* spp. em 25g de ovo. Para ovos *in natura*, essa legislação não faz nenhuma referência a padrões microbiológicos, enquanto a Resolução nº 12 de 2001 (ANVISA, 2001) determina apenas a ausência de *Salmonella* sp. para ovos *in natura*.

Moats (1980) analisando a qualidade microbiológica de ovos lavados e não lavados de diferentes plantas de beneficiamento, observou as seguintes porcentagens de micro-organismos nas cascas de ovos: *Streptococcus* 8%, *Staphylococcus* 41%, *Micrococcus* 15%, *Aerococcus* 8%, *Coryneform* 15%, *Lactobacillus* 1%, *Flavobacterium* 1%, Coli-aerogenes 10%, outros aeróbios Gram negativo 1%, leveduras e mofos 1%. A contagem de micro-organismos da casca dos ovos foi bem variável, apresentando menor contagem nos ovos lavados.

A aplicação de óleo vegetal sobre a casca não resultou em melhoria da qualidade microbiológica de ovos armazenados por quatro semanas em temperatura ambiente e quatro meses sob refrigeração (Imai, 1981). Entretanto, os ovos armazenados sob refrigeração por até quatro meses, independentemente de terem recebido ou não aplicação de óleo, apresentaram qualidade microbiológica superior aos ovos armazenados por duas semanas em temperatura ambiente. De qualquer maneira, segundo o autor, o prazo de validade dos ovos com e sem aplicação óleo parece ser limitado a um período de um a dois meses em ovos mantidos sob refrigeração. Foi observada a presença de bactérias Gram negativo, especialmente de bactérias psicrotróficas como *Pseudomonas, Aeromonas, Flavobacterium, Alcaligenes, Acinetobacter* e *Enterobacter* em ovos estocados por quatro semanas em temperaturas ambiente. A ausência de crescimento de bactérias Gram positivo foi atribuída à presença da lisozima no albúmen do ovo. Nos ovos armazenados sob refrigeração por quatro meses também foram observadas a presença das mesmas bactérias psicrotróficas Gram negativo dos ovos armazenados em temperatura ambiente, além de *Klebsiella, Citrobacter, Serratia* e alguns cocos Gram positivo.

Em ovos coletados em diversos pontos de venda do município de Botucatu-SP, Langoni et al. (1995) observaram a presença de pelo menos uma bactéria em 57,84% das amostras e em 8,82% das amostras de ovos havia mais de uma bactéria presente. Foi observada a presença das seguintes bactérias: *Streptococcus β* hemolítico (17,65%), *Escherichia coli* (10,7%), *Staphylococcus epidermidis* (9,8%), *S. aureus* (6,86%), *Streptococcus α* hemolítico (5,88%), *S. enterica* Enteritidis (1,96%), *S. enterica* Virchow (0,98%), *S. entérica* Thyphimurium (0,98%), *Corynebacterium* sp. (2,94%), *Bacillus*

cereus (2,94%), *Enterobacter aerogenes* (1,96%), *Micrococcus* sp. (0,98%), *Enterobacter cloacae* (0,98%), *Pasteurella haemolytica* (0,98%) e *Shiguela* sp. (0,98%).

Papadopoulou et al. (1997) detectaram a presença de várias espécies de bactérias como *S. aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis, Enterobacter agglomerans, Serratia liquefaciens, Citrobacter freundii, Pseudomonas stutzeri* e *Pseudomonas aeruginosa* em ovos coletados em diferentes estabelecimentos.

Segundo Jordan e Pattison (1998), a contaminação de ovos por *E. coli* pode resultar de sua penetração através da casca, e estima-se que 0,5 a 6% dos ovos podem conter esse micro-organismo. Estes autores descreveram vários outros micro-organismos que são capazes de contaminar o ovo (Tab. 2). Segundo Ricke et al. (2001) citado por Aragon-Alegro et al. (2005), entre os gêneros bacterianos mais comumente envolvidos na deterioração do ovo estão as *Pseudomonas, Actinobacter, Proteus, Aeromonas, Alcaligenes, Escherichia, Micrococcus, Serratia, Enterobacter, Flavobacterium, Salmonella, Staphylococcus, Campylobacter, Listeria* e *Yersinia.*

Tabela 2: Micro-organismos mais comuns que podem ser encontrados em ovos

Micro-organismos	
Vírus	
Retrovirídae	
Oncovirinae	Leucose /sarcoma tipo C
Vírus da retículoendoteliose	
	Outras neoplasias virais (raramente)
Picornaviridae	Enterovírus aviário – encefalite aviária à vírus
Reoviridae	Reovírus aviário
	Rotavírus aviário (duvidoso)
Adenovírus	Adenovírus aviário grupo 1
	Adenovírus aviário grupo 2
	Vírus da egg drop syndrome
Ortomyxoviridae	Vírus da influencia aviária
Circoviridae	Vírus da anemia (duvidoso)
Bactérias	
Salmonela spp.	Grande nº de sorotipos
E. coli	
Staphylococcus spp.	Várias espécies
Streptococcus spp.	Várias espécies
Mycobacterium avium	Tuberculose aviária (raramente)
Campylobacter spp.	(Raramente- possível através de cascas)
Mycoplasmas	
M. gallisepticum e M. synoviae	
Chlamydia	
C. psittaci	
Fungos	
Aspergillus fumigatus	Outras espécies de aspergilus também podem ser transmitidas pelo ovo
Organismos esporulados	Incluem grande variedade de organismos Gram positivo e Gram negativo, mas que são contaminantes comensais

Fonte: Adaptado de Jordan e Pattison (1998)

Cardoso et al. (2001) observaram a presença de coliformes totais em 33,3% e de termotolerantes em 8,3% das amostras de ovos coletados de vários fornecedores da região de Descalvado, no estado de São Paulo.

Apesar de poder ser isolada da superfície da casca de ovos de galinhas contaminadas com *Campylobacter jejuni*, essa bactéria não foi encontrada em conteúdos de ovos, pois normalmente este micro-organismo não consegue penetrar nas cascas de ovos. Porém, quando inoculado em gemas e armazenado a 18ºC, sobrevive por até 14 dias. Entretanto, a sua viabilidade foi drasticamente reduzida quando inoculado no albúmen ou na câmara de ar (Doyle, 1984; Jordan e Pattison, 1998; Sahin et al., 2003).

Andrade et al. (2004), analisando ovos comercializados em supermercados, feiras livres, postos de venda e granjas de Goiana – GO, observaram a presença de *Pseudomonas* spp. em 39,3% das amostras, *Enterobacter* spp. em 33,0%, *Escherichia coli* em 12,5%, *Citrobacter* spp. em 4,5%, *Salmonella* spp. em 4,5%, *Klebsiella* spp. em 0,9% e *Aspergillus* spp. em 5,4%.

Musgrove et al. (2004) avaliaram ovos lavados e não lavados armazenados pelo período máximo de cinco semanas e encontraram na superfície das cascas desses ovos micro-organismos como *E. coli, Enterobacter* spp., *Enterobacter cloacae, Enterobacter sakazakii, Serratia* spp., *Kluyvera* spp., *Salmonella, Citrobacter youngae, Klebsiella pneumoniae, Rahnella aquatilis, Providencia rettgeria, Providencia* spp., *Yersinia* spp., *Pantoea spp.* e não–Enterobacteriaceae incluindo *Xanthomonas maltophilia e Flavimonas oryzihabitans.* É interessante ressaltar que *E. coli* foi isolada em todas as três repetições na semana zero e em pelo menos uma repetição durante as semanas um, dois, três e cinco, mas somente em ovos não lavados. *Enterobacter* spp. foi o segundo micro-organismo mais isolado.

Jones et al. (2004b) não observaram diferença entre ovos lavados e não lavados e armazenados a 4ºC durante 10 semanas para *Enterobacteriaceae, Pseudomonas* sp., mesófilos aeróbios totais e bolores e leveduras. A contagem média de mesófilos em ambos os tratamentos foram inferiores a 10UFC/mL durante todo o período de armazenamento e a maior contagem encontrada foi $1,6x10^4$UFC/mL na 9ª semana de armazenamento. Do mesmo modo, observou-se também uma baixa contagem de bolores e leveduras (2UFC/mL) e que apenas 3,2% das amostras foram positivas para *Enterobacteriaceae*, sendo todas inferiores a 10UFC/mL. No caso de *Pseudomonas* spp., 12,1% das amostras foram positivas e a maior contagem observada foi $1,6x10^4$UFC/mL.

Analisando amostras de ovos coletadas em uma indústria de processamento durante a etapa da quebra, Aragon-Alegro et al. (2005) não observaram a presença de *Listeria* spp. nem *S. aureus.* Entretanto, foi observado presença de *Salmonella* spp. e contagem de bactérias aeróbias mesófilas de até $2,4x10^5$UFC/g.

Martínez et al. (2005) analisaram ovos de 10 marcas diferentes e comercializados em vários tipos de estabelecimentos na Cidade do México – México e encontraram 12 gêneros bacterianos diferentes: *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Bacillus* spp., *Branhamella* spp., *Edwardsiella* spp., *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., *Yersinia* spp. e *Salmonella enteritidis.* Do total de 131 bactérias isoladas, não foi possível identificar 20 bactérias. Na gema foram observados 67% das bactérias isoladas, no albúmen 20% e nas cascas 13%. Apenas uma amostra positiva (0,25%) de

Staphylococcus spp., foi isolada do albúmen e uma amostra positiva (0,25%) de *Salmonella enteritidis* foi isolada da gema.

Jones et al. (2005b) observaram contagens de bactérias aeróbias variando de $2{,}0x10^0$ a $3{,}0x10^0$UFC/mL no conteúdo dos ovos comerciais submetidos ao processo de lavagem com água em diferentes temperaturas. Embora a utilização de água em diferentes temperaturas não tenha influenciado na contagem de bactérias aeróbias no conteúdo dos ovos, a lavagem com água em temperatura mais alta (48,9ºC) reduziu a contagem de bactérias aeróbias nas cascas e membranas da casca em comparação a lavagem com água com temperaturas mais baixas (15,6ºC).

Em outro trabalho semelhante, Jones et al. (2006) não observaram nenhuma amostra positiva para *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e *Campylobacter* spp. no conteúdo interno de 384 amostras de ovos. Nas cascas dos ovos foram encontrados *Salmonella* spp. em 0,78% e *Campylobacter* spp. em 0,5% das amostras analisadas. A presença de *Listeria* spp. (0,78%) foi observada apenas nas amostras de água utilizada na lavagem dos ovos. Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada a presença de *S. enteritidis* e *Listeria monocytogenes*. A contagem de *Enterobacteriaceae* nos conteúdos dos ovos foi baixa e sua incidência esporádica ao longo das oito semanas de armazenamentos dos ovos.

Adesiyun et al. (2006) realizaram análises microbiológicas em ovos coletados em granjas, supermercados e pequenos comércios e observaram a presença de *Enterobacter* spp. (3,3%), *Klebsiella* spp. (1,6%), *Citrobacter* spp. (0,5%), *Serratia* spp. (1,6%), *Proteus* spp. (2,2%), *Pseudomonas* spp. (1,1%), *Acinetobacter* spp. (0,5%), *Alcaligenes* spp. (0,5%) e outras enterobactérias (6,0%).

Para avaliar a penetração de diferentes bactérias através da casca de ovos, De Réu et al. (2006) substituíram todo o conteúdo interno dos ovos por ágar nutriente e após esse procedimento, passaram os ovos por imersão em solução contendo *Staphylococcus warneri, Acinetobacter baumannii, Alcaligenes* sp., *Serratia marcescens, Carnobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. *e S. enteritidis*. Através da redução do cloreto de trifenil tetrazólio presente no ágar a formazan, que é de cor vermelha, observaram que as características da casca como área da casca, espessura da casca e número de poros não influenciaram na taxa de penetração bacteriana pela casca. Os autores também observaram que as cascas de ovos com menor deposição de cutícula apresentaram maior penetração bacteriana do que as cascas com maior deposição de cutícula. Todas as cepas utilizadas foram capazes de penetrar através das cascas e essa passagem ocorreu mais frequentemente após quatro a cinco dias de estocagem. Os resultados indicaram que as bactérias Gram negativo, móveis e não agrupadas foram as bactérias que penetraram na casca com maior freqüência. *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp. foram as bactérias com maior taxa de penetração, com 60% e 58% das cascas, respectivamente, seguidos pela *S. enteritidis* com 43% de taxa de penetração. Ao analisar ovos *in natura*, ou seja, que não tiveram seu conteúdo interno substituido por ágar nutriente e que passaram pelo mesmo processo de imersão, verificou-se também que a área da casca e sua porosidade não influenciaram na taxa de penetração das bactérias. Neste caso, *S. enteritidis* foi a bactéria com maior taxa de penetração através das cascas, sendo encontrada em 33% das amostras. Tanto nos ovos *in natura* quanto nos ovos que tiveram seu conteúdo interno substituido por ágar nutriente, os que apresentaram maior penetração de bactérias pela casca foram também os que apresentaram maior

contaminação da superfície da casca após 21 dias de estocagem.

Jones e Musgrove (2007) analisaram ovos que seriam destinados a indústria por não apresentar características (padrão) de qualidade para comercialização *in natura*. A contagem de micro-organismos aeróbios no conteúdo dos ovos variou de $2,0x10^1$ a $8,0x10^2$UFC/mL, tendo como média $1,0x10^2$UFC/mL. Foram encontrados baixos níveis de Enterobacteriaceae nos conteúdos dos ovos, embora a prevalência tenha sido de 36,7% das amostras. Uma amostra de casca (0,5%) foi positiva para *Campylobacter* spp. enquanto duas amostras de casca (1,1%) foram positivas para *Salmonella* spp., (ambas *S. entérica* Heidelberg). Aproximadamente 37% das amostras das cascas foram positivas para *Listeria* spp., enquanto apenas 6% dos conteúdos apresentaram esta bactéria. As amostras identificadas foram *L. grayi* (2,6%), *L. welshimeri* (13,2%) e *L. innocua* (84,2%). *L. innocua* foi isolada apenas dos conteúdos ovos.

Musgrove et al. (2008) identificaram vários gêneros e espécies de bactéria nas cascas de ovos coletados na indústria durante as etapas de pré-lavagem, lavagem, secagem, classificação, embalagem, entre outras. Foram observados os seguintes gêneros da família Enterobacteriaceae**:** *Cedecea*, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Escherichia* e *Enterobacter*. As bactérias não Enterobacteriaceae isoladas foram: *Aeromonas*, *Chryseomonas*, *Listonella*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Vibrio* e *Xanthomonas.* Embora tenham sido isolados muitos gêneros bacterianos, poucos desses micro-organismos isolados e identificados são considerados patógenos de origem alimentar como *Salmonella* spp., *Enterobacter sakazakii*, *Vibrio* spp. e *Aeromonas hydrophila*.

Ao avaliarem a casca e a câmara de ar de ovos com suspeita de contaminação fúngica, Fraga et al. (2007) observaram que dos 140 ovos analisados, 80 apresentaram manchas superficiais nas cascas e destes, 72 estavam com a câmara de ar contaminada. Dos 60 ovos aparentemente livres de contaminação, 20 foram abertos para observação da câmara de ar e os outros 40 analisados após 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente e destes, sete ovos apresentaram a câmara de ar contaminada. Os fungos observados na superfície da casca dos ovos foram: *Aspergillus speluneus, A. sydowi, A. candidus, A. ambiguus, A. microcysticus, Fusarium solani, Mucor ramosissimus, Penicillium decumbens, P. citrinum, P. airantiogriseum, P. corylophilum, P. citreonigrum, P. waksmanii, P. nalagiovense, P. paxilli, P. viridicatum, P. pinophilum, P. purpurogenum* e *Scopulariopsis brevicaulis*. Nas câmaras de ar foram: *Aspergillus cameus, A. ambiguus, Bipolaris* spp., *Cladosporium termissimum, Fusarium roseum, Monocilium* spp., *Paecilomyces lilacinus, Penicillium corylophilum, P. griseofulvum, Scopulariopsis brevicaulis, Trichophyton soudanense* e *Verticillium* spp..

Figueiredo (2008), analisando a qualidade microbiológica de ovos de poedeiras com 30 e 60 semanas e armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração não observou a presença de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e coliformes termotolerantes. Uma única amostra (0,8%) apresentou a presença de *Enterobacter* sp. e duas amostras (1,7%) *Pseudomonas* sp. Em 14 amostras (11,7%) foram encontradas a presença de *Staphylococcus* coagulase negativo e em seis amostras (5%) a presença de fungos.

Klein (2010) também não observou a presença de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo em ovos provenientes das três principais

distribuidoras do estado de Minas Gerais após armazenamento em temperatura ambiente e sob refrigeração. Entretanto, foi observada a presença de *Staphylococcus* coagulase negativo em 11,8% das amostras, bolores e leveduras em 2,0%, mesófilos aeróbios em 62,5%, coliformes totais em 20,1% e termotolerantes em 1,4% das amostras.

Magalhães (2007) observou após a análise de *swabs* da superfície interna e externa da casca de ovos armazenados por 14 dias, que ovos com presença de fissuras na casca apresentavam maior contagem de bolores. Os ovos com a presença de fissuras na casca apresentaram contagem de bolores de 29,3UFC, enquanto os ovos sem fissuras na casca apresentaram apenas 17,7UFC. Foi observado também que os ovos embalados em filme plástico apresentaram menor contagem de bolores (17,5UFC) em comparação aos ovos que não estavam embalados em filme plástico (29,5UFC).

Torrico et al. (2010) não observaram a presença de micro-organismos mesófilos em ovos (método "pour plate") antes da aplicação de óleo mineral ou quitosana sobre a superfície de suas cascas e seu armazenamento por cinco semanas a 25ºC. Após esse período de armazenamento, foi observado uma contagem de 35UFC/g em ovos com aplicação de óleo mineral, 15UFC/g nos ovos com aplicação de quitosana e 5UFC/g nos ovos sem nenhuma aplicação. Utilizando outro método de análise (método "spread plate") os ovos analisados antes do armazenamento apresentaram contagem de $3,2x10^2$UFC/g e após o armazenamento, a contagem de micro-organismos mesófilos foi de apenas 25UFC/g. Os ovos com aplicação de óleo mineral e quitosana apresentaram contagem de 75UFC/g após o período de armazenamento.

A sobrevivência e o crescimento de micro-organismos no ambiente de processamento e armazenamento dos alimentos, em função da má higienização, podem levar à contaminação do produto, reduzindo a sua segurança e qualidade (Vanderzant e Splittstoesser, 1992). A alta umidade pode favorecer o crescimento de patógenos e de micro-organismos deteriorantes que podem ser transferidos diretamente para o produto ou ser carreados para outros ambientes. Se o ambiente está úmido e mal higienizado, certamente a viabilidade de micro-organismos indesejáveis será mantida (Sayeed e Sankaran, 1990).

A temperatura de estocagem é fundamental na preservação da qualidade microbiológica dos ovos. Bradshaw et al. (1990) inocularam *Salmonella enteritidis* em ovos estocados a 37; 15,5 e 7ºC e observaram maior multiplicação dessa bactéria nos ovos armazenados a 37ºC do que em 15,5ºC. Durante 94 dias de experimento não foi observada a multiplicação dessa bactéria em ovos armazenados a 7ºC. Segundo Miyamoto et al. (1998), quanto mais rápido os ovos forem armazenados sob refrigeração, menor será a capacidade de penetração de *Salmonella enterica enteritidis* e *Salmonella enterica* Typhimurium através das cascas.

Humphrey (1990) inoculou *Salmonella enteritidis* (sorotipos PT4, PT8, PT13A e PT141) na gema e albúmen de ovos e observou que após o armazenamento por até três semanas a oito, 10, 12 e 15ºC, não ocorreu crescimento dessa bactéria no albúmen em nenhuma temperatura de armazenamento, pelo contrário, houve redução da população viável nos ovos armazenados nas temperaturas de 12ºC e 15ºC. Nenhuma das cepas inoculadas conseguiu crescer nas gemas dos ovos armazenados a 8ºC e, quando armazenados a 10ºC, ocorreu uma prolongada fase de latência e um lento crescimento de todas as cepas, exceto a PT8, que não conseguiu se desenvolver nessa temperatura. Nos ovos armazenados a 12 e 15ºC ocorreu um

crescimento relativamente rápido e com uma curta fase de latência. Estes resultados demonstram que o armazenamento de ovos em temperaturas abaixo de 10ºC pode ter efeitos benéficos à saúde pública, por prevenir a multiplicação de salmonelas.

Oliveira e Silva (2000) estudaram o efeito do tempo e da temperatura de armazenagem sobre a multiplicação de *Salmonella enteritidis* na casca e gema de ovos experimentalmente contaminados por contato com maravalhas e mantidos em temperaturas ambiente e sob refrigeração. Os autores observaram a ocorrência de translocação de *S. enteritidis* da casca para a gema após 24h de contaminação nos ovos refrigerados e em 48h nos ovos mantidos em temperatura ambiente. Contudo, a armazenagem em temperatura ambiente permitiu que *S. enteritidis* chegasse à gema em maior número de vezes e com uma maior taxa de multiplicação.

De acordo com Chen et al. (2002), o rápido resfriamento de ovos (7,2ºC em menos de 30 min) e seu posterior armazenamento a 7,2ºC inibiu o crescimento de *S. enteritidis* na gema e albúmen durante 36 dias de armazenamento. Para avaliar o comportamento da *S. enteritidis* diante do armazenamento sob refrigeração e posterior armazenamento em altas temperaturas, os autores, após o processo de refrigeração, armazenaram os ovos por 30 dias a 7,2ºC e após esse período, os ovos foram mantidos a uma temperatura de 37ºC durante 6 dias. Os autores observaram que o resfriamento rápido após a postura inibiu o crescimento da *S. enteritidis* no albúmen durante os 36 dias de armazenamento, mesmo após os ovos serem mantidos a 37ºC por seis dias. Na gema, ao contrário, houve crescimento após o resfriamento rápido e posterior manutenção dos ovos por seis dias a 37ºC.

Para verificar se haveria alteração no crescimento de micro-organismos após uma oscilação de temperatura durante o transporte de ovos, Theron et al. (2003) aplicaram um choque térmico de 4ºC ou 37ºC, durante duas, quatro ou seis horas e, posteriormente, armazenaram os ovos a uma temperatura de 25ºC durante 14 dias. Foi observado que os ovos que receberam o choque térmico de 4ºC por quatro horas apresentaram melhor qualidade microbiológica, inclusive sobre os ovos que apenas permaneceram sob refrigeração a 8ºC e que não receberam nenhum choque térmico. Essa estratégia de aplicação de um choque térmico de 4ºC durante quatro ou seis horas apresentou efeito benéfico no controle de micro-organismos, tais como *Pseudomonas* spp. e coliformes totais. Os ovos que receberam a aplicação do choque térmico de 37ºC e depois foram armazenados a 25ºC tiveram uma redução considerável da sua qualidade microbiológica.

Lublin e Sela (2008) inocularam *S. enterica* Enteritidis e *Salmonella enterica* Virchow na gema de ovos e sobre a casca e armazenaram a 6ºC e 25ºC durante oito semanas. No primeiro dia de análise, após duas semanas de armazenamento, não foi detectada a presença de *S. enterica* Virchow nas cascas dos ovos em ambas as temperaturas de armazenamento, enquanto que a presença de *S. enteritidis* foi detectada apenas nas cascas de ovos armazenados a 25°C. Na gema, embora *S. enterica* Virchow tenha reduzido sua contagem, ela ainda sobreviveu por até seis semanas em ovos armazenados a 6°C e quando armazenados a 25°C, conseguiu se multiplicar até atingir a contagem de 10^9UFC/mL após oito semanas de armazenamento. Ao contrário da *S. entérica* Virchow que não conseguiu penetrar através da casca e atingir o interior dos ovos, *S. enteritidis* conseguiu penetrar através da casca em apenas uma amostra, após duas semanas de armazenamento 25ºC.

Em uma pesquisa realizada com ovos coletados no comércio varejista de Campinas-SP, no período de janeiro a março de 1995, Oliveira e Silva (2000) observaram a presença de *S. enteritidis* em 9,6% das cascas e 3,2% das gemas dos ovos analisados. Cardoso et al. (2007), em um trabalho semelhante, isolaram salmonelas em três cascas (2,8%) e apenas uma gema (0,9%), sendo *S. enteritidis* o único sorotipo identificado.

Baú et al. (2001), analisando amostras de ovos produzidos em granjas e em pequenas propriedades da cidade de Pelotas, não encontraram nenhuma amostra positiva para salmonela nas cascas e nos conteúdos desses ovos. Resultado semelhante foi observado por Silva et al. (2004), em conteúdos de ovos comercializados em Maceió. Carvalho et al. (2006) também não observaram a presença de *Salmonella* spp. em gemas de ovos adquiridos com no máximo cinco dias de comercialização.

Na Polônia, Radkowski (2001) avaliou 1200 ovos coletados em 40 supermercados e não detectou a presença de *Salmonella* spp. tanto na superfície da casca quanto no conteúdo dos ovos.

Peresi et al. (1998), analisando possíveis causas de surtos de salmonelose notificados no período de julho de 1993 a junho de 1997 na região noroeste do Estado de São Paulo, verificaram que em 22 (95,7%) dos 23 surtos ocorridos, a salmonela foi veiculada por alimentos que continham ovos. O consumo de alimentos à base de ovos crus foram responsáveis por 20 desses surtos (87,0%), enquanto à cocção insuficiente de ovos inteiros e o consumo de alimento cozido (nhoque) foram as causas dos outros dois surtos (8,7%). Apenas um surto (4,3%) foi associado ao consumo de carne de aves. Ao analisar 12 amostras de ovos que foram utilizados para elaboração dos alimentos envolvidos nestes surtos, em cinco amostras (41,7%) foram isoladas cepas de *Salmonella* spp.

2.9. Aminas bioativas

As aminas bioativas são bases orgânicas de baixo peso molecular e que possuem atividade biológica. Elas são naturalmente encontradas em baixos níveis em tecidos animais e vegetais, podendo ser formadas e degradadas como resultado da atividade metabólica normal de animais, vegetais e demais micro-organismos. Elas podem ser classificadas em poliaminas e aminas biogênicas. As poliaminas estão envolvidas no crescimento e regeneração celular, enquanto que as aminas biogênicas podem ser formadas durante a estocagem ou processamento de produtos alimentícios pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas (Brink et al., 1990; Lima e Glória, 1999; Salazar et al., 2000).

As aminas são formadas por transaminação de aldeídos ou cetonas, hidrólise de substâncias nitrogenadas, decomposição de fosfolipídeos, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos, sendo esta última a principal via de formação. A descarboxilação de aminoácidos ocorre pela remoção do grupo α-carboxila formando a amina correspondente (Halász et al., 1994; Shalaby, 1996). Deste modo, a arginina pode facilmente se converter em agmatina e a ornitina pode sofrer descarboxilação através da atividade bacteriana e formar putrescina. Devido a ação bacteriana, a lisina pode se transformar em cadaverina. A tiramina, triptamina e feniletilamina podem ser formadas a partir de tirosina, triptofano e fenilalanina, respectivamente. A histidina sob certas condições pode sofrer descarboxilação e se transformar em histamina (Shalaby, 1996). A composição de aminoácidos das proteínas do ovo está descrita na Tab. 3.

Tabela 3: Composição aminoacídica das proteínas do ovo

Aminoácidos	Quantidade (g)*
Arginina	0,41
Histidina	0,17
Isoleucina	0,43
Leucina	0,52
Lisina	0,42
Metionina	0,22
Fenilalanina	0,33
Treonina	0,34
Triptofano	0,12
Valina	0,5
Proteína total	6,1

Adaptado de Englert (1998). * Referência: ovo de 50g de peso.

As aminas bioativas são classificadas de acordo com o número de grupamentos amina, da estrutura química e da via biossintética. Quanto ao número de grupamento amina na molécula, são classificadas em monoaminas (tiramina, feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermina, espermidina e agmatina) (Smith, 1980; Smith, 1981; Bardócz, 1995; Silla Santos, 1996). A agmatina, que originalmente foi identificada como um neurotransmissor, recentemente, também foi classificada como uma poliamina (Moinard et al., 2005). De acordo com a estrutura química (Fig. 1), as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) e heterocíclicas (histamina, triptamina) (Silla Santos, 1996; Salazar et al., 2000).

Em relação à via biossintética, as aminas se classificam em biogênicas e naturais. As biogênicas são formadas pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas. Fazem parte deste grupo a histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina. As aminas naturais espermina e espermidina são formadas *in situ* nas células à medida que são requeridas, sendo a agmatina e a putrescina intermediárias. A histamina além de ser classificada como biogênica também pode ser classificada como natural, pois é armazenada nos mastócitos e basófilos (Bardócz, 1995; Shalaby, 1996; Lima e Glória, 1999).

2.9.1. Poliaminas

As poliaminas, putrescina, espermidina e espermina, formadas endogenamente pelas células e também retiradas da dieta, têm despertado bastante interesse nos pesquisadores, pois entre suas funções biológicas estão a participação no crescimento e proliferação celular através da regulação da função de ácidos nucléicos e síntese de proteínas, podendo estar envolvidos no processo de desenvolvimento dos tumores (Kalac e Krausová, 2005; Bardócz, 1995). Os requisitos de poliaminas são maiores durante os períodos de intenso crescimento, como na adolescência, mas também durante o envelhecimento devido à diminuição da atividade das enzimas participantes na síntese das poliaminas. Órgãos com altas taxas de reposição celular como o trato gastrointestinal, pâncreas e baço, foram reconhecidos como dependentes das poliaminas ingeridas na alimentação. Do mesmo modo, um aumento da ingestão de poliaminas na dieta parece ser favorável na recuperação de pacientes no pós-operatório

ou durante a cicatrização de feridas (Kalac, 2006). A depleção de poliaminas inibe a proliferação celular ou pode causar o desenvolvimento de fetos defeituosos, enquanto que um acúmulo exagerado induz apoptose e transformação celular (Moinard et al., 2005).

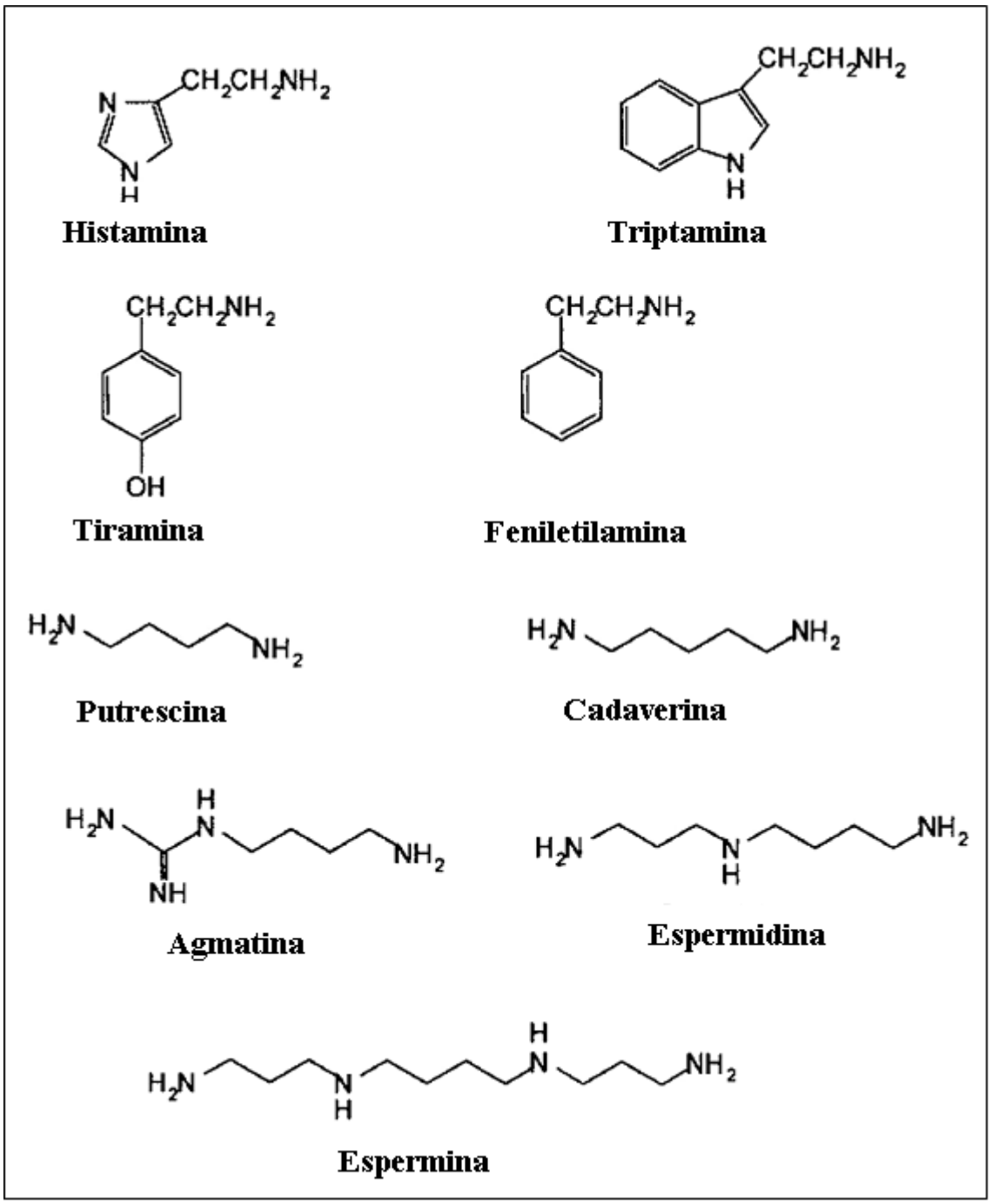


Figura 1: Estrutura química de algumas aminas biogênicas (Onal, 2007)

Segundo Cipolla et al. (2007), anormalidades no metabolismo de poliaminas podem estar envolvidas em diversos processos patológicos, incluindo o câncer. Entretanto, segundo Larqué et al. (2007), dietas com alto conteúdo de poliaminas podem desempenhar papel importante na recuperação da microbiota intestinal e da mucosa intestinal por causa de sua influência sobre os processos de reparação tecidual .

Foram identificadas três fontes de poliaminas, a biossíntese *in situ* a partir da arginina via ornitina, com ornitina descarboxilase como a enzima-chave, formando inicialmente putrescina (Fig. 2); a síntese e liberação pela flora bacteriana gastrointestinal, e; a ingestão direta na dieta. A dieta é uma importante fonte de fornecimento de pelo menos uma parte da demanda necessária de poliaminas para sustentar o metabolismo normal. No entanto, os requisitos diários ainda não foram determinados (Kalac, 2006).

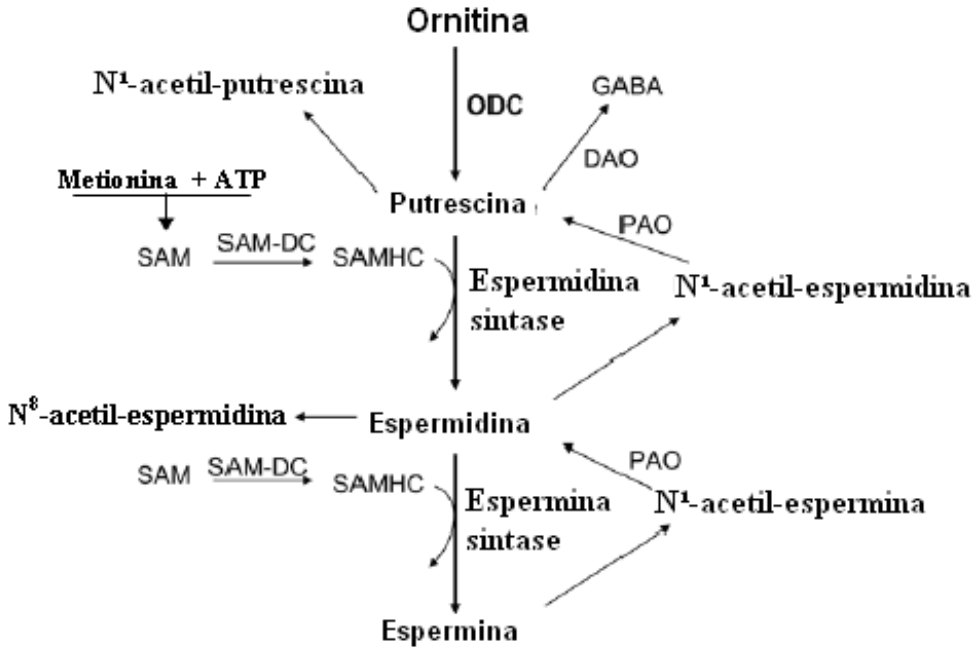


Figura 2: Síntese e interconversão das poliaminas. DAO, diamina oxidase; GABA, ácido γ-aminobutírico, ODC, ornitina descarboxilase; PAO, poliamina oxidase; SAM, S-adenosilmetionina, SAM-DC, S-adenosilmetionina descarboxilase; SAM-HC, S-adenosilmetionina homocisteamina (Larqué et al., 2007; Moinard et al., 2005).

Endogenicamente, as poliaminas podem ser sintetizadas a partir de ornitina por uma reação catalisada pela enzima ornitina descaboxilase (ODC), que produz putrescina. A espermidina é derivada da putrescina após a adição de um derivado do grupo propilamina (S-adenosilmetionina descarboxilado) pela ação da espermidina sintase. A espermidina é igualmente convertida em espermina pela enzima espermina sintase, que adiciona um segundo grupo propilamina de S-adenosilmetionina descarboxilado na espermidina. As sínteses de espermidina e espermina são, portanto, condicionadas à disponibilidade de um aminoácido

essencial, a metionina, o precursor da S-adenosilmetionina (SAM) pela sua condensação com o ATP na presença de íons Mg^{2+}. O teor de poliaminas intracelulares é fortemente regulado pela atividade de duas enzimas-chave, a ornitina descaboxilase e S-adenosilmetionina descarboxilase (SAM-DC). A interconversão das poliaminas é realizada por duas reações associadas: a acetilação, mediada pela ação de uma acetil coenzima A, a poliamina N-acetil-transferase e a clivagem através da ação de uma enzima, a poliamina oxidase (PAO). As reações de acetilação são os principais mecanismos usados pelas células para controlar o acúmulo intracelular de poliaminas (Larqué et al., 2007; Moinard et al., 2005).

A agmatina é uma amina que pode ser sintetizadas através da descarboxilação da L-arginina pela enzima arginina descarboxilase. A agmatina pode ser hidrolisada a putrescina pela enzima agmatinase, o que implica em outro caminho no processo de síntese de poliaminas. No entanto, embora esta rota seja claramente descrita em bactérias, ela é contraditória em mamíferos. A suplementação de agmatina em culturas de células tumorais produz uma supressão da proliferação celular (Moinard et al., 2005).

2.9.2. Aminas em alimentos

A formação de aminas em alimentos tem como pré-requisitos a disponibilidade de aminoácidos livres, a presença de micro-organismos descarboxilase positivos e condições favoráveis que permitam o crescimento bacteriano, a síntese e a atividade das enzimas descarboxilase (Brink et al., 1990). Normalmente, aminoácidos livres estão presentes em alimentos, mas também podem ser provenientes de proteínas como resultados de atividades de micro-organismos proteolíticos. Micro-organismos descarboxilase positivo podem fazer parte da população associada ao alimento ou podem ser introduzidos por contaminação antes, durante ou após o processamento (Halász et al., 1994). Apesar das aminas serem normalmente formadas durante o processo de decomposição ou deterioração (envolvendo formação de aminoácidos livres através de proteólise com presença bacteriana e ação de enzimas descarboxilase), altos níveis de histamina podem ser formados antes dos alimentos apresentarem características organolépticas ruins ou inaceitáveis, predispondo o seu consumo por parte do homem (Shalaby, 1996).

Como as aminas são formadas pela atividade enzimática do alimento ou pela atividade descarboxilase de bactérias, a inibição da atividade e a prevenção de crescimento bacteriano seriam muito importantes para controlar o teor de amina de alimentos (Silla Santos, 1996).

A histamina, putrescina, cadaverina, espermina, espermidina, agmatina, tiramina, feniletilamina e triptamina são as mais importantes aminas biogênicas encontradas em alimentos (Shalaby, 1996; Min et al., 2007). As poliaminas espermidina e espermina são encontradas principalmente em matérias-primas, enquanto que a quantidade de putrescina aumenta devido a atividade bacteriana durante o processamento e armazenamento inadequado de alimentos de origem animal (Kalac e Krausová, 2005). Como a alta concentração dessas substâncias em alimentos podem ser devido a ação de enzimas bacterianas, elas podem ser usadas como indicador da qualidade de alimentos (Halász et al., 1994).

Estudos indicam que inúmeras bactérias são produtoras de aminas, principalmente as representantes da família Enterobacteriaceae, particularmente os gêneros *Escherichia, Enterobacter, Salmonella, Shigella* e *Proteus* ao lado de

espécies dos gêneros *Achromobacter*, *Lactobacillus, Leuconostoc, Pseudomonas, Pediococcus, Streptococcus, Propionibacterium* e *Clostridium* (Lima e Glória, 1999). Segundo Glória (2005), a presença de cadaverina em amostras deterioradas poderia indicar contaminação por enterobactérias, pois elas são capazes de descarboxilar a lisina.

Silla Santos (1998) observou que bactérias de várias espécies apresentaram capacidade de descarboxilar aminoácidos como, por exemplo, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus curvatus* e *Hafnia alvei* que apresentaram atividade histidina descarboxilase positiva. A tirosina foi descarboxilada por bactérias das espécies *Pseudômonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens* e *Staphylococcus saprophyticus*. A ornitina foi descarboxilada pela *E. aerogenes*, *E. coli*, *P. fluorescens, S. liquefaciens* e *Micrococcus varians* e a lisina pela *E. aerogenes, P. fluorescens*, *E. coli* e *S. liquefaciens.* As bactérias da família Enterobacteriaceae apresentaram maior atividade na descarboxilação de aminoácidos que as bactérias ácido lácticas, micrococos e estafilococos.

A produção de aminas por micro-organismos é influenciada pelo pH dos alimentos, temperatura de armazenamento, concentração de oxigênio, presença de vitaminas e coenzimas, concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis. *Enterobacter cloacae* produziu 2mg de putrescina/mL após 24 horas de incubação a 20ºC, sendo que a 10ºC não houve produção desta amina. *Klebsiella* sp. também mostrou menor produção de cadaverina a 10ºC do que a 20ºC. Foi verificado que a produção de histamina é mais lenta a 10ºC e praticamente cessa a 5ºC. O pH ótimo para ocorrência da descarboxilação de aminoácidos varia entre 2,5 a 6,5, além disso, o crescimento de bactérias em meio ácido estimula a síntese das enzimas descarboxilases (Hudson-Arnold e Duane-Brown, 1978, Halász et al., 1994).

Rokka et al. (2004) avaliando a qualidade de cortes de frangos embalados em atmosfera modificada e armazenados em diferentes temperaturas, observaram que a temperatura de armazenamento afetou a taxa de formação da tiramina. Quando armazenados acima de 6,1ºC, os níveis de tiramina aumentaram após cinco dias, enquanto os níveis de putrescina e cadaverina aumentaram após sete e nove dias, respectivamente. Embora putrescina e cadaverina não tenham sido formados em temperatura abaixo de 6,1ºC houve formação de tiramina, mas em uma taxa mais lenta do que quando os cortes de frangos estavam armazenados em temperaturas acima de 6,1ºC. A formação de tiramina pareceu ser altamente compatível com o aumento na contagem de aeróbios mesófilos viáveis durante o armazenamento, já que em níveis acima de 10^6 UFC/g ocorreu uma associação linear entre a contagem de aeróbios mesófilos viáveis e os níveis de tiramina.

Peña (2006) ao analisar amostras de Salames Tipo Italiano, verificou que o pH de 4,6 a 4,9 encontrado nas amostras foi favorável a produção de altas concentrações de histamina (entre 93 e 145 $mg.Kg^{-1}$) e de tiramina (entre 67 e 71 $mg.Kg^{-1}$). Segundo o autor, estes valores de pH foram um fator importante ao influenciar o metabolismo dos micro-organismos e originar enzimas descarboxilases que determinaram os níveis dessas aminas.

2.9.3. Efeitos tóxicos das aminas

Embora algumas aminas como histamina, tiramina, putrescina, espermina e espermidina sejam necessárias para realização de muitas funções fisiológicas nos homens e animais, o consumo de

alimentos contento altas quantidades destas aminas podem causar efeitos tóxicos. A toxidade das aminas biogênicas depende da resposta individual de cada pessoa e a presença simultânea de cofatores como outras aminas, consumo de álcool ou produtos farmacêuticos que podem agir sinergicamente ou como antagonistas (Min et al., 2007). A sintomatologia clínica da intoxicação por aminas varia de acordo com a amina ingerida, podendo causar crises hipotensivas ou hipertensivas, taquicardia, bradicardia, salivação, lacrimejamento, aumento da freqüência respiratória e dor de cabeça. A intoxicação por histamina é a mais freqüente intoxicação causada por aminas biogênicas e apresenta como sintomas a urticária, coceira, inflamação localizada, edema, náusea, vômito, diarréia, dor abdominal, hipotensão, dor de cabeça, rubor e taquicardia (Shalaby, 1996; Lima e Glória, 1999).

Os efeitos farmacológicos da tiramina no organismo são a vasoconstrição periférica, aumento do débito cardíaco, lacrimejamento e salivação, aumento da frequência respiratória, aumento do nível de açúcar no sangue, liberação de noradrenalina no sistema nervoso simpático e enxaqueca. Hipotensão, bradicardia, contração exagerada dos músculos da mandíbula, paralisia das extremidades e potencialização da toxicidade de outras aminas são os efeitos observados na cadaverina e putrescina, enquanto a feniletilamina causa liberação de noradrenalina no sistema nervoso simpático, aumento da pressão arterial e enxaqueca. A triptamina pode levar ao aumento da pressão arterial (Shalaby, 1996).

As monoaminas biogênicas (serotonina, feniletilamina e tiramina) e as diaminas (histamina e triptamina) também são formadas e degradadas durante o metabolismo celular, apresentando grande variedade de funções fisiológicas, como a regulação da temperatura corpórea, volume e pH do estômago, além de poder alterar a atividade cerebral. Há evidências que na presença de nitrito e ácidos, a espermidina e possivelmente a espermina podem levar a formação de nitrosaminas em alimentos. Em alimentos gordurosos como o bacon, altas temperaturas e na presença de água, o carcinógeno N-nitrosopirrolidina pode ser formado pela putrescina e espermidina (Bardócz, 1995).

O organismo de indivíduos saudáveis podem rapidamente metabolizar as aminas ingeridas por acetilação e reações de oxidação mediadas por enzimas como a MAO (monoaminoxidase), DAO (diaminoxidase) e PAO (poliaminoxidase). Na presença de íons cobre (Cu^{2+}), essas enzimas aminoxidases degradam as poliaminas devido a deaminação oxidativa de seu grupo amino primário e seus derivados N-acetil, convertendo-os em produtos de degradação fisiologicamente inativos (Bardocz, 1995; Moinard et al., 2005; Seiler, 2004). No entanto, no caso de indivíduos alérgicos, na presença de inibidores das amino oxidases ou da ingestão de elevados níveis de aminas, o processo de metabolização pode ser interrompido ou limitado, levando ao acúmulo de aminas que ao entrar na corrente sanguínea provocam uma intoxicação (Silla Santos, 1996; Shalaby, 1996).

Embora os níveis tóxicos de aminas biotivas ainda não sejam precisos, Brink et al. (1990), consideram níveis de aminas entre 500 e 1000mg/Kg em alimentos potencialmente perigosos para saúde humana e sugerem um limite máximo de ingestão de 100 mg/Kg de histamina em alimentos, 2 mg/L de histamina em bebidas alcoólicas e 100-800 mg/Kg de tiramina e 30 mg/Kg de feniletilamina em alimentos.

Geralmente, o conteúdo de putrescina em carnes frescas é baixo, muitas vezes perto

do limite de detecção dos procedimentos analíticos. No entanto, níveis mais elevados foram observados na carne produzida com falta de higiene ou armazenadas em condições inadequadas. Geralmente o conteúdo de putrescina, espermidina e espermina de carnes frescas são menores que 2, menores que 5 e entre 20 a 40mg.kg^{-1}, respectivamente. Informações sobre mudanças no conteúdo de poliaminas durante o armazenamento da carne bovina e suína correspondem à formação de putrescina pela atividade bacteriana. No entanto, dados sobre alterações de espermidina e espermina durante o armazenamento sob refrigeração tem sido inconsistentes. O processamento da carne, provavelmente não altera os níveis de espermidina e espermina (Kalac, 2006).

A presença e a quantificação de aminas biogênicas têm sido amplamente pesquisadas em diferentes tipos de alimentos como queijos, vinhos, sucos, frutas, verduras e em carnes de diversas espécies como frango, bovina, suína e peixes (Shalaby, 1996; Lima e Glória, 1999; Kalac e Krausová, 2005). Entretanto, são poucos os artigos retratando a pesquisa de aminas em ovos e em sua maioria, as informações são baseadas em dados coletados em um pequeno número amostral (Figueiredo, 2008).

2.9.4. Aminas bioativas em ovos

Alguns trabalhos avaliando a presença de aminas em ovos são descritos na literatura. Saito et al. (1992) avaliaram ovos deteriorados quanto ao teor de aminas biogênicas e encontraram 1,52mg/100g de putrescina e 5,52mg/100g de cadaverina. Histamina, tiramina, espermidina e espermina estavam presentes em níveis abaixo do limite de detecção. Bardócz et al. (1995) observaram em ovos cozidos uma variação de 0,026 a 0,035; 0 a 0,015 e 0,02 a 0,06mg/100g de putrescina, espermidina e espermina, respectivamente.

Em um estudo realizado por Moudgal et al. (1991) foi observado a presença de histamina (0,0765 mg/100g) em gema de ovos frescos. Foi observado também que poedeiras com maior índice de postura apresentavam concentração superior de histamina nas gemas que poedeiras com menor índice de postura. Apesar da redução da concentração de histamina durante o armazenamento sob refrigeração a 10ºC por cinco dias e também ao aquecimento a 41ºC por 30 ou 60 minutos, essa amina ainda foi detectada após o cozimento dos ovos.

Okamoto et al. (1997) encontraram baixos teores de poliaminas em ovos *in natura* e cozidos. Os teores encontrados foram inferiores a 0,04mg/100g de putrescina, 0,1mg/100g de espermina, 0,05mg/100g de cadaverina, 0,05mg/100g de histamina e 0,14mg/100g de espermidina.

Lima et al. (2006) avaliaram a presença de putrescina, espermina e espermidina em ovos comercializados em supermercados e observaram quantidades semelhantes de espermidina e espermina no albúmen e gema destes ovos. Na gema crua observou-se 0,032mg/100g de espermidina e 0,076mg/100g de espermina enquanto no albúmen foram encontrados 0,054mg/100g de espermidina e 0,093mg/100g de espermina. Apesar de uma aparente diminuição dos teores de espermidina e espermina do albúmen após o cozimento, 0,038mg/100g e 0,049mg/100g respectivamente, e um aumento dessas aminas na gema para 0,044mg/100g de espermidina e 0,104mg/100g de espermina, o processo de cozimento não alterou significativamente o teor dessas poliaminas. Os teores das duas aminas observados nos ovos foram menores que os encontrados nos outros alimentos analisados, como batata, arroz, feijão, tomate, laranja, cebola e alho. A putrescina foi detectada apenas em níveis de traços.

Pesquisando a presença de aminas em diversos tipos de grãos, bebidas, vegetais, carnes, frutas, leites e ovos, Nishimura et al. (2006) observaram a cadaverina no albúmen (0,02 mg/100g) e a putrescina (0,088 mg/100g), a espermidina (0,058 mg/100g) e a cadaverina (2,66 mg/100g) na gema de ovos.

Cipolla et al. (2007) pesquisando a presença de espermina, espermidina, cadaverina e putrescina através da espectrometria de massa em vários alimentos, incluindo ovos frescos, observaram apenas a presença de putrescina no albúmen (0,0088 mg/100g), no ovo integral (0,18 mg/100g) e gema (0,384 mg/100g). Vale ressaltar, que assim como em outros artigos sobre pesquisa de aminas em ovos, o número amostral utilizado foi pequeno, apenas três amostras.

Figueiredo (2008) analisou ovos de poedeiras com 30 e 60 semanas armazenados sob refrigeração e em temperatura ambiente durante 28 dias e observou a presença de feniletilamina em todas as amostras de albúmen analisadas. Nos ovos de poedeiras com 60 semanas, a refrigeração auxiliou na manutenção dos valores de feniletilamina em níveis mais baixos quando comparados aos resultados dos ovos mantidos em temperatura ambiente. Os ovos de poedeira com 30 semanas apresentaram após 28 dias de armazenamento teores médios de feniletilamina de 4,18mg/100g, enquanto nos ovos de poedeiras de 60 semanas esse valor foi de 3,42mg/100g. A concentração máxima de feniletilamina encontrada foi de 4,70 mg/100g em ovos de poedeiras com 30 semanas aos 28 dias de armazenamento. Na gema foi detectada apenas a presença de espermidina em uma concentração máxima de 0,125mg/100g.

Oliveira et al. (2009a) analisaram ovos armazenados durante 50 dias sob refrigeração (6ºC) e 30 dias em temperatura ambiente (25ºC) e detectaram a presença de espermidina, espermina, agmatina e putrescina na gema. A maior concentração de espermidina foi observada aos 40 dias nos ovos armazenados sob refrigeração e 15 dias nos armazenados em temperatura ambiente. A presença na gema de agmatina com de 0,046mg/100g e putrescina com 0,017mg/100g somente foi observada aos 40 dias de armazenamento sob refrigeração. Os autores sugeriram que ovos contendo a presença de outras aminas além da espermidina ou teores de espermidina superiores a 0,1mg/100g na gema, poderiam ser considerados ovos de baixa qualidade.

Ramos et al. (2009) pesquisam a presença de putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina, propilamina, etilamina, etanolamina, espermina e espermidina na gema de ovos armazenados durante 26 dias em temperaturas de 5 e 25ºC. Foram observadas a presença de putrescina, cadaverina, propilamina, etilamina e etanolamina nas amostras analisadas, sendo que a temperatura de armazenamento dos ovos não influenciou nos níveis dessas aminas. Durante o período de armazenamento houve diminuição da concentração das cinco aminas detectadas e segundo os autores, isso pode ter ocorrido devido ao aumento de peso da gema decorrente da pasagem de água do albúmen para a gema durante o armazenamento; à migração dessas aminas para o albúmen e outras modificações químicas, já que se observaram diferentes velocidades de redução da concentração entre as aminas ao longo do armazenamento.

2.10. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE-UV para quantificação de aminas bioativas em gema e albúmen de ovos

A validação de métodos analíticos é o processo utilizado para garantir que os

parâmetros analíticos estão adequados para o uso pretendido, garantindo a confiabilidade dos resultados. No processo de validação, todas as variáveis do método devem ser consideradas, incluindo procedimento de amostragem, preparo da amostra, separação cromatográfica, detecção e análise dos dados. Desse modo, a validação tem como objetivo demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para assegurar a obtenção de resultados com a qualidade exigida (Lanças, 2004, Souza, 2007).

O processo de validação deve ser realizado sempre que um método existente for modificado para atender a requisitos específicos ou um método totalmente novo for desenvolvido visando assegurar que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2010). Assim, para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por uma avaliação denominada validação (Ribani et al. 2004).

Há vários procedimentos distintos para validação, dependendo da finalidade do procedimento. Sempre há discrepâncias, mesmo que mínimas, entre os diferentes sistemas de validação. No Brasil, os critérios sugeridos pela ANVISA não coincidem na integra com aqueles preconizados pelo MAPA. Portanto, não há um sistema único de validação que atenda às exigências dos diferentes órgãos nacionais e internacionais de avaliação da qualidade de laboratórios de análise. Apesar da discrepância quanto a alguns aspectos, a maioria das instituições responsáveis pela qualidade de dados gerados em laboratórios analíticos concorda sobre a necessidade de adoção de alguns critérios fundamentais para a validação de metodologia de análise (Lanças, 2004).

Existem dois tipos de validação de métodos: a validação no laboratório "*in house validation*", que consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar se um determinado método está sendo bem conduzido. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade. O segundo tipo, a validação completa ou "*full validation*", envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Pode-se considerar que a validação no laboratório como sendo uma etapa preliminar à validação completa (Thompson et al., 2002; Ribani et al. 2004).

Para se realizar o processo de validação são utilizadas características de desempenho tais como linearidade, especificidade /seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez (ICH, 2005; Thompson et al., 2002; Brito et al., 2003).

2.10.1. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais à quantidade do analito presente na amostra, em um intervalo especificado (Thompson et al., 2002; EURACHEM, 1998).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Em geral, são necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas deve ser no mínimo de duas a sete em cada nível de concentração (INMETRO, 2010; Souza, 2007). Para as análises em nível de traços, é recomendado adotar o limite de quantificação como a concentração mais baixa da curva analítica (INMETRO, 2010).

A equação da reta que relaciona resposta obtida no ensaio em função da concentração do analito é:

$$y = a + bx$$

sendo:
y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);
x = concentração;
a = interseção com o eixo y, quando x = 0;
b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (Ribani et al., 2004).

2.10.2. Seletividade

A especificidade/seletividade relaciona-se à capacidade que o método possui de identificar o composto em pesquisa mesmo na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Significa que o valor medido provém somente do analito, assegurando que não há interferentes (ICH, 2005; ANVISA, 2003).

A seletividade pode ser avaliada através de ensaios com padrões ou materiais de referência, análise de amostras com e sem a presença do analito (padrão) ou utilização de outra técnica específica para a substância de interesse que permite comprovar a seletividade (INMETRO, 2010).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subseqüente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse. Se a seletividade não for assegurada, alguns parâmetros como linearidade, exatidão e precisão serão seriamente comprometidas (Ribani et al., 2004).

2.10.3. Precisão

A precisão é a proximidade dos resultados obtidos em várias medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra e pode ser expressa em desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) (Lanças, 2004; ANVISA, 2003).

A precisão pode ser avaliada em condições de repetitividade ou reprodutibilidade. A repetitividade é caracterizada utilizando os resultados obtidos por análises sucessivas da mesma amostra em curtos intervalos de

tempo, usando um mesmo método e efetuadas sob as mesmas condições (laboratório, equipamentos e mesmo analista). Quando os resultados avaliados são obtidos utilizando uma mesma amostra e método, mas em diferentes laboratórios, equipamentos e analistas, essa avaliação da precisão é chamada de reprodutibilidade (Lanças, 2004).

Desse modo, a repetitividade é expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito a branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método. A faixa de valor aceitável de acordo com a concentração do analito na amostra pode variar de 2% (concentração do analito igual a 1) a 45% no caso da concentração estudada for de 10^{-9} ou em partes por bilhão (ppb) (INMETRO, 2010).

2.10.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos em relação ao verdadeiro valor contido na amostra, exprimindo a compatibilidade do valor aceito com o valor de referência (Thompson et al., 2002; Lanças, 2004) A exatidão pode ser determinada com o uso de material de referência certificados fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como por exemplo: INMETRO, NIST (*National Institute of Standards and Technology - USA)*, LGC (*Laboratory of the Government Chemist - UK*). Outras formas de se avaliar a exatidão é através da participação em comparações interlaboratoriais ou a realização de ensaios de recuperação, em que as amostras são fortificadas com quantidades conhecidas do analito e os resultados são comparadas em relação à quantidade real presente na amostra (INMETRO, 2010).

A Tab. 4 apresenta os valores estabelecidos para os parâmetros recuperação (%) e coeficientes de variação de acordo com o proposto por EC (2002) e Codex Alimentarius (2009).

Tabela 4: Valores de recuperação e coeficiente de variação considerados aceitáveis para resultados quantitativos

Concentração (µg/kg)	Recuperação (%)	Coeficiente de variação (%)
≤ 1	50 a 120	35
> 1 a ≤ 10	60 a 120	30
> 10 a ≤ 100	70 a 120	20
> 100 a ≤ 1000	70 a 110	15
> 1000	70 a 110	10

2.10.5. Limite de detecção

O limite de detecção é a mínima quantidade do analito que pode ser detectada pelo método analítico, mas não necessariamente quantificada (Thompson et al., 2002; EURACHEM, 1998). Existem várias maneiras de se determinar o limite de detecção, entre eles o método visual, método da relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

O método visual baseia-se na utilização da adição de concentrações conhecidas do analito, de modo a distinguir sinal analítico de ruído, pela visualização da menor concentração visível que pode ser confiavelmente detectado. O método da relação sinal-ruído só pode ser aplicado aos

procedimentos analíticos que apresentam ruído da linha de base e é realizada comparando sinais medidos a partir amostras com baixas e conhecidas concentrações do analito com os sinais de amostras em branco. Geralmente, um sinal-ruído entre 3 ou 2:1 é considerado aceitável para a estimativa do limite de detecção (Brito et al., 2003; ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

A determinação do limite de detecção baseado em parâmetros da curva analítica é feito com base no desvio padrão da resposta e da inclinação ou coeficiente angular da curva analítica. Assim o do limite de detecção pode ser calculado como: LD = 3,3 x σ / S onde σ = desvio padrão da resposta e S = inclinação da curva analítica. Para calcular o σ pode-se utilizar as resposta obtidas após a análise de amostras brancas ou pelo desvio padrão das amostras da equação de regressão (ICH, 2005).

2.10.6. Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis pelo método analítico (Thompson et al., 2002; EURACHEM, 1998).

A forma de determinação do limite de quantificação é bastante semelhante a utilizada para o limite de detecção e também pode ser feita pelo método visual, método da relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica. Entretanto, a relação sinal-ruído deve ser de 10:1 e na equação usada para determinação do limite de detecção pelos parâmetros da curva analítica ao invés de utilizar 3,3, a multiplicação é feita por 10, sendo LQ = 10 x σ / S (ICH, 2005).

Segundo Ribani et al. (2004) o método mais utilizado para estimar o limite de detecção e quantificação é o da relação sinal-ruído, porém em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas, a medição do ruído não é trivial e às vezes pode ser subjetiva. Além disso, tanto o limite de detecção quanto o limite de quantificação podem ser afetados pelas condições cromatográficas. Picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando em limite de detecção e quantificação mais baixos. O melhor caminho para resolver este problema do cálculo do limite de detecção e limite de quantificação é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. Desse modo, a curva analítica deve conter a concentração correspondente ao limite de quantificação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Validação do método analítico por CLAE-UV para quantificação de aminas bioativas em gema e albúmen de ovos

3.1.1. Método de determinação de aminas bioativas

As aminas bioativas foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por pareamento de íons em coluna de fase reversa e quantificadas por detecção ultravioleta (UV) após derivação pré-coluna com cloreto de dansila.

3.1.2. Reagentes e padrões

Os padrões de aminas empregados foram da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA): dicloridrato de putrescina, dicloridrato de cadaverina, cloridrato de tiramina, dicloridrato de histamina, tricloridrato de espermidina, tetracloridrato de espermina, e cloridrato de 2-feniletilamina. O cloreto de dansila que foi utilizado como agente derivador, o ácido tricloroacético e a L-prolina também foram adquiridos da marca

Sigma. A acetona, ácido clorídrico e o tolueno, ambos de grau cromatográfico foram adquiridos da (Merck, Darmstadt, Alemanha). A água utilizada na realização das análises foi ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

3.1.3. Preparo dos reagentes e padrões

A solução estoque dos padrões das aminas foi preparada por diluição do padrão de cada amina separadamente em ácido clorídrico 0,1N, formando soluções padrão contendo 1mg/mL de cada amina. Em seguida, um mL de cada solução padrão foi transferida para balão volumétrico, formando uma solução das sete aminas juntas, contendo 0,143µg/mL. A partir desta solução foram preparadas as soluções nas concentrações desejadas para as análises.

A solução de derivação foi preparada adicionando 750mg de Cloreto de Dansila em 100mL de acetona e armazenada a -20ºC, enquanto a solução de L-prolina foi preparada na concentração de 100 mg/mL de água destilada e armazenada sob refrigeração.

3.1.4. Preparo das amostras

O processo de extração utilizado para a determinação de aminas bioativas foi o mesmo utilizado por Figueiredo (2008) e Oliveira et al. (2009a), sendo diferente apenas a velocidade de centrifugação utilizada por esses autores. Desse modo, foram pesadas 3g de cada amostra em tubos de centrífuga de polipropileno, aos quais foram adicionados 7mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Os tubos foram agitados por 10 minutos em mesa agitadora Thermolyne type 50800 (Barnstead Thermolyne, Iowa, USA) a 225rpm e depois centrifugados a 12.100 g a 4ºC por 21 minutos em centrífuga refrigerada Beckmen J2 MC (Beckman Coulter Inc, Califórnia, USA). Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes com adições de sete e seis mL de TCA 5%, totalizando 20mL de ácido adicionado. Os extratos obtidos foram armazenados em microtubos de 1,5mL e congelados a -20ºC para posterior realização do processo de derivação e análise cromatográfica.

As etapas de derivação e as condições cromatográficas foram adaptadas das metodologias descrita por Malle e Valle (1996), Duflos et al. (1999) e Brasil (2011) utilizadas para determinação de aminas em pescado. Para o processo de derivação, 200µL do extrato foram transferidos para tubos de centrífuga de polipropileno e foram adicionados 400µL de solução saturada de bicarbonato de sódio e 800µL de solução de cloreto de dansila. A solução foi agitada em vortex por aproximadamente 30 segundos e deixada ao abrigo da luz em banho de água quente à aproximadamente 60ºC por cinco minutos. Após essa etapa, adicionou-se 200µL de solução de L–Prolina, agitou-se novamente em vortex por aproximadamente 30 segundos e a solução foi armazenada ao abrigo da luz à temperatura ambiente por 30 minutos.

Decorrido esse tempo, foram adicionados 1000µL de tolueno e agitado em vortex por um minuto para posterior centrifugação a 4350g por 10 minutos à temperatura de 4ºC, para a separação das fases. A fase orgânica (sobrenadante) foi recuperada com auxílio de um pipetador automático para um tubo de ensaio de 5mL e levada ao concentrador de amostras para evaporação por adição de fluxo de Nitrogênio por aproximadamente 10 minutos a uma temperatura de aproximadamente 60°C.

O extrato obtido foi dissolvido com 600µL de acetonitrila grau UV/CLAE (Merck, Darmstadt, Alemanha) e filtrado com unidade filtrante com membrana de PTFE, poro 0,45um e diâmetro de 13 a 15mm, (Millipore Corp, Milford, MA, EUA), sendo o filtrado reservado para injeção.

3.1.5. Condições cromatográficas

Para a realização das análises cromatográficas foi utilizado o cromatógrafo ÄKTAmicro™ (GE HealthCare, Buckinghamshire, England), equipado com duas bombas modelo P-900, injetor manual modelo INV-907 com loop de 100µl, detector UV visível (UV-900) e o *software* Unicorn 5.11 (GE HealthCare, Buckinghamshire, England) para o processamento de dados. Os cromatogramas foram processados no comprimento de onda de 254nm.

Para a separação das aminas foi utilizada uma coluna cromatográfica Kromasil C_{18} (5µm, 100 Angstron, 25cm x 4.6mm) (AkzonNobel, Amsterdam, Holanda) e água e acetonitrila como fases móveis. O gradiente de eluição está apresentado na Tab. 5.

Tabela 5: Gradiente de eluição para as fases móveis água e acetonitrila utilizadas na determinação de aminas

Tempo em minutos	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	100	0
8,42	100	0
8,43	40	60
12,52	28	72
13,10	28	72
25,09	25	75
27,37	25	75
33,50	5	95
40,11	5	95
40,12	0	100

3.1.6. Procedimentos de validação

Para realizar o processo de validação foram utilizadas as seguintes características de desempenho: linearidade, seletividade, precisão, exatidão e limite de detecção e quantificação.

3.1.6.1. Linearidade

Para a avaliação da linearidade foram analisadas amostras de gema/albúmen adicionadas de soluções padrão de aminas nas concentrações de 0,07; 0,14; 0,28; 0,56; 1,12 e 2,24mg/100g em sete repetições. Após as análises foi construído um gráfico relacionando área do pico versus concentração e, por regressão linear, foram definidas as equações das curvas e os coeficientes de correlação e determinação (INMETRO, 2010).

3.1.6.2. Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação dos tempos de retenção dos padrões de aminas adicionados no solvente (água) e na presença das matrizes gema e albúmen.

3.1.6.3. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados a partir da equação que leva em consideração os parâmetros da curva analítica, segundo ICH, (2005).

$$LD = \frac{3 \times \sigma}{S} \qquad LQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

sendo:
LD = limite de detecção
LQ = limite de quantificação
σ = desvio padrão da resposta
S = inclinação da curva analítica

Para o cálculo do σ a ser utilizado nas equações para determinação dos limites de detecção e quantificação foram utilizadas as resposta obtidas após as análises de amostras brancas, ou seja, sem a adição de solução padrão de aminas.

3.1.6.4. Precisão

A precisão das análises foi avaliada pela determinação do coeficiente de variação (CV) em condições de repetitividade, utilizando os resultados obtidos por análises sucessivas da mesma amostra, em curtos intervalos de tempo e efetuadas sob as mesmas condições (equipamentos e mesmo analista). Desse modo, amostras de gema/albúmen foram adicionadas de solução padrão de aminas para realização de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa (0,14mg/100g), média (0,56mg/100g) e alta (2,24mg/100g), com três réplicas cada (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Os coeficientes de variação foram avaliados de acordo com parâmetros estabelecidos pela EC (2002) e Codex Alimentarius (2009) (Tab. 4).

3.1.6.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada através da realização de ensaios de recuperação, em que amostras de gema/albúmen foram fortificadas com quantidades conhecidas do analito e os resultados foram comparados em relação à quantidade real presente na amostra. Foram realizadas nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa (0,14mg/100g), média (0,56mg/100g) e alta (2,24mg/100g). A recuperação obtida em cada concentração foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{obtida} \times 100}{C_{esperada}}$$

sendo:
C_{obtida} = Concentração determinada pela análise na amostra adicionada
$C_{esperada}$ = Concentração real adicionada na matriz

As recuperações nas diferentes concentrações analisadas foram comparadas ao intervalo de variação aceitável na faixa de concentração recomendada pela EC (2002) e Codex Alimentarius (2009) (Tab. 4).

3.2. Análises físico-químicas, microbiológicas e aminas bioativas

As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), no período de 17/03/2010 a 20/07/2010. As análises de aminas bioativas foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Bioprodutos da Fundação Ezequiel Dias (Funed).

3.2.1. Ovos

Foram utilizados 1920 ovos brancos, pesando entre 53 a 63g (peso de ovos destinados à exportação) e produzidos por poedeiras de mesma linhagem (Hy-line W36) com idade de 46 semanas. Os ovos foram coletados em galpões automatizados de uma granja de grande porte que realiza exportação de ovos *in natura*, localizada no município de Nepomuceno - MG. A coleta foi realizada em um mesmo horário e, após

esse procedimento, foram selecionados e classificados na própria granja. Em seguida, os ovos foram distribuídos ao acaso em dois grupos: em um grupo a casca dos ovos foi tratada com Óleo Mineral USP (Química Anastácio®, São Paulo - SP, Brasil) utilizando uma máquina de spray de óleo (Yamasa®, Rinópolis - SP, Brasil) e no outro grupo não foi realizado nenhum tratamento na casca dos ovos. Após este procedimento, os ovos foram novamente distribuídos em dois grupos: em um grupo os ovos foram acondicionados em embalagem plástica, tipo estojo, com tampa e capacidade para 12 unidades (Cristal Form®, Caxias do Sul - RS) e no outro, os ovos foram acondicionados em bandejas de papelão convencional com capacidade para 30 unidades. Deste modo, foram obtidos os seguintes tratamentos: ovos sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e sem utilização de embalagem (SO e SE); ovos sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e com utilização de embalagem (SO e CE); ovos com aplicação de óleo mineral sobre a casca e sem utilização de embalagem (CO e SE) e ovos com aplicação de óleo mineral sobre a casca e com utilização de embalagem (CO e CE). Posteriormente, os ovos foram acondicionados em caixas de papelão e transportados para o LSMA onde foram armazenados sob refrigeração. Para efeito prático e facilitar a discussão, iremos considerar como "ovos embalados" os ovos armazenados em embalagem plástica com tampa e os "sem embalagem" os acondicionados na bandeja de papelão.

Durante todo o experimento, as temperaturas e umidades máximas e mínimas do local de estocagem foram registradas diariamente por um termohigrômetro Incoterm® (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). A temperatura de refrigeração média durante o armazenamento foi 5,1ºC e a média das temperaturas mínima e máxima foram 4,5 e 7,2ºC, respectivamente. A umidade relativa média foi 63,7% e a umidade relativa mínima e máxima foram 60,3 e 73,6%, respectivamente.

Para a realização das análises microbiológicas, os tratamentos foram dispostos em arranjo fatorial de 2 x 2 x 12, sendo dois tipos de embalagens (embalagem plástica com tampa e embalagem de papelão), dois tipos de revestimento da superfície da casca (com e sem aplicação de óleo mineral) e 12 períodos de estocagem (um, cinco, 12, 19, 26, 40, 54, 68, 82, 96, 110 e 124 dias), totalizando 48 tratamentos com quatro repetições de cinco ovos cada.

As análises de UH, pH e coleta de amostras para análises de aminas bioativas foram realizadas um dia após a realização das análises microbiológicas. Desse modo, essas análises foram realizadas com um, seis, 13, 20, 27, 41, 55, 69, 83, 97, 111 e 125 dias de armazenamento. As amostras de albúmem e gema coletados para as análises de aminas foram originadas dos mesmos ovos utilizadas para as análises de físico-química e foram mantidas a -20ºC até o momento da análise.

3.2.2. Variáveis avaliadas

Foram realizadas as seguintes avaliações físico-químicas: Unidade Haugh (UH), pH do albúmen (pH) e peso do ovo. As análises microbiológicas realizadas foram: contagem global de mesófilos aeróbios (UFC/g), contagem de psicrotróficos aeróbios (UFC/g), coliformes totais e termotolerantes (UFC/g), bolores e leveduras (UFC/g), pesquisa de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* spp.. As aminas bioativas pesquisada foram: putrescina, cadaverina, tiramina, histamina, espermidina, espermina e feniletilamina. O início das análises microbiológicas, UH e pH foram realizadas um dia após a chegada dos ovos ao laboratório, ou seja, um dia após a postura.

3.2.2.1. Determinação do peso do ovo

Os ovos foram pesados em balança analítica digital Gehaka BG 1000 antes de serem quebrados para realização das avaliações de UH e pH.

3.2.2.2. Altura do albúmen e Unidade Haugh (UH)

Após a pesagem dos ovos foram realizadas as avaliações de UH e da altura do albúmen, com o auxílio de um aparelho de UH da marca AMES, modelo S-8400 (Massachusetts, USA).

Os valores das UH foram calculados usando a fórmula $UH = 100\log [H + 7.57 - 1.7 W^{0,37}]$ (Brant et al., 1951).

Sendo:

H: a altura do álbum em milímetros e
W: o peso do ovo em gramas.

A qualidade interna foi avaliada segundo o Programa de Controle da Qualidade preconizado pelo "USDA" que define as condições que devem ser encontradas desde quando o ovo é produzido até o seu consumo pela população. Para tal, ovos considerados de qualidade excelente (AA) devem apresentar valores de UH superiores a 72, ovos de qualidade alta (A), entre 60 e 72 UH e ovos de qualidade inferior (B), com valores de UH inferiores a 60 (USDA, 2000).

3.2.2.3. pH do albúmen

As avaliações de pH do albúmen foram realizadas com os mesmos ovos utilizados nas avaliações das UH. Para realizar esta análise foi utilizado um medidor de pH digital microprocessador PG1800 da marca Digimed® (São Paulo, SP, Brasil). O medidor de pH foi calibrado a cada dia de avaliação.

3.2.2.4. Análises microbiológicas

Para a realização das análises microbiológicas, para cada dia de análise, foram feitas quatro repetições com um pool de cinco ovos, totalizando 192 amostras. Inicialmente, os ovos foram colocados em solução de álcool 70% por 15 minutos. Depois, foram secos com gase estéril, quebrados assepticamente dentro de uma cabine de segurança biológica classe IIA e transferidos para o interior de uma saqueta estéril própria para coleta de amostras.

A pesquisa de *Staphylococcus* spp., foi realizada de acordo com a Instrução Normativa nº 62 - Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (Brasil, 2003). Nas análises de micro-organismos mesófilos (36 ± 1ºC por 48h) e psicrotróficos (7ºC por 7 dias), foram empregados Petrifilms™ *Aerobic Count Plate* (3M™, St Paul, MN, USA), adotando diluições diferentes (10^{-3} a 10^{-5}) para atender aos padrões exigidos pela legislação vigente (AOAC, 1990). Para as análises de bolores e leveduras e coliformes totais e termotolerantes foi empregada a técnica do número mais provável (NMP), utilizando-se para tanto, o método Simplate™ (AOAC, 2003; AOAC, 2005a).

Para pesquisa de *Salmonella* spp., foi empregada a técnica imunoenzimática pelo equipamento VIDAS 30, (Biomerieux, Hazelwood, Missouri, USA). Uma alíquota da amostra (25mL) foi adicionada a uma solução de salina peptonada estéril 1% e incubada por 24h a 35ºC. Posteriormente, foi transferido 0,1mL desta solução para um caldo de enriquecimento específico e incubado por mais 24h a 41ºC. Após esse período, 0,5mL da solução foi transferido para barretes específicas de análise de *Salmonella* e foram lidos no equipamento Vidas 30 em até quatro horas (AOAC, 2005b).

3.2.2.5. Determinação dos teores de aminas bioativas

A presença de aminas bioativas foi pesquisada no albúmen e gema dos ovos. Para a determinação dos teores de aminas, em cada dia de análise, foram feitas três repetições com um pool de cinco albúmens/gemas, em oito períodos distintos (um, seis, 13, 20, 27, 55, 83 e 125 dias), totalizando 96 amostras para pesquisa de aminas no albúmen e 96 amostras para a gema.

3.3. Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 2 x 12, sendo dois tipos de embalagens (embalagem plástica com tampa e bandeja de papelão), dois tipos de revestimento da superfície da casca (com e sem aplicação de óleo mineral) e 12 períodos de estocagem (um, seis, 13, 20, 27, 41, 55, 69, 83, 97, 111 e 125 dias), totalizando 48 tratamentos com quatro repetições de cinco ovos cada. Para as avaliações de UH, pH e peso do ovo as diferenças entre as médias de grupos foram comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK), em nível de significância de 5% e para os períodos de avaliação foram estimados por modelos de regressão.

Para a avaliação das variáveis microbiológicas foi realizada a transformação de dados e aquelas que não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis em nível de significância de 5%, segundo Sampaio (2002). Algumas variáveis microbiológicas também foram discutidas através de estatísticas descritivas devido a ausência ou baixo número de amostras positivas observadas no experimento.

O delineamento experimental usado para as análises de aminas bioativas foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 2 x 8, sendo dois tipos de embalagens (embalagem plástica com tampa e bandeja de papelão), dois tipos de revestimento da superfície da casca (com e sem aplicação de óleo mineral) e oito períodos de estocagem (um, seis, 13, 20, 27, 55, 83 e 125 dias), totalizando 32 tratamentos com três repetições de cinco ovos cada. Para as variáveis relacionadas a pesquisa de aminas bioativas foi realizada a transformação de dados e as médias foram comparadas pelo Teste de Fisher, em nível de significância de 5%. Para aquelas que não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis em nível de significância de 5%. A análise de correlação entre as variáveis foi avaliada através da correlação de Pearson e para as variáveis que não apresentaram distribuição normal e homocedasticidade foi realizada a correlação de Sperman.

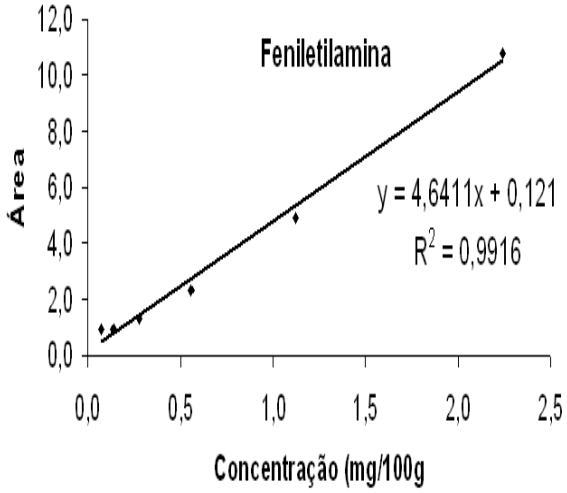
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

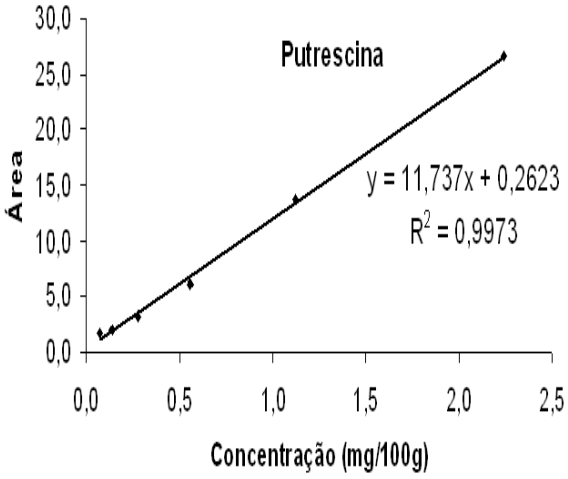
4.1. Validação da metodologia para quantificação de aminas em gema e albúmen de ovos

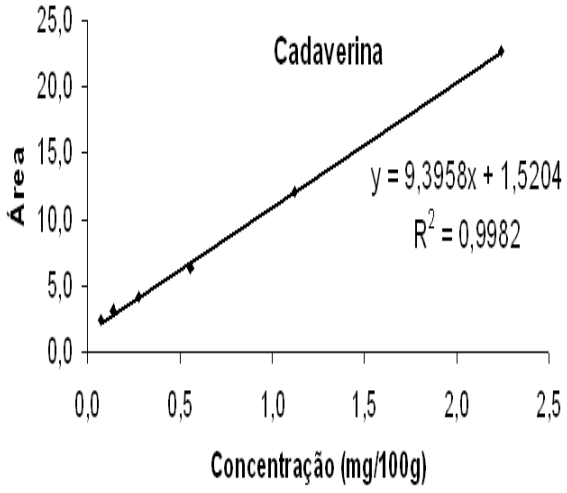
4.1.1. Linearidade

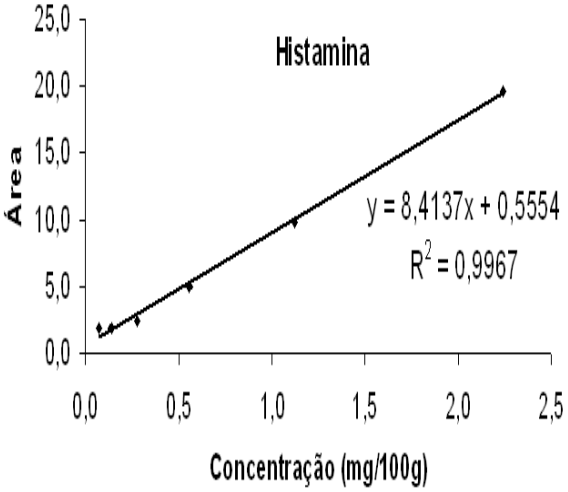
As curvas analíticas, o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (R^2) das aminas adicionadas a gema e ao albúmen, obtidas na avaliação da linearidade na faixa de 0,07 a 2,24mg/100g, estão representadas nas Fig. 3 e 4 e na Tab. 6.

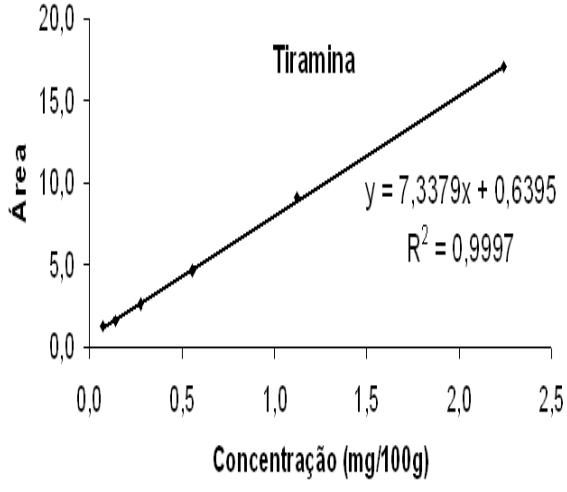
A partir dos valores obtidos, concluiu-se que o modelo foi adequado, pois o coeficiente de determinação foi maior que 0,99, considerado como evidência de um excelente ajuste dos dados para a linha de regressão. Apenas o coeficiente de determinação da histamina adicionada à matriz albúmen, com 0,98, apresentou valor inferior a 0,99.

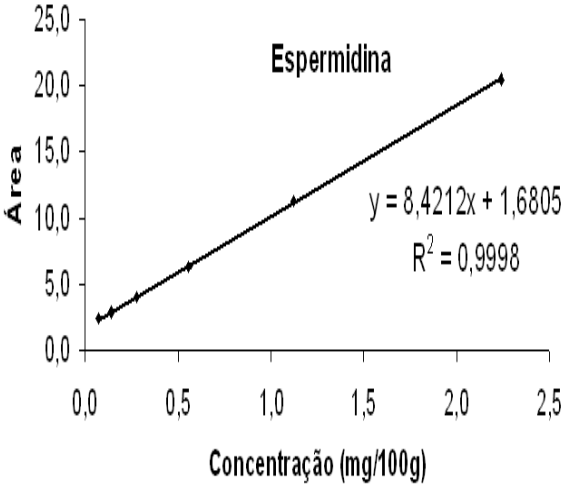

Feniletilamina
y = 4,6411x + 0,121
R2 = 0,9916
Área
Concentração (mg/100g
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5


Putrescina
y = 11,737x + 0,2623
R2 = 0,9973
Área
Concentração (mg/100g)
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5


Cadaverina
y = 9,3958x + 1,5204
R2 = 0,9982
Área
Concentração (mg/100g)
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5


Histamina
y = 8,4137x + 0,5554
R2 = 0,9967
Área
Concentração (mg/100g)
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5


Tiramina
y = 7,3379x + 0,6395
R2 = 0,9997
Área
Concentração (mg/100g)
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5


Espermidina
y = 8,4212x + 1,6805
R2 = 0,9998
Área
Concentração (mg/100g)
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5

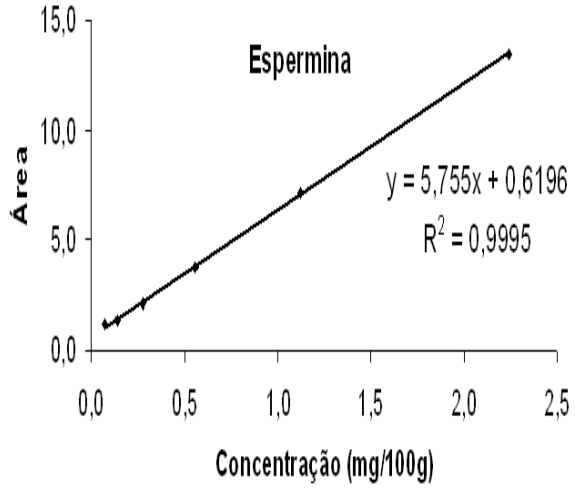
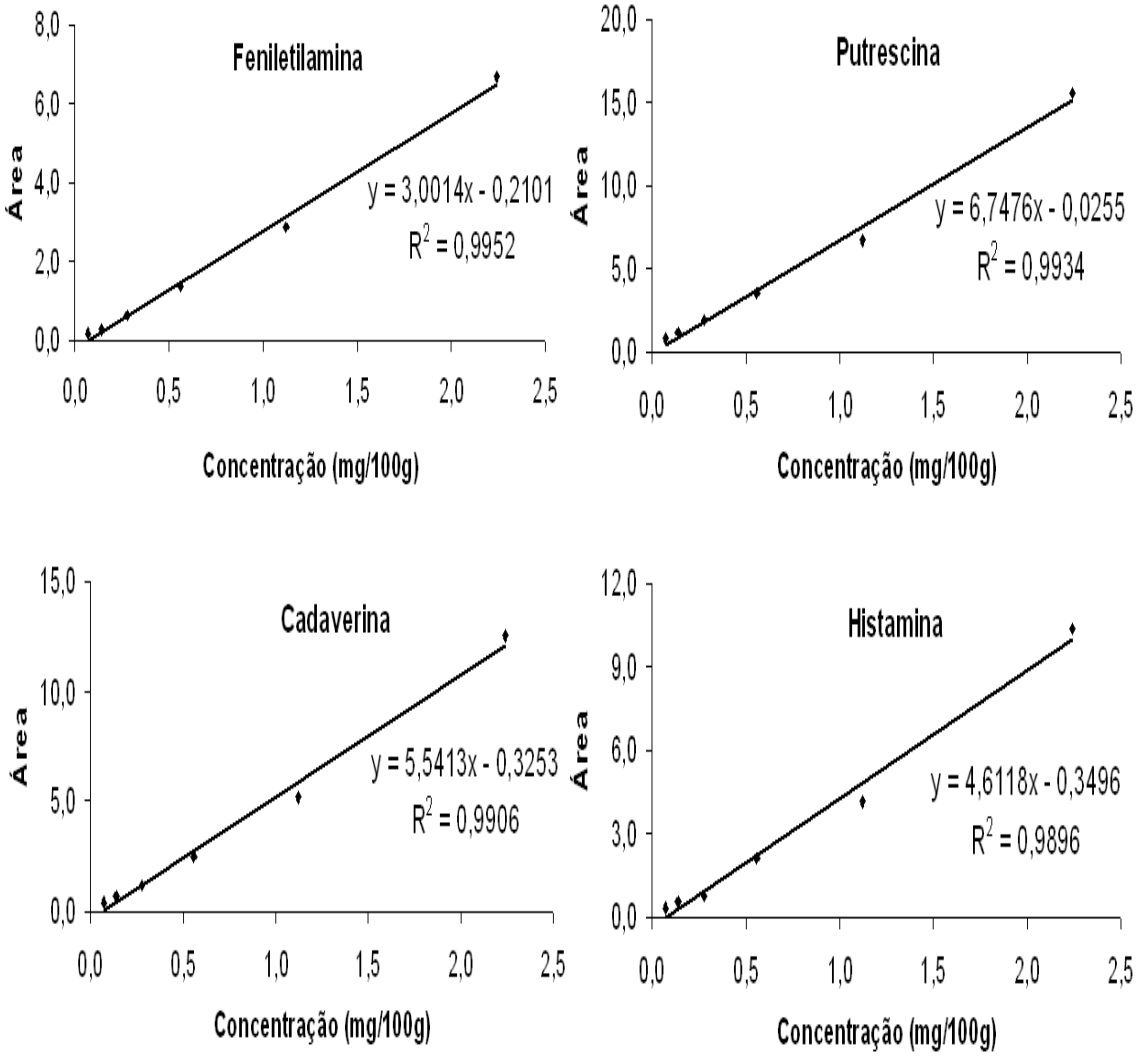


Figura 3: Curvas de linearidade das aminas adicionadas a matriz gema na faixa de 0,07 a 2,24mg/100g.



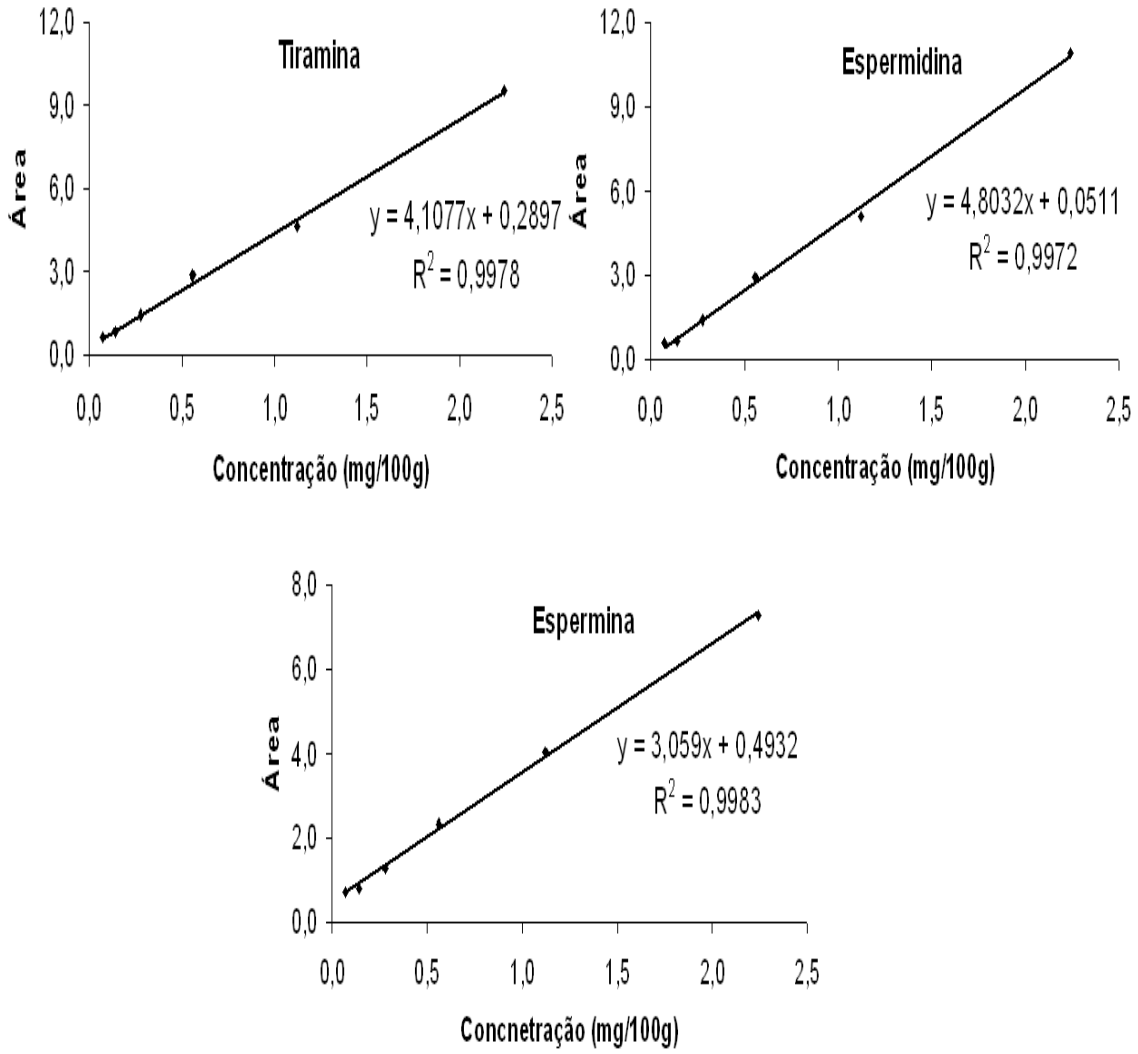


Figura 4: Curvas de linearidade das aminas adicionadas a matriz albúmen na faixa de 0,07 a 2,24mg/100g.

Os valores dos coeficientes de correlação (r), independentemente da utilização da gema ou albúmen como matriz, apresentaram valores superiores a 0,99 e estão em conformidade com os critérios do INMETRO (2003) que recomendam valores maiores que 0,90 para os testes de linearidade. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani et al, 2004).

Tabela 6: Equações de regressão linear, coeficientes de determinação e de correlação das curvas analíticas para cada amina adicionada a matriz gema e albúmen

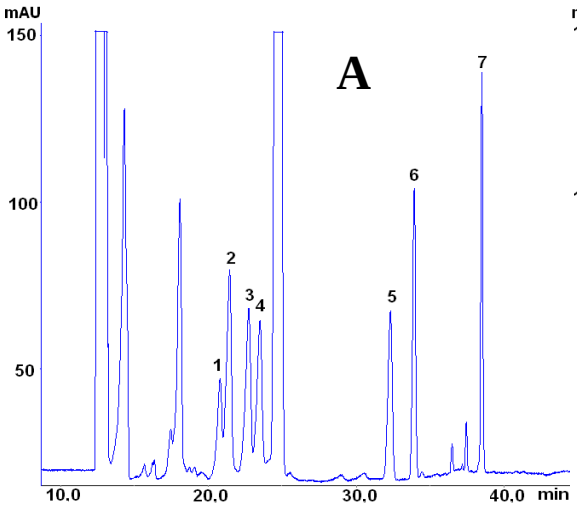
Aminas	Equação	R^2	r
Gema			
Feniletilamina	y = 4,6411x + 0,1210	0,9916	0,9957
Putrescina	y = 11,737x + 0,2623	0,9973	0,9986
Cadaverina	y = 9,3958x + 1,5204	0,9982	0,9991
Histamina	y = 8,4137x + 0,5554	0,9967	0,9983
Tiramina	y = 7,3379x + 0,6395	0,9997	0,9998
Espermidina	y = 8,4212x + 1,6805	0,9998	0,9999
Espermina	y = 5,755x + 0,6196	0,9995	0,9997
Albúmen			
Feniletilamina	y = 3,0014x - 0,2101	0,9952	0,9976
Putrescina	y = 6,7476x - 0,0255	0,9934	0,9966
Cadaverina	y = 5,5413x - 0,3253	0,9906	0,9953
Histamina	y = 4,6118x - 0,3496	0,9896	0,9947
Tiramina	y = 4,1077x + 0,2897	0,9978	0,9988
Espermidina	y = 4,8032x + 0,0511	0,9972	0,9985
Espermina	y = 3,059x + 0,4932	0,9983	0,9991

4.1.2. Seletividade

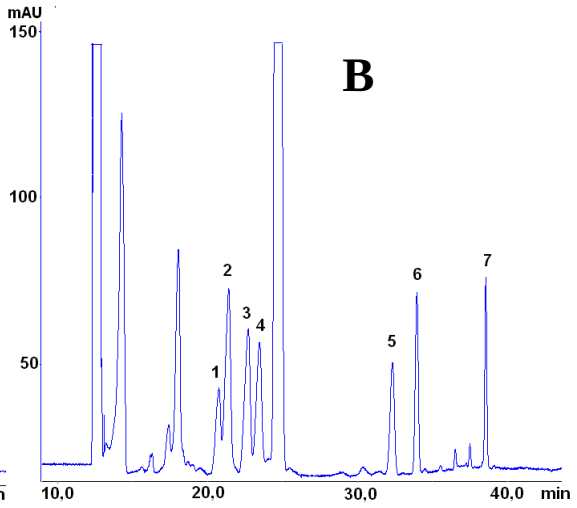
Na Fig. 5 estão apresentados os cromatogramas obtidos na análise da solução padrão de 2,24mg/100g das sete aminas, das matrizes gema e albúmen adicionadas com soluções padrão e das amostras de gema e albúmen sem adição da solução padrão de aminas (amostra controle). Os tempos de retenção médios foram de 20,97±0,01min para feniletilamina; 21,66±0,04min para putrescina; 23,01±0,05min para cadaverina; 23,72±0,04min para histamina; 32,65±0,08min para tiramina; 34,18±0,06min para espermidina e 38,75±0,08min para a espermina.

Pode-se observar através da comparação dos cromatogramas das amostras controle (cromatogramas C e E) e das amostras com adição de solução padrão de 2,24mg/100g das sete aminas (cromatogramas A e B) que quando houve a adição das aminas as matrizes, a detecção ocorreu no mesmo tempo de retenção das aminas na água (cromatograma A), apresentando boa resolução. Desta forma, como os picos referentes às sete aminas puderam ser distinguidos dos outros compostos detectados presentes nas matrizes gema e albúmen e também que os tempos de retenção das aminas nas matrizes foram os mesmos observados com a adição das aminas à água, o método pode ser considerado seletivo.

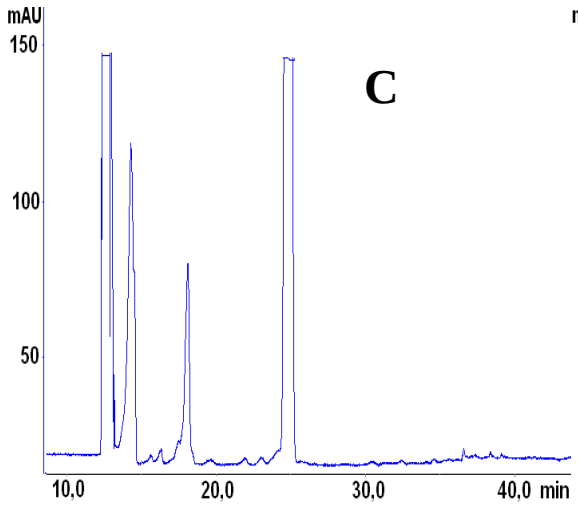
Nas amostras da matriz gema foi detectada a presença de outros picos que não foram observados nas análises da matriz albúmen, entretanto, a presença desses picos não interferiu na separação e posterior quantificação das aminas na gema.



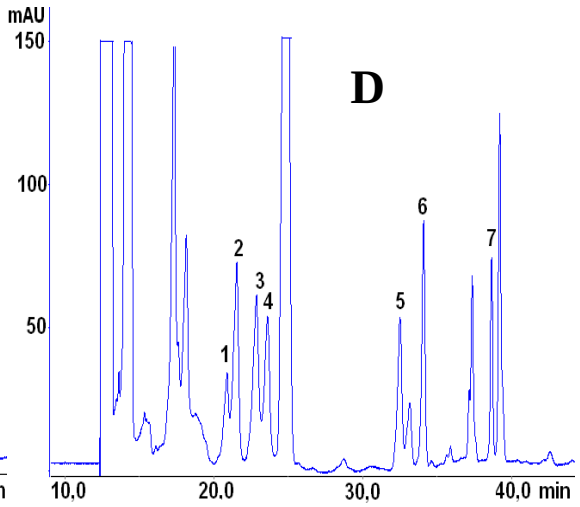
Cromatograma A: adição da solução padrão de 2,24mg/100g a água.



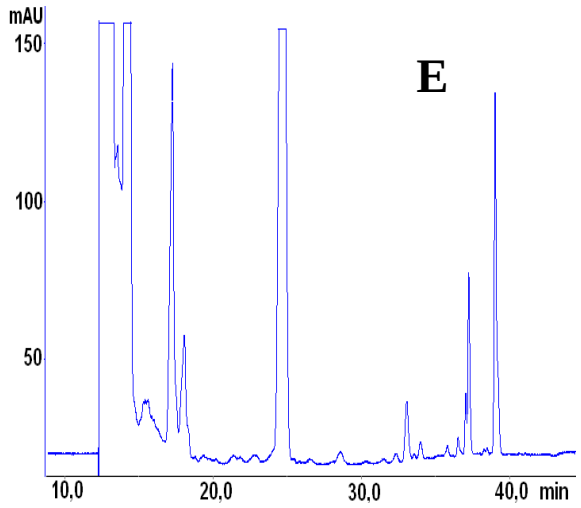
Cromatograma B: adição da solução padrão de 2,24mg/100g ao albúmen.



Cromatograma C: sem adição da solução padrão ao albúmen.



Cromatograma D: adição da solução padrão de 2,24mg/100g a gema.



Cromatograma E: sem adição da solução padrão a gema.

Figura 5: Cromatogramas com adição da solução padrão de 2,24mg/100g das sete aminas ao solvente (água) (A), as matrizes gema (D) e albúmen (B) e sem a adição da solução padrão a gema (E) e albúmen (C); 1 = feniletilamina; 2 = putrescina; 3 = cadaverina; 4 = histamina; 5 = tiramina; 6 = espermina; 7 = espermidina.

Aos 24,5 minutos da corrida cromatográfica apareceu um pico elevado que não foi identificado. Trata-se, possivelmente, de um pico interferente devido a utilização do cloreto de dansila no processo de derivação. Malle e Valle, (1996), ao avaliarem diferentes protocolos para determinação de aminas em pescado, também observaram o aparecimento de um pico interferente e sugeriram ser resultado de reações envolvendo o excesso de cloreto de dansila. Innocente et al. (2007) observaram o aparecimento de um pico semelhante ao neutralizar diferentes concentrações de cloreto de dansila com L-prolina e destacaram a importância desse procedimento para se evitar o aparecimento de um pico interferente. Desse modo, é possível que a quantidade e L-prolina adicionada durante o processo de derivação não tenha sido suficiente para neutralizar todo o cloreto de dansila, permitindo o aparecimento desse pico.

4.1.3. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método para as matrizes gema e albúmen de todas as aminas avaliadas estão apresentados na Tab. 7. Os limites de detecção do método variaram de 0,02 a 0,03mg/100g para a matriz gema e de 0,02 a 0,04 mg/100g para a matriz albúmen. A feniletilamina na matriz albúmen foi a amina que apresentou maior limite de detecção com 0,04mg/100g. Os limites de quantificação do método variaram de 0,07 a 0,1mg/100g para a gema e de 0,07 a 1,1mg/100g para o albúmen. Semelhante ao ocorrido com o limite de detecção da feniletilamina no albúmen, essa amina também foi a que apresentou um maior limite de quantificação com 0,11mg/100g.

Tabela 7: Limites de detecção e de quantificação do método para matriz gema e albúmen em ovos

Aminas	Limite de detecção (mg/100g)	Limite de quantificação (mg/100g)
Gema		
Feniletilamina	0,03	0,10
Putrescina	0,02	0,07
Cadaverina	0,03	0,10
Histamina	0,02	0,07
Tiramina	0,02	0,08
Espermidina	0,02	0,07
Espermina	0,03	0,10
Albúmen		
Feniletilamina	0,04	0,11
Putrescina	0,02	0,07
Cadaverina	0,02	0,08
Histamina	0,02	0,07
Tiramina	0,02	0,08
Espermidina	0,03	0,09
Espermina	0,03	0,10

A putrescina, histamina, tiramina e espermina apresentaram o mesmo valor de limite de quantificação independentemente da matriz avaliada. A feniletilamina e a espermidina apresentaram um maior limite de quantificação no albúmen em comparação a gema, enquanto a cadaverina apresentou um maior limite de quantificação na gema quando comparado com o valor encontrado no albúmen.

4.1.4. Exatidão e precisão

Na Tab. 8 estão indicados os percentuais médios de recuperação e os coeficientes de variação (CV) obtidos na pesquisa de aminas bioativas na gema e albúmen de ovos. A exatidão do método foi avaliada através do percentual médio de recuperação e a precisão avaliada através do coeficiente de variação.

A taxa de recuperação de aminas na matriz gema variou de 65,8% para a histamina a 118,7% para a feniletilamina na concentração de 0,14mg/100g, enquanto na concentração de 0,56mg/100g a recuperação variou de 91,5% para a cadaverina a 108,3% para espermina. Para a concentração de 2,24mg/100g, a menor taxa de recuperação foi observada para a espermidina com 96,2% e a maior para a tiramina com 109,7% de recuperação.

A exatidão da metodologia utilizada para quantificação de aminas na gema de ovos avaliada através da realização de ensaios de recuperação está dentro do preconizado pela EC (2002) e Codex Alimentarius (2009), que determinam uma recuperação entre 70 a 110% e 80 a 110% respectivamente, para concentrações do analito maiores que 0,1 mg/100g. Entretanto, a recuperação de feniletilamina e histamina na concentração de 0,14mg/100g foram de 118,7% e 65,8%, respectivamente, não atendendo a essa especificação. Desse modo, dentro da faixa de 0,14 a 2,24mg/100g, o método avaliado apresentou exatidão satisfatória para putrescina, cadaverina, tiramina, espermidina e espermina.

Tabela 8: Recuperações médias e coeficientes de variação de aminas nas matrizes gema e albúmen.

Aminas	Gema		Albúmen	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
Feniletilamina				
0,14mg/100g	118,7	9,2	116,4	8,6
0,56mg/100g	105,5	8,4	93,6	6,7
2,24mg/100g	105,8	8,5	102,0	5,7
Putrescina				
0,14mg/100g	96,7	9,9	94,0	9,4
0,56mg/100g	107,0	7,5	97,2	9,2
2,24mg/100g	103,7	2,9	103,6	8,3
Cadaverina				
0,14mg/100g	105,4	8,7	91,2	8,6
0,56mg/100g	91,5	9,7	90,5	9,8
2,24mg/100g	107,3	7,2	104,4	9,7
Histamina				
0,14mg/100g	65,8	7,1	80,2	4,5
0,56mg/100g	99,5	7,6	96,2	9,8
2,24mg/100g	105,6	3,5	103,9	9,8
Tiramina				
0,14mg/100g	85,9	9,9	88,8	9,4
0,56mg/100g	104,4	2,2	105,2	9,4
2,24mg/100g	109,7	1,7	113,9	5,5
Espermidina				
0,14mg/100g	95,4	9,9	98,0	3,6
0,56mg/100g	102,6	9,1	105,8	5,7
2,24mg/100g	102,7	1,8	102,8	4,3
Espermina				
0,14mg/100g	95,3	5,9	56,0	2,2
0,56mg/100g	108,3	8,2	102,0	10,0
2,24mg/100g	96,2	3,3	111,1	6,0

A recuperação média de aminas na matriz albúmen variou de 56% para a espermina a 116,4% para a feniletilamina na concentração de 0,14mg/100g. Na avaliação da recuperação de aminas adicionadas no albúmen em médias concentrações (0,56mg/100g), houve variação na recuperação de 90,5% para a cadaverina a 105,8% para espermidina, enquanto na concentração de 2,24mg/100g a recuperação variou de 102% na feniletilamina a 113,9% para a tiramina. Semelhante ao observado na matriz gema, a feniletilamina também apresentou valores de recuperação que não atendem ao preconizado pela EC (2002) e Codex Alimentarius (2009) para a concentração de 0,14mg/100g. A espermina foi outra amina que também não apresentou valores de recuperação dentro do preconizado para essa mesma concentração. Assim, apenas a putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e espermidina apresentaram exatidão satisfatória dentro da faixa de 0,14 a 2,24mg/100g para a matriz albúmen.

A precisão do método apresentou resultados satisfatórios para todas as sete aminas na faixa de 0,14 a 2,24mg/100g, independentemente da matriz utilizada. Os coeficientes de variação dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação

variaram de 1,7 a 9,9% para a matriz gema e de 2,2 a 10% no albúmen. Esses valores estão dentro do preconizado pela EC (2002) e Codex Alimentarius (2009) que prevê um coeficiente de variação máximo de 10% para a concentração avaliada no neste trabalho.

Na matriz gema, a espermina apresentou o menor valor de coeficiente de variação na concentração de 0,014mg/100g com 5,9%, enquanto na concentração de 056mg/100g e 2,24mg/100g foi a tiramina que apresentou os menores valores com 2,2 e 1,7%, respectivamente. Putrescina, tiramina e espermidina com 9,9% apresentaram os maiores valores de coeficiente de variação na concentração de 0,014 mg/100g e nas concentrações de 0,56 e 2,24mg/100g, a cadaverina com 9,7% e a feniletilamina com 8,5%, respectivamente, apresentaram os maiores valores.

Na matriz albúmen, a espermina também apresentou o menor valor de coeficiente de variação na concentração de 0,014mg/100g com 2,2%. Nas concentrações de 0,56 e 2,24mg/100g, a espermidina com 5,7% e 4,3%, respectivamente, foi a amina que apresentou os menores valores. A putrescina e tiramina, semelhante ao observado na matriz gema, também foram as aminas que apresentaram o maior valor de coeficiente de variação na concentração de 0,014mg/100g com 9,4% e na concentração de 0,56mg/100g a cadaverina e histamina apresentaram os maiores valores. Na concentração de 2,24mg/100g, a espermina foi a amina que apresentou o maior coeficiente de variação na matriz albúmen com 10,0%.

4.2. Análises físico-químicas

A aplicação de óleo mineral sobre a casca dos ovos armazenados durante 125 dias influenciou na qualidade físico-química do conteúdo interno dos ovos, resultando em valores de UH mais elevados e de pH do albúmen mais baixos. A utilização de embalagem associada com aplicação de óleo mineral sobre a casca de ovos também resultou em valores de pH do albúmen mais baixos. Durante o período de armazenamento, foi observada uma redução dos pesos dos ovos.

4.2.1. Unidades Haugh (UH)

A influência do período de armazenamento sob refrigeração nos valores de UH de ovos com e sem aplicação de óleo mineral e embalados e não embalados pode ser observada nas Tab. 9 e 10.

Tabela 9: Médias dos valores de UH de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração

Embalagem	**Aplicação de óleo**		
	sem óleo	**com óleo**	**Média**
sem embalagem	84,28	87,57	85,92 a
com embalagem	83,76	88,22	85,99 a
Média	84,02 B	87,89 A	

Média seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de SNK ($p<0,05$). CV = 2,21.

A aplicação de óleo mineral sobre a casca dos ovos influenciou positivamente ($p<0,05$) nos valores de UH (Tab. 9). Os ovos com aplicação de óleo apresentaram valor médio de 87,89 UH durante o período de armazenamento, enquanto os ovos sem aplicação de óleo apresentaram o valor de 84,02 UH, demonstrando que a aplicação de óleo sobre a casca dos ovos contribuiu para uma melhor manutenção da qualidade

interna dos ovos armazenados sob refrigeração por 125 dias. O benefício da utilização de óleo mineral na manutenção da qualidade interna de ovos também foi observado por outros autores como Imai (1981); Stadelman e Cotterill (1995) e Ordónez (2005).

Não foi observada diferença (p>0,05) na utilização ou não da embalagem nos valores de UH durante todo o período de armazenamento (Tab. 9). Os ovos sem embalagem e com embalagem apresentaram valor médio de UH durante o período de armazenamento de 85,92 UH e 85,99 UH, respectivamente. Assim, de acordo com os resultados e dentro das condições deste experimento, a utilização desse tipo de embalagem com o único propósito de preservar por maior tempo a qualidade interna dos ovos seria desaconselhada por implicar em aumento do custo de produção/venda e não manter os valores de UH em níveis mais elevados.

Os valores médios de UH de ovos embalados e não embalados e com e sem aplicação de óleo mineral ao longo de 125 dias de armazenamento estão representados na Tab. 10. Não foram observadas diferenças (p>0,05) entre os períodos (dias) de armazenamento e os tratamentos utilizados.

Tabela 10: Médias dos valores de UH de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	Tratamento			
	SO e SE	SO e CE	CO e SE	CO e CE
1	98,12	97,90	99,03	98,90
6	93,78	91,90	97,10	96,88
13	91,23	89,93	95,45	94,18
20	89,55	88,20	91,73	92,33
27	86,25	86,27	90,60	91,35
41	83,85	82,05	88,45	87,75
55	81,78	82,43	86,43	87,25
69	79,98	79,78	82,25	83,83
83	76,60	79,40	81,78	83,95
97	76,73	76,43	79,65	82,65
111	77,00	76,73	80,03	80,95
125	76,55	74,13	78,33	78,60
Média	84,28	83,76	87,57	88,22

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem.

4.2.1.1. UH dos ovos com ou sem aplicação de óleo mineral

Os ovos com aplicação de óleo mineral e sem embalagem apresentaram inicialmente 99,03 UH e, após 125 dias de armazenamento, ocorreu diminuição de 20,7 UH ou 20,9%, passando a apresentar 78,33 UH. Nos ovos sem aplicação de óleo e sem embalagem houve redução de 21,57 UH ou 22,0%, passando de 98,12 para 76,55 UH (Tab. 10). Jirangrat et al. (2010) também observaram diminuição de UH de 84,12 para 62,90 UH (redução de 21,22 UH) em ovos que não receberam aplicação de óleo mineral e para 74,44 UH (diminuição de 9,68 UH) em ovos que receberam essa aplicação após o armazenamento por 105 dias sob refrigeração a 4ºC. Esses resultados foram semelhantes ao de Biladeau e Keener (2009) que observaram redução de UH em

ovos com aplicação de óleo mineral de 83,7 UH para 73,1 UH (diminuição de 10,6 UH) após 12 semanas de armazenamento a 7ºC e nos ovos sem a aplicação de óleo, o valor encontrado ao final do período de armazenamento foi 65,7 UH (diminuição de 18,0 UH). Wardy et al. (2010) observaram após 20 semanas de armazenamento a 4ºC diminuição de apenas 12,99 UH nos ovos com aplicação de óleo, enquanto que nos ovos sem aplicação de óleo mineral essa redução foi de 31,85 UH.

Os resultados observados neste experimento (Tab. 10) foram melhores do que os encontrados por Imai (1981) que observou redução de 90 UH para 63 UH e 54 UH em ovos com aplicação de óleo vegetal e sem aplicação desse óleo, respectivamente, após 120 dias de armazenamento. Segundo esse autor, os ovos com aplicação de óleo vegetal apresentaram valores de UH significativamente maiores que os sem aplicação de óleo.

Segundo Souza et al. (1983), a associação do óleo com baixas temperaturas de armazenamento mostrou ser mais eficiente que baixas temperaturas isoladamente para manter a qualidade dos ovos até o 35º dia de armazenamento, sendo, entretanto, desaconselhável essa dupla operação, visto que tanto um quanto o outro, separadamente, conservaram a qualidade dos ovos até o final do armazenamento. Resultado semelhante foi observado no presente experimento, pois os ovos sem óleo mineral e sem embalagem mantiveram sua qualidade interna durante os 125 dias de armazenamento. A associação de óleo e baixa temperatura também mostrou ser mais eficiente que apenas a baixa temperatura (Tab. 9). Bacurau et al. (1994) também observaram que apenas o uso da refrigeração independentemente da aplicação ou não de óleo mineral foi eficiente para manter a qualidade interna satisfatória por 28 dias de armazenamento. Ainda assim, os ovos com aplicação de óleo foram os que apresentaram o maior valor de UH ao término do período de armazenamento.

Apesar de alguns trabalhos (Waimaleongora-ek et al., 2009; Wardy et al. 2010) demonstrarem a melhor qualidade interna dos ovos com a aplicação de óleo mesmo quando mantidos em temperatura ambiente, vale a pena ressaltar que a refrigeração auxilia não só na melhoria bioquímica e sensorial através de uma maior proporção de albúmen denso em relação ao albúmen líquido, como também propicia melhoria da qualidade dos ovos do ponto de vista microbiológico, principalmente no caso da presença de agentes patogênicos como *Salmonela* spp.

Após a postura, durante o armazenamento dos ovos, o albúmen denso torna-se líquido devido a inúmeras reações químicas que ocorrem em seu interior, envolvendo o ácido carbônico (H_2CO_3). O CO_2 formado pela dissociação do H_2CO_3, passa para o ambiente através da casca ocorrendo o aumento do pH e provocando a dissociação química do complexo protéico (Romanoff e Romanoff, 1963; Koehler, 1974). A alteração do conteúdo e natureza das ovomucinas, que é a responsável pela estrutura gelatinosa do albúmen, devido a fatores como sua proteólise, clivagem das pontes de dissulfitos e às interações entre α e β ovomucinas levam a redução da altura do albúmen denso e, com isso, a redução dos valores de UH (Robinson e Monsey, 1971; Stevens, 1996). Deste modo, a utilização de óleo mineral sobre a casca dos ovos ou qualquer outra substância como óleos vegetais, polímeros sintéticos, polissacarídeos e proteínas que sejam capazes de impedir a perda de CO_2 do albúmen para o ambiente, irá auxiliar na manutenção da qualidade interna dos ovos por um maior período de tempo. Assim, vários trabalhos têm sido realizados para avaliar os benefícios da utilização dessas substâncias na melhoria da qualidade dos

ovos (Alleoni e Antunes, 2004; Alleoni e Antunes, 2005; Caner, 2005; Torrico et al., 2010).

Apesar do longo período de armazenamento, de acordo com os critérios adotados pelo Programa de Controle da Qualidade do "United States Departament of Agriculture" (USDA, 2000), todos os ovos, independentemente da utilização ou não de embalagens e a aplicação ou não de óleo mineral sobre a casca, seriam classificados como de excelente qualidade (AA) por apresentarem valores de UH superiores a 72 UH. Esse fato é devido principalmente a ação da temperatura de refrigeração durante todo o período de armazenamento, comprovando o benefício de sua utilização na conservação da qualidade dos ovos.

4.2.1.2. UH dos ovos com ou sem utilização de embalagem

Os ovos sem aplicação de óleo e sem embalagem apresentaram inicialmente valores de UH de 98,12 e após 125 dias de armazenamento ocorreu uma redução de 21,57 UH ou 22,0%, passando a apresentar 76,55 UH. Nos ovos sem aplicação de óleo e com embalagem houve uma redução de 23,77 UH ou 24,3%, passando de 97,90 para 74,13 UH (Tab. 10).

Souza et al. (1983) observaram que o armazenamento de ovos em baixas temperaturas (2,6ºC e 8ºC) foi mais importante na manutenção da qualidade interna dos ovos do que a utilização de embalagem, uma vez que os ovos apresentaram boa qualidade até o 35º dia de armazenamento. Ramos et al. (2010) também não observaram melhoria na preservação da integridade do albúmen e, consequentemente, dos valores de UH, em ovos embalados e armazenados sob refrigeração por 15 dias.

Ao contrário do observado neste experimento, Xavier et al. (2008) observaram que os ovos embalados em filme plástico e armazenados sob refrigeração apresentaram valores de UH superiores aos dos ovos não embalados após o seu armazenamento por 35 dias.

O benefício da utilização de diferentes tipos de embalagens na manutenção da qualidade interna dos ovos tem sido relatado por alguns autores (Coterril e Gardner, 1957; Campos et al., 1973; Magalhães, 2007; Rocculi et al., 2009) quando o armazenamento dos ovos é feito em temperatura ambiente. Entretanto, de acordo com os resultados encontrados, a utilização desse artifício em ovos armazenados sob refrigeração não resultaram em valores de UH mais elevados.

A utilização de embalagens na manutenção da qualidade de ovos tem o mesmo objetivo da aplicação de óleo mineral ou outra substância selante sobre a casca dos ovos, que é impedir a perda de CO_2 para o ambiente, evitando a dissociação do complexo protéico que leva a fluidificação do albúmen denso. Com a utilização de embalagens, apesar de ocorrer perda de CO_2 do albúmen, ele fica retido no interior da embalagem, criando um gradiente de concentração ao redor dos ovos que impede que essa perda continue devido a formação de um equilíbrio entre o CO_2 presente no albúmen e o presente na embalagem.

A embalagem, além de proteger os ovos contra contaminação ambiente e quebras de casca, atua também como importante agente de *marketing* e de melhoria da aparência dos produtos das empresas. Como praticamente não existe diferença visual entre os ovos produzidos em diferentes granjas, as embalagens assumem o papel de chamar a atenção do consumidor para o produto da empresa. Atualmente, os ovos

são exportados em bandeja de papelão semelhante às utilizadas neste experimento e que ao contrário das embalagens avaliadas, não permite a realização de propaganda da empresa através da impressão de sua marca em sua superfície.

A embalagem das bandejas de ovos com filmes plásticos ou a utilização de embalagem semelhante a usada neste experimento para transportar ovos destinados a mercados consumidores mais distantes, como é o caso dos ovos exportados *in natura*, não é viável economicamente, pois reduz a quantidade de ovos transportados nas caixas por não permitir um perfeito encaixe entre as bandejas. Essa falta de encaixe perfeito, além de reduzir a quantidade de ovos transportada também pode levar a um maior índice de quebra ou de cascas trincadas durante o transporte e manipulação por não possibilitar perfeito contato entre embalagens, e sim entre ovos de uma bandeja com o fundo de outra bandeja. Desse modo, a utilização de embalagens semelhante a utilizada neste trabalho somente seria aconselhada se resultasse algum benefício na melhoria da qualidade dos ovos, fato que não ocorreu.

Além da utilização da refrigeração, um dos possíveis motivos para a não observação de diferença na qualidade dos ovos embalados e não embalados se deve ao fato de que as embalagens utilizadas (tipo estojo e com capacidade para 12 unidades) não proporcionam perfeito isolamento dos ovos embalados do ambiente externo por apresentar uma pequena abertura lateral entre a tampa e os casulos onde os ovos são acondicionados. Essa abertura, apesar de pequena, pode ter permitido a saída do CO_2 para o ambiente não proporcionando o efeito desejado na manutenção da qualidade dos ovos.

4.2.1.3. UH dos ovos com aplicação de óleo mineral e com embalagem

No início do período de armazenamento, os ovos com aplicação de óleo mineral e com embalagem apresentaram valores médios de 98,90 UH e ao final do período de armazenamento de 78,60UH, o que resultou em perda de 20,30 UH ou 20,5% (Tab. 10).

Resultados semelhantes foram encontrados por Mellor et al. (1975) que não observaram diferença significativa entre os valores de UH dos ovos que receberam a aplicação de óleo mineral e que foram ou não embalados antes de serem armazenados sob refrigeração. Após 14 dias de armazenamento houve redução de 6,4 UH nos ovos embalados com saco plástico e 6,21 UH nos ovos sem embalagem.

Segundo Davis e Brunson (1962), a utilização de óleo mineral sobre a casca dos ovos foi mais eficiente na manutenção da qualidade interna do que a utilização de embalagem de celofane que, por sua vez, foi mais eficiente que a não utilização de embalagem ou a não aplicação de óleo. A diferença entre os ovos com aplicação de óleo e dos ovos com embalagem foi de 14,0 UH e destes para os ovos sem aplicação de óleo e sem embalagem foi de 7,4 UH. Após três semanas, os ovos com aplicação de óleo e armazenados em temperatura ambiente apresentaram os mesmos valores de UH que os ovos embalados e mantidos a 10ºC.

A equação de regressão dos valores de UH em função dos dias de armazenamento sob refrigeração está apresentada na Tab. 11 e sua representação gráfica na Fig. 6.

Foi observada redução ($p<0,05$) dos valores de UH ao longo dos dias de armazenamento (Fig. 6). No primeiro dia de análise, os ovos apresentaram valor médio de 96,74 UH e, ao término do período de armazenamento, esse valor reduziu para 77,86 UH,

resultando em uma perda média de 18,88 UH. Assim, de acordo com os resultados médios dos valores de UH, todos os ovos avaliados durante os 125 dias de armazenamento seriam classificados como sendo de qualidade excelente (AA) por apresentarem valores superiores a 72 UH, segundo o Programa de Controle da Qualidade preconizado pelo Departamento de Agricultura Americano (USDA, 2000).

Tabela 11: Equações de regressão dos valores de UH de ovos armazenados durante 125 dias sob refrigeração

Variável	**Equação**	**R^2 (%)**
Dias de estocagem	$y = 97,05 – 0,315x + 0,0013x^2$	98,55

*Teste de Fisher ($p<0,01$); x = nº de dias de armazenamento

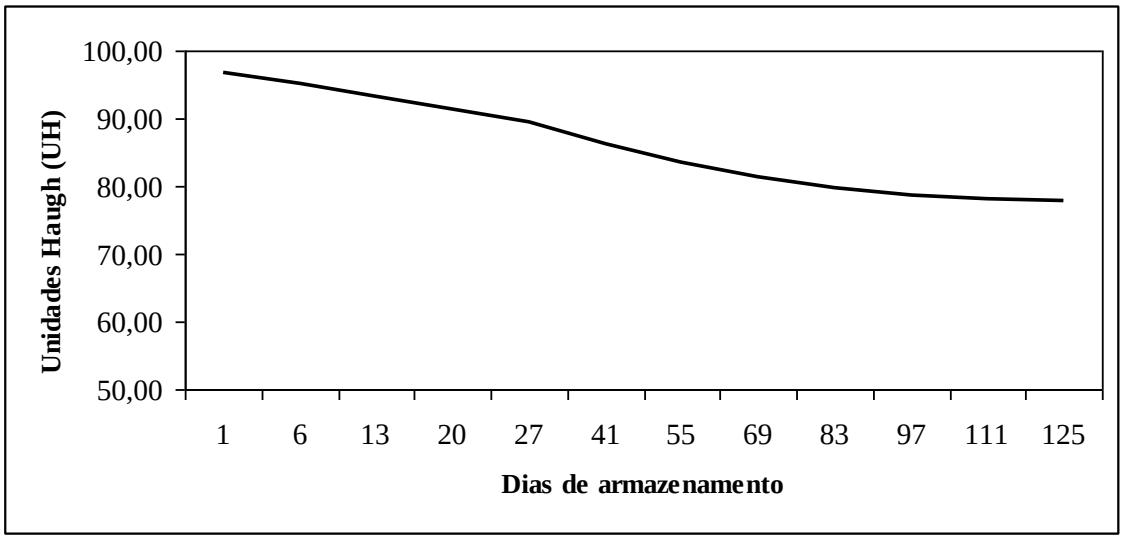


Figura 6: Gráfico de regressão dos valores de UH de ovos armazenados durante 125 dias sob refrigeração.

O benefício da utilização da refrigeração na manutenção da qualidade interna dos ovos durante seu armazenamento também foi relatado por diversos autores. Fernandes et al. (1983) observaram diminuição mais lenta nos valores de UH em ovos armazenados a 5ºC em comparação aos armazenados à 25ºC. As UH no dia da postura passaram de 92,06 para 79,41 e 45,29 após 14 dias de armazenamento à 5º e 25 ºC, respectivamente. Alleoni e Antunes (2001) observaram diminuição de UH de 83,66 para 41,71UH após sete dias de armazenamento em temperatura ambiente e para zero após 14 dias. Nos ovos mantidos sob refrigeração não foram verificadas diferenças significativas nos valores de UH com sete, 14 e 21 dias de armazenamento. Samli et al. (2005), ao avaliar o valor de UH de ovos armazenados a cinco, 21 e 29ºC durante dois, cinco e 10 dias não observaram diferença no valor de UH durante os 10 dias de estocagem a 5ºC. No entanto, o valor de UH dos ovos armazenados a 21 e 29ºC diminuíram significativamente durante a estocagem, chegando a 53,74 e 40,57 UH, respectivamente. Oliveira (2006) observou diminuição mais acentuada dos valores de UH dos ovos armazenados a 25 ºC quando comparado a 6ºC, atingindo valores de 69,13 e 18,39 UH para ovos com 10 e 30 dias de armazenamento a 25ºC, respectivamente. Após 50 dias de armazenamento a 6ºC, houve diminuição de 99,55 UH para 71,74 UH. Santos et al. (2009) observaram redução nos valores de UH de 79,17 para 76,88 UH após 21 dias de

armazenamento sob refrigeração. Klein (2010) observou redução de 5,46 UH em ovos armazenados durante 21 dias sob refrigeração, enquanto que os ovos mantidos em temperatura ambiente apresentaram redução média de 28,32 UH.

A UH é uma relação entre peso do ovo e qualidade do albúmen, que é avaliada pela altura do albúmen. Com o aumento do período de armazenamento, ocorre a diminuição da altura do albúmen e, consequentemente, diminuição dos valores de UH. Assim, ovos que apresentam valores de UH mais altos, refletem ovos de melhor qualidade. A fórmula utilizada para cálculo das UH fixa a relação que quanto maior o ovo, maior será a altura do albúmen, o que de fato não ocorre. De fato, com aumento do tamanho do ovo ocorre o aumento do albúmen, mas não necessariamente ocorre aumento da altura desse albúmen (Silversides, 1994). Os ovos de poedeiras velhas, apesar de serem mais pesados, quando comparados com os ovos de poedeiras novas, apresentam menor valor de UH durante todo o período de armazenamento (Figueiredo, 2011; Carvalho et al. 2007). Devido a esse fato, a utilização da UH para verificação da qualidade interna de ovos tem sido criticada, sendo aconselhado seu uso apenas na avaliação de ovos de poedeiras de mesma linhagem e idade (Eisen et al., 1962; Silversides et al., 1993; Silversides, 1994).

4.2.2. pH do albúmen

A influência do período de armazenamento sob refrigeração nos valores de pH do albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral e embalados e não embalados pode ser observada na Tab. 12.

Tabela 12: Médias dos valores de pH do albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração

Embalagem	**Aspersão de óleo**		
	sem óleo	**com óleo**	**Média**
sem embalagem	9,17 Aa	8,63 Ba	8,90
com embalagem	9,16 Aa	8,38 Bb	8,77
Média	9,17	8,51	

Média seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de SNK ($p<0,05$). CV = 1,58.

A aplicação de óleo mineral sobre a casca dos ovos influenciou positivamente ($p<0,05$) nos valores de pH do albúmen (Tab. 12) resultando em valores mais baixos comparados aos ovos sem aplicação de óleo, independentemente da utilização ou não de embalagens. Os ovos com aplicação de óleo apresentaram valor médio de pH de 8,51 durante o período de armazenamento, enquanto os ovos sem aplicação de óleo apresentaram o valor de pH de 9,17. Dessa forma, a aplicação de óleo mineral foi eficiente para impedir uma maior perda de CO_2 para o ambiente, o que levaria a uma maior redução em sua qualidade interna. Tal fato pode ser comprovado pelos resultados das análises de UH contidos na Tab. 9 em que se observaram valores de UH mais elevados, indicando que os ovos que receberam a aplicação de óleo mineral sobre a casca apresentaram uma melhor qualidade ao longo do período de armazenamento.

Não foi observada diferença ($p>0,05$) na utilização ou não de embalagens em ovos que não receberam a aplicação de óleo mineral sobre a casca, entretanto, houve diferença ($p<0,05$) na manutenção dos valores de pH em níveis mais baixos quando foi feita a aplicação de óleo e a utilização de embalagens (Tab. 12).

Portanto, foi observada interação entre aplicação de óleo mineral sobre a casca e a utilização de embalagens durante o armazenamento. O valor médio de pH do albúmen durante o período de armazenamento dos ovos sem embalagem foi de 8,90, enquanto que nos ovos com embalagem o pH médio foi de 8,77. De acordo com os resultados, a utilização de embalagens sem a associação com o uso do óleo mineral para se evitar a perda de CO_2 e o aumento do pH do albúmen não é eficaz, sendo desaconselhado seu uso por implicar em aumento dos custos de produção.

Os valores médios do pH do albúmen, equações de regressão e coeficientes de determinação de ovos embalados e não embalados e com e sem aplicação de óleo mineral durante 125 dias de armazenamento estão representados na Tab. 13 e suas representações gráfica na Fig. 7.

Através da Fig. 7 é possível observar o aumento dos valores de pH ao longo do período de armazenamento dos ovos, independentemente da aplicação ou não de óleo mineral ou a utilização ou não de embalagens. Alleoni e Antunes (2001), após armazenar ovos sob refrigeração (8ºC), observaram aumento de pH de 7,78 para 9,09 após 21 dias. Samli et al. (2005) observaram aumento do pH de 7,47 para 8,26 após 10 dias de armazenamento a 5ºC. Em ovos armazenados a 6ºC, o pH alcançou valor médio de 9,13 aos 50 dias, ao passo que, no armazenamento a 25ºC, o valor médio para o pH aos 30 dias foi de 9,41 (Oliveira et al., 2009b).

Tabela 13: Valores do pH do albúmen, equações de regressão e coeficientes de determinação obtidos para o efeito do tempo de armazenamento e aplicação ou não de óleo mineral e utilização ou não de embalagem durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	**Tratamento**			
	SO e SE	**SO e CE**	**CO e SE**	**CO e CE**
1	8,94	8,52	8,19	8,17
6	8,96	9,12	8,23	8,19
13	8,99	9,18	8,29	8,22
20	9,02	9,20	8,34	8,25
27	9,05	9,21	8,40	8,27
41	9,11	9,22	8,52	8,33
55	9,17	9,23	8,63	8,38
69	9,23	9,23	8,74	8,43
83	9,28	9,23	8,86	8,49
97	9,34	9,23	8,97	8,54
111	9,40	9,23	9,09	8,59
125	9,46	9,23	9,20	8,65
Média	9,20	9,15	8,62	8,38
Equação de regressão	y=8,94 + 0,004x	y=9,24 - 0,723/x	y=8,18 + 0,008x	y=8,17+ 0,003x
R^2 (%)	54,36	74,76	90,66	51,65

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem.

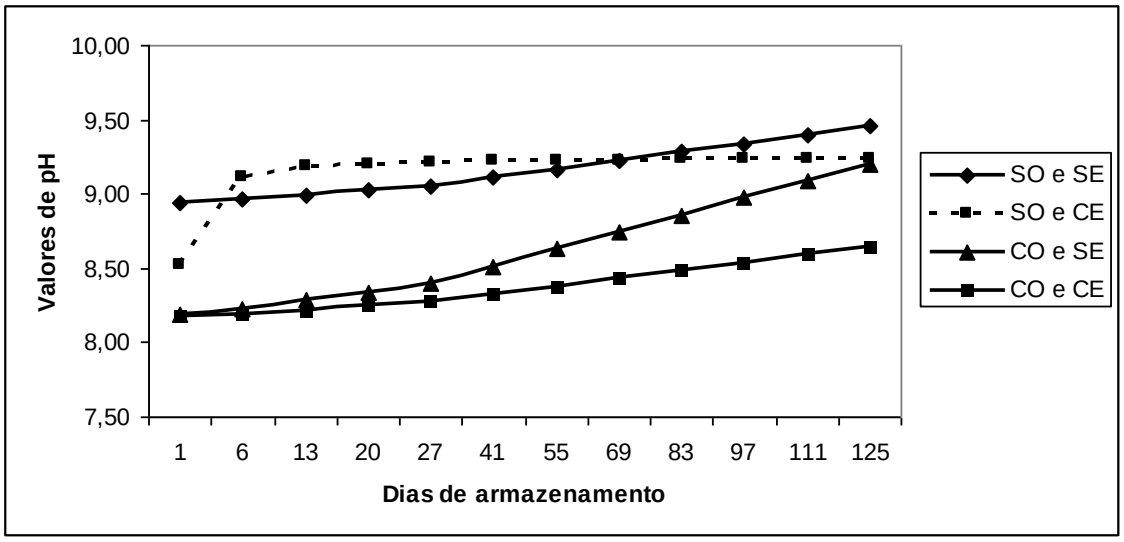


Figura 7: Gráfico de regressão de pH do albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração.

4.2.2.1. pH do albúmen dos ovos com ou sem aplicação de óleo mineral

Os ovos com aplicação de óleo mineral apresentaram valores de pH menores que os ovos sem óleo mineral, independentemente da utilização ou não da embalagem, durante todo período de armazenamento (Fig. 7). Os ovos com aplicação de óleo e sem embalagem apresentaram, inicialmente, um pH de albúmen de 8,19 e após 125 dias de armazenamento ocorreu o aumento desse pH, passando a apresentar 9,20. Nos ovos sem aplicação de óleo mineral e sem embalagem houve um aumento nos valores de pH de 8,94 para 9,46 ao término do período de armazenamento (Tab. 13 e Fig. 7).

Ao contrário do observado neste experimento, outros autores observaram redução dos valores de pH após a aplicação de óleo mineral e seu armazenamento durante algumas semanas. Jirangrat et al. (2010) observaram redução de pH de 8,71 para 8,53 em ovos que não receberam aplicação de óleo mineral e para 7,96 em ovos que receberam essa aplicação após 15 semanas de armazenamento a 4ºC. Biladeau e Keener (2009) também observaram redução de pH nos ovos revestidos com óleo mineral após 12 semanas de armazenamento a 7ºC, passando inicialmente de 8,35 para 7,96, enquanto que nos ovos sem aplicação de óleo houve aumento de pH de 8,64 para 9,25. Segundo os autores desses dois trabalhos, a diminuição do pH pode ser devido à persistência da desagregação dos componentes do ovo e/ou mudança no sistema tampão bicarbonato. Wardy et al. (2010) também observaram aumento do pH do albúmen dos ovos sem aplicação de óleo mineral e diminuição do pH dos ovos com aplicação de óleo mineral ao armazená-los por 20 semanas a 4ºC e por cinco semanas a 25ºC. Entretanto, é importante ressaltar que o valor de pH inicial observado foi de 9,04 e que após as 20 semanas de armazenamento o pH do albúmen foi de aproximadamente 8,40, valor próximo ao observado no presente trabalho.

Semelhante ao observado neste trabalho, Bacurau et al. (1994) observaram que a refrigeração foi eficiente para controlar o aumento do pH por 28 dias, mas que a aplicação de óleo mineral auxiliou na manutenção do pH do albúmen em níveis

mais baixos quando comparados aos ovos que não receberam esse tratamento.

Logo após a postura, principalmente até os primeiros três ou quatro dias de armazenamento, ocorre um maior aumento do pH do albúmen devido a passagem do CO_2 do albúmen para o ambiente resultante da perda do equilíbrio entre o dióxido de carbono dissolvido, íons bicarbonatos, íons carbonato e proteínas (Karoui et al., 2006). No ovo recém posto, o albúmen contém aproximadamente de 4 a 5mg de CO_2 dissolvido e, em torno de 100mg de CO_2 em forma de bicarbonato (Santos, 2005). O aumento do pH do albúmen depende predominantemente da capacidade de tamponamento do albúmen, mas também da temperatura, tempo de armazenamento e concentração de gases no ambiente onde os ovos estejam armazenados. Assim, mesmo quando armazenados a temperaturas mais elevadas, um ambiente com saturação de CO_2 pode reduzir o aumento dos valores de pH, contribuindo para uma melhor qualidade interna.

Neste contexto, o armazenamento de ovos em temperaturas mais baixas como as de refrigeração, tem papel fundamental na manutenção dos valores de pH em níveis mais baixos. Isso ocorre porque os gases são mais solúveis em líquidos frios do que nos mais quentes e, portanto, menos CO_2 é liberado para o exterior através da casca a 4ºC do que a 25 ºC (Wardy et al., 2010). Assim, ovos armazenados em temperatura ambiente, e deste modo, com menor solubilidade do CO_2 no albúmen, tem os valores de pH aumentados mais rapidamente, ocasionando a liquefação do albúmen e a perda de qualidade em menor tempo.

4.2.2.2. pH do albúmen dos ovos com ou sem embalagem

Os ovos sem aplicação de óleo mineral e sem embalagem apresentaram inicialmente valores de pH de 8,94 e após 125 dias de armazenamento ocorreu um aumento na alcalinidade para 9,46. Nos ovos sem aplicação de óleo mineral e com embalagem houve um aumento de pH de 8,52, para 9,23 ao término do período de armazenamento (Tab. 13 e Fig. 7).

Os ovos sem aplicação de óleo mineral e sem embalagem foram os que apresentaram inicialmente o maior valor de pH com 8,94 (Tab. 13). Os ovos foram coletados em um mesmo galpão e em um mesmo dia e horário, sendo apenas separados aleatoriamente no momento de formação dos diferentes tratamentos, desse modo, era esperado que apresentassem valores de pH próximos uns dos outros. Como a primeira análise de pH foi realizada aproximadamente 30h após a postura e em boa parte desse período os ovos não se encontravam sob refrigeração (devido a seleção, classificação e transporte) essa diferença de valores de pH deve ser resultado do efeito dos tratamentos, ou seja, a utilização ou não de embalagens/óleo ou os dois juntos. Os resultados de alguns trabalhos (Scott e Silversides, 2001; Xavier et al., 2008; Figueiredo, 2011; Oliveira et al., 2009b; Klein, 2010) demonstraram que o maior e mais rápido aumento do pH do albúmen ocorre nos primeiros dias após a postura, principalmente em ovos mantidos em condições desfavoráveis, como por exemplo, em temperatura ambiente.

Xavier et al. (2006) também observaram aumento significativo do pH do albúmen de ovos embalados de 8,37 para 9,35 após 35 dias de armazenamento sob refrigeração, não sendo observada diferença de valores de pH até o 25º dia de armazenamento. Nos ovos sem embalagem, não houve aumento significativo de pH apenas até o 20º dia de armazenamento.

4.2.2.3. pH do albúmen de ovos com aplicação de óleo mineral e com embalagem

Os ovos com aplicação de óleo mineral sobre a casca e com embalagem foram os que apresentaram os valores de pH mais baixos durante todo o período de armazenamento dos ovos. O pH do albúmen aumentou de 8,17 para 8,65 ao término dos 125 dias de armazenamento (Tab. 13 e Fig. 7).

O benefício da utilização apenas de óleo ou apenas de embalagem na manutenção do pH mais baixo em comparação a não utilização de nenhum tratamento pode ser observado na Fig. 7. Mas quando foi utilizado óleo sobre a casca associado à utilização de embalagem, esse tratamento foi mais eficiente para evitar o aumento de pH do que a aplicação de óleo ou utilização de embalagem isolados.

4.2.3. Perda de peso dos ovos

A influência do período de armazenamento dos ovos sob refrigeração pode ser observada nas Tab. 14 e 15. Não foi observada diferença ($p>0,05$) na aplicação ou não de óleo mineral sobre a casca e a utilização ou não da embalagem na manutenção do peso dos ovos durante todo o período de armazenamento (Tab. 14).

Tabela 14: Médias dos pesos dos ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	Tratamento			
	SO e SE	SO e CE	CO e SE	CO e CE
1	56,81	56,03	57,88	54,95
125	52,52	53,35	56,56	54,59
Peso médio	55,49	56,00	55,62	55,65
Perda de peso total (%)	7,5	4,8	2,3	0,6
Perda de peso total (g)	4,29	2,68	1,32	0,36
Perda de peso/semana (g)	0,24	0,15	0,07	0,02

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem.

A não observação de diferença entre os tratamentos pode ser resultado das boas condições em que os ovos foram armazenados. Apesar do longo tempo de armazenamento, observou-se uma perda de peso média relativamente pequena, demonstrando que a temperatura de armazenamento e a umidade relativa utilizadas durante o experimento foram eficientes para minimizar a perda de peso dos ovos quando comparados com os tratamentos utilizados.

A determinação da porcentagem de perda de peso dos ovos durante o armazenamento é importante para o produtor atender ao intervalo de peso determinado pelo comprador, principalmente no caso de ovos destinados à exportação e que permanecem longos períodos armazenados. Se o comprador estabelece como limite inferior de peso, ovos com 53,0g, e durante o transporte e armazenamento ocorre uma perda de peso 2,3% (como no caso dos ovos com aplicação de óleo mineral e sem embalagem), o produtor deve considerar essa perda de peso e enviar ovos com peso superior a 54,2g, evitando que os ovos cheguem ao seu destino com peso inferior ao determinado pelo comprador.

4.2.3.1. Peso dos ovos com ou sem aplicação de óleo

Os ovos com aplicação de óleo e sem embalagem apresentaram inicialmente um peso médio de 57,88g e, após 125 dias de armazenamento, ocorreu a perda de peso de 1,32g ou 2,3%, passando a apresentar peso de 56,56g. Nos ovos sem aplicação de óleo e sem embalagem houve perda peso de 4,29g ou 7,5%, reduzindo de 56,80g para 52,52g ao término do período de armazenamento (Tab. 14). Bacurau et al. (1994) também observaram menor perda de peso em ovos com aplicação de óleo e armazenados por 28 dias sob refrigeração.

A perda de peso observado por Biladeau e Keener (2009) durante o armazenamento de ovos por 12 semanas a 7ºC foi de 0,03g por semana para ovos com aplicação de óleo e de 0,28g por semana para ovos sem aplicação de óleo mineral. Valores semelhantes foram observados neste trabalho com perda de peso de 0,24 por semana para ovos sem aplicação de óleo e sem embalagem e de 0,07g por semana em ovos com aplicação de óleo e sem embalagem após 125 dias de armazenamento.

Jirangrat et al. (2010) observaram perda de peso de 12,44% em ovos que não receberam aplicação de óleo mineral e de apenas 1,19% em ovos que receberam essa aplicação após 15 semanas sob refrigeração. Resultado diferente foi observado no presente trabalho aos 111 dias de armazenamento (Tab. 14) em que os ovos sem óleo e sem embalagem apresentaram perda de peso de 4,4%, enquanto os ovos com óleo e sem embalagem de 4,8%. Wardy et al. (2010) também observaram menor perda de peso em ovos com aplicação de óleo mineral (perda de 1,06%) após 20 semanas de armazenamento sob refrigeração. Nos ovos sem aplicação de óleo a perda foi de 11,77% do peso inicial.

Alguns autores (Wong et al., 1996; Waimaleongora-ek et al., 2009; Torrico et al., 2010) relataram a eficiência da utilização de óleo mineral sobre a casca na redução da perda de peso em ovos armazenados em temperatura ambiente, entretanto são poucos trabalhos com ovos armazenados sob refrigeração.

4.2.3.2. Peso dos ovos com ou sem utilização de embalagem

Os ovos sem aplicação de óleo e com embalagem apresentaram inicialmente peso médio de 56,03g e após 125 dias de armazenamento ocorreu uma redução de peso para 53,35g, resultando em perda de 2,68g ou 4,8%, enquanto que nos ovos sem aplicação de óleo e sem embalagem essa perda total foi de 4,29g ou 7,5% (Tab. 14).

Myers et al. (1963) observaram perda de peso de 0,64g em ovos com embalagens de cloreto de vinilideno após oito semanas de armazenamento a 10ºC. Ramos et al. (2010), apesar de um curto período de armazenamento, também não observaram diferença na perda de peso de ovos embalados em filme plástico dos ovos que não receberam embalagem após 15 dias de armazenamento.

4.2.3.3. Peso dos ovos com aplicação de óleo mineral e com embalagem

No início do período de armazenamento, os ovos com aplicação de óleo mineral e com embalagem apresentaram peso médio de 54,95g e ao final do período de armazenamento 54,59g de peso, o que resultou em uma perda de apenas 0,36g ou 0,6% (Tab. 14).

Como a perda de peso ocorre principalmente através da passagem de água pela casca, era esperado que a aplicação de óleo sobre a casca dos ovos evitasse essa perda através da obstrução dos

poros e selamento da superfície da casca, fato que não ocorreu neste experimento. Do mesmo modo, alguns trabalhos (Xavier, 2008; Magalhães, 2007) relataram que a utilização de embalagens auxiliou na manutenção da qualidade interna dos ovos pela criação de um ambiente saturado de CO_2 dentro da embalagem, evitando sua perda para o ambiente e auxiliando na manutenção de melhores valores de UH e pH; assim esperava-se também, que a embalagem evitasse a perda de água e consequentemente, perda de peso dos ovos.

Os valores médios do peso dos ovos, equação de regressão e coeficiente de determinação de ovos durante 125 dias de armazenamento estão representados na Tab. 15 e suas representações gráficas na Fig. 8.

Tabela 15: Valores dos pesos dos ovos, equações de regressão e coeficientes de determinação obtidos para o efeito do tempo de armazenamento em ovos durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	Peso dos ovos
1	57,04 A
6	56,93 A
13	56,79 A
20	56,64 A
27	56,50 A
41	56,20 A
55	55,91 AB
69	55,62 BC
83	55,33 BC
97	55,04 C
111	54,74 C
125	54,45 C
Média	55,93
Equação de regressão	y = 57,06 – 0,020x
R^2 (%)	91,30

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Teste de Fisher ($p<0,01$); x = nº de dias de armazenamento. CV= 2,35.

Após 125 dias de armazenamento o peso médio dos ovos passou de 57,04g para 54,45g, resultando em uma perda média de 2,59g ou 4,54% do peso inicial. Até o 55º dia de armazenamento, não foi observada diminuição ($p>0,05$) no peso dos ovos. Esses resultados são melhores do que os relatados por Jones e Musgrove (2005a), que observaram uma perda de peso dos ovos de 6,55% após 10 semanas de armazenamento a 4ºC e 80% de UR. Semelhante ao observado neste trabalho, (Tab. 15), Keener et al. (2006) também não observaram diminuição dos pesos dos ovos após sete semanas de armazenamento.

Após a postura, durante o armazenamento, o ovo tem seu peso diminuído pela perda de água e CO_2 do albúmen para o ambiente através da casca (Romanoff e Romanoff, 1963 e Koehler, 1974). A redução do peso do ovo também pode ocorrer pela provável perda de amônia, nitrogênio e sulfeto de hidrogênio que são produtos da degradação química de seus constituintes orgânicos (Solomon, 1991; Silversides e Budgell, 2004). Dessa forma, o tempo e as condições de estocagem são determinantes na porcentagem de perda de peso dos ovos. Os ovos mantidos em temperatura ambiente perdem mais água e CO_2 para o meio ambiente ocasionando um menor peso

quando comparados aos mantidos sob refrigeração (Figueiredo, 2011). Samli et al. (2005) não observaram diminuição do peso dos ovos com o armazenamento a 5ºC por 10 dias. Entretanto, durante o armazenamento a 29ºC, os ovos perderam 1,30g com cinco dias e 1,94g com 10 dias de armazenamento. Em ovos armazenados em temperatura ambiente (21,6ºC e 57,3% de UR), Figueiredo (2008) observou uma perda de peso de 2,6% após 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente e sob refrigeração (2,6ºC e 75% de UR) apenas 1,54%. Essa perda de peso foi superior ao observado aos 20 dias de armazenamento neste trabalho (Tab. 15), que apresentou redução de 0,7%, embora os ovos tenham sido armazenados em temperatura de 5,1ºC e 63,7% de UR.

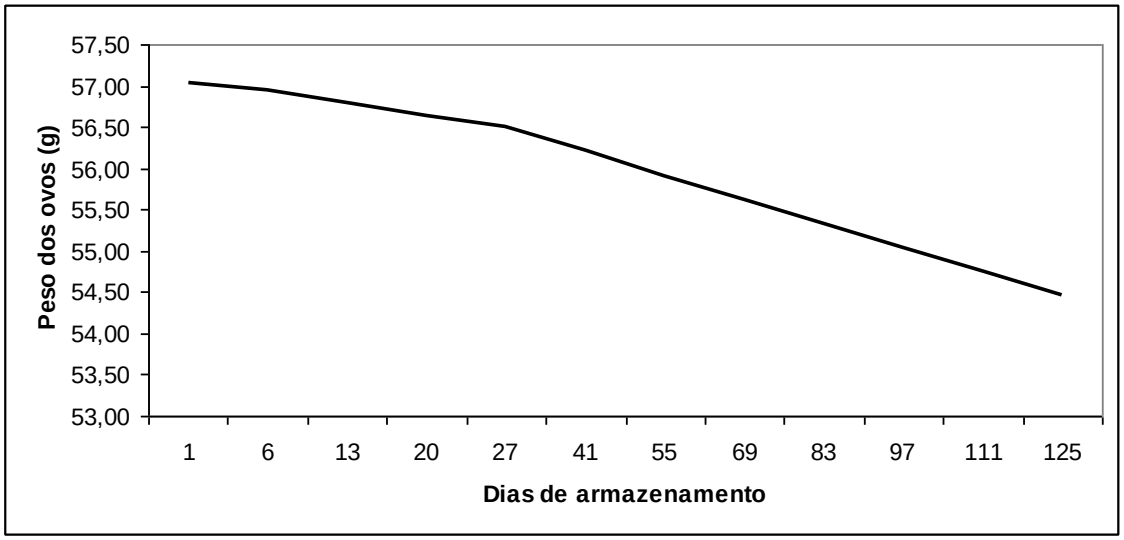


Figura 8: Gráfico de regressão do peso de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e com e sem embalagem durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração.

A umidade relativa dos locais de armazenamento dos ovos também é muito importante para impedir a perda de peso dos ovos. Em ambientes com baixa umidade relativa, a perda de água para o ambiente ocorre de maneira mais rápida do que quando armazenados em ambiente com umidade relativa mais alta. Barbosa et al. (2008) observaram a perda média de 3,63% do peso inicial em ovos armazenados por 35 dias a 20,7ºC e 78% de UR, enquanto que os ovos armazenados a 26,8ºC e 39% de UR apresentaram uma perda média de 9,20% em relação ao peso inicial.

A perda de peso de 2% a 3% é comum na comercialização dos ovos e dificilmente é perceptível para o consumidor. No entanto, o aumento da câmara de ar e uma diminuição do tamanho do conteúdo do ovo torna-se perceptível quando as perdas excedem esses valores (FAO, 2003). De acordo com esses valores, somente o ovos com aplicação de óleo apresentaram perda de peso inferior ou dentro do intervalo sugerido pela FAO como imperceptível pelos consumidores.

4.3. Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas do conteúdo interno dos ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados não apresentaram diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos utilizados em nenhum dos períodos de armazenamento. Não foi observada a presença de *Salmonella* spp.,

Staphylococcus aureus, coliformes termotolerantes e bolores e leveduras no conteúdo interno dos ovos, entretanto, as contagens de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos foram bastante elevadas.

4.3.1. *Salmonella* spp.

Os resultados das análises de *Salmonella* spp. no conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de óleo mineral e embalados e não embalados foram negativo para todas as 192 amostras. Esse resultado pode ser reflexo da boa condição sanitária das aves e também das boas condições de higiene das instalações da granja. A ausência de *Salmonella* spp. em ovos também foi observada em vários outros trabalhos como por Baú et al. (2001), ao analisar 46 amostras de ovos produzidos em granjas e 48 amostras de ovos produzidos em pequenas propriedades e por Radkowski (2001) e Silva et al. (2004) que não encontraram amostra positiva para *Salmonella* spp. nas cascas e nos conteúdos de ovos de diversos fornecedores distintos. Carvalho et al. (2006) também não observaram a presença de *Salmonella* spp. em gemas de ovos. Figueiredo (2008) não observou a presença de *Salmonella* spp. em ovos de poedeiras com 30 e 60 semanas de idade armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração. Em ovos provenientes das três principais distribuidoras do estado de Minas Gerais, Klein (2010) também não observou a presença de *Salmonella* spp. Segundo Humphrey (1994), a contaminação de ovos por *Salmonella* spp. geralmente é baixa, próxima de 1%.

A taxa de contaminação por *S. enteritidis* em ovos recém postos de poedeiras infectadas por essa bactéria varia entre zero e 0,6%, entretanto a análise de ovos ainda em formação no oviduto dessas poedeiras apresentou taxas de contaminação entre 27,1% e 31,4% (Keller et al., 1995). Segundo esses autores, fatores como anticorpos, enzimas antibacterianas, seqüestro de ferro e proteínas inibidores de proteases bacterianas presente na gema e albúmen são capazes de controlar a contaminação dos ovos por *S. enteritidis* antes da completa formação da casca e postura dos ovos.

Barros et al. (2001) também atribuíram a ausência de *S. enteritidis* no interior de todo o conteúdo do ovo (albúmen e gema), após sua imersão em solução contendo essa bactéria, a fatores antibacterianos encontrados no albúmen, como a ação de enzimas antibacterianas e deficiência do íon ferro. Oliveira e Silva (2000), em experimento semelhante, mas analisando isoladamente a gema, constataram a contaminação por *S. enteritidis* proveniente da casca, a partir de 24h após a contaminação artificial.

Em geral, salmonela possui um crescimento ótimo em pH em torno da neutralidade, tendo efeito bactericida em valores acima de 9,0 e abaixo de 4,0 (Jay et al., 2005). Como o pH do albúmen aumenta durante o armazenamento podendo atingir valores superiores a pH 9,0, o pH do albúmen se torna mais um obstáculo ao crescimento e sobrevivência de salmonelas em ovos. De acordo com Messens et al. (2004), no albúmen fresco ocorreu um maior crescimento de várias cepas (n=11) de *S. enterica* Enteritidis e também de outros sorovares de salmonelas (duas *S. enterica* Typhimurium, uma *S. enterica* Senftenberg, uma *S. enterica* Stanleyville, uma *S. enterica* Mbandaka e uma *S. enterica* Blockley) do que em albúmen de ovos armazenados por até três semanas. Além do alto pH ser desfavorável ao crescimento de micro-organismos, ele acentua a quelação dos íons ferro pela ovotransferrina, indisponibilizando-o para o crescimento bacteriano (Chen et al., 2002).

Oliveira e Silva (2000) observaram a presença de *Salmonella* spp. em 12

amostras de gema (9,6%) e quatro amostras (3,2%) de casca de ovos comerciais. Andrade et al. (2004), após analisar 112 amostras de ovos provenientes de granjas comerciais, encontraram apenas uma amostra positiva (0,89%) para salmonela, sendo *S. enteritidis*. Cardoso et al. (2007) isolaram salmonelas em três cascas (2,78%) e apenas uma gema (0,92%), sendo a *S. enteritidis* o único sorotipo identificado. Andrade et al. (2004) encontraram uma (0,37%) amostra positiva para *Salmonella* spp. em ovos coletados em granjas e 4 amostras (1,47%) positivas para os ovos coletados em mercearias. Martínez et al. (2005) encontraram apenas uma amostra positiva (0,25%) para *S. enteritidis*. É importante ressaltar que nestes trabalhos citados anteriormente, os ovos não foram armazenados sob refrigeração em nenhum momento até a realização das análises.

A refrigeração dos ovos durante os 124 dias de armazenamento é um importante fator que pode justificar a ausência de *Salmonella* spp. nos ovos analisados. Bradshaw et al. (1990) inocularam *Salmonella enteritidis* em ovos estocados a 37; 15,5 e 7ºC e observaram maior multiplicação dessa bactéria nos ovos armazenados a 37ºC do que a 15,5ºC. Durante 94 dias de experimento não foi observada a multiplicação dessa bactéria em ovos armazenados a 7ºC. Lublin e Sela (2008) também observaram maior multiplicação de *S. enterica* Enteritidis e *S. enterica* Virchow na gema de ovos armazenados a 25ºC do que a 6ºC. Nos ovos armazenados a 6ºC, houve redução da contagem de *S. enterica* Virchow até a sua ausência na oitava semana. Segundo Oliveira e Silva (2000), o armazenamento de ovos em temperatura ambiente permitiu que a *S. enteritidis* chegasse à gema em um maior número e com maior taxa de multiplicação do que quando armazenados sob refrigeração.

Humphrey (1990) não observou crescimento de *S. enteritidis* após sua inoculação no albúmen de ovos armazenados a oito, 10, 12 e 15ºC por até três semanas e pelo contrário, houve redução da população viável nas temperaturas de 12ºC e 15ºC. Nenhuma das cepas inoculadas conseguiu crescer nas gemas dos ovos estocados a 8ºC e quando estocados a 10ºC ocorreu um lento crescimento. Segundo o autor, a estocagem de ovos em temperaturas abaixo de 10ºC pode ter efeitos benéficos à saúde pública, por prevenir a multiplicação de salmonelas.

A temperatura de estocagem também exerceu efeito sobre *S. enteritidis* presente na superfície das cascas dos ovos contaminados artificialmente (Barros et al., 2001). Com o armazenamento a temperatura ambiente (25ºC), *S. enteritidis* continuou viável na casca por até 168h, enquanto que sob refrigeração (8ºC) após 24h já havia ocorrido uma redução das contagens e com 96 e 168h, observou-se sua ausência nas cascas dos ovos. Desse modo, além de auxiliar na qualidade microbiológica dos ovos, a refrigeração também pode ter um importante papel no controle da contaminação cruzada no momento do preparo dos alimentos nas residências dos consumidores.

A ocorrência de surtos de salmoneloses vem sendo sempre associada ao consumo de produtos avícolas, principalmente ao consumo de alimentos elaborados à base de ovos crus ou relacionados à cocção insuficiente de ovos inteiros (Peresi et al., 1998). Isto indica a importância da temperatura, seja de refrigeração no armazenamento ou a de cocção no momento do preparo, como ponto de controle para se evitar a ocorrência de infecções alimentares provocadas por salmonelas em ovos. Entretanto, ao contrário do que já ocorre em alguns países da União Européia e EUA (USDA, 2000), a legislação brasileira não faz exigência com

relação ao armazenamento dos ovos sob refrigeração logo após a postura, transporte ou comercialização. O consumidor também precisa ser melhor informado com relação ao armazenamento, manipulação dos ovos e preparo dos alimentos para reduzir os riscos de infecção por esse patógeno. Um elevado número de comerciantes e consumidores (38,5% e 37,8%, respectivamente) considerou a refrigeração como pouco importante ou indiferente para a qualidade sanitária do ovo em pesquisa realizada por Rodrigues e Salay (2001).

A presença de *Salmonella* spp. em ovos não significa necessariamente que haverá prejuízos para saúde do consumidor, mas aumenta a possibilidade caso o alimento não seja manipulado corretamente, podendo inclusive ocorrer multiplicação dessas bactérias aumentando o risco de ocorrer toxinfecções alimentares. Como a *Salmonella* spp. é sensível ao calor, o correto aquecimento e cozimento durante o preparo dos ovos ou dos alimentos a base de ovos é capaz de eliminá-la. Desta maneira, é importante que se evite o consumo de ovos crus ou mal cozidos, da mesma forma que se deve evitar alimentos crus ou mal cozidos que levam ovos em sua constituição.

4.3.2. *Staphylococcus* spp.

Os resultados das análises de pesquisa de *Staphylococcus* spp. no conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de óleo mineral e embalados e não embalados são apresentados na Tab. 16.

Tabela 16: Contagens médias (UFC/g x 10^0) de *Staphylococcus* spp. no conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 124 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	Tratamento			
	SO e SE	SO e CE	CO e SE	CO e CE
1	< 1,0	< 1,0	2,0 x 10^0 est.	< 1,0
5	2,2 x 10^1 est.	< 1,0	< 1,0	< 1,0
12	1,0 x 10^0 est.	< 1,0	< 1,0	7,0 x 10^0 est.
19	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
26	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
40	< 1,0	2,0 x 10^0 est.	< 1,0	< 1,0
54	< 1,0	3,0 x 10^0 est.	< 1,0	< 1,0
68	< 1,0	1,0 x 10^0 est.	< 1,0	< 1,0
82	< 1,0	2,0 x 10^0 est.	1,0 x 10^0 est.	< 1,0
96	< 1,0	< 1,0	< 1,0	1,0 x 10^0 est.
110	< 1,0	9,0 x 10^0 est.	< 1,0	1,0 x 10^0 est.; 5,0 x 10^0 est.
124	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem; est.: estimado.

Foram encontradas 13 amostras positivas (6,8%) para *Staphylococcus* sp. em um total de 192 amostras analisadas. Após a realização da prova da coagulase e dos testes complementares (Brasil, 2003), não foi observada presença de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo nas amostras positivas. Deste modo, todos os ovos analisados estão dentro dos padrões preconizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1990) para ovo integral líquido que estabelece a ausência de *Staphylococcus aureus* em 1g de ovo.

Figueiredo (2008) também não observou a presença de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo no conteúdo de ovos. Entretanto, 11,7% dos ovos analisados apresentavam *Staphylococcus* coagulase negativo. Resultado semelhante foi observado por Klein (2010), que observou a presença de colônias semelhantes às de *Staphylococcus* spp. em 11,8% dos ovos analisados, sendo todas negativas para o teste da coagulase. Do total das amostras que apresentaram colônias coagulase negativo, 4,16% foram provenientes de ovos armazenados em temperatura ambiente e 7,64% de ovos armazenados sob refrigeração.

Em amostras coletadas em uma indústria de processamento de ovos, nenhuma foi positiva para *Staphylococcus aureus* (Aragon-Alegro et al., 2005). Martínez et al. (2005) encontraram apenas uma amostra positiva (0,25%) para *Staphylococcus* sp..

A aplicação ou não de óleo sobre as cascas dos ovos e a utilização ou não de embalagens não influenciou na presença de *Staphylococcus* coagulase negativo, não sendo observada diferença (Teste de Qui-Quadrado) entre os tratamentos utilizados em nenhum dos períodos de armazenamento. Nas amostras de ovos sem aplicação de óleo e com embalagem (n=48), cinco amostras foram positivas (10,4%), enquanto os ovos sem aplicação de óleo e sem embalagem e os com aplicação de óleo sem embalagem apenas duas amostras (4,2%) foram positivas. Nos ovos com aplicação de óleo e com embalagem foram detectadas quatro amostras positivas (8,3%), sendo que duas dessas amostras foram detectadas no 110º dia de armazenamento. Nas análises realizadas nos 19º, 26º e 124º dias não foi observada a presença de *Staphylococcus* coagulase negativo em nenhuma amostra.

Segundo Lamaita et al. (2005), os padrões legais determinados pela legislação brasileira para análise de alimentos especificam apenas a presença de *Staphylococcus* sp. coagulase positivo em alimentos e enfatiza a necessidade da revisão da legislação, incluindo Staphylococcus coagulase negativo, dada sua importância do ponto de vista de segurança alimentar. A presença de espécies coagulase negativo produtoras de toxinas tem sido relatados por diversos autores como Rapini et al. (2005), Veras et al. (2008) e Bartels et al. (2009).

Os resultados encontrados sugerem que independentemente da utilização ou não da embalagem, a aplicação de óleo sobre a casca dos ovos não influenciou na presença de *Staphylococcus* coagulase negativo no conteúdo interno dos ovos, sendo que das 13 amostras positivas, sete não receberam aplicação de óleo, enquanto as outras seis amostras receberam a aplicação de óleo mineral. As amostras de ovos embalados, independentemente da aplicação ou não de óleo mineral, apresentaram nove amostras positivas, enquanto que os ovos não embalados apenas quatro amostras foram positivas.

Em todas as amostras positivas foi detectada uma baixa contagem, variando de $1,0x10^0$UFC/g est. a $2,2x10^1$UFC/g est. Uma possível explicação para essa baixa contagem é a ação da lisozima presente no albúmen, que possui efeito bactericida contra bactérias Gram positivo (Jay et al., 2005). Segundo esses autores, o *S. aureus* é capaz de crescer em um pH de 4,0 a 9,8, apesar de seu pH ótimo ser entre 6,0 a 7,0. Além disso, embora seja um micro-organismo mesófilo, algumas cepas são capazes de crescer a temperaturas mais baixas, podendo variar de 7 a 47,8ºC. Deste modo, o armazenamento dos ovos sob refrigeração e o aumento do pH durante o armazenamento altera as condições ótimas de crescimento e multiplicação desse micro-organismo, resultando em baixas contagens bacterianas.

4.3.3. Bolores e leveduras

Em todas as 192 amostras analisadas de conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e com e sem utilização de embalagem não foi observada a presença de bolores e leveduras durante os 124 dias de armazenamento sob refrigeração.

A legislação brasileira não faz nenhuma referência ou exigência com relação a presença de bolores em ovo integral líquido (Brasil, 1990). No entanto, bolores e leveduras podem causar deterioração em alimentos e, portanto, devem ser considerados nos programas de garantia de qualidade e segurança alimentar das indústrias alimentícias (Franco e Landraf, 1996).

Quando os ovos são armazenados em condições favoráveis ao crescimento de bolores, como em ambientes sem refrigeração e com alta umidade relativa do ar, é comum observar manchas na superfície das cascas, podendo suspeitar de contaminação fúngica. O crescimento de bolores na superfície da casca pode ser o primeiro passo para a contaminação interna do ovo através de sua passagem pelos poros e/ou microfraturas presente nas mesmas, levando a alterações em sua qualidade microbiológica. A umidade relativa recomendada para o armazenamento de ovos com o objetivo de minimizar a perda de sua qualidade interna é acima de 70% (Romanoff e Romanoff, 1963; Brasil, 1990; Alleoni e Antunes, 2001), o que favorece o desenvolvimento de bolores na superfície das cascas dos ovos.

O crescimento de bolores no albúmen pode resultar em sua completa gelificação, mudanças de cor e ruptura da membrana da gema. Durante a ovoscopia, é possível visualizar a presença de pontos ou a formação anéis com coloração escura ou colorida, enquanto que na superfície da membrana interna da casca pode-se observar a presença de mofos (Stadelman e Cotterill, 1995; Silva et al., 1997).

Os gêneros de bolores geralmente encontrados em ovos são *Mucor*, *Penicillium*, *Hormodendron*, *Cladosporium*, entre outros; enquanto a *Torula* é a única levedura encontrada com alguma regularidade. *Penicillium* spp. e *Cladosporium* spp. são as causas mais freqüentes do aparecimento de manchas do tamanho da cabeça de um alfinete e do apodrecimento de ovos por bolores (Jay et al., 2005).

Andrade et al. (2004) também não observaram a presença de bolores e leveduras em ovos coletados em granjas, entretanto, em 5,36% das amostras de ovos coletados em supermercados, postos de vendas e feiras livres foram observados a presença de *Aspergillus* spp. Jones et al. (2004b) observaram uma baixa contagem média de bolores e leveduras de $2x10^0$UFC/mL em ovos lavados e não lavados armazenados por até 10 semanas a 4ºC. Na oitava semana foi detectada a mais alta contaminação de bolores $2,5x10^0$UFC/mL em ovos não lavados.

Figueiredo (2008) observou a presença de bolores em apenas seis amostras (5%) de ovos, sendo que quatro (66,7%) dessas amostras eram de ovos armazenados em temperatura ambiente, enquanto nos ovos mantidos sob refrigeração foram encontradas somente duas (33,3%) amostras com presença de bolores. Klein (2010) observou que duas amostras (1,39%) de ovos armazenados por até 21 dias em temperatura ambiente apresentaram a presença de bolores, enquanto que nos ovos armazenados sob refrigeração em apenas uma amostra (0,69%) foi observada a presença desses micro-organismos.

Segundo Magalhães (2007), a presença da embalagem de filme plástico reduziu a

contagem de bolores na superfície interna e externa da casca dos ovos quando comparados aos ovos que não estavam embalados em filme plástico. Os ovos sem embalagem apresentaram contagem de 29,52UFC, enquanto que nos ovos embalados a contagem foi de 17,55UFC.

4.3.4. Coliformes totais e termotolerantes

Os resultados da pesquisa de coliformes totais no conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de óleo mineral e embalados e não embalados são apresentados na Tab. 17. Não foi observada em nenhuma amostra a presença de coliformes termotolerantes.

Não foi observada diferença ($p>0,05$) na contagem média de coliformes totais entre os quatro tratamentos utilizados e em nenhum dos 12 períodos de análise (Tab. 17). A contagem de coliformes totais variou de $< 1,0x10^0$UFC est. a $5,2x10^2$UFC durante todo o período de armazenamento. A contagem média de coliformes totais após um dia de armazenamento foi de $1,9x10^2$UFC e ao final do período de armazenamento foi de $2,3x10^2$UFC. Nos ovos armazenados durante 26 e 82 dias não foi encontrado coliformes totais ($<1,0x10^0$UFC est) em nenhuma amostra.

Durante os 124 dias de armazenamento, os ovos sem aplicação de óleo e sem embalagem, apesar de não significativo, apresentaram uma maior contagem média ($1,6x10^2$UFC) comparada aos outros tratamentos, enquanto os ovos sem aplicação de óleo e com embalagem apresentaram a menor contagem média ($7,7x10^1$UFC) de coliformes totais.

Tabela 17: Contagens médias (UFC/g) de coliformes totais no conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 124 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	Tratamento				Média
	SO e SE	SO e CE	CO e SE	CO e CE	
1	$1,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$
5	$5,2 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^0$	$1,8 \times 10^2$	$7,8 \times 10^1$	$2,0 \times 10^2$
12	$1,8 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$
19	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$	$3,1 \times 10^2$	$7,8 \times 10^1$
26	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$
40	$1,8 \times 10^2$	$5,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
54	$1,8 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^0$	$4,2 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^0$	$5,6 \times 10^1$
68	$8,8 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^0$	$1,8 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^0$	$6,8 \times 10^1$
82	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$
96	$3,4 \times 10^2$	$9,3 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^0$	$1,0 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
110	$1,4 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^0$	$2,2 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$
124	$1,9 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
Média	$1,6 \times 10^2$	$7,7 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem.

Os resultados das análises de coliformes totais e termotolerantes indicaram a presença de coliformes totais em 54 amostras (28,1%) das 192 amostras analisadas. Como a legislação brasileira não estabelece padrões para presença desse grupo de micro-organismos em ovo integral líquido e como não foi detectada a presença de coliformes termotolerantes, todos os ovos analisados se encontravam dentro do padrão microbiológico exigido para ovo integral líquido pelo Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1990).

Foi observado nas 54 amostras positivas que 10 amostras (18,5%) pertenciam a ovos sem aplicação de óleo e com embalagem, enquanto os ovos com óleo e sem embalagem apresentaram 18 amostras (33,4%) com presença de coliformes totais. Em 14 amostras (25,9%) dos ovos sem aplicação de óleo e sem embalagem foi observada a presença de coliformes totais e nos ovos com óleo e com embalagem, em 12 amostras (22,2%) foi detectado esse grupo de micro-organismos.

As bactérias que formam o grupo coliforme são bacilos Gram negativo, não esporulados, aeróbios ou aeróbios facultativos e que fermentam lactose em 48h. Em geral, os coliformes são representados por quatro gêneros da família Enterobacteriaceae: *Citrobacter, Enterobacter, Escherichia e Klebsiella* (Jay et al., 2005). Os coliformes totais têm como característica serem capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48h a 35ºC, enquanto os coliformes termotolerantes são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24h, a 44,5-45,5ºC. Este grupo inclui três gêneros, *Escherichia, Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo a cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* de origem não fecal.

A análise de coliformes totais é realizada para se ter uma indicação das condições higiênicas durante o processamento de alimentos, enquanto que a pesquisa de coliformes termotolerantes fornece a indicação de contaminação de origem fecal desses alimentos. Uma possível explicação para ausência de coliformes termotolerantes nos ovos analisados foi a utilização de ovos limpos e sem presença de fezes na casca, as boas condições de higiene na manipulação e das instalações da granja (galpões e salas de seleção e classificação) e o fato de os ovos não terem permanecido em contato com as aves, penas ou fezes.

Os trabalhos encontrados na literatura demonstram uma grande variação para os resultados de coliformes totais e termotolerantes. Tal fato ocorre, provavelmente, devido as diferentes origens dos ovos, como granjas mais tecnificadas e não-tecnificadas (ovos caipiras), supermercados e outros pontos de venda e também das condições higiênicas de como esses ovos foram coletados e armazenados até a realização das análises.

Semelhante ao observado neste trabalho, Cardoso et al. (2001) observaram a presença de coliformes totais em 33,3% das amostras, entretanto, esses autores também observaram a presença de termotolerantes em 8,33% das amostras de ovos analisadas. Figueiredo (2008) encontrou uma única amostra positiva (0,84%) para *Enterobacter* sp. em ovos após sete dias de armazenamento em temperatura ambiente. Andrade et al. (2004) encontraram *Escherichia coli* em 1,83% e *Enterobacter* spp. em 2,20% das amostras de ovos de várias granjas diferentes. Adesiyun et al. (2006), ao trabalhar com ovos coletados em granjas, supermercados e pequenos comércios, também observaram a presença de *Enterobacter* spp. em apenas 3,3%, *Klebsiella* spp. em 1,6% e *Citrobacter* spp. em 0,5% das amostras analisadas. Klein (2010) observou em ovos armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração que 29 amostras (20,14%) apresentaram resultados positivos para coliformes totais e que duas amostras (1,38%) foram positivas para coliformes termotolerantes.

4.3.5. Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis

Os resultados da pesquisa de micro-organismos mesófilos aeróbios no conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de

óleo mineral e embalados e não embalados são apresentados na Tab. 18.

A aplicação de óleo sobre as cascas dos ovos e a utilização ou não de embalagens não influenciou na qualidade microbiológica dos ovos através da utilização dos micro-organismos mesófilos como parâmetro, não sendo observada diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos utilizados em nenhum dos períodos de armazenamento (Tab. 18). Apesar de não significativo, os ovos sem óleo e sem embalagem apresentaram a contagem média mais baixa com $1,4x10^6$UFC, enquanto os ovos com óleo e com embalagem apresentaram contagem média mais alta com $2,8x10^6$UFC.

Tabela 18: Contagens médias (UFC/g) de micro-organismos mesófilos aeróbios no conteúdo interno de ovos, com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 124 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	Tratamento				Média
	SO e SE	SO e CE	CO e SE	CO e CE	
1	$4,5 x10^4$	$7,2 x 10^6$	$< 1,0 x 10^3$	$7,2 x 10^6$	$3,6 x 10^6$
5	$1,3 x10^4$	$2,2 x 10^3$	$1,0 x 10^5$	$3,5 x 10^5$	$1,2 x 10^5$
12	$5,5 x 10^3$	$2,8 x 10^6$	$4,0 x 10^5$	$2,7 x10^4$	$8,0 x 10^5$
19	$7,6 x 10^5$	$3,5 x10^4$	$3,1 x 10^6$	$2,4 x 10^6$	$1,6 x 10^6$
26	$1,5 x 10^3$	$6,2 x 10^6$	$2,2 x10^4$	$6,4 x 10^6$	$3,2 x 10^6$
40	$6,6 x 10^6$	$3,7 x 10^5$	$5,2 x 10^5$	$9,3 x 10^5$	$2,1 x 10^6$
54	$8,3 x 10^5$	$1,7 x10^4$	$6,2 x 10^6$	$1,8 x 10^5$	$1,8 x 10^6$
68	$5,8 x10^4$	$6,6 x 10^5$	$3,5 x 10^6$	$6,2 x 10^6$	$2,6 x 10^6$
82	$2,1 x 10^5$	$8,9 x 10^5$	$8,9 x 10^5$	$8,3 x 10^6$	$2,6 x 10^6$
96	$2,5 x 10^5$	$9,3 x10^4$	$2,5 x 10^6$	$5,0 x 10^2$	$7,1 x 10^5$
110	$7,5 x 10^6$	$1,1 x 10^7$	$6,2 x 10^6$	$2,2 x 10^5$	$6,2 x 10^6$
124	$4,4 x 10^5$	$3,0 x 10^5$	$9,3 x 10^5$	$1,4 x 10^6$	$7,6 x 10^5$
Média	$1,4 x 10^6$	$2,5 x 10^6$	$2,0 x 10^6$	$2,8 x 10^6$	

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem.

Imai (1981) também não observou diferença na qualidade microbiológica de ovos com e sem aplicação de óleo armazenados a 3ºC durante quatro meses e entre os ovos mantidos em temperatura ambiente por quatro semanas. Após os quatro meses sob refrigeração a contagem média variou de $1,8x10^3$ a $2,8x10^8$UFC em ovos com aplicação de óleo e de $2,2x10^3$ a $3,9x10^8$UFC em ovos sem aplicação de óleo.

Em 73 amostras (38%), do total de 192 amostras analisadas, apresentaram contagens de mesófilos acima dos padrões preconizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1990) para ovo integral líquido que estabelece contagem máxima de $5x10^4$UFC/g. Esse percentual é bastante elevado, principalmente se tratando de amostras de ovos produzidos em uma granja com produção de ovos destinados ao mercado externo. Os ovos utilizados no experimento também eram ovos limpos, sem presença de fezes na casca e não ficaram em contato com as poedeiras, penas, fezes ou superfícies sujas pelo fato de a coleta dos ovos ter sido realizada pouco tempo após a postura, ajudando a reduzir o tempo em que os ovos poderiam sofrer uma contaminação ambiental. Do total de amostras com contagens acima do permitido pela legislação, 16 amostras (21,9%) perteciam aos ovos sem aplicação de óleo mineral e sem utilização de

embalagem, 19 amostras (26,0%) aos ovos sem aplicação de óleo e com embalagem, 18 amostras (24,6%) aos ovos com aplicação de óleo e sem embalagem e 20 amostras (27,4%) aos ovos com aplicação de óleo e com embalagem.

Klein (2010) avaliando a qualidade microbiológica de ovos proveniente das três principais distribuidoras de ovos de Minas Gerais observou a presença de 90 amostras positivas (62,5%) para contagem de mesófilos aeróbios em um total de 144 amostras analisadas. Em 47,2% (68 amostras) foram observadas contagens acima do preconizado pela legislação ($5,0x10^4$UFC/g). Esse resultado é superior ao observado no presente experimento.

Durante os 125 dias de armazenamento, a contagem média de mesófilos variou entre $1,2x10^5$UFC no 5º dia e $6,2x10^6$UFC no 110ª dia. Assim, avaliando as contagens médias obtidas nos diferentes períodos de análises, em nenhum dos 12 períodos de armazenamento os ovos estariam dentro do padrão exigido pela legislação brasileira (Brasil, 1990).

A Tab. 18 apresenta os resultados médios das contagens das quatro repetições realizadas, o que ainda assim, resultou em médias de UFC bastante elevadas. Apesar das elevadas médias, do total de amostras realizadas, 58 amostras (30,2%) não apresentaram nenhuma contagem ($<1,0x10^3$UFC). Do mesmo modo, 50 amostras (26%) apresentaram contagens abaixo do intervalo de precisão e repetibilidade da metodologia aplicada (Petrifilm®), ou seja, abaixo de 25UFC (AOAC, 1990). Assim, a maior parte das amostras de ovos apresentou ausência ou baixas contagens, enquanto que as amostras que apresentaram resultados dentro do intervalo de precisão e repetibilidade da metodologia tiveram elevadas contagens, contribuindo para elevação da média e deixando a contagem acima do permitido pela legislação.

O percentual de amostras positivas (69,8%) para mesófilos encontrados neste trabalho foram superiores aos encontrados por outros autores. Adesiyun et al. (2006) observaram a presença de micro-organismos mesófilos em 34,8% dos ovos coletados em granjas e Figueiredo (2008) observou que 1,7% das amostras coletadas em uma única granja tinham a presença de bactérias mesófilas. Jones et al. (2004b) observaram uma contagem média de mesófilos em ovos armazenados por 10 semanas a 4ºC inferiores a 10UFC/mL, sendo que a maior contagem encontrada foi de $1,6 \times 10^4$UFC/mL na nona semana de armazenamento.

Jones e Musgrove (2007) analisaram ovos que seriam destinados a indústria e observaram que a contagem de micro-organismos aeróbios no conteúdo desses ovos variou de $2,0 \times 10^1$ a $8,0x10^2$UFC/mL, tendo como média $1,0x10^2$UFC/mL. Analisando amostras de ovos coletadas em uma indústria de processamento durante a etapa da quebra, Aragon-Alegro et al. (2005) observaram uma contagem de bactérias aeróbias mesófilas de até $2,4x10^5$UFC/g.

Avaliando a aplicação de óleo mineral e seu efeito na contagem de micro-organismos mesófilos, Torrico et al. (2010) não observaram a presença de micro-organismos mesófilos no conteúdo dos ovos após a postura e antes da aplicação de óleo e após cinco semanas de armazenamento a 25ºC, os ovos sem aplicação de óleo apresentaram contagem de 5UFC/g e os ovos com aplicação de óleo de 35UFC/g.

Trabalhos sobre a aplicação de óleo mineral e utilização de embalagem que avaliem seus efeitos na qualidade microbiológica de ovos são escassos na literatura, sendo necessária a realização de novas pesquisas.

A metodologia de pesquisa e contagem de micro-organismos mesófilos é utilizada para avaliação da presença de bactéria aeróbicas capazes de crescer a 36 ± 1ºC após 48h. Dentro deste amplo grupo de bactérias, estão incluídos os coliformes totais e termotolerantes. Como as análises de coliformes realizadas indicaram a presença de coliformes totais em 28,1% das amostras, é possível que o grande número de amostras com crescimento de mesófilos seja reflexo da presença de coliformes totais nos ovos. Como as contagens médias de coliformes totais variaram de $7{,}7x10^{1}$UFC a $1{,}6x10^{2}$UFC durante o período de armazenamento (Tab. 17) e, as contagens médias de micro-organismos mesófilos variaram de $1{,}4x10^{6}$ a $2{,}8x10^{6}$ (Tab. 18), possivelmente, um terço das bactérias mesófilas encontradas nos ovos pertecem ao grupo de coliformes totais.

Os micro-organismos mesófilos aeróbios incluem um grupo capaz de se multiplicar entre 20 e 45ºC, apresentando uma temperatura de crescimento ótima de 32ºC e, portanto, encontram na temperatura ambiente de países de clima tropical condições ótimas para o seu metabolismo (Franco e Landraf, 1996). Esse grupo de bactérias é importante, pois inclui a maioria das bactérias contaminantes de alimentos, tanto as deterioradoras como as patogênicas. As primeiras podem causar alterações organolépticas do produto e as outras podem causar danos à saúde do homem. Portanto, os micro-organismos mesófilos aeróbios são considerados um bom indicador de qualidade microbiológica, sendo a contagem microbiana em placas realizada para se avaliar as condições higiênicas pelas quais o produto foi processado. Entre eles estão alguns micro-organismos que podem ser encontrados nos ovos: como *Bacillus* spp., Enterobacteriaceae e *Streptococcus* spp. (Franco e Landraf, 1996; Jay et al., 2005).

4.3.6.Micro-organismos psicrotróficos

Os resultados da pesquisa de micro-organismos psicrotróficos no conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de óleo mineral e embalados e não embalados são apresentados na Tab. 19.

Tabela 19: Contagens médias (UFC/g) de micro-organismos psicrotróficos no conteúdo interno de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 124 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	Tratamento				Média
	SO e SE	SO e CE	CO e SE	CO e CE	
1	$5{,}5\ x10^{4}$	$6{,}7\ x10^{7}$	$< 1{,}0\ x\ 10^{3}$	$6{,}2\ x\ 10^{6}$	$3{,}2\ x10^{6}$
5	$6{,}0\ x\ 10^{3}$	$5{,}0\ x\ 10^{2}$	$5{,}0\ x\ 10^{2}$	$1{,}2\ x\ 10^{3}$	$2{,}0\ x\ 10^{3}$
12	$1{,}2\ x\ 10^{3}$	$1{,}6\ x\ 10^{6}$	$3{,}0\ x10^{4}$	$1{,}2\ x\ 10^{3}$	$4{,}1\ x\ 10^{6}$
19	$4{,}7\ x\ 10^{3}$	$4{,}0\ x10^{4}$	$7{,}5\ x10^{5}$	$8{,}0\ x10^{5}$	$4{,}0\ x\ 10^{5}$
26	$7{,}5\ x\ 10^{2}$	$6{,}2\ x\ 10^{6}$	$3{,}2\ x\ 10^{3}$	$1{,}3\ x10^{5}$	$1{,}6\ x\ 10^{6}$
40	$1{,}0\ x\ 10^{7}$	$3{,}1\ x\ 10^{6}$	$5{,}7\ x10^{5}$	$1{,}4\ x\ 10^{6}$	$3{,}8\ x\ 10^{6}$
54	$7{,}9\ x10^{5}$	$1{,}3\ x10^{4}$	$6{,}2\ x\ 10^{6}$	$5{,}0\ x10^{5}$	$1{,}9\ x\ 10^{6}$
68	$1{,}0\ x10^{5}$	$2{,}5\ x\ 10^{2}$	$8{,}5\ x10^{5}$	$6{,}2\ x\ 10^{6}$	$1{,}8\ x\ 10^{6}$
82	$1{,}6\ x10^{4}$	$9{,}3\ x10^{5}$	$9{,}8\ x10^{5}$	$1{,}9\ x\ 10^{7}$	$5{,}3\ x\ 10^{6}$
96	$2{,}6\ x10^{5}$	$< 1{,}0\ x\ 10^{3}$	$2{,}7\ x\ 10^{6}$	$5{,}0\ x\ 10^{2}$	$7{,}5\ x\ 10^{5}$
110	$6{,}9\ x10^{4}$	$1{,}0\ x\ 10^{6}$	$6{,}2\ x\ 10^{6}$	$2{,}4\ x10^{5}$	$1{,}9\ x\ 10^{6}$
124	$2{,}9\ x10^{5}$	$2{,}5\ x\ 10^{2}$	$1{,}0\ x\ 10^{6}$	$1{,}9\ x\ 10^{6}$	$7{,}9\ x\ 10^{5}$
Média	$9{,}9\ x10^{5}$	$1{,}6\ x\ 10^{6}$	$1{,}6\ x\ 10^{6}$	$3{,}0\ x\ 10^{6}$	

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem.

Semelhante aos resultados encontrados nas análises de micro-organismos mesófilos, a aplicação de óleo mineral sobre as cascas dos ovos e a utilização ou não de embalagens não influenciaram nas contagens de micro-organismos psicrotróficos, não sendo observada diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos utilizados em nenhum dos períodos de armazenamento (Tab. 19). Os ovos sem aplicação de óleo mineral e sem embalagem apresentaram contagem média de $9,9x10^5$UFC, enquanto os ovos com aplicação de óleo mineral e com embalagem apresentaram contagem igual $3,0x10^6$UFC. As amostras de ovos sem aplicação de óleo mineral e com embalagem e de ovos com aplicação de óleo mineral e sem embalagem apresentaram a mesma contagem média de $1,6x10^6$UFC. A menor contagem média entre os períodos de armazenamento avaliados foi observado no quinto dia com $2,0x10^3$UFC e a maior contagem média ao 82º dia com $5,3x10^6$UFC.

Imai (1981) observou a presença de bactérias Gram negativo, especialmente de bactérias psicotróficas como *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Acinetobacter* spp. e *Enterobacter* spp. em ovos estocados por quatro semanas em temperaturas ambiente. Nos ovos armazenados a 3ºC por quatro meses também foram observadas a presença das mesmas bactérias psicotróficas dos ovos armazenados em temperatura ambiente além de *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. e alguns cocos Gram positivo.

A Tab. 19 apresenta os resultados médios das contagens das quatro repetições realizadas, o que ainda assim, resultou em médias de UFC bastante elevadas. Apesar das elevadas médias, do total de amostras analisadas, 103 (53,6%) não apresentaram nenhuma contagem ($<1,0x10^3$UFC). Assim, mais da metade das amostras de ovos não apresentaram contagens, enquanto que as amostras que apresentaram resultados dentro do intervalo de precisão e repetibilidade da metodologia tiveram elevadas contagens, contribuindo para elevação da média.

Os micro-organismos psicrotróficos são aqueles capazes de crescer em temperaturas entre 0 e 7ºC produzindo colônias visíveis em um período de sete a 10 dias (Jay et al., 2005). Vários gêneros bacterianos isolados em ovos possuem espécies que conseguem crescer em temperatura igual ou inferior a 7ºC, como por exemplo: *Pseudomonas* spp., *Salmonela* spp., *Listeria* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp., e *Yersinia* spp. Algumas dessas bactérias, como as bactérias do gênero *Pseudomonas*, embora usualmente não sejam patogênicas via alimento, podem provocar toxinfecção alimentar quando presentes em número elevado. Elas também podem levar a deterioração dos ovos, com a alteração de cor e o aparecimento de pontos coloridos na gema e albúmen e até a desintegração da gema. Além de alterações na cor, alguns ovos podem apresentar mudanças no odor com o desenvolvimento de um odor pútrido (Silva et al., 1997; Jay et al., 2005). A legislação brasileira não estabelece padrões microbiológicos para micro-organismos psicrotróficos em ovos *in natura* e nem para os seus produtos que são armazenados sob refrigeração como é o caso do ovo integral refrigerado ou do ovo pasteurizado resfriado.

4.4. Aminas bioativas em gema e albúmen de ovos

As análises de aminas bioativas nas gemas e albumens de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento detectaram putrescina,

cadaverina, espermidina e espermina nas gemas dos ovos e putrescina, cadaverina e feniletilamina no albúmen em concentrações acima do limite de quantificação do método. Nas gemas dos ovos foram detectadas histamina e tiramina em algumas amostras, mas em concentrações abaixo dos limites de quantificação do método de 0,07 e 0,08mg/100g, respectivamente. No albúmen de algumas amostras também foram detectadas histamina, tiramina, espermidina e espermina em concentrações abaixo dos limites de quantificação de 0,07; 0,08; 0,09 e 0,1mg/100g, respectivamente. Não foram observadas diferenças ($p<0,05$) entre os tratamentos avaliados. A aplicação ou não de óleo mineral sobre a casca e utilização ou não de embalagem, bem como a associação de ambos os tratamentos não influenciaram na concentração de aminas presentes tanto na gema quanto no albúmen dos ovos, durante todo o período de armazenamento.

As concentrações médias de putrescina obtidas nas análises das gemas e albumens de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração podem ser observadas na Tab. 20.

Tabela 20: Médias dos teores de putrescina (mg/100g) na gema e albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	**Putrescina (mg/100g)/Tratamento**				**Média**
	SO e SE	**SO e CE**	**CO e SE**	**CO e CE**	
Gema					
1	0,238	0,120	0,180	0,122	**0,165**
6	0,120	0,116	0,083	0,140	**0,115**
13	0,112	0,079	0,105	0,130	**0,106**
20	0,096	0,080	0,145	0,145	**0,117**
27	0,109	0,103	0,128	0,139	**0,120**
55	0,146	0,092	0,094	0,070	**0,101**
83	0,062	0,070	0,122	0,097	**0,088**
125	0,113	0,117	0,068	0,113	**0,103**
Média	**0,125**	**0,097**	**0,116**	**0,120**	
Albúmen					
1	0,170	0,166	0,155	0,154	**0,161**
6	0,106	0,195	0,121	0,144	**0,142**
13	0,106	0,139	0,128	0,118	**0,123**
20	0,125	0,153	0,132	0,167	**0,144**
27	0,163	0,143	0,114	0,132	**0,138**
55	0,180	0,152	0,144	0,111	**0,147**
83	0,131	0,140	0,128	0,152	**0,138**
125	0,181	0,156	0,130	0,098	**0,141**
Média	**0,145**	**0,155**	**0,132**	**0,135**	

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem.

A concentração média de putrescina na gema durante todo o período de armazenamento variou de 0,062 a 0,238mg/100g. Em 90 amostras analisadas (93,7%), foram observados níveis de putrescina acima do limite de quantificação (0,07mg/100g) do método analítico. Em todas as amostras de albúmen analisadas

foram observados níveis de putrescina acima do limite de quantificação (0,07mg/100g) do método. A concentração média de putrescina no albúmen durante todo o período de armazenamento variou de 0,123mg/100g no 13º dia de armazenamento a 0,161mg/100g após um dia de armazenamento. Em todos os períodos de análise, as concentrações médias de putrescina no albúmen apresentaram resultados ligeiramente superiores à concentração de putrescina na gema, exceto nos ovos analisados com um dia de armazenamento.

A principal via de formação de aminas nos alimentos é pela reação de descarboxilação conduzidas por descarboxilases bacterianas. Segundo Kalac e Krausová (2005), em alimentos de origem animal, o conteúdo de aminas, como a putrescina, aumenta devido à atividade bacteriana durante o seu processamento e armazenamento inadequado. Deste modo, as boas condições de armazenamento durante a realização do experimento pode ter contribuído para evitar o aumento dos níveis de putrescina na gema e albúmen.

Os resultados das análises de cadaverina e suas concentrações médias nas gemas e albumens de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento podem ser observados na Tab. 21.

Tabela 21. Médias dos teores de cadaverina (mg/100g) na gema e albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	**Cadaverina (mg/100g)/Tratamento**				**Média**
	SO e SE	**SO e CE**	**CO e SE**	**CO e CE**	
Gema					
1	0,250	0,156	0,620	0,179	**0,301**
6	0,727	0,067	0,064	0,415	**0,319**
13	0,098	0,183	0,343	0,377	**0,250**
20	0,346	0,120	0,307	0,276	**0,263**
27	0,369	0,379	0,196	0,072	**0,254**
55	0,683	0,209	0,270	0,144	**0,327**
83	0,041	0,339	0,106	0,593	**0,269**
125	0,159	nd	0,216	0,223	**0,150**
Média	**0,334**	**0,182**	**0,265**	**0,285**	
Albúmen					
1	0,185	0,175	0,283	0,197	**0,210**
6	0,177	0,204	0,157	0,210	**0,187**
13	0,173	0,157	0,162	0,144	**0,159**
20	0,158	0,223	0,204	0,199	**0,196**
27	0,158	0,203	0,211	0,266	**0,210**
55	0,220	0,198	0,188	0,156	**0,190**
83	0,116	0,165	0,147	0,281	**0,177**
125	0,146	0,181	0,209	0,150	**0,171**
Média	**0,167**	**0,188**	**0,195**	**0,200**	

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem; nd=não detectado.

A presença dessa amina foi detectada em 81 amostras (84,4%) de gema, e destas, 65 amostras (67,7%) apresentavam concentração acima do limite de

quantificação do método (0,1mg/100g de gema). Nas gemas dos ovos sem aplicação de óleo mineral e com utilização de embalagem não foi encontrada cadaverina aos 125 dias de armazenamento. Entre as quatro aminas detectadas na gema, a cadaverina foi a amina que apresentou concentrações médias mais altas durante o período de armazenamento, atingindo o valor de 0,327mg/100g de cadaverina aos 55 dias de armazenamento. Em apenas três amostras (3,1%) de albúmen, do total de 96 amostras analisadas, não foi detectada cadaverina e nas 93 amostras (96,9%) restantes, todas apresentavam teores de cadaverina acima do limite de quantificação (0,08mg/100g de albúmen). Ao longo do período de armazenamento, a concentração média de cadaverina no albúmen variou de 0,159mg/100g no 13º dia de armazenamento a 0,210mg/100g com um e 27 dias de armazenamento. A concentração média de cadaverina no albúmen durante o armazenamento apresentou resultados ligeiramente mais baixos que os encontrados na gema em todos os períodos de análise.

A presença de putrescina e cadaverina na gema e albúmen poderia indicar início de deterioração, visto que estas são aminas biogênicas. Entretanto, estas aminas foram observadas no início do experimento, em ovos frescos e não ocorreu alteração significativa em suas concentrações durante o armazenamento. Segundo Glória (2005), a presença de cadaverina em amostras deterioradas poderia indicar contaminação por enterobactérias, pois elas são capazes de descarboxilar a lisina. Entretanto, as análises de correlação indicaram ausência de correlação entre os teores de cadaverina presente na gema e albúmen com as contagens de coliformes totais dos conteúdos dos ovos (Tab.17).

Embora ainda não tenham sido definidos os níveis tóxicos para putrescina e cadaverina em alimentos, alguns efeitos farmacológicos como hipotensão, bradicardia, contração exagerada dos músculos da mandíbula e paralisia das extremidades são observados com a ingestão dessas aminas. Além disso, a putrescina e a cadaverina podem potencializar a toxicidade de outras aminas, como histamina e tiramina (Shalaby, 1996).

Diferentemente do presente trabalho, Lima et al. (2006) não detectaram putrescina na gema e albúmen de ovos comercializados em supermercados. Figueiredo (2008) também não observou a presença de putrescina e cadaverina na gema e albúmen de ovos armazenados durante 28 dias sob refrigeração. Cipolla et al. (2007) observaram níveis de 0,384mg/100g de putrescina na gema e 0,0088mg/100g de putrescina no albúmen.

Nishimura et al. (2006) encontraram cadaverina na gema de ovos, porém em concentrações mais altas (2,66mg/100g) do que as observadas neste experimento. Na gema, ainda foi encontrado 0,088mg/100g de putrescina, enquanto no albúmen foi encontrado apenas 0,02mg/100g de cadaverina.

Uma menor concentração de putrescina na gema (0,017mg/100g) foi observada por Oliveira et al. (2009) durante os 50 dias de armazenamento de ovos sob refrigeração. Ao contrário do presente trabalho que encontrou putrescina em todos os períodos avaliados, estes autores encontraram esta amina apenas aos 40 dias de armazenamento.

Ramos et al. (2009) observaram diminuição na concentração de putrescina e cadaverina na gema de ovos durante os 26 dias de armazenamento sob refrigeração. A concentração de putrescina diminuiu de 1,41 para 0,074mg/100g, enquanto a cadaverina diminuiu de 1,08 para 0,73mg/100g. Segundo estes autores, essa redução pode ter ocorrido devido ao

aumento de peso da gema decorrente da passagem de água do albúmen para a gema durante o armazenamento; à migração dessas aminas para o albúmen e outras modificações químicas.

As concentrações médias de feniletilamina no albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração podem ser observados na Tab. 22.

Os albumens dos ovos com aplicação de óleo e sem embalagem foram os únicos que apresentaram feniletilamina em concentrações acima do limite de quantificação em todos os períodos de análise. Apesar de ter sido detectada, não foi possível quantificar a feniletilamina aos 27 e 125 dias de armazenamento no albúmen de ovos sem aplicação de óleo e sem embalagem; 27 e 83 dias de armazenamento em ovos sem aplicação de óleo e com embalagem e seis e 83 dias de armazenamento em ovos com aplicação de óleo e com embalagem.

Tabela 22: Médias dos teores de feniletilamina (mg/100g) no albúmen de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	**Feniletilamina (mg/100g)/Tratamento**				**Média**
	SO e SE	**SO e CE**	**CO e SE**	**CO e CE**	
1	0,257	0,136	0,134	0,115	**0,161**
6	0,152	0,159	0,205	tr	**0,129**
13	0,115	0,115	0,110	0,112	**0,113**
20	0,134	0,118	0,139	0,117	**0,127**
27	tr	tr	0,126	0,114	**0,060**
55	0,154	0,165	0,111	0,118	**0,137**
83	0,122	tr	0,124	tr	**0,062**
125	tr	0,114	0,171	0,165	**0,112**
Média	**0,117**	**0,101**	**0,140**	**0,093**	

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem; nd = não detectado; tr = traços.

Ao longo do período de armazenamento, a concentração média de feniletilamina variou de 0,060 a 0,161mg/100g aos 27 dias e após um dia de armazenamento, respectivamente. Esses valores são mais baixos do que os relatados por Figueiredo (2008) que observou após 28 dias de armazenamento, concentrações médias de feniletilamina de 4,18 e 3,42mg/100g em albumens de ovos de poedeiras de 30 e 60 semanas, respectivamente. Esse autor também não observou um aumento linear da concentração de feniletilamina durante 28 dias de armazenamento, entretanto, as maiores concentrações foram observadas ao término do período de armazenamento.

A feniletilamina é uma amina biogênica que poderia indicar início de deterioração do albúmen dos ovos, entretanto, semelhante ao ocorrido com a putrescina e cadaverina, sua presença foi observada em ovos após um dia de postura e não ocorreu alteração significativa em suas concentrações durante o armazenamento.

A concentração mais alta de feniletilamina observada foi de 0,257mg/100g, entretanto, esse valor é muito inferior a concentração considerada tóxica ao homem. Segundo Brink et al. (1990) a ingestão de alimentos com concentrações de feniletilamina superiores a 3,0mg/100g podem ser potencialmente perigosos para a saúde

humana. O aumento da pressão arterial e enxaqueca são sintomas que podem ser observados em indivíduos com intoxicação por feniletilamina (Shalaby, 1996; Santos et al., 2003).

A presença de aminas biogênicas nas gemas e albumens analisados pode ser explicada pela presença de bactérias no conteúdo dos ovos. Estudos indicam que inúmeras bactérias são produtoras de aminas, principalmente representantes da família Enterobacteriaceae, particularmente os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus* ao lado de espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Streptococcus* (Langoni et al., 1995; Lima e Glória, 1999; Andrade et al., 2004; Musgrove et al., 2004; Adesiyun et al., 2006; Jones e Musgrove, 2007; Musgrove et al., 2008).

Semelhante ao observado nos resultados das análises de micro-organismos mesófilos (Tab. 18), psicotróficos (Tab. 19) e coliformes totais (Tab. 17) em que não ocorreu aumento das contagens desses micro-organismos durante o período de armazenamento, também não foi observado aumento da concentração de nenhumas das aminas biogênicas encontradas nas gemas e albumens dos ovos durante o armazenamento.

Apesar dos resultados microbiológicos apresentarem elevadas contagens, sobretudo de microorganismos psicotróficos e de mesófilos aeróbios, a temperatura de refrigeração (5,1ºC) utilizada durante o armazenamento dos ovos pode ser um motivo para a baixa concentração de cadaverina, putrescina e feniletilamina observadas nas gemas e albumens dos ovos analisados. Rokka et al. (2004) não observaram a formação de putrescina e cadaverina em cortes de frangos quando armazenados em temperatura abaixo de 6,1ºC, temperatura esta, que também prejudicou o crescimento de Enterobacteriaceae e microorganismos proteolíticos. Em temperatura abaixo de 6,1ºC houve formação de tiramina, mas em uma taxa mais lenta do que em temperaturas acima de 6,1ºC. Segundo Halász et al. (1994), a *Enterobacter cloacae* não produziu putrescina quando incubada a 10ºC e *Klebsiella* sp. também apresentou uma menor produção de cadaverina a 10ºC do que a 20ºC.

Outro fator que pode ter influenciado na formação de putrescina, cadaverina e feniletilamina no albúmen, resultando em baixas concentrações e impedindo seu aumento ao longo do armazenamento é o pH do albúmen. Desde o primeiro dia de análise, os valores de pH observados no albúmen (Tab. 13), apresentaram valores superiores ao pH ótimo para ocorrência da descarboxilação de aminoácidos que varia entre 2,5 a 6,5. Além disso, o crescimento de bactérias em meio ácido estimula a síntese das enzimas descarboxilases (Hudson-Arnold e Duane-Brown, 1978, Coutts et al., 1986).

A concentração média de espermidina nas gemas de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados podem ser observados na Tab. 23.

Foi detectada espermidina em 65 amostras (68%), entretanto, em apenas 23 amostras (24%) a concentração dessa amina estava acima do limite de quantificação de 0,07mg/100g. A espermidina apresentou baixas concentrações médias ao longo do período de armazenamento, variando de 0,007 a 0,074mg/100g de gema.

Tabela 23: Médias dos teores de espermidina (mg/100g) na gema de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	Espermidina (mg/100g)/Tratamento				Média
	SO e SE	SO e CE	CO e SE	CO e CE	
1	0,180	0,071	0,047	nd	**0,074**
6	0,073	tr	0,026	tr	**0,025**
13	tr	0,068	0,028	0,036	**0,033**
20	0,026	nd	0,110	0,029	**0,041**
27	0,088	tr	tr	nd	**0,022**
55	0,027	tr	tr	tr	**0,007**
83	tr	tr	0,073	nd	**0,018**
125	0,081	nd	nd	nd	**0,020**
Média	**0,059**	**0,017**	**0,035**	**0,008**	

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem. nd = não detectado; tr = traços.

As concentrações médias de espermina obtida nas análises das gemas de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração podem ser observados na Tab. 24.

Tabela 24. Médias dos teores de espermina (mg/100g) na gema de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e embalados e não embalados durante 125 dias de armazenamento sob refrigeração

Dias de armazenamento	Espermina (mg/100g)/Tratamento				Média
	SO e SE	SO e CE	CO e SE	CO e CE	
1	0,110	tr	tr	0,185	**0,074**
6	0,247	0,097	0,289	nd	**0,158**
13	nd	nd	nd	nd	**0,000**
20	0,073	0,281	tr	nd	**0,088**
27	nd	nd	0,116	0,092	**0,052**
55	0,086	0,214	0,080	nd	**0,095**
83	nd	nd	nd	nd	**0,000**
125	nd	nd	nd	tr	**0,000**
Média	**0,064**	**0,074**	**0,061**	**0,035**	

SO e SE: sem óleo e sem embalagem; SO e CE: sem óleo e com embalagem; CO e SE: com óleo e sem embalagem; CO e CE: com óleo e com embalagem; nd = não detectado; tr = traços.

A espermina foi detectada em 34 amostras (35,4%), e destas, apenas 17 amostras (17,7%) apresentaram concentração acima do limite de quantificação de 0,1mg/100g. A concentração média máxima de espermina observada foi após seis dias de armazenamento com 0,158mg/100g, enquanto que aos 13, 83 e 125 dias de armazenamento esta amina não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas

Em nenhuma amostra de albúmen analisada foi observada espermidina ou espermina acima do limite de quantificação de 0,09 e 0,1mg/100g, respectivamente. A ausência dessas aminas no albúmen de ovos também foi observada por outros autores como Nishimura et al. (2006), Cipolla et al. (2007), Figueiredo (2008), Oliveira et al. (2009). A ausência de espermidina e espermina na gema de ovos foi relatada por Cipolla et al. (2007) e Ramos et al. (2009).

Lima et al. (2006), analisando a gema de ovos comercializados em supermercados, também observaram baixas concentrações de espermina (0,076mg/100g) e de espermidina (0,032mg/100g). No albúmen foram encontradas espermidina e espermina nas concentrações de 0,054mg/100g e 0,093mg/100g, respectivamente.

Ao analisar gema de ovos, Nishimura et al. (2006) não observaram espermina, mas encontraram espermidina em concentrações de 0,058mg/100g. Figueiredo (2008) também não observou espermina na gema de ovos, mas encontrou espermidina na concentração de 0,125mg/100g após 28 dias de armazenamento sob refrigeração.

Oliveira et al. (2009) observaram um aumento na concentração de espermidina na gema de ovos armazenados durante 40 dias sob refrigeração de 0,049 para 0,177mg/100g e após esse período, observaram uma redução para 0,027mg/100g aos 50 dias de armazenamento. Não foi observada a presença de espermina na gema dos ovos armazenados sob refrigeração, apenas em ovos mantidos em temperatura ambiente aos 30 dias de armazenamento em uma concentração de 0,199mg/100g de gema.

As aminas naturais espermina e espermidina, além de serem disponibilizadas através da ingestão de alimentos, também são formadas *in situ* nas células à medida que são requeridas (Shalaby, 1996; Lima e Glória, 1999). Entre suas funções biológicas estão a participação no crescimento e proliferação celular através da regulação da função de ácidos nucléicos e síntese de proteínas. Deste modo, essas aminas participam do processo de crescimento normal do organismo e um aumento de sua ingestão na dieta parece ser favorável na recuperação de pacientes no pós-operatório ou durante a cicatrização de feridas (Kalac, 2006). Entretanto, um acúmulo exagerado dessas aminas induz apoptose e transformação celular, podendo estar envolvidas no processo de desenvolvimento dos tumores (Bardócz, 1995; Kalac e Krausová, 2005; Moinard et al., 2005).

Baseado nos resultados observados neste experimento, não é possível estabelecer um critério de qualidade de ovos levando em consideração a presença ou quantidade de aminas bioativas na gema e albúmen de ovos. Apesar do longo período de armazenamento, os níveis de aminas encontrados nas gemas e albumens dos ovos foram baixos, não representando risco para saúde do homem.

4.4.1. Correlação entre aminas bioativas, resultados físico-químicos e microbiológicos

As análises de correlação entre as aminas bioativas encontradas nas gemas e albumens e a presença de micro-organismos mesófilos, psicotróficos e coliformes totais no conteúdo interno dos ovos, identificou apenas uma correlação positiva, porém baixa, entre a cadaverina presente na gema e micro-organismos mesófilos (Tab. 25). Deste modo, a presença dessas bactérias e, consequentemente, a produção de descarboxilases devem ter influenciado no processo de descarboxilação da lisina, levando a formação de cadaverina na gema.

A ausência de correlação entre as aminas biogênicas encontradas nos conteúdos dos ovos e os resultados das análises microbiológicas pode ser devido às baixas concentrações de aminas observadas nas gemas e albumens de ovos.

Tabela 25: Correlação entre níveis de aminas, micro-organismos mesófilos e pH do albúmen de ovos armazenados sob refrigeração por 125 dias

	CadG	CadA	PutA	PutG
M. mesófilos	0,20			
pH		- 0,20*	- 0,17*	-0,32

PutG = putrescina na gema; CadG = cadaverina na gema; PutA = putrescina no albúmen; CadA = cadaverina no albúmen; M.= micro-organismos. Correlação de Spearman para $p \leq 0,05$; *Correlação de Pearson para $p \leq 0,05$.

A putrescina presente na gema e a putrescina e cadaverina presente no albúmen apresentaram uma correlação negativa, embora fraca, com o pH do albúmen (Tab. 13). Este tipo de correlação era esperado, pois o pH ácido em alimentos, diferente dos valores de pH do albúmen encontrados nos ovos, é um fator fundamental na formação de aminas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A aplicação de óleo mineral sobre a casca dos ovos influenciou na qualidade físico-química do conteúdo interno dos ovos armazenados sob refrigeração;
- A utilização da embalagem não influenciou nos valores de UH;
- A embalagem quando utilizada em associação com a aplicação de óleo mineral sobre a casca de ovos resultou em valores de pH do albúmen mais baixos.
- A aplicação de óleo mineral sobre a casca e a utilização de embalagem não influenciaram na qualidade microbiológica dos ovos.
- Não foi observada a presença de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, coliformes termotolerantes e bolores e leveduras no conteúdo interno dos ovos.
- Os ovos apresentaram elevadas contagens de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos.
- Foram observadas contagens de micro-organismos mesófilos acima do permitido pela legislação brasileira.
- Foram detectadas e quantificadas em baixas concentrações: putrescina, cadaverina, espermidina e espermina nas gemas e putrescina, cadaverina e feniletilamina no albúmen de ovos refrigerados.
- O método analítico utilizado apresentou boa linearidade, seletividade e precisão e limites de detecção e quantificação adequados para determinação de feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermina e espermidina em amostras de gema e albúmen de ovos.

6. CONCLUSÃO

O armazenamento dos ovos sob refrigeração em associação com a aplicação de óleo mineral sobre a casca auxiliam na manutenção da qualidade físico-química dos ovos, mesmo após prolongado período de armazenamento. A qualidade microbiológica não é influenciada pela utilização de embalagens e/ou aplicação de óleo mineral sobre as cascas dos ovos. Assim, a utilização desse tipo de embalagem com propósito de preservar a qualidade interna dos ovos não é aconselhada por implicar em aumento do custo de produção.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por pareamento de íons em coluna de fase reversa e quantificadas

por detecção ultravioleta (UV) após derivação pré-coluna com cloreto de dansila foi validado, sendo adequado sua utilização para determinação de aminas bioativas em gemas e albumens de ovos.

Os níveis de aminas presentes na gema e albúmen são baixos, não oferecendo riscos a saúde dos consumidores. Não é possível estabelecer um critério de qualidade de ovos levando em consideração a presença ou quantidade de aminas bioativas na gema e albúmen de ovos armazendos sob refrigeração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESIYUN, A.; OFFIAH, N.; SEEPERSADSINGH, N.; RODRIGO, S.; LASHLEY, V.; MUSAI, L. Frequency and antimicrobial resistance of enteric bacteria with spoilage potential isolated from table eggs. *Food Res. Int.*, v. 39, p. 212–219, 2006.

AHLBORN, G.; SHELDON, B. W. Enzymatic and microbiological inhibitory activity in eggshell membranes as influenced by layer strains and age and storage variables. *Poult. Sci.*, v. 84, p. 1935–1941, 2005.

AHN, D. U.; KIM, S. M.; SHU, H. Effect of egg size and strain and age of hens on the solids content of chicken eggs. *Poult. Sci.*, v. 76, p. 914-919, 1997.

ALLEONI, A. C. C.; ANTUNES, A. J. Unidade Haugh como medida da qualidade de ovos de galinha armazenados sob refrigeração. *Sci. Agric., v*. 58, n. 4, p. 681-685, 2001.

ALLEONI, A. A. C.; ANTUNES, A. J. Internal quality of eggs coated with whey protein concentrate. *Sci. Agríc.***,** v.61, n.3, p.276-280, 2004.

ALLEONI, A. C. C.; ANTUNES, A. J. Albumen foam stability and s-ovalbumin contents in eggs coated with whey protein concentrate. *Rev. Bras. Ciênc. Avíc.*, v.6, n.2, p.105-110, 2004b.

ALLEONI, A. C. C.; ANTUNES, A. J. Perfil de textura e umidade espremível de géis do albume de ovos recobertos com soro de leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 25, n.1, 153-157, 2005.

ALLEONI, A. C. C. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Sci. Agric.*, v. 63, n. 3, p. 291-298, 2006.

ANDRADE, M. A.; CAFÉ, M. B.; JAYME. V. S.; ROCHA, P. T.; LEANDRO, N. S. M.; STRINGHINI, J. H. Avaliação da qualidade bacteriológica de ovos de galinha comercializados em Goiana, Goiás, Brasil. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 5, n. 4, p. 221- 228, 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos*. Brasília, 2001.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Brasília, 2003.

AOAC Official Method. Aerobic count plate, dry rehydratable film Petrifilm^{tm} aerobic plate method. *J. AOAC Int.*, v. 83, p.635, 1990.

AOAC Official Method 2002.11. Detection and quantification of yeast and molds in foods - Simplate Yeast and Mold Color Indicator (Y&M - CI). *J. AOAC Int.*, v. 86, n. 2, 2003.

AOAC Official Method 2005.03. Detection and confirmed quantitation of coliforms and

E.coli in foods - Simplate Coliform and E.coli Color Indicator. *J. AOAC Int.*, v.88, p.1318, 2005a.

AOAC Official Method. *Salmonella in Foods*, Enzyme-linked immunofluorescent assay screening method (VIDAS *Salmonella* [SLM] Assay (bioMerieux Vitek, SA, 595 Anglum Drive, Hazelwood, MO 63042, USA). 18th Ed., Chapter 17, 17.9.14A, p. 139-141, 2005b.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; SOUZA, K. L. O.; SOBRINHO, P. S. C.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. Avaliação da qualidade microbiológica de ovo integral pasteurizado produzido com e sem a etapa de lavagem no processamento. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, v. 25, n. 3, p. 618-622, 2005.

BACURAU, L. G.; ZAPAT, J. F. F.; FUENTES, M. F. F.; BARROSO, M. A. T.; SALES, M. G. Preservação de ovos de galinha por tratamento superficial da casca. *Pesq. Agropec. Bras*., v.29, n.4, p. 643-651, 1994.

BARBOSA, N. A. A.; SAKOMURA, N. K.; MENDONÇA, M. O.; FREITAS, E. R.; FERNANDES, J. B. K. Qualidade de ovos comerciais provenientes de poedeiras comerciais armazenados sob diferentes tempos e condições de ambientes. *ARS Veterinaria*, v.24, n.2, p.127-133, 2008.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 6, p. 341-346, 1995.

BARDOCZ, S; DUGUID, T. J; BROWN, D. S.; GRANT, G. PUSZTAI, A.; WHITE, A.; RALPH, A. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Brit. J. Nutrit.*, v.73, p.819-828, 1995.

BARROS, M. R.; ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; SAMPAIO, H. M.; CROCCI, A. J. Sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos contaminados artificialmente, após desinfecção e armazenados em diferentes temperaturas. *Rev. Bras. Cienc. Avic*., v. 3, n. 3, p. 219-223, 2001.

BARTELS, A. S.; ANDRADE, A. D.; NEUMANN, E.; SILVA, A. M. Identificação de portadores de *Staphylococcus* enterotoxigênicos e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n. 6, p. 1450-1453, 2009.

BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frango e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. *Ciênc. Rural*, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2001.

BILADEAU, A. M.; KEENER, K. M. The effects of edible coatings on chicken egg quality under refrigerated storage. *Poult. Sci.*, v. 88, p. 1266-1274, 2009.

BOARD, R. G.; AYRES, J. C.; KRAFT, A. A.; FORYTHE, R. H. The microbiological contamination of eggs shells and egg packing materials. *Poult. Sci.*, v. 41, p. 584-595, 1964.

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. *J. Food Protect.*, v. 53, p. 1033-1036, 1990.

BRAKE, J.; WALSH, T. J. C.; BENTON, E. JR.; PETITTE, J. N.; MEIJERHOF, R.; PENALVA, G. Egg handling and storage. *Poult. Sci.*, v. 76, p. 144–151, 1997.

BRANT, A. W.; OTTE, A. W.; NORRIS, K. H. Recommend standards for scoring

and measuring opened egg quality. *Food Technol.*, v.5, p. 356-361, 1951.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Portaria nº 01 de 21 de fevereiro de 1990. Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados*. Brasília, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, e alterações.* DOU. Brasília atualizado em 1997. Disponível em: <www.agricultura.gov.br.> Acesso em: 23 de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.* Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Instrução Normativa nº 25, de 2 de junho de 2011. Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Pescado e seus Derivados*. Brasília, 2011.

BRINK, B. T.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H. M. L. J.; VELD, J. H. J. H. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 11, p. 73-84, 1990.

BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. J.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129-146, 2003.

CAMPOS, E. J., MELLOR, D. B., GARDNER, A. G. Efeito do tipo de embalagem e da temperatura de armazenamento sobre a qualidade interna de ovos de consumo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.25, n.3, p. 211-219, 1973.

CAMPOS, E. J.; BRANT, P. C. O emprego do rodofilme como método de preservação da qualidade de ovos de consumo. *Arq. Esc. Vet. UFMG*. v.17, p. 131-136, 1965.

CANER, C. Whey protein isolate coating and concentration effects on egg shelf life. *J. Sci. Food Agric.*, v.85, p.2143-2148, 2005.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, N. A. M. I.; GAMA, M. S. Q. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de Descalvado. *Arq. Instit. Biol., São Paulo,* v. 68, n. 1, p. 19-22, 2001.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; STOPPA, G. F. Z.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A. M. I.; LUCIANO, R. L. Pesquisa de *Salmonella* spp. em ovos comerciais. *Rev. Hig. Alim.*, v.21, n.156, p.115-119, 2007.

CARVALHO, F. B.; STRINGHINI, H. J.; JARDIM FILHO, R. M.; LEANDRO, N. S. M.; PÁDUA, J. T.; DEUS, H. A. S. B. *Influência da conservação e do período de armazenamento sobre a qualidade interna e da casca de ovos comerciais*. 2002. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/cet/2/08/index.shtm.> Acesso em: 14/09/2006.

CARVALHO, J. C. A. P.; MANO, S.; CUNHA, F. L.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Pesquisa de *Salmonella enteritidis* em ovos em casca**.** *R. Bras. Ciênc. Vet.*, v. 13, n. 2, p. 106-108, 2006.

CARVALHO, F. B.; STRINGHINI, J. H.; JARDIM FILHO, R. M.; LEANDRO, N. S. M.; CAFÉ, M. B.; DEUS, H. A. S. B. Qualidade interna e da casca para ovos de

poedeiras comerciais de diferentes linhagens e idades. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 8, n. 1, p. 25-29, 2007.

CHEN, H.; ANANTHESWARAN, R. C.; KNABEL, S. J. Effect of rapid cooling on the growth and penetration of *Salmonella enteritidis* into egg contents. *J. Food Safety*, v.22, p. 255-271, 2002.

CIPOLLA, B. G; HAVOUIS, R.; MOULINOUX, J. P. Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. *Amino Acids*. v. 33, p.203–212, 2007.

CODEX ALIMENTARIUS, *Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals***.** CAC/GL 71-2009, p.38, 2009.

COUTTS, R. T.; BAKER, G. B.; PASUTTO, F. M. Foodstuffs as sources of psychoactive amines and their precursors: Content, significance and identification. *Adv. Drug Res*. v. 15, p.169 - 231, 1986.

COTTERILL, O. J.; GARDNER, F. Retarding thick white deterioration by holding shell eggs in sealed containers. *Poult. Sci.*, v.36, p.196-206, 1957.

DAVIS, B. H.; STEPHENSON, H. P. Egg quality under tropical conditions in north Queensland. *Food Austral*, v. 43, p. 496-499, 1991.

DAVIS, B. H.; BRUNSON, C. C. Relative effectiveness of oil and cellophane in protecting eggs. *Poult. Sci.*, v.41, p.1314-1317, 1962.

DE RÉU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W.; HEYNDRICKX, M.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; HERMAN, L. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *Int. J. Food Microbiol*., v.112, p.253-260, 2006.

DOYLE, M. P. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 47, n. 3, p. 533-536, 1984.

DUFLOS, G.; DERVIN, C.; MALLE, P.; BOUQUELET, S. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). *J. AOAC Int*., v. 82, p.1097-1101, 1999.

EC - COMISSÃO das Comunidades Européias. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Directiva 2002/657/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Européias*, L 221, p. 8-36, 2002. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2002/l_221/l_22120020817pt00080036.pdf>. Acesso em 10 de janeiro de 2010.

EISEN, E. J.; BOHREN, B. B.; MCKEAM, H. E. The Haugh unit as a measure of egg albumen quality. *Poult. Sci.*, v. 41, p. 1461-1468, 1962.

ENGLERT, S. *Avicultura. Tudo sobre raças, manejo e alimentação***.** Guaíba: Agropecuária, 7ª ed. 238p. 1998.

ESSEIN, A. I. Egg quality traits and their interrelationships as affected by storage method and duration of storage in humid wet climate. *Beitr. Trop. Landwirtsch Vet. Med.*, v. 28, n. 3, p. 345-353, 1990.

EURACHEM. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods.A Laboratory Guide to Method Validation*. Teddington: LGC, 1998, 62p.

FAO. *Egg marketing - A guide for the production and sale of eggs*. FAO Agricultural Services, Bulletin 150, 2003.

FERNANDES, E. A.; GUARATO, E. L.; MURAKAMI, A. E. Efeito da temperatura e do período de armazenamento sobre a qualidade interna de ovos de consumo. *Inf. Agropec. Belo Horizonte*, v.9, n.107, p. 58-61, 1983.

FIGUEIREDO, T. C. *Características físico-química e microbiológica e aminas bioativas em ovos de consumo.* 2008. 91f**.** Dissertação (Mestrado Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FIGUEIREDO, T. C.; CANÇADO, S. V.; VIEGAS, R. P.; RÊGO, I. O. P.; LARA, L. J. C.; SOUZA, M. R.; BAIÃO, N. C. Qualidade de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.3, p.712-720, 2011.

FRAGA, M. E.; CURVELLO, F. A.; ROSA, C. A. R. Isolamento de fungos de ovos tipo comercial. *Rev. Bras. Med. Vet*., v.29, n.1, p.37-38, 2007.

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

GAST, R. K; BEARD, C. W. Detection and enumeration of *Salmonella enteritidis* in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. *J. Food Protect.*, v. 55, p. 152-156, 1992.

GLÓRIA, M. B. A. Amines. In: HUI, H.; NOLLET, L. L. *Handbook of Food Science*. New York: Marcel Dekker, 2005. Cap.13. 38p.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 5, p. 42-49, 1994.

HEIMAN, V.; CARVER, J. F. The albumen index as a physical measurement of observed egg quality. *Poult. Sci.*, v. 15, p. 141-148, 1936.

HINCKE, M. T.; GAUTRON, J.; PANHELEUX, M.; GARCIA-RUIZ, J.; MCKEE, M. D. Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. *Matrix Biology*, v. 19. p. 443-453, 2000.

HOLTS, W. F.; ALQUIMIST, H. J. Measurement of deterioration in the stored hen's egg. *U. S. Egg Poult. Magazine*, v. 33, p. 70, 1932.

HUDSON-ARNOLD, S.; DUANE-BROWN, W. *Advanced Food Research*. London: Academic Press, v. 24, p. 113, 1978.

HUMPHREY, T. J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 21, p. 31-40, 1994.

HUMPHREY, T. J. Growth of salmonellas in intact shell eggs: Influence of storage temperature. *Vet. Rec*., v.126, p.292, 1990.

ICH, International Conference on Harmonization.*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. 2005. Disponível em: <http://www.ich.org.> Acesso em: 05 de dezembro de 2011.

IMAI, C. Effect of coating eggs on storage stability. *Poult. Sci*., v.60, p. 2053-2061, 1981.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos***.** DOQ-

CGCRE-008. Revisão: 01, Março/2003, p.35, 2003.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2010. *Orientações sobre validação de métodos analíticos***.** DOQ-CGCRE-008. Revisão: 03, fevereiro/2010, p.20, 2010.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. *Modern food microbiology*. 7. ed. New York: Springer, 2005. 790 p.

JIRANGRAT, W.; TORRICO, D. D.; NO, J.; NO, H. K.; PRINYAWIWATKUL, W. Effects of mineral oil coating on internal quality of chicken eggs under refrigerated storage. *Int. J. Food Sci. Technol*, v.45, p. 490–495, 2010.

JONES, D. R.; ANDERSON, K. E.; CURTIS, P. A.; JONES, F. T. Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. effects of layer strain and hen age. *Poult. Sci.*, v. 81, p. 715-720, 2002.

JONES, D. R.; CURTIS, P. A.; ANDERSON, K. E.; JONES F. T. Microbial contamination in inoculated shell eggs: II. Effects of layer strain and egg storage. *Poult. Sci.*, v. 83, p. 95-100, 2004a.

JONES, D. R.; MUSGROVE, M. T.; NORTHCUTT, J. K. variations in external and internal microbial populations in shell eggs during extended storage. *J. Food Protect.*, v. 67, n. 12, p. 2657-2660, 2004b.

JONES, D. R.; MUSGROVE, M. T. Effects of extended storage on egg quality factors. *Poult. Sci.*, v. 84, p. 1774-1777, 2005a.

JONES, D. R.; MUSGROVE, M. T. Correlation of eggshell strength and *Salmonella enteritidis* contamination of commercial shell eggs. *J. Food Protect.*, v. 68, n.10, p. 2035–2038, 2005b.

JONES, D. R.; MUSGROVE, M. T.; CAUDILL, A. B.; CURTIS, P. A.; NORTHCUTT, J. K. Microbial quality of cool water washed shell eggs**.** *Int. J. Poult. Sci.*, v.4, n.12, p. 938-943, 2005.

JONES, D. R.; MUSGROVE, M. T.; CAUDILL, B.; CURTIS, P. A. Frequency of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* and *Enterobacteriaceae* detection in commercially cool water-washed shell eggs**.** *J. Food Safety*, v.26, p. 264-274, 2006.

JONES, D. R.; MUSGROVE, M. T. Pathogen prevalence and microbial levels associated with restricted shell eggs. *J. Food Protect.*, v.70, n.9, p.2004-2007, 2007.

JORDAN, F. T. W.; PATTISON, M. *Poultry Diseases*, 4. ed. London: W. B. Saunders Company Ltd, 1998. 546 p.

KALAC, P. Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: A review. *Meat Sci.*, v. 73, p. 1–11, 2006.

KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem.*, v. 90, p. 219-230, 2005.

KAROUI, R.; KEMPS, B.; BAMELIS, F.; DE KETELAERE, B.; DECUYPERE, E.; DE BAERDEMAEKER, J. Methods to evaluate egg freshness in research and industry: a review. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 222, p. 727-732, 2006.

KEENER, K. M.; LACROSSE, J. D.; BABSON, J. K. Chemical method for determination of carbon dioxide content in egg yolk and egg albumen. *Poult. Sci.*, v. 80,p. 983-987, 2001.

KEENER, K. M.; MCAVOY, K. C.; FOEGEDING, J. B.; CURTIS, P. A.; ANDERSON, K. E.; OSBORNE, J. A. Effect of testing temperature on internal egg

quality measurements. *Poult. Sci.*, v. 85, p. 550-555, 2006.

KELLER, L. H.; BENSON, C. E.; KROTEC, K.; ECKROADE, R. J. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infect. Immun.*, v. 63, n. 7, p. 2443-2449, 1995.

KIDWELL, M. G.; NORDSKOG, A. W.; FORSYTHE, R. H. On the problem of correcting albumen quality measure for eggs weight. *Poult. Sci.*, v. 43, p. 42-49, 1964.

KLEIN, R. W. T. *Avaliação da qualidade interna de ovos de consumo submetidos a diferentes condições de armazenamento*. 2010. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

KOEHLER, H. H. Physicochemical appraisal of changes in egg white during storage. *J. Agric. Food Chem.*, v. 22, n. 2, 1974.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; et al. Contagem de *Staphylococcus* spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*., v.57, p.702-709, 2005.

LANÇAS, F. M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos, SP: RiMa, 2004. p. 62.

LANGONI, H.; PRADO, R. A. T.; PINTO, J. P. A. N.; BALDINI, S.; PIMENTEL, V. L. Isolamento de salmonelas em ovos de galinha oferecidos para consumo no comércio de Botucatu, SP. *Hig. Aliment.*, v. 9, n. 37, p. 45-47, 1995.

LARQUÉ, E; MOLINA, M. S.; ZAMORA, S. M. D. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, v. 23, p. 87–95, 2007.

LEANDRO, N. S. M.; DEUS, H. A. B.; STRINGHINI, J. H.; CAFÉ, M. A.; ANDRADE, M. A.; CARVALHO, F. B. Aspectos de qualidade interna e externa de ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na região de Goiânia. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 6, n. 2, p. 71-78, 2005.

LEHNINGER, A. L. *Lehninger principles of biochemistry*. 4. ed. New York: W.H. Freeman, 2004.1119 p.

LIMA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A. Aminas bioativas em alimentos. *Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 33, n. 1, p. 70-79, 1999.

LIMA, G. P. P.; ROCHA, S. A.; TAKAKI, M.; RAMOS, P. R. R. R. Teores de poliaminas em alguns alimentos da dieta básica do povo brasileiro. *Ciênc. Rural*, v. 36, n. 4, p. 1294-1298, 2006.

LUBLIN, A.; SELA, S. The impact of temperature during the storage of table eggs on the viability of *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Virchow in the eggs. *Poult. Sci.*, v. 87, p.2208–2214, 2008.

MAGALHÃES, A. P. C. *Qualidade de ovos comerciais de acordo com a integridade da casca, tipo de embalagem e tempo de armazenamento*. Seropédica, RJ, 2007. 55 p. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

MALLE, P.; VALLE, M.; BOUQUELET, S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Int.*, v.79, p.43-49, 1996.

MARTÍNEZ, A. M.; NAVARRETE, J. V.; CORPUS, M. L. O.; VALENCIA, S. D.; HUIDOBRO, D. L.; GUTIÉRREZ, V. R. T. Identificación de *Salmonella enteritidis* in huevo para consumo en la ciudad del México. *Téc. Pec. Méx*., v.43, n.2, p. 229-237, 2005.

MELLOR, D. B.; GARDNER, F. A.; CAMPOS, E. J. Effect of type of package and storage temperature on interior quality of shell treated shell eggs. *Poult. Sci.*, v.54, p. 742-746, 1975.

MESSENS, W.; DUBOCCAGE, L.; GRIJSPEERDT, K.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L. Growth of *Salmonella* serovars in hens' egg albumen as affected by storage prior to inoculation. *Food Microbiol*., v.21, p. 25–32, 2004.

MIN, J. S.; LEE, S. O.; JANG, A.; JO, C.; LEE, M. Control of microorganisms and reduction of biogenic amines in chicken breast and thigh by irradiation and organic acids. *Poult. Sci*., v. 86, p. 2034–2041, 2007.

MINE, Y.; OBERLE, C.; KASSAIFY, Z. Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs**.** *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, n.1, 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. *J. Food Protect.*, v. 61, p. 350-353, 1998.

MOATS, W. A. Classification of bacteria from commercial egg washers and washed and unwashed eggs. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 40, n. 4, p. 710-714, 1980.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.*, v. 24, p.184–197, 2005.

MORAIS, C. F. A.; CAMPOS, E. J.; SILVA, T. J. P. Qualidade interna de ovos comercializados em supermercados na cidade de Uberlândia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 49, n. 3, p. 365-373, 1997.

MOUDGAL, R. P.; PANDA, J. N.; MOHAN, J. Histamine in egg yolk: heat resistance and relationnn to production status. *Brit. Poult. Sci.*, v. 32, p. 865-869, 1991.

MOURA, A. M. A.; OLIVEIRA, N. T. E.; THIEBAUT, J. T. L.; et al., Efeito da temperatura de estocagem e do tipo de embalagem sobre a qualidade interna de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*). *Ciênc. Agrotec*., Lavras, v. 32, n. 2, p. 578-583, 2008.

MUSGROVE, M. T.; JONES, D. R.; NORTHCUTT, J. K.; COX, N. A.; HARRISON, M. A. Identification of *Enterobacteriaceae* from washed and unwashed commercial shell eggs. *Food Protect.*, v. 67, n. 11, p. 2613-2616, 2004.

MUSGROVE, M. T.; NORTHCUTT, J. K.; JONES, D. R.; COX, N. A. E.; HARRISON, M. A. *Enterobacteriaceae* and related organisms isolated from shell eggs collected during commercial processing. *Poult. Sci.*, v.87, p.1211-1218, 2008.

MYERS, P. W.; DAVIS, G. T.; ROEHM, G. H. Plastic packaging of eggs. Cooking qualities of oil-dipped and cryovac-packaged eggs. *Poult. Sci*., v. 42, n.1 p. 156-160, 1963.

NISHIMURA, K.; SHIINA, R.; KASHIWAGI, K.; IGARASHIY, K. Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *J. Biochem*. v. 139, p. 81-90, 2006.

OKAMOTO, A.; SUGI, E.; KOIZUMI, Y.; YANAGIDA, F.; UDAKA, S. Polyamine

content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Biosci., Biotechnol. Biochem.*, v. 61, n. 9, p. 1582-1584, 1997.

OLIVEIRA, B. L. *Avicultura: Produção de ovos comerciais*. Universidade Federal de Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1991. p. 72.

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 52, n. 6, p. 655-661, 2000.

OLIVEIRA, G. E.; FIGUEIREDO, T. C.; SOUZA, M. R. OLIVEIRA, A. L.; CANÇADO, S. V.; GLORIA, M. B. A. Bioactive amines and quality of egg from Dekalb hens under different storage conditions**.** *Poult. Sci.*, v. 88, p. 2428-2434, 2009a.

OLIVEIRA, T. M. M.; WILD, M. B.; SILVA, Y. L. S.; DEIMLING, J. F.; OLIVEIRA, N. T. E. Qualidade interna de ovos casca marrom comercializados em diferentes embalagens no município de Marechal Cândido Rondon-PR. In: *Anais Congresso ZOOTEC 2009*, Águas de Lindóia/SP, Anais Congresso ZOOTEC 2009. FZEA/USP-ABZ, 2009, p. 1-4.

ONAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.*, v. 103, p. 1475-1486, 2007.

ORDÓNEZ, J. A. *Tecnologia de alimentos de origem animal*. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 2, p. 280.

OVERFIELD, N. D. *Testing of eggs for quality*. London: Her Majesty's Stationary, 1974. 43 p.

PAPADOPOULOU, C.; DIMITRIOU, D.; LEVIDIOTOU, S.; GESSOULI, H.; PANAGIOU, A.; GOLEGOU, S; ANTONIADES, G. Bacterial strains isolated from eggs and their resistance to currently used antibiotics: is there a health hazard for consumers? *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 20, p. 35-40, 1997.

PARDI, H. S. *Influência da comercialização na qualidade de ovos de consumo*. 1977. 73f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

PARNELL, E. D.; JASKA, R. Temperature and relative humidity on market eggs quality. *Texas Agric. Expet. Sta. Publ.* MP-296, 1958.

PARSONS, C. H.; MINK, L. D. Correlation of methods for measuring the interior quality of eggs. *U. S. Egg Poult. Magazine.*, v. 43, p. 484-489, 1937.

PEÑA, C. V. M. *Histamina e tiramina em produtos cárneos. Santa Maria*, 2006. 84 f. (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

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*. *Rev. Saúde Públ.*, v.32, n. 5, p.477-83, 1998.

PINTO, A. T.; SILVA, E. N.; SANTOS, C. R. Boas práticas operacionais em sala de classificação de ovos. *Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas*, p. 63, 2004.

RADKOWSKI, M. Short communication. Occurrence of *Salmonella* spp. in consumption eggs in Poland. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 64, p. 189-191, 2001.

RAMOS, B.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Changes of yolk biogenic amine concentrations during storage of shell hen eggs. *Food Chem.*, v. 116, p. 340-344, 2009.

RAMOS, K. C. B. T.; CAMARGO, A. M.; OLIVEIRA, E. C. D.; CEDRO, T. M. M.; MORENZ, M. J. F. Avaliação da idade da poedeira, da temperatura de armazenamento e do tipo embalagem sobre a qualidade de ovos comerciais. *Rev. Ciênc. Vida***,** v. 30, n. 2, jul-dez, p.00-00, 2010.

RAPINI, L. S.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S. Presença de *Staphylococcus spp* produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*., v.57, p.825-829, 2005.

RIBANI M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova*, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RICKE, S. C.; BIRKHOLD, S. G.; GAST, R. K. Eggs and Egg Products. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4 ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 473-481.

ROBINSON, D. S; MONSEY, J. B. Studies on the composition of egg-white ovomucin. *Biochen. J*., v.121, p.537-547, 1971.

ROCCULI, P.; TYLEWICZ, U.; PEKOSLAWSKA, A.; ROMANI, S.; SIRRI, F.; SIRACUSA, V.; DALLA ROSA, M.; MAP storage of shell hen eggs, Part 1: Effect on physico-chemical characteristics of the fresh product. *Food Sci. Technol.*, v. 42, p. 758-762, 2009.

RODRIGUES, K. R. M.; SALAY, E. Atitudes de granjeiros, atacadistas, varejistas e consumidores em relação à qualidade sanitária do ovo de galinha *in natura. Rev. Nutr*., v.14, n.3, p.185-193, 2001.

ROKKA, M; EEROLA, S; SMOLANDER, M; ALAKOMI, H. L; AHVENAINEN, R. Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions b. biogenic amines as quality-indicating metabolites *Food Control*, v.15, p.601–607, 2004.

ROMANOFF, A. L.; ROMANOFF, A. J . *The avian egg*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, INC., 1963. 918 p.

SABRANI, M.; PAYNE, C. G. Effect of oiling on internal quality of eggs stored at 28 and 12ºC. *Brit. Poult. Sci*., v.19, p. 567-571, 1978.

SAHIN, O.; KOBALKA, P.; ZHANG, Q. Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, p. 1070-1079, 2003.

SAITO, K.; HORIE, M.; NOSE, N.; NAKAGOMI, K.; NAKAZAWA, H. Determination of polyamines in foods by liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. *Analyt. Sci.*, v. 8, p. 675-680, 1992.

SALAZAR, M. T.; SMITH, T. K.; HARRIS, A. High-performance liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in feedstuffs, complete feeds, and animal tissues. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 1708-1712, 2000.

SAMLI, H. E.; AGMA, A.; SENKOYLU, N. Effects of storage time and temperature on egg quality in old laying hens. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 14, p. 548-553, 2005.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2002, 308 p.

SANTOS, M. S. V.; ESPÍNDOLA, G. B.; LÔBO, R. N. B.; FREITAS, E. R.; GUERRA, J. L. L.; SANTOS, A. B. E. Efeito da temperatura e estocagem em ovos**.** *Ciênc. Tecnol. Aliment*., Campinas, v.29, n. 3, p. 513-517, 2009.

SANTOS, M. S. V. *Avaliação do desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais, submetidas às dietas suplementadas com diferentes óleos vegetais.* Fortaleza, 2005. 174 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza/ CE.

SANTOS, W. C.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines formation in milk by Lactococcus in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32ºC. *Food Chem.,* v. 81, p. 595–606, 2003.

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

SAYEED, S.; SANKARAN, R. A study on the behavior of air micro flora in food industries. *J. Food Sci. Technol.*, v. 27, n. 5, p. 340-344, 1990.

SCOTT, T. A.; SILVERSIDES, F. G. The effect of storage and strain of hen on egg quality. *Poult. Sci.*, v. 79, p. 1725-1729, 2000.

SEILER, N. Catabolism of polyamines. *Amino Acids*, v. 26, p.217-233, 2004.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 29, p. 213-231, 1996.

SILLA SANTOS, M. H. Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 39, p. 227-230, 1998.

SILVA, M. C. D.; RAMALHO, L.; FIGUEIREDO, E. T. *Salmonella* sp. em ovos e carcaças de frango *in natura* comercializadas em Maceió, AL. *Hig. Aliment.*, v. 18, p. 80-84, 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, 1997. 295 p.

SILVERSIDES, F. G.; TWIZEYIMANA, F.; VILLENEUVE, P. A study relating to the validity of the Haugh unit correction for egg weight in fresh eggs. *Poult. Sci. J.*, v. 72, p. 760-764, 1993.

SILVERSIDES, F. G. The Haugh unit correction for egg weight is not adequate for comparing eggs from chickens of different line and ages. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 3, p 120- 126, 1994.

SILVERSIDES, F. G.; SCOTT, T. A. Effect of storage and layer age on quality of eggs from two lines of hens. *Poult. Sci.*, v. 80, p. 1240-1245, 2001.

SILVERSIDES, F. G.; BULDGELL, K. The relationships among measures of egg albumen height, pH and whipping volume. *Poult. Sci.*, v. 83, p. 1619-1623, 2004.

SMITH, T. A. Amines in food. *Food Chem.*, v. 6, p. 169-200, 1980-81.

SOLOMON, S. E. *Egg and Eggshell Quality*. London: Publishing Limited, 1991. 149p.

SOUZA, P. A.; FALEIROS, R. R. S.; SOUZA, H. B. N.; ARIKI, J.; CURTARELLI, S. M. Efeitos da

temperatura, embalagem, aplicação do óleo mineral e do tempo de armazenamento sobre a qualidade dos ovos. 8º Congresso Latino Americano de Avicultura e 8º Congresso Brasileiro de Avicultura, 1983, Camboriu, SC. *Anais do 8º Congresso Latino Americano de Avicultura e 8º Congresso Brasileiro de Avicultura*, Camboriu, SC: 1983, v.2, p.592-600.

SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimento*. Belo Horizonte, 2007. 297 f. (Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. *Egg science & Technology*. 4. ed. New York: Food Products Press, 1995. 591 p.

STEVENS, L. Egg proteins: what are their functions. *Sci. Program.*, v. 79, p. 65-87, 1996.

THERON, H.; VENTER, P.; LUES, J. F. R. Bacterial growth on chicken eggs in various storage environments. *Food Res. Int.*, v.36, p. 969-975. 2003.

THIAGARAJAN, D.; SAEED, A. M.; ASEM, E. K. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens. *Poult. Sci.*, v. 73, p. 89-98, 1994.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analisys. *J. Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 5, p. 835- 855, 2002.

TORRICO, D. D.; JIRANGRAT, W.; NO, H. K.; PRINYAWIWATKUL, W.; GE, B.; INGRAM, D. A novel emulsion coating and its effects on internal quality and shelf life of eggs during room temperature storage. *Int. J. Food Sci. Technol.*, v.45, p.2241-2249, 2010.

TOUSSANT, M. J.; LATSHAW, J. D. Ovomucin content and composition in chicken eggs with different interior quality. *J. Sci. Food Agric*, v.79, p.1666-1670, 1999.

UBA - União Brasileira de Avicultura. *Relatório anual 2009/2010*. Disponível em: <http://www.uba.org.br.>. Acesso em: 28 de julho de 2011.

UBABEF - União Brasileira de Avicultura. *Relatório anual 2010/2011*. Disponível em: <http://www.abef.com.br.>. Acesso em: 28 de janeiro de 2012.

USDA – United States Department of Agriculture. *Egg-Grading Manual*. n.75, 2000.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*, 3. Ed. Washington; American Public Health Association – APHA, p. 121, 1992.

VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int. J. Infec. Dis.*, v.12, p.410-415, 2008.

WAIMALEONGORA-EK, P.; GARCIA, K. M.; NO, H. K.; PRINYAWIWATKUL, W.; INGRAM, D. R. Selected Quality and Shelf Life of Eggs Coated with Mineral Oil with Different Viscosities. *J. Food Sci.*, v.74, n. 9, p. S423 - S429, 2009.

WARDY, W.; TORRICO, D. D.; NO, H. K.; PRINYAWIWATKUL, W.; SAALIA, F. K. Edible coating affects physico-functional properties and shelf life of chicken eggs during refrigerated and room temperature storage. *Int. J. Food Sci. Technol.*, v.45, p. 2659-2668, 2010.

WILGUS, H. S.; WAGENEN, A. The weight of the firm albumen as a measure of its condition. *Poult. Sci.*, v. 15, p. 319-321, 1936.

WILLIAMS, K. C. Some factors affecting albumen quality with particular reference to Haugh unit score. *Poult. Sci.*, v. 48, p. 6-16, 1992.

WONG, Y. C.; HERALD, T. J.; HACHMEISTER, K. A. Evaluation of mechanical and barrier properties of protein coating on shell eggs. *Poult. Sci.*, v.75, p. 417-422, 1996.

XAVIER, I. M. C. *Qualidade funcional de ovos de consumo submetidos a diferentes condições de armazenamento.* 2006. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

XAVIER, I. M. C.; CANÇADO, S. V.; FIGUEIREDO, T. C.; LARA, L. J. C.; LANA, A. M. Q.; SOUZA, M. R.; BAIÃO, N. C. Qualidade de ovos de consumo submetidos a diferentes condições de armazenamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*., v.60, n.4, p.953-959, 2008.

YUKIKO, H. K.; SAKAKIBARA, 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. *Food Protect*., v. 64, n. 8, p. 1134-1137, 2001.