

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA**

**Efeitos da lavagem e da sanitização com ácido peracético ou luz
ultravioleta sobre a ultraestrutura da casca e características
microbiológicas de ovos de consumo**

Marcela Viana Triginelli

**BELO HORIZONTE
2020**

Marcela Viana Triginelli

Efeitos da lavagem e da sanitização com ácido peracético ou luz ultravioleta sobre a ultraestrutura da casca e características microbiológicas de ovos de consumo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal/Não Ruminantes

Orientador: Prof. Leonardo José Camargos Lara

Coorientador: Prof. Tadeu Chaves de Figueiredo

T828e Triginelli, Marcela Viana, 1983 -
Efeitos da lavagem e da sanitização com ácido peracético ou luz ultravioleta sobre a ultraestrutura da casca e características microbiológicas de ovos de consumo/ Marcela Viana Triginelli, - 2020.

93 f.:il

Orientador: Leonardo José Camargos Lara
Coorientador: Tadeu Chaves de Figueiredo

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.
Área de concentração: Produção Animal

1- Ovos – Teses – 2. Alimentos - Teses – 3. Avaliação – Teses – 1. Lara, Leonardo José Camargos – II. Figueiredo, Tadeu Chaves de - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 664

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



Escola de Veterinária
UFMG

ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
COLEGIADO DO PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 30123-970 - Belo Horizonte- MG
TELEFONE (31)-3409-2173

www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao
E-mail: cpzootec@vet.ufmg.br

ATA DE DEFESA DE TESE DE MARCELA VIANA TRIGINELI

Às 09:00 horas do dia 14 de fevereiro de 2020, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado em reunião no dia 05/12/2019, para julgar, em exame final, a defesa da tese intitulada: *Efeito da lavagem e da sanitização com ácido peracético de luz ultravioleta sobre a microdestinação da carne e características microbiológicas de carnes de consumo*, como requisito final para a obtenção do Grau de **Doutor em Zootecnia área de concentração Produção de Não Ruminantes**.

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Leonardo José Camargos Lara, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Tese, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento da tese, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Prof.(a)/Dr.(a) <i>Leonardo José Camargos Lara</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) <i>Marcelo Ruyndi de Souza</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) <i>Mariana de Vasconcelos Lanzado</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) <i>Nadja Mariana Mogyca Leandro</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) <i>Joaquim Robert Nicoli</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a):
 Aprovado (a)
 Reprovado (a)

Para concluir o Doutorado, o(a) candidato(a) deverá entregar 10 volumes encadernados da versão final da tese acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao (a) candidato (a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora e encaminhada juntamente com um exemplar da tese apresentada para defesa.

Belo Horizonte, 14 de fevereiro de 2020.

Assinatura dos membros da banca:

Leonardo José Camargos Lara
Marcelo Ruyndi de Souza
Mariana de Vasconcelos Lanzado

Nadja Mariana Mogyca Leandro

(Vide Normas Regulamentares da defesa de Tese no verso)

(Este documento não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador)

Doutorado/Atadefesa.doc

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Leonardo José Camargos Lara, por sempre ter depositado em mim toda confiança. Obrigada pelo apoio incondicional em todos os momentos. Você é um grande exemplo como profissional e pessoa!

Ao Prof. Tadeu Chaves de Figueiredo, meus sinceros agradecimentos por todo suporte na execução deste trabalho.

Aos Profs. Marcelo Resende de Souza e Silvana Vasconcelos Cançado, agradeço imensamente por todo aprendizado. Vocês estiveram ao meu lado deSSe o início dando apoio nessa trajetória.

Ao Prof. Ítallo Conrado por todo apoio e análises estatísticas realizadas.

Ao Prof. Nelson Carneiro Baião por toda sabedoria e experiência.

À Prof. Ângela Maria Quintão Lana pelo auxílio no delineamento experimental.

Ao Prof. Luiz Antônio Cruz Souza pelo auxílio oferecido para medir as lâmpadas UV.

À granja Rancho da Lua, em especial ao médico veterinário Jonas, por ter aberto as portas da propriedade para toda a execução do nosso experimento.

Aos amigos do Grupo de Estudos Avícolas da UFMG (GEAV), em especial Lorena, Hítalo, Tainá, Bruno, Bárbara, Isadora e Claudio. Vocês foram essenciais durante todo o meu doutorado e foi um prazer trabalhar com uma equipe tão alegre, unida e pronta para qualquer desafio! Às amigas Érica, Fernanda, Larissa, Renata, Paulinha e à Profa. Carla, obrigada pelo companheirismo e apoio de sempre.

Aos colegas do laboratório de microbiologia, principalmente, Cosme, Ranier, Naiara, Gustavo, Gabriela e Emanuely. E às colegas Viviane, Raísa e Carolina. Todos vocês foram essenciais!

À minha mãe por me dar equilíbrio e me ensinar a ter foco, força e fé.

Ao meu pai por me fazer ser mais otimista e acreditar que tudo pode dar certo.

Ao Éder por todo o amor, paciência e companheirismo.

Aos meus avós, tios e primos por vibrarem comigo a cada vitória alcançada.

À Escola de Veterinária da UFMG pela estrutura e apoio.

Ao colegiado de pós-graduação da Escola de Veterinária da UFMG.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	14
1. Estrutura e características dos ovos.....	14
1.1. Formação e ultraestrutura da casca.....	15
2. Microbiologia dos ovos.....	18
3. Análises microbiológicas.....	23
3.1. Preparação das amostras.....	23
3.2. Contagem Padrão em Placas.....	25
3.3. Identificação de micro-organismos por métodos tradicionais.....	27
3.4. Identificação de micro-organismos por técnicas moleculares.....	28
3.5. Identificação de bactérias por espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI) acoplada ao analisador por tempo de voo (TOF).....	31
4. Características microbiológicas de ovos de consumo provenientes de aves criadas em gaiolas	34
5. Lavagem e sanitização de ovos.....	36
5.1. Radiação Ultravioleta.....	40
5.2. Ácido peracético.....	42
6. Referências bibliográficas	45
CAPÍTULO II - Efeitos da lavagem e da sanitização com ácido peracético ou luz ultravioleta sobre a ultraestrutura da casca e características microbiológicas de ovos de consumo	
Resumo.....	54
Introdução.....	55
Material e Métodos	57
Resultados e Discussão.....	62
Referências Bibliográficas	87
CAPÍTULO III – CONSIDERAÇÕES FINAIS	93

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – Efeitos de diferentes métodos de sanitização sobre as características microbiológicas e da ultraestrutura da casca de ovos de consumo

Tabela 1. Análises microbiológicas e físico-químicas da água utilizada para lavagem-----	58
Tabela 2. Médias das camadas ultraestruturais da casca de ovos lavados e não lavados submetidos a diferentes métodos de desinfecção-----	64
Tabela 3. Contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos da casca, conteúdo após 48 horas e conteúdo após 15 dias de armazenamento de ovos lavados e não lavados submetidos a diferentes métodos de sanitização-----	65
Tabela 4. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos na casca de ovos lavados e não lavados em função do método de sanitização-----	66
Tabela 5. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos no conteúdo após 48 horas de armazenamento de ovos lavados e não lavados submetidos a diferentes métodos de sanitização-----	67
Tabela 6. Contagens de Enterobacteriaceae da casca, conteúdo após 48 horas e conteúdo após 15 dias de armazenamento de ovos lavados e não lavados em função do método de sanitização-----	70
Tabela 7. Contagem de Enterobacteriaceae no conteúdo após 48 horas de armazenamento de ovos lavados e não lavados em função do método de sanitização-----	70
Tabela 8. Contagem de Enterobacteriaceae no conteúdo após 15 dias de armazenamento de ovos lavados e não lavados em função do método de sanitização	71
Tabela 9. Contagens de bolores e leveduras da casca, conteúdo após 48 horas e conteúdo após 15 dias de armazenamento de ovos lavados e não lavados submetidos a diferentes métodos de sanitização após 15 dias de armazenamento-----	73

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Principais características morfológicas da casca de ovos de galinha-----	16
Figura 2. Representação esquemática da ionização da amostra-----	32
Figura 3. Análise do espectro formado por tempo de voo-----	32

CAPÍTULO II – Efeitos de diferentes métodos de sanitização na contagem microbiológica da casca e do conteúdo de ovos de consumo e na ultraestrutura da casca

Figura 1. Fotomicrografia das camadas da casca do ovo por meio de microscopia eletrônica em aumento de 200x.-----	63
Figura 2. Comparação entre as contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos totais (log UFC/mL <i>pool</i> de quatro ovos) no conteúdo dos ovos após 48 horas e 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente pelo teste de Wilcoxin. -----	69
Figura 3. Comparação entre as contagens de Enterobacteriaceae (log UFC/mL <i>pool</i> de quatro ovos) no conteúdo dos ovos após 48 horas e 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente pelo teste de Wilcoxin.-----	72
Figura 4. Comparação entre as contagens de bolores e leveduras (log UFC/mL <i>pool</i> de quatro ovos) no conteúdo dos ovos após 48 horas e 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente pelo teste de Wilcoxin.-----	74
Figura 5. Composição da microbiota encontrada na casca dos ovos por filo. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC-----	77
Figura 6. Composição da microbiota encontrada na casca dos ovos por família. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC-----	78
Figura 7. Composição da microbiota encontrada na casca dos ovos por gênero. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC-----	80

Figura 8. Composição da microbiota encontrada no conteúdo dos ovos divididos por filo. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC----- **82**

Figura 9. Composição da microbiota encontrada no conteúdo dos ovos por família. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC----- **83**

Figura 10. Composição da microbiota encontrada no conteúdo dos ovos por gênero. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC----- **85**

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito da lavagem e diferentes métodos de sanitização sobre a ultraestrutura da casca, avaliação microbiológica da casca, conteúdo dos ovos e conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente, foram coletados 600 ovos de consumo de galinhas da linhagem *Bovans White*[®] de 53 semanas de idade, alojadas em gaiolas e com sistema de coleta de ovos automatizado. Os ovos selecionados foram distribuídos de forma aleatória em esquema fatorial 2x3 (presença ou não de lavagem x processo de sanitização), submetidos aos tratamentos ovos não lavados (NL): sem sanitização (SS); sanitizados com ácido peracético (355 ppm; 0,5ml/ovo; APA); sanitizados com radiação ultravioleta C (254 nm; 2.067 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$, 5s; UVC) e ovos lavados (L): SS; APA e UVC. Um total de 24 ovos foi coletado para avaliação ultraestrutural da casca, sendo quatro ovos por tratamento. Foram feitas medições das camadas mamilar, paliçada, cristal vertical e da cutícula da casca nas regiões apical, equatorial e basal e o cálculo das médias das três regiões. Oito amostras compostas de quatro ovos foram coletadas para contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, Enterobacteriaceae, bolores e leveduras na casca, conteúdo após 48 horas e conteúdo após 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Após a cultura dos micro-organismos, colônias morfológicamente diferentes foram selecionadas para identificação utilizando-se o método de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e analisador por tempo de voo (TOF). A lavagem reduziu a espessura da cutícula dos ovos ($p < 0,05$) e o uso de APA reduziu a espessura da região calcificada ($p < 0,05$). Os ovos lavados e sanitizados com APA ou UVC apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) de contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos da casca quando comparados aos ovos apenas lavados. O conteúdo dos ovos L-SS apresentou a menor contaminação por aeróbios mesófilos totais ($p < 0,05$). O conteúdo dos ovos SS, independentemente da lavagem, não apresentou bactérias da família Enterobacteriaceae. Após 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente, as contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, bolores e leveduras foram menores ($p < 0,05$) no conteúdo dos ovos lavados. O conteúdo dos ovos submetidos à radiação UVC apresentou a menor contagem de bolores e leveduras ($p < 0,05$). Ovos lavados e sanitizados com UVC apresentaram a menor contagem de Enterobacteriaceae do conteúdo após 15 dias de armazenamento. As contagens de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae, bolores e

leveduras do conteúdo após 15 dias de armazenamento foram mais altas em praticamente todos os tratamentos, com exceção dos ovos submetidos ao tratamento L-UVC. Na casca os filos Firmicutes e Proteobacteria foram os mais prevalentes. Houve redução de bactérias da família Enterobacteriaceae e aumento de Staphylococcaceae após a lavagem dos ovos. No conteúdo, o filo Firmicutes foi o mais prevalente nos ovos não lavados e o filo Proteobacteria nos ovos lavados. O gênero *Enterobacter* foi o mais prevalente no conteúdo dos ovos lavados. Não foi identificada *Salmonella* nem na casca e nem no conteúdo dos ovos. Por apresentar as menores contagens de bactérias da casca e do conteúdo e a menor contaminação por bolores e leveduras no conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento, a lavagem associada ao uso de UVC pode ser considerada o método de escolha na sanitização de ovos de consumo.

Palavras-chave: Contagem de micro-organismos; Ácido peracético; Ultravioleta; MALDI-TOF.

ABSTRACT

The present study examined the effect of egg washing and different disinfection methods on eggshell ultrastructure, on abundance and taxonomic diversity of microorganisms on eggshells, and on egg content, immediately after treatment and after 15 days of storage. A total of 600 eggs were collected from 53-week-old Bovans White[®] hens, housed in cages, using an automated egg collection system. Selected eggs were randomly assigned to treatments using a factorial scheme 2×3 : as follows: a) unwashed eggs: without sanitization (WS), sanitized with peracetic acid ([PAA]; 355 ppm; 0.5 mL/egg), and sanitized with ultraviolet C radiation ([UVC]; 254 nm; 2.067 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$, 5s), and b) washed eggs (W): WS, PAA, and UVC. A total of 24 eggs were collected for ultrastructural evaluation of the shell, with four eggs per treatment. Measurements were made of the mammillary, palisade, vertical crystal and cuticle in the apical, equatorial, and basal eggshell layers, then average values of the three measurements were calculated. Eight samples of four eggs each were collected to count total mesophilic aerobic microorganisms, Enterobacteriaceae, molds, and yeasts in the shell, contents after 48 hours and contents after 15 days of storage at room temperature. After culturing the microorganisms, morphologically different colonies were selected for identification by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF). Washing reduced the cuticle thickness of eggs ($p < 0.05$) and the use of PAA reduced the thickness of the calcified region ($p < 0.05$). Eggs washed and sanitized with PAA or UVC showed significant ($p < 0.05$) reduction of shell aerobic mesophilic microorganism counts when compared to eggs washed only. The contents of W-WS eggs showed the lowest contamination by total mesophilic aerobes ($p < 0.05$). The contents of WS eggs, regardless of washing, was free of Enterobacteriaceae. After 15 days of storage at room temperature, the counts of total mesophilic aerobic microorganisms, molds and yeasts were lower ($p < 0.05$) in the contents of washed eggs. The contents of eggs subjected to UVC radiation showed the lowest mold and yeast counts ($p < 0.05$). Eggs washed and sanitized with UVC showed the lowest count of Enterobacteriaceae in the contents after 15 days of storage. Counts of mesophilic aerobes, Enterobacteriaceae, molds and yeasts of the contents after 15 days of storage increased in almost all treatments, however, to a lower degree in W-UVC treatment. On eggshells, the phyla Firmicutes and Proteobacteria were the most prevalent. There was a reduction of bacteria of the Enterobacteriaceae family and an increase of Staphylococcaceae after washing the eggs. In the contents, Firmicutes was most prevalent in the unwashed eggs

and Proteobacteria was predominant in washed eggs. The genus Enterobacter was most prevalent in the contents of the washed eggs. No Salmonella was identified on either the shell or the contents of the eggs. By having the lowest bacterial counts on the shell and contents, and the lowest mold and yeast contamination on the egg contents after 15 days of storage, washing associated with the use of UVC can be considered the method of choice in sanitizing consumption eggs.

Key words: Microorganisms count; Peracetic Acid; Ultraviolet; MALDI TOF

INTRODUÇÃO

Os ovos são capazes de fornecer todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento embrionário e é um alimento considerado rico nutricionalmente para o consumo humano, sendo composto por 58,5% de albúmen, 31% de gema e 10,5% de casca e membranas da casca. O albúmen contém proteínas, enquanto a gema é composta por lipídios e proteínas. A casca é formada basicamente por carbonato de cálcio e possui poros que proporcionam as trocas gasosas entre o ambiente e o interior dos ovos. A cutícula é depositada na superfície mineral da casca, momento antes da postura do ovo e é caracterizada por um complexo orgânico lubrificante com propriedades antimicrobianas (Board e Tranter, 1995).

De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), a produção brasileira de ovos no ano de 2019 totalizou mais de 44,4 bilhões de unidade, recorde histórico desde o ano de 2010 e com aumento de 10% quando comparado ao ano anterior. O consumo de ovos *per capita* no Brasil foi de 230 unidades/ano e nunca foi tão alto (ABPA, 2020).

A possibilidade de entrada de bactérias pela casca é determinante para o controle do processo de deterioração dos ovos. Diante disso diferentes métodos de limpeza das cascas vêm sendo estudados. Acreditava-se que a incidência de deterioração em ovos era maior naqueles que passavam pelo processo de lavagem. Porém isso está intimamente ligado a qualidade da água e ao método utilizado (Board, 1966).

Apesar da possibilidade de alteração na cutícula, a lavagem dos ovos é utilizada em muitos países como rotina, principalmente em função do uso da tecnologia de coleta automática dos ovos aliado ao desenvolvimento de eficientes máquinas de lavagem, sanitização, classificação e embalagem dos ovos. A prática ainda é controversa baseado no histórico de piora da qualidade dos ovos que passam por processos inadequados de lavagem (Hutchinson et al., 2004).

Aliado ou não ao processo de lavagem, diferentes métodos de sanitização podem ser utilizados para auxiliar na redução dos micro-organismos da casca como, por exemplo, a luz ultravioleta (UVC) (De Reu et al., 2006) e o ácido peracético (Al-Ajeeli et al., 2016).

O consumidor está cada vez mais atento em relação à segurança dos alimentos, além da observação visual de limpeza das cascas dos ovos, também se mostra preocupado com a qualidade microbiológica do ovo. O ovo pode ser contaminado via transovariana (vertical), ainda no oviduto, ou por penetração dos micro-organismos pelos poros da casca após a postura (horizontal). A maior parte da contaminação do ovo ocorre pela via horizontal e

existe correlação entre a contaminação bacteriana da casca e do conteúdo dos ovos (De Reu et al., 2006).

As doenças transmitidas por alimentos constituem um importante problema de saúde pública, e vários agentes podem estar envolvidos. A casca dos ovos pode estar contaminada com diversos tipos de micro-organismos, incluindo bactérias patogênicas, como *Salmonella*, sendo assim, muitos processadores de ovos utilizam sistemas de lavagem e sanitização para descontaminar a sua superfície (Al-Ajeeli et al., 2016).

É essencial que se mantenham altos níveis de higiene nas propriedades e que se tenha um bom manejo das aves a fim de minimizar a contaminação dos ovos. A maior parte da contaminação dos ovos ocorre imediatamente após a postura, sendo assim, as práticas de higiene nos aviários se mostra ainda mais importante.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da lavagem e da sanitização por luz ultravioleta (UVC) ou ácido peracético (APA) sobre a contagem microbiana e a presença de *Salmonella* da casca, conteúdo dos ovos após 48 horas de armazenamento e no conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento. Foi realizada a avaliação dos efeitos da lavagem e dos processos de sanitização sobre a ultraestrutura da casca dos ovos e, além disso, a identificação de parte da comunidade bacteriana da casca e conteúdo dos ovos recém-coletados utilizando-se espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF).

CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

1. Estrutura e características dos ovos

O ovo é considerado um dos alimentos mais completos sendo capaz de fornecer proteína, lipídios, vitaminas e minerais. Em termos gerais o ovo tem três frações distintas: gema (óvulo), albúmen (clara) e casca (cutícula, exterior calcificado e membranas). O peso da gema corresponde a 25 a 33% do peso total do ovo e sua formação ocorre em três estágios. A primeira, ainda na fase embrionária da galinha, quando ela apresenta mais de 3000 óvulos microscópicos, a segunda que corresponde ao desenvolvimento do ovário desde o nascimento até a maturidade sexual e a última que ocorre pouco antes da ovulação, quando os óvulos aumentam de tamanho. Na gema estão presentes a látebra, o disco germinativo e camadas concêntricas cercadas pela membrana vitelina. A membrana vitelínica é a camada que cobre a gema e tem a função de protegê-la de rupturas (Board e Tranter, 1995).

A gema é composta por lipídios e proteínas em uma proporção aproximada de 2:1. Os ácidos graxos presentes podem ser alterados de acordo com a fonte lipídica consumida pelas aves. Além disso, estão presentes também vitaminas lipossolúveis, principalmente A, D e E. Dentre os lipídios, 70% são triacilgliceróis, 25% são fosfolipídios e 5% correspondem a colesterol e ésteres de colesterol (Johnson, 2015). Os ácidos graxos presentes na gema do ovo de uma galinha que consome ração a base de milho e soja correspondem a 35% de ácidos graxos saturados, 45% de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e 20% de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (Anton et al., 2006).

O albúmen é formado em aproximadamente três horas, dentro do oviduto, em uma porção denominada magno. Seu peso corresponde a aproximadamente 60% do peso total dos ovos. O albúmen pode ser dividido em quatro camadas (chalazas, camada interna fina fluida, camada grossa externa, camada fina fluida externa) (Johnson, 2015) e mais da metade do conteúdo proteico dos ovos se encontra neste local. O albúmen, em geral, apresenta baixa contaminação microbiana, pois contém fatores antimicrobianos como a lisozima, coanoalbumina, ovomucoide, avidina e riboflavina, além da ovotransferrina, que o torna deficiente em ferro desfavorecendo a proliferação de micro-organismos dependentes deste mineral para seu crescimento (Board e Tranter, 1995; Johnson, 2015).

A lisozima pode ser usada como conservante de alimentos já que ela apresenta atividade contra a formação de esporos de bactérias mesófilas e termófilas (Anton et al.,

2006). A lisozima lisa a parede de bactérias Gram-positivo, sendo a principal responsável pela proteção dos ovos contra este tipo de bactéria (Board, 1966).

A ovoalbumina serve como fonte de aminoácidos para o desenvolvimento embrionário, enquanto a ovomucina representa ação inibidora de proteases no ovo e age bloqueando a ação de micro-organismos (Johnson, 2015).

As membranas internas da casca possuem espessura de aproximadamente 50 a 70 μm . A membrana externa possui 15 a 25 μm e penetra nos cones mamilares. As membranas são produzidas na região proximal do istmo em um processo que dura uma a duas horas. As membranas são constituídas de uma mistura de proteínas com ligações derivadas de dissulfeto e lisina. Elas são semipermeáveis à passagem de gases, água, mas não permitem a passagem do albúmen e a sua espessura reduz proporcionalmente com a idade da galinha e com o período de incubação (Johnson, 2015).

A casca dos ovos se forma por precipitação controlada de carbonato de cálcio nas fibras da membrana externa. Quando completa, a casca dos ovos é observada como uma estrutura bem definida que segue a seguinte ordem do interior para o meio externo: corpo mamilar, camada paliçada (mais grossa da casca), camada de cristal vertical e cutícula (fina camada que reveste a casca) (Hincke et al., 2012).

Por último, ocorre a deposição da cutícula que serve como barreira impermeabilizante para a casca, funcionando como proteção primária contra a entrada de fungos e bactérias (Board e Halls, 1973). A cutícula é depositada na superfície mineral da casca, momento antes da postura do ovo e é caracterizada por um complexo orgânico lubrificante. Ela é constituída primariamente por proteínas associadas a uma porção de polissacarídeos e lipídios (Sparks, 1994). Esta camada (barreira física) previne a entrada de micro-organismos. Além disso, Wellman-Labadie et al. (2008) encontraram na cutícula atividade enzimática de lisozima e presença de proteínas antimicrobianas que confirmaram sua importância como agente antibacteriano.

1.1 Formação e ultraestrutura da casca dos ovos

A casca dos ovos foi modificada ao longo da evolução com o objetivo de resistir aos desafios do meio e suprir nutricionalmente e metabolicamente os embriões. O ovo das aves pode ser considerado o mais avançado dentre os ovíparos vertebrados. A casca é complexa e permite a troca de gases e água com o meio (Hincke et al., 2012).

Os primeiros passos na mineralização da casca se iniciam quando o ovo sai do istmo e entra na glândula da casca. Um conjunto de agregados orgânicos é depositado na membrana externa, esses locais posteriormente darão origem aos botões mamilares (Nys et al., 2004). Os mecanismos que impedem a calcificação em direção à membrana interna ainda não são bem compreendidos. Uma das hipóteses é que o colágeno tipo X seja capaz de prevenir a calcificação (Arias et al., 1993).

A casca é composta por 96% de carbonato de cálcio. Os componentes restantes incluem matriz orgânica (2%), magnésio, fósforo e uma variedade de oligoelementos (Nys et al., 2004). A casca do ovo exhibe mistura intermitente de fases orgânicas e inorgânicas (Hincke et al., 2012).

As camadas da casca são compostas por membranas, camada mamilar (aproximadamente 100 μm), camada paliçada (aproximadamente 300 μm), cristal vertical (3 a 8 μm) e cutícula (0,5 a 12,8 μm), incluindo dados de ovos de outras espécies de aves) (Samiullah e Roberts, 2014). Nos ovos de galinhas a espessura da cutícula é de aproximadamente 1 μm (Wellman-Labadier et al., 2008) (Figura 1).

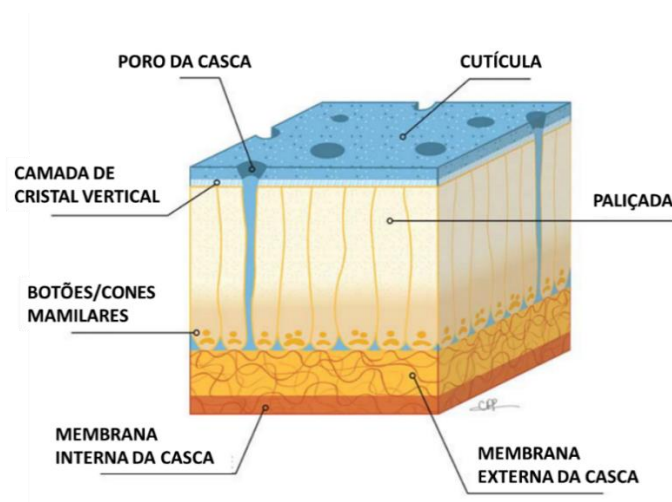


Figura 1: Principais características morfológicas da casca de ovos de galinha. Adaptada de Hincke et al., 2012.

A camada mamilar é uma matriz regular de cones ou botões, cada um com um núcleo de material orgânico concentrado descrito como mucopolissacarídeo neutro e contém sulfato de queratano. As fibras individuais da membrana externa da casca são incorporadas aos botões mamilares. Nessa camada está presente a reserva de cálcio que facilita a dissolução do mineral e a mobilização de cálcio para o embrião. Os cones mamilares são compostos de

cristais de calcita de tamanho pequeno e depositados sem orientação determinada (Hincke et al., 2012).

A camada paliçada é composta por grupos de colunas perpendiculares à superfície da casca e se estende para fora dos cones mamilares. Para finalizar, a camada de cristal vertical tem uma estrutura cristalina de densidade mais alta que a camada paliçada. Seu exterior possui grandes cristais e é resistente a impactos. Os poros que atravessam a casca permitem a difusão dos gases e do vapor de água. O material da cutícula atravessa o poro e preenche o espaço poroso superior (Hincke et al., 2012).

A deposição da casca do ovo ocorre em três etapas em um processo que dura quase 17 horas. Na primeira etapa, que tem cerca de cinco horas, ocorre o início da mineralização, os primeiros cristais de calcita depositam-se na superfície da membrana externa do ovo. Durante esta fase, o crescimento dos cristais de calcita é radial e os locais de nucleação dão origem aos cones mamilares. Na segunda etapa, o rápido crescimento da calcita forma a camada paliçada. Há uma deposição linear de carbonato de cálcio por cerca de 10 horas (Hincke et al., 2012).

A ultraestrutura das camadas pode ser parcialmente explicada por um modelo de competição de crescimento entre os cristais. O crescimento de cristais a partir do local de nucleação ocorre em todas as direções, mas, devido à competição pelo espaço, apenas os que crescem perpendicularmente à superfície do ovo ganham espaço. Este modelo explica a aparência de orientação preferida do cristal na parte externa da camada da casca do ovo e se baseia na hipótese de crescimento anisotrópico (inibição de crescimento de cristais nas faces paralelas ao eixo que resulta em alongamento do cristal de calcita). Outra hipótese que justifica a diferença de textura do mineral é a localização da osteopontina em faces específicas de cristal de calcita na paliçada (Hincke et al., 2012). A ultraestrutura é definida pelo tamanho dos cristais, sua forma e como eles são organizados e orientados (textura cristalográfica) (Rodriguez-Navarro et al., 2013).

A última etapa corresponde ao final da mineralização e dura aproximadamente uma hora e meia. A interrupção da mineralização ocorre em fluido uterino supersaturado de íons de cálcio e bicarbonato muito provavelmente devido a inibição por componentes de alto peso molecular, como os ânions de fósforo. O fósforo é detectado nas camadas superficiais da casca e cristais finos de hidroxiapatita, semelhantes a agulhas, são encontradas na camada calcificada mais externa (Hincke et al., 2012).

Os botões mamilares são compostos de cristais de calcita de tamanho pequeno. Na camada paliçada os cristais aumentam de tamanho progressivamente e alongam-se em direção à superfície do ovo. O tamanho dos cristais que compõem a casca do ovo aumenta da parte mais interna (20 μm) até a parte mais externa (80 μm) (Ruiz e Lunam, 2000).

A casca dos ovos, além de carbonato de cálcio, possui uma fina camada de hidroxiapatita presente na cutícula. A cutícula é então formada por uma parte calcificada e uma não calcificada depositadas diretamente sobre a camada de cristal vertical. Sua formação ocorre nas células secretoras não ciliadas que revestem o útero. A cutícula consiste principalmente de proteínas (> 85%) e possui duas camadas: a mais interna é mineralizada e apresenta vesículas contendo hidroxiapatita depositadas durante a fase final da calcificação da casca do ovo (terminação); e a mais externa que permanece não mineralizada (Solomon, 1991).

A cutícula pode estar sobreposta nos poros da casca, na qual a presença de aberturas radiais produz canais que permitem a difusão de gases. A parte não calcificada da cutícula é formada por glicoproteínas (90%), polissacarídeos (4%) e lipídios (3%), e a parte calcificada por cristais de hidroxiapatita (3%). Existem mais de 800 tipos de proteínas na cutícula dos ovos, sendo a maior parte insolúvel em água. Os aminoácidos ácido glutâmico e a glicina são os mais presentes (Fernandez et al., 2001).

A cutícula tem a função de lubrificação facilitando a rotação dos ovos no útero e desempenha papel importante na finalização da deposição de cristais de cálcio durante a formação do ovo. Além disso, outra função marcante da cutícula é a proteção contra a entrada de micro-organismos (Samiullah e Roberts, 2014).

Na maioria das vezes, a cutícula não reveste 100% da casca dos ovos como já foi observado por microscopia eletrônica, podendo estar intacta ou até ausente em diferentes porções. Em ovos recém-postos, a cutícula se apresenta mais completa e vai deteriorando-se à medida que o ovo é exposto às diferentes condições ambientais (Samiullah e Roberts, 2014).

2. Microbiologia dos ovos

Muitos estudos comprovaram que existe uma grande variação nos níveis de contaminação da casca dos ovos. A população varia de algumas centenas até milhões de bactérias. Com exceção dos ovos com a casca visivelmente suja, o nível de contaminação

não está relacionado com a aparência da casca. A média de diâmetro de células bacterianas é de 0,5 µm a 1,0 µm. Os poros dos ovos de galinha apresentam diâmetro de 17 µm, e a casca contém cerca de 10.000 poros (Board e Tranter, 1995).

Em condições naturais, a superfície dos ovos abriga uma microbiota de bactérias e fungos que agem de forma funcional, protegendo os ovos/embriões da infecção de bactérias mais patogênicas (Cook et al., 2005).

A velocidade com que os micro-organismos penetram nos ovos está relacionada com a temperatura de armazenamento, a qualidade da casca, a idade dos ovos e o grau de contaminação. Estudos mostram que *Salmonella* Enteritidis pode migrar do albúmen para a gema em um dia, dependendo da temperatura de armazenamento e do nível de contaminação. A migração ocorreu em um dia a 30° C, mas não ocorreu até o 14° dia a 7° C (Jay, 2005).

Os ovos adquirem sua primeira carga microbiana durante a passagem pela cloaca da galinha, o que pode ser comprovado pela presença dos filos Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes no ceco de aves adultas (Wei et al., 2013) e na casca dos ovos (Olsen et al., 2017).

A microbiota da casca dos ovos é, na sua maioria, composta de bactérias Gram-positivo, que são micro-organismos deteriorantes. As bactérias Gram-negativo são melhor combatidas pelas substâncias antimicrobianas presentes nos ovos (Chousalkar et al., 2010).

Stepien-Pysniak (2010) encontrou a presença de bactérias Gram-negativo em 40,3% dos ovos analisados. A maior porcentagem de contaminação bacteriana foi observada na casca dos ovos. Foram 33 espécies de bactérias Gram-negativo encontradas sendo, *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens* dominantes no albúmen, enquanto *E. coli* e *Acinetobacter* spp. foram mais prevalentes na gema. Na casca dos ovos analisados, *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter* spp. e os gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* foram os dominantes. *Salmonella* foi isolada em 3,2% da casca dos ovos e *S. Enteritidis* foi isolada de 0,8% das gemas.

De Reu et al. (2006) avaliaram ovos com casca íntegra provenientes de aves de diferentes idades, inoculados com diferentes amostras de bactérias (*Staphylococcus warneri*, *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes* sp., *Serratia marcescens*, *Cornobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. e *Salmonella* Enteritidis) selecionadas do conteúdo de ovos comerciais e identificadas por sequenciamento de DNA. Todas as amostras foram selecionadas para a resistência à estreptomicina. Para visualizar a penetração das bactérias através da casca, o conteúdo do ovo foi drenado após a realização de um pequeno furo de 1cm². Em seguida,

foi adicionado a esses ovos ágar nutriente com estreptomicina, a fim de favorecer o crescimento apenas das bactérias desejadas. A abertura feita no ovo foi fechada com silicone comercial. As bactérias que penetravam o ovo alteravam a cor do meio. Tanto os ovos preparados com ágar nutriente quanto os ovos com seu conteúdo normal foram inoculados por imersão em solução salina tamponada com fosfato (PBS), contendo uma das bactérias selecionadas na concentração de $10^5 - 10^6$ UFC, resultando em 10^3 a 10^4 UFC da bactéria selecionada na casca. Os ovos foram analisados em diferentes períodos de armazenamento até 20 dias, a 20 °C e 60% de umidade relativa (UR). Os autores tinham como objetivo relacionar características do ovo como área de casca, espessura da casca, número de poros e deposição de cutícula com a entrada dos micro-organismos no seu interior. Concluiu-se que a área da casca e o número de poros não teve relação com a penetração das bactérias, porém, a deposição de cutícula está relacionada à penetração das bactérias estudadas para o interior dos ovos analisados. Todas as amostras de bactérias selecionadas foram capazes de penetrar nos ovos após aproximadamente cinco dias. Os primeiros micro-organismos a penetrarem pela casca foram: *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. e *Salmonella* Enteritidis. Os autores concluíram também que há uma associação entre os micro-organismos da casca e os micro-organismos encontrados no interior dos ovos.

Bactérias e fungos são os principais micro-organismos responsáveis pelas alterações físico-químicas observadas no ovo após a postura. Apesar da cutícula atuar como barreira contra micro-organismos, a ação glicolítica de algumas bactérias e fungos podem digerir as proteínas nela presentes. Entre as bactérias encontradas nos ovos é possível citar os seguintes gêneros: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* e *Staphylococcus*. Entre os bolores, estão os gêneros *Cladosporium*, *Hormondendron* *Mucor* e *Penicillium* (Jay, 2005).

A deterioração microbiológica dos ovos para consumo humano é estudada há muitos anos. A casca dos ovos pode ser facilmente invadida por micro-organismos instantes após a postura e esta é uma forma importante para a contaminação dos ovos. Contaminação por micro-organismos que causam deterioração não foi comprovada pela via congênita. É possível observar que uma alta incidência de deterioração ocorre em ovos coletados de locais contaminados. São necessários 20 dias entre a penetração da bactéria presente na casca e a presença de mudanças macroscópicas no albúmen, o que é atribuído pela proteção mecânica

oferecida pelas membranas da casca e, principalmente pelos fatores antimicrobianos presentes no albúmen (Board, 1966).

A forma mais comum de deterioração dos ovos é a putrefação. Manchas verdes são causadas por *Pseudomonas* spp., especialmente *P. fluorescens*. Putrefação sem cor por *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e outros gêneros. Manchas negras por *Proteus*, *Pseudomonas* e *Aeromonas*. Manchas rosas por *Pseudomonas*, manchas vermelhas por *Serratia* spp.; manchas tipo creme por *Proteus vulgaris* e *P. intermedium*. A deterioração por bolores normalmente aparece como manchas pontilhadas devido ao crescimento do micélio, *Penicillium* e *Cladosporium* estão entre as causas mais comuns. As bactérias também podem causar deterioração nos ovos dando aspecto de mofado, como *Pseudomonas graveolens* e *Preoteus* spp. (Jay, 2005).

Os principais patógenos associados à contaminação do ovo são *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Pullorum, *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolítica*. Entre os gêneros bacterianos mais envolvidos na deterioração desse alimento estão *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Proteus* *Pseudomonas* e *Serratia* (Aragon-Alegro et al., 2005).

Sabarinath et al. (2009), avaliando diferentes propriedades de galinhas de postura e ovos no supermercado do Canadá, observaram que os micro-organismos da família Enterobacteriaceae foram os mais comumente encontrados em todas as fontes estudadas, dentre eles *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. Além disso, em menor quantidade, foram encontradas também *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Cedecea*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella* e *Serratia*. Dentre as bactérias não entéricas, foram isoladas *Aerococcus*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*. Do total de bactérias isoladas nos ovos 54,4% encontravam-se nas membranas da casca e 45,6% na gema. Enterobactérias podem ser usadas para medir a qualidade do alimento e as suas condições sanitárias de processamento. A maioria dos organismos encontrados podem ser considerados apenas como patógenos oportunistas em humanos. Porém, outros como, *Salmonella*, *Enterobacter sakazakii* e *Aeromonas hydrophila*, encontrados pelos autores, são potencialmente patogênicos. O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos Gram-negativo não produtores de esporos e que costumam estar relacionados a surtos de infecção alimentar (Franco e Landgraf, 1996). Existe uma

preocupação constante com relação a presença de *Salmonella* em ovos de consumo sendo, portanto, um dos micro-organismos comumente analisados.

Os gêneros de bactérias considerados importantes como patógenos e deteriorantes encontrados na superfície dos ovos, segundo Neira et al. (2017), são *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Campylobacter*.

O consumidor consciente se preocupa com a qualidade do alimento sob dois aspectos importantes, o microbiológico e a contaminação química (Holt et al., 2011). No Brasil, a legislação prevê que ovos trincados devem ser destinados à pasteurização (Brasil, 2017) e os ovos podem ser lavados de forma mecanizada. Porém, o que acontece em alguns casos de surtos de salmonelose em humanos, é que a presença da bactéria ocorreu no interior do ovo e não somente na sua superfície externa. *Salmonella* pode ser considerada um dos agentes mais comumente envolvidos em surtos de infecção alimentar, principalmente *S. Enteritidis*. As galinhas são consideradas importantes reservatórios de *Salmonella* e, por isso, é necessário um rígido controle no plantel durante a recria e produção de ovos (Neira et al., 2017).

Salmonella pode entrar no conteúdo do ovo tanto durante a formação, ainda no oviduto da galinha (Okamura et al., 2001; Baron e Jan, 2011), quanto pela invasão através dos poros após o contato com excretas ou ambiente contaminado (Messens et al., 2005). A presença de *Salmonella* nas excretas está relacionada a sua capacidade de aderir as células intestinais das aves, sendo assim, a bactéria permanece nas instalações das aves de postura. Galinhas infectadas com altas doses de *S. Enteritidis* podem eliminar o agente nas excretas por meses. A forma como *Salmonella* contamina os ovos influencia seu potencial de multiplicação. A gema proporciona nutrientes em abundância para sua proliferação, porém as proteínas do albúmen possuem a capacidade de romper as membranas da bactéria. A manutenção dos ovos em baixas temperaturas durante o armazenamento pode reduzir a migração do agente para a gema e prevenir sua multiplicação (Gast, 2017).

Em uma revisão feita por Holt et al. (2011), observou-se que a prevalência de ovos com *Salmonella* Enteritidis é esporádica e varia de 0,3% a 1,1% nos estudos analisados. Apesar de ser baixa, essa porcentagem no volume total de produção de ovos ainda pode ser considerada um risco, além disso, deve-se lembrar que as condições de higiene de coleta, processamento e forma de armazenamento também impactam fortemente na qualidade microbiológica dos ovos.

A incidência de *Salmonella* em humanos está intimamente ligada a prevalência de *S. Enteritidis* em ovos comerciais (Gast, 2017).

Chaemsanit et al. (2015) avaliaram a presença de bactérias em ovos coletados diretamente da granja, imediatamente após a postura, e ovos de supermercado (até quatro dias após a data de postura) e observaram 14 gêneros diferentes de bactérias incluindo *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e a espécie *Escherichia coli*. Na casca foi observado o predomínio de *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. A bactéria *Salmonella* spp. foi identificada em duas amostras estudadas, sendo uma da granja e a outra proveniente do supermercado. A contagem de micro-organismos aeróbios totais da granja variou entre 7,2 a 8,0 log UFC/mL, enquanto os ovos do supermercado apresentaram contagens de 2,9 a 6,2 log UFC/mL. Os autores concluíram que os ovos da granja estavam mais contaminados que os ovos do supermercado e atribuíram estes resultados ao processo de higienização feito após a postura.

Como foi possível observar, para analisar a qualidade microbiológica dos alimentos, são utilizados micro-organismos indicadores. Os micro-organismos indicadores fornecem informações sobre a contaminação, além disso, estas análises podem indicar a qualidade do processamento pelo qual o produto foi submetido. A contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos. Micro-organismos aeróbios precisam de oxigênio para produção de energia, os aeróbios mesófilos são capazes de se multiplicar entre 5° C e 50° C, sendo a temperatura ótima entre 25° C e 40° C. Esse grupo inclui a maioria dos contaminantes dos alimentos de origem animal (Franco e Landgraf, 1996). A família Enterobacteriaceae também pode ser usada como indicador de segurança dos alimentos, e é muito utilizada na avaliação da qualidade dos ovos. Esta família representa um total de 1,3% do total da microbiota de ovos (Moyle et al., 2016).

3. Análises microbiológicas dos ovos

3.1 Preparação das amostras

Para que os resultados da análise microbiológica sejam confiáveis, é necessário que os critérios de avaliação sejam claramente estabelecidos e estejam de acordo com as legislações vigentes de cada país. Sendo assim, deve-se estabelecer um plano de amostragem

definindo o número de unidades a serem analisadas, a definição dos micro-organismos que serão estudados e a metodologia analítica a ser adotada (Franco e Landgraf, 1996).

Antes de empregar o método de análise escolhido é importante ficar atento à obtenção correta de amostras, o transporte para o laboratório e preparação. A amostra obtida deve ser representativa e todos os dados importantes devem ser coletados (Franco e Landgraf, 1996). No caso dos ovos, além do número da amostra, é importante conhecer a propriedade e o sistema de produção, além da idade das aves, a nutrição e a linhagem. No transporte do produto, deve-se levar em conta se foi refrigerado ou não, o tempo que levará da coleta até a realização das análises e o método de preparação da amostra para análise.

A preparação da amostra a ser analisada, muitas vezes é um processo demorado e trabalhoso. Normalmente, a porção que será utilizada corresponde à uma alíquota da amostra total que precisa ser homogeneizada com diluente apropriado. Para a homogeneização da amostra com o diluente, o saco plástico estéril apropriado pode ser colocado em homogeneizador denominado *stomacher*, que é um instrumento constituído de duas pás que batem em um movimento de vaivém (Franco e Landgraf, 1996).

Para homogeneizar as amostras diferentes diluentes podem ser utilizados, por exemplo, o *Phosphate Buffered Saline* (PBS) e a água peptonada. Knappe et al. (2002) coletaram ovos de propriedades com diferentes sistemas de coleta e os acondicionaram em sacos plásticos contendo 50 mL de tampão fosfato salino (PBS). Em seguida retiraram 5 mL da amostra homogeneizada que foi colocada em tubo estéril para a realização das diluições. Andrade et al. (2004), para analisar o conteúdo dos ovos, coletaram os ovos com luvas, acondicionaram em sacos plásticos e transportaram em temperatura ambiente até o laboratório. Em seguida, os ovos foram pincelados com álcool iodado 2%, flambados, quebrados com uma pinça estéril. Após a quebra, clara e gema foram despejadas em béqueres esterilizados, em que se constitui cada amostra por três ovos. Uma alíquota de 25 gramas foi pesada e transferida para Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada a 1% e incubada a 37° C por 24 horas.

Sendo assim, é importante padronizar o método de preparação das amostras tendo em vista qual o interesse da análise, ajustando os preparos para avaliação na casca dos ovos ou no seu conteúdo.

A avaliação da qualidade microbiológica do ovo permite classificá-lo quanto às suas condições de coleta, processamento, armazenamento, embalagem, distribuição, sua vida útil e potenciais riscos à saúde humana. Os métodos tradicionais ou convencionais de análise

microbiológica foram desenvolvidas há muitos anos e vêm sendo empregados até os dias atuais com o auxílio de algumas técnicas novas que foram desenvolvidas para se tornarem mais precisas, exatas e rápidas (Franco e Landgraf, 1996; Jay, 2005).

3.2 Contagem padrão em placas (CPP)

A CPP é baseada na multiplicação microbiana, ou seja, na formação de colônias visíveis em meios de cultura sólidos que propiciam o crescimento de um determinado tipo de agente (Franco e Landgraf, 1996), o que não permite a determinação exata do número de micro-organismos presentes em um alimento (Jay, 2005). Os procedimentos para o método foram descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e *American Public Health Association* (APHA) (Maturin e Peeler, 2001). O sucesso para a identificação microbiológica pode ser determinado pela habilidade em cultivar os micro-organismos *in vitro*, nas condições que lhes forem proporcionadas (Amann et al., 1995).

O método CPP é o mais utilizado para determinar o número de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFC) em um alimento. Neste método, porções de amostras de alimentos são misturadas, homogeneizadas, diluídas serialmente em um diluente apropriado, plaqueadas sobre ou dentro de um meio ágar adequado, o qual é incubado sob temperatura apropriada e tempo determinado. Em seguida, é feita a contagem das colônias visíveis (Jay, 2005). Essa metodologia é certamente a mais utilizada nos laboratórios de análises de alimentos, pois diferentes grupos de micro-organismos podem ser enumerados de acordo com o meio de cultura e condições de incubação (Franco e Landgraf, 1996). Porém, não são todas as bactérias capazes de serem cultivadas, apenas uma fração limitada pode ser caracterizada e nomeada por este método (Fakruddin e Mannan, 2013).

De acordo com Maturin e Peeler (2001), para a realização do método CPP, é preciso realizar diluições decimais seriais com o auxílio de pipetas estéreis. Em seguida, é adicionado à amostra um meio nutriente, preferencialmente em duplicata. Para semear a amostra pode-se utilizar o método *pour-plate* ou *spread plate*. No plaqueamento em superfície, ou *spread-plate*, a amostra diluída é uniformemente distribuída na placa com ágar gelificado e com a superfície seca, enquanto o *pour-plate* coloca-se primeiro a alíquota da amostra e em seguida o meio de cultura (Jay, 2005).

Para realizar a contagem do crescimento microbiológico das placas, Maturin e Peeler (2001) sugerem uma adaptação do guia da APHA. Os autores propõem que sejam contadas as placas que contenham entre 25 e 250 colônias. Todas as colônias devem ser contadas.

Placas com mais de 250 colônias devem ser consideradas como incontáveis. A partir da contagem, os cálculos serão feitos com base nas diluições.

A interpretação dos resultados obtidos por este método pode estar sujeita a alterações que se devem a fatores como amostragem utilizada, distribuição dos micro-organismos na amostra, adequação nutricional do meio, pois o meio de cultura deve suprir as necessidades metabólicas dos micro-organismos, do plaqueamento empregado, temperatura e tempo de incubação, tipo de diluente utilizado, número relativo de organismos na amostra e existência de outros organismos competidores ou antagonistas (Jay, 2005). Apesar da simplicidade da técnica, muitas diluições podem ser necessárias para viabilizar a leitura dos resultados, além disso, essa leitura pode ser bastante imprecisa, mesmo quando contadores automáticos são utilizados (Franco e Landgraf, 1996).

Knape et al. (2002) utilizaram a técnica de plaqueamento *spread plate* para analisar a superfície da casca de ovos quanto ao número de micro-organismos aeróbios totais após a lavagem com produtos específicos e encontraram valores variando de 2,55 até 4,08 log UFC/mL. Com isso, os autores concluíram que o método de lavagem, a qualidade da água e os níveis de sanitizante na água podem interferir na qualidade microbiológica dos ovos.

Também analisando o número total de bactérias aeróbias, além das análises de coliformes, leveduras e bolores, Jones et al. (2015) utilizaram o método CPP para determinar as características microbiológicas da casca e do conteúdo dos ovos de diferentes sistemas de criação e em diferentes épocas do ano. Diante dos resultados, os autores concluíram que há interação das estações do ano com os sistemas de criação das aves alterando os níveis de contaminação da casca e do conteúdo dos ovos.

Samiullah et al. (2014) concluíram utilizando o método CPP que a contagem total de bactérias e de Enterobacteriaceae foi baixa na casca dos ovos de dois sistemas de criação, gaiola convencional e aves fora das gaiolas com acesso à piquetes (*free-range*) em diferentes idades. Os valores para contagem de aeróbios totais variaram entre 1,55 e 4,07 log UFC na casca dos ovos do sistema de gaiolas convencionais e de 2,50 a 4,39 log UFC na casca dos ovos do sistema *free-range*.

Vlcková et al. (2018) observaram 2,75 UFC/ovo de *Escherichia coli*, 1,11 log UFC/ovo de *Enterococcus* e 3,65 log UFC/ovo de número total de micro-organismos na casca de ovos do sistema de criação em gaiolas enriquecidas. Esses valores foram significativamente menores aos encontrados nos ovos de aves em *free-range* (4,51, 2,56 e 5,04 log UFC/ ovo para *E. coli*, *Enterococcus* e total de micro-organismos, respectivamente).

Para a análise do número total de micro-organismos foi utilizado o meio ágar padrão. Para contagem de *E. coli* foi utilizado o meio Mac-Conkey e para a contagem de *Enterococcus* foi utilizado o meio Slanetz Bartley.

3.3 Identificação de micro-organismos por métodos tradicionais

Na técnica de CPP somente células viáveis são contadas e as colônias isoladas e caracterizadas podem ser cultivadas em culturas puras para posterior identificação. Por muito tempo os métodos de identificação mais utilizados se baseavam na fisiologia do micro-organismo e nos testes bioquímicos realizados. Os ensaios bioquímicos geralmente são precedidos de coloração Gram que direciona o protocolo mais apropriado a seguir. Suspensões de células microbianas são então submetidas a reações bioquímicas a partir de substratos oferecidos e reagentes aplicados. O perfil de reação bioquímica é então comparado a uma base de dados, levando ao resultado de identificação (Franco e Landgraf, 1996).

Nas etapas de detecção, os testes bioquímicos utilizados apresentam características que nos permitem observar a mudança de pH e alteração de coloração dos meios de cultura, quando houver crescimento bacteriano. Diferentes sistemas de diferenciação por métodos bioquímicos são encontrados no mercado, alguns deles mais modernos e automatizados. Metodologias tradicionais para identificação de micro-organismos requerem muito tempo para obtenção de resultados. As indústrias de alimentos necessitam de resultados mais rápidos e mais confiáveis (Andrade et al., 2010).

Ensaio imunoenzimático (ELISA) também são utilizados com frequência, sendo que alguns destes ensaios são disponibilizados comercialmente em forma de *kits* prontos para o uso. Os *kits* possuem diferentes especificidades e sensibilidades na detecção de micro-organismos como *Salmonella* sp., por exemplo. Sendo assim, o teste de ELISA aparece como uma alternativa diagnóstica, entretanto, devido à ocorrência de divergências com outros métodos, esse teste diagnóstico ainda pode ser questionado (Andrade et al., 2010).

Para análise e identificação de *Salmonella*, é necessário seguir um esquema de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo da amostra. O pré-enriquecimento corresponde ao período de crescimento não seletivo que favorece a recuperação e multiplicação das bactérias viáveis presentes no alimento. No enriquecimento seletivo, a amostra contendo várias espécies, é cultivada em condições que favorecem o crescimento de uma determinada bactéria. Os caldos tetracionato, Rappaport-Vassiliadis e selenito-cistina são os mais

indicados para esta bactéria (Maturin e Peeler, 2001). Em seguida, é feito plaqueamento em meios de cultura apropriados e pode ser feita a confirmação por métodos bioquímicos e sorológicos.

Andrade et al. (2004) buscaram a identificação das bactérias, dentre elas *Salmonella*, pelo perfil bioquímico. Os autores examinaram ovos de galinha comercializados como “caipiras” de diferentes origens, com intuito de pesquisar o *status* microbiológico desses ovos. Primeiramente, foi feito pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, em seguida, uma alíquota dos caldos foi estriada em placas contendo diferentes meios. Diferentes colônias foram selecionadas, cultivadas e submetidas às provas bioquímicas. Micro-organismos com perfil bioquímico para *Salmonella* foram submetidos às provas adicionais como motilidade, fermentação de raminose, maltose e provas sorológicas. O perfil microbiológico encontrado pelos autores refere-se a micro-organismos que compõem a microbiota intestinal, tanto das aves como dos homens, assim como das mãos e do ambiente de criação. Das amostras analisadas, *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli* foram as mais prevalentes. A presença de *Salmonella* spp em ovos caipiras de pequenas criações de fundo de quintal, com caracterização antigênica *Salmonella* spp. e *Salmonella* Enteritidis foi de 1,48 % e 0,36 %, respectivamente, demonstrando controle não efetivo nessas criações.

3.4 Identificação de micro-organismos por técnicas moleculares

Os métodos moleculares se tornaram dentro de muitos aspectos mais importantes que os bioquímicos clássicos e de cultivo à medida que mais micro-organismos de origem alimentar podem ser classificados pela análise dos ácidos nucleicos (Jay, 2005).

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) não depende de cultivo e foi desenvolvida por Saiki em 1985 e, principalmente por Mullis em 1987. A PCR consiste na capacidade de transformar uma molécula de material genético de DNA em bilhões de moléculas semelhantes pela ação da enzima DNA polimerase. Para que ocorra a amplificação, com a síntese de novas fitas de DNA, são necessários alguns reagentes e à combinação adequada de temperatura e de tempo. A dificuldade está na natureza da molécula de DNA que é uma cadeia composta por quatro nucleotídeos: adenina, tiamina, guanina e citosina. A sequência dessas bases tem a informação genética (Mullis, 1990).

A habilidade de detectar e identificar a molécula de ácido nucleico dos micro-organismos pela técnica de PCR foi um avanço importante para a detecção rápida de

bactérias (Fenollar e Raoult, 2004). Com a finalidade de se obter amostras de DNA adequadas para a amplificação, o primeiro passo necessário é realizar a extração do DNA de forma correta.

Após a extração, a multiplicação é exponencial e ocorre pela ação de uma enzima que, tendo um segmento de DNA de fita simples como molde, é capaz de construir a fita complementar deste segmento, pela polimerização de nucleotídeos adicionados ao sistema (Fenollar e Raoult, 2004).

Cada ciclo realizado em um termociclador envolve três passos: desnaturação, anelamento e extensão. No primeiro passo ocorre a desnaturação do DNA e separação em fitas simples, pelo aquecimento da molécula até 94° C. Na segunda fase, o anelamento, a temperatura é reduzida (54° C) e cada *primer* se encaixa nas respectivas sequências complementares à região-alvo da amplificação. E, finalmente, a etapa de polimerização ou extensão com a formação da fita complementar, quando a solução é novamente aquecida. Nesta etapa, a enzima Taq DNA polimerase se posiciona junto aos *primers* que se anelaram anteriormente e uma nova fita se inicia. Sintetizada a primeira cópia, o processo recomeça podendo ser amplificado até 10^7 moléculas depois de uma série de ciclos de amplificação. Dessa maneira, são formadas novas fitas de DNA de dupla hélice, correspondente a região-alvo de amplificação (delimitada pelos *primers*) (Franco e Landgraf, 1996; Jay, 2005; Oliveira et al., 2007).

O DNA amplificado é detectado por meio de utilização de gel de agarose (polissacarídeo natural) ou poliacrilamida (matriz sintética), a partir do princípio de que o DNA é carregado negativamente e suas moléculas migram para o polo positivo do eletrodo quando colocado em um campo elétrico. A proporção de carga para massa no DNA é uniforme e, portanto, todos os fragmentos de DNA lineares possuirão as mesmas propriedades eletroforéticas quando submetidas à corrente elétrica em um meio sem resistência. O gel de agarose é um meio efetivo e de baixo custo que permite a separação do DNA de acordo com seu tamanho e conformação (Viljoen et al., 2005).

Com os avanços das técnicas moleculares, o pequeno gene da subunidade 16S do ribossomo (16S rRNA) passou a ser usado como marcador genético. Ele é altamente conservado entre diferentes espécies de bactérias e possui regiões hipervariáveis que são usadas para identificar diferentes micro-organismos. Com a técnica de PCR, os fragmentos do gene 16S rRNA podem ser selecionados e amplificados a partir do DNA (Amann et al., 1995).

Para a detecção de diferentes gêneros de bactérias é necessária a utilização do gene 16S rRNA. O DNA amplificado utilizando esta abordagem de amplo espectro permite a identificação do micro-organismo pela comparação com um banco de dados (Fenollar e Raoult, 2004).

Nas análises microbiológicas dos ovos, a técnica de PCR pode ser utilizada. Hutchinson et al. (2004) avaliaram os riscos envolvidos na lavagem de ovos comerciais. Os ovos foram inoculados com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium assim que foram postos e, em seguida, lavados com uma solução clorada e desinfetante a base de amônia quaternária e surfactantes não iônicos, utilizando um procedimento considerado ideal e um procedimento estabelecido pelos autores com desvios de concentração de sanitizante e temperatura. Os ovos foram analisados em sua superfície e conteúdo e a presença de *Salmonella* foi avaliada presuntivamente por testes bioquímicos e ampliação do DNA *fingerprinting*. Finalmente, as amostras avaliadas presuntivamente anteriormente foram analisadas por amplificação randômica de DNA polimórfico. Os autores observaram que o processo feito em condições não adequadas de temperatura, tempo e qualidade do sanitizante pode prejudicar a qualidade dos ovos e favorecer a entrada de patógenos devido aos danos causados à cutícula do ovo.

A técnica da PCR também foi utilizada por Chousalkar et al. (2010) para analisar a presença de genes específicos de *E. coli* na casca, na parte da interna da casca e no conteúdo dos ovos. Primeiramente, foi realizado o isolamento da bactéria e, presuntivamente, a seleção das colônias para posterior identificação. Os *primers* escolhidos para a reação continham a sequência definida para duas enterotoxinas (A e B) e para colicina V. Dos 500 ovos analisados, foi encontrada *E. coli* na casca de 35 ovos e na parte interna da casca de dez ovos. A bactéria não foi isolada do conteúdo interno dos ovos analisados. Das amostras isoladas, apenas quatro provenientes da casca foram positivas para a enterotoxina A. A enterotoxina B e a colicina V não foram observadas. Segundo os autores, a posse de um único ou de alguns genes de virulência não confere uma amostra o *status* patogênico, a menos que essa amostra tenha adquirido a combinação adequada de genes de virulência para causar doença em uma espécie hospedeira específica.

3.5 Identificação de bactérias por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF)

Para agilizar a identificação e a classificação de micro-organismos, novas técnicas estão surgindo, uma delas é a espectrometria de massas, que se baseia no estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. O espectrômetro de massa engloba uma fonte de ionização, o analisador de massas, o detector e um sistema de aquisição e análise de dados (Aebersold e Mann, 2003).

Para a análise de espectrometria de massa, uma das técnicas que podem ser utilizadas para sublimar e ionizar a amostra é o MALDI, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, que se refere ao processo de ionização a laser assistida por matriz. O MALDI consiste na fonte que gera íons em fase gasosa a partir de moléculas em fase sólida, líquida ou gasosa. Ele é acoplado a um analisador de massas que realiza as medições pela formação de íons em fase gasosa, ou seja, o analisador de massa separa íons de acordo com a relação massa/carga (m/z). Há vários tipos de analisadores de massas, normalmente acoplado ao MALDI encontra-se o TOF (*time-of-flight*), que se refere ao tempo de voo, ou seja, é medido o tempo do voo da amostra ionizada no tubo com vácuo, até que atinja o detector, baseado no princípio de que diferentes massas e cargas adquirem diferentes velocidades de voo (Aebersold e Mann, 2003). Geralmente, o TOF-MS possui transmissão muito alta, faixa de massa ilimitada e baixa resolução de massa (Tanaka et al, 1988). A medida da relação massa/carga é dada após a ionização e dessorção da amostra e sua aceleração por um campo elétrico dentro de um tubo de vácuo que a separa em função da sua massa molecular (Assis et al., 2011) (Figuras 1 e 2).

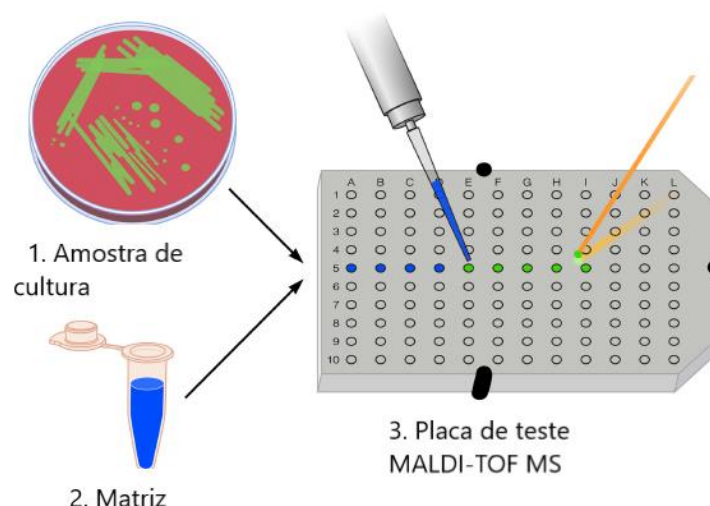


Figura 2. Representação esquemática da ionização da amostra. A amostra é depositada sobre uma placa juntamente com a solução da matriz ocasionando a ionização. O laser dispara pulsos de luz que serão absorvidos pela matriz provocando o processo de dessorção da matriz e da amostra. Adaptado de Clark et al. 2013.

A matriz, constituída de um ácido orgânico, é essencial para a ionização bem-sucedida da amostra, uma vez que ela atua como fornecedora de próton e absorve a energia emitida pelo laser. A irradiação do feixe de laser atua por um curto período para evitar danos ou degradação da amostra, além disso um atenuador de feixe é empregado. A interação entre os fótons da molécula do laser e da matriz desencadeia a sublimação da matriz em fase gasosa, seguida pela ionização da amostra (Clarck et al., 2013).

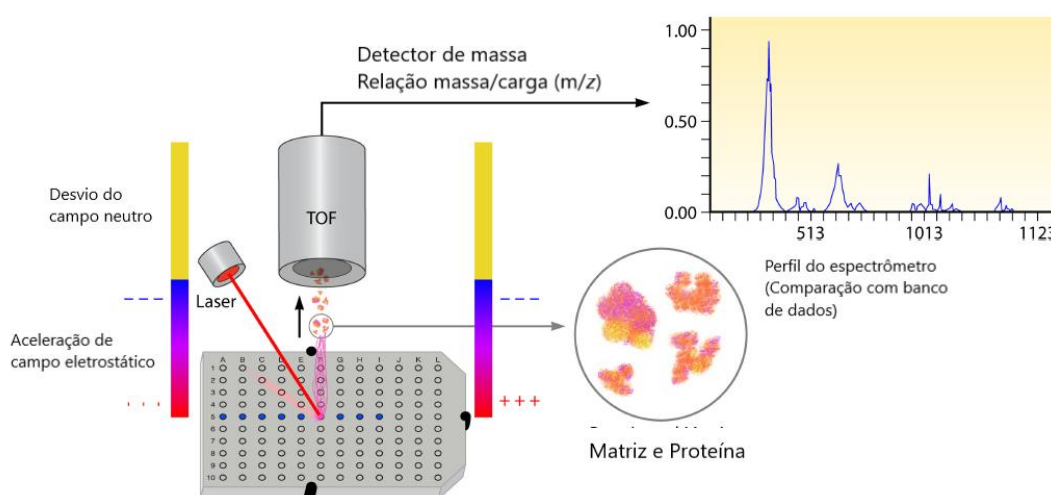


Figura 3. Análise do espectro formado por tempo de voo. Os íons gerados são separados com base na relação massa-carga no tubo de TOF e um espectro formado por esses íons é analisado por um software. O perfil é analisado pelo banco de dados de referência do aparelho. Adaptado de Clark et al. 2013.

De acordo com Lay (2001), o uso do MALDI para identificação de bactérias envolvia inicialmente a análise do RNA bacteriano. Atualmente, há muitos estudos que relatam a caracterização de proteínas específicas de diferentes micro-organismos. Os experimentos que visam a análise de proteínas bacterianas podem ser mais complexos devido a pequena quantidade de proteína presente ou porque a proteína alvo não é conhecida antecipadamente.

Apesar de existirem outros métodos conhecidos para identificação de bactérias, o MALDI-TOF/MS tem uma grande vantagem que é a rapidez e o baixo custo da análise (Aebersold e Mann, 2003; Assis et al., 2011; Lay, 2001;). Porém, para a obtenção dos resultados é necessário um banco de dados que contenha a identificação dos peptídeos das bactérias, conhecido como impressão digital de massa peptídica. Os bancos de dados são obtidos comercialmente, mas há a possibilidade de criação de bancos próprios com grande variedade de amostras. Outra desvantagem é a dificuldade de análise de micro-organismos com parede espessa como no caso de fungos filamentosos e micobactérias. Além disso, o método é incapaz de obter o perfil de resistência aos antimicrobianos das bactérias analisadas (Assis et al., 2011).

O tempo gasto para identificação bacteriana de uma cultura positiva pode variar entre 24 e 72 horas. No entanto, os avanços na espectrometria de massa na análise de proteínas estão abrindo novas perspectivas no campo da microbiologia diagnóstica (Emonet et al., 2010).

O método é dependente de cultivo, sendo assim, o micro-organismo pode ser cultivado em diferentes meios de cultura e o preparo da placa de MALDI-TOF pode ser realizado pela transferência direta de uma colônia de bactéria para a placa de análise do equipamento, ou após o processo de extração de proteínas utilizando etanol e ácido fórmico (Assis et al., 2011; Emonet et al., 2010).

O MALDI-TOF vem sendo utilizado com sucesso na rotina dos laboratórios para identificação de espécies bacterianas associadas a surtos de doenças infecciosas em humanos, por ser um método rápido e de boa acurácia ele pode ser considerado como uma alternativa aos métodos moleculares (Seng et al., 2013).

Karunarathna et al. (2017) utilizaram a técnica MALDI-TOF para a identificação de bactérias provenientes de ovos não eclodidos de três incubatórios no Canadá. De 889 colônias bacterianas submetidas a análise, 83,13 % foram identificadas ao nível de gênero e 67,15% ao nível de espécie e 16% das bactérias não foram identificadas. A maioria das

bactérias isoladas pertenciam ao gênero *Enterococcus* (29,71%) seguida do gênero *Escherichia* (19,46%). A espécie predominante de *Enterococcus* identificada foi *E. faecalis*. Também, neste trabalho foi realizada a comparação da técnica MALDI-TOF com a técnica de sequenciamento do gene 16s rRNA para 20 amostras, cujo resultado foi 100% de compatibilidade. O uso do MALDI-TOF para identificação de bactérias em ovos de consumo ainda não é uma prática rotineira.

4. Características microbiológicas de ovos de consumo provenientes de aves criadas em gaiolas

O sistema de criação pode influenciar as características microbiológicas dos ovos (Englmaierová et al., 2014; Samiullah et al., 2014). O uso e o desenvolvimento de diferentes sistemas de criação para poedeiras comerciais vem sofrendo mudanças ao longo dos anos. Com o avanço da genética que transformou aves menos produtivas em híbridos, a indústria da postura de ovos evoluiu juntamente com o uso de gaiolas. A racionalização da produção com a automatização de alimentadores e a remoção de esterco com esteiras reduziram drasticamente a mão-de-obra e favoreceram a produção em larga escala. Em contrapartida, dificultaram o processo de limpeza e sanitização que podem acabar favorecendo a permanência de algum micro-organismo no ambiente de criação das aves (Tauson, 2005).

A criação em gaiolas apresenta vantagens quando comparada aos sistemas alternativos de criação, pois as aves não entram em contato com suas excretas o que diminui o risco de contaminação e transmissão de doenças (Duncan, 2000). Além disso, o sistema de criação em gaiolas proporciona bons resultados econômicos. A mortalidade em granjas de gaiolas convencionais, sem problemas sanitários, é de aproximadamente 0,1 a 0,2% por semana. Quando se compara a mortalidade em gaiolas enriquecidas, criação no piso e sistema *free-range*, o sistema de criação em gaiolas apresenta a menor mortalidade (Lay Jr. et al. 2011).

No Brasil, a criação em gaiolas constitui o sistema predominante de criação de poedeiras comerciais. A criação de aves em gaiola permite maior controle da produção, bem como otimiza a distribuição da ração, a aplicação de vacinas e medicamentos. Quanto ao espaço disponível para cada poedeira alojada em gaiola, no Brasil, utiliza-se área 350 a 450 cm² por ave, esses valores podem apresentar alterações de acordo com os manuais de linhagem e decisões da própria unidade produtora.

A densidade de alojamento nos Estados Unidos e Ásia é de aproximadamente 400 cm² por ave, enquanto na Noruega o espaço chega a 700 cm² por ave. Fatores como tamanho do grupo, número de andares de gaiolas, conformação das gaiolas e forma de coleta de ovos variam bastante em diferentes regiões do mundo, devido a diretivas nacionais, condições ambientais, custo dos equipamentos, alimentação e mão-de-obra (Tauson, 2005). Na União Europeia a criação em gaiolas está proibida desde 2012 (Diretiva 1999/74/CE) e a adoção de sistemas alternativos se tornou obrigatória. Hoje, mais da metade dos ovos vendidos nos supermercados de países europeus, são produzidos por galinhas alojadas em gaiolas enriquecidas.

De Reu et al. (2008) preconizaram que a contaminação de até 5 log UFC/ovo é aceitável como parâmetro de qualidade higiênica, sendo assim, os ovos provenientes do sistema *free-range*, que apresentaram a maior contagem de bactérias totais (6,24 log UFC/ovo), podem ser considerados de maior risco.

Neira et al. (2017) compararam a microbiologia dos ovos provenientes dos sistemas de criação gaiola convencional e *free-range*. Em ambos os sistemas, o filo Firmicutes foi o mais prevalente, representando 50% do total dos filos encontrados na casca dos ovos. No sistema de criação em gaiola, os outros filos encontrados foram Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria, nas porcentagens 16%, 12%, 10% e 6%, respectivamente. No sistema *free-range*, Fusobacteria e Proteobacteria foram os menos prevalentes (0,5% e 4%, respectivamente), enquanto Bacteroidetes e Actinobacteria tiveram as porcentagens de 28% e 17%, respectivamente. Os autores identificaram diversas famílias como Clostridiaceae, Bacteroidaceae, Lachnospiraceae e Ruminococcaceae que são frequentes na microbiota intestinal das aves. Porém outras famílias como Coriobacteriaceae, Corynebacteriaceae, Fusobacteriaceae, Porphyromonadaceae e Pasteurellaceae foram identificadas pela primeira vez na superfície dos ovos.

As diferenças entre a contagem total de bactérias na casca e no conteúdo dos ovos, além da presença ou ausência de bactérias patogênicas como *Salmonella*, podem ser atribuídas não somente ao sistema de criação como aos métodos de higiene estabelecidos na propriedade e a frequência de limpeza e sanitização das instalações.

5. Lavagem e sanitização dos ovos

A lavagem era antigamente considerada uma prática importante para a segurança dos ovos e surgiu originalmente com o objetivo de ser utilizada em ovos sujos (tipo B). A partir de 1919, foi observado que ovos lavados apresentavam pior qualidade com o passar do tempo, sendo assim, concluiu-se que a lavagem de ovos sujos causava deterioração do conteúdo quando os ovos eram armazenados por mais dias. No final da década de 1940, a lavagem de ovos passou a ser largamente utilizada e as máquinas utilizadas para o processo se modernizaram reduzindo a possibilidade de contaminação e quebra de ovos. No Japão, em 1990, os ovos passaram a ser lavados em resposta a crescente preocupação com *Salmonella* (Messens, 2011).

Bactérias são menos propensas a atravessar a casca dos ovos na ausência de água. A presença de água pode ser um fator determinante na contaminação do conteúdo dos ovos por excretas, por exemplo. Quando se avalia o ovo imediatamente após a postura, a cutícula está úmida e a temperatura dos ovos é de aproximadamente 42°C, conseqüentemente, mais quente que o ambiente. O resfriamento faz com que o conteúdo interno contraia, causando uma pressão negativa dentro do ovo. Essa diferença de pressão é equalizada puxando o ar (ou água) da superfície externa da casca para o interior do ovo. A sucção ajuda na passagem de bactérias presentes na superfície através dos poros (Hutchinson et al., 2003).

O tempo decorrido entre a postura dos ovos e sua lavagem é um dos fatores mais importantes para a eficácia do processo. Este período pode variar consideravelmente dependendo do manejo da propriedade. A lavagem dos ovos antes da secagem completa da cutícula pode representar um grande risco à contaminação dos ovos, porém, isso dificilmente ocorre na prática, já que a cutícula seca imediatamente após a postura em condições de criação normais. Em países onde a lavagem de ovos de consumo é permitida, o processo normalmente é feito até 24 horas após a postura (Messens, 2011).

A observação de maior deterioração de ovos após a lavagem, principalmente com o uso de desinfetantes ou sanitizantes pode estar relacionada a degradação da cutícula. Favier et al. (2001) avaliaram a ação de diferentes sanitizantes e surfactantes e observaram que pode ocorrer interação dos produtos com a cutícula causando desnaturação das proteínas e perda de sua integridade.

Por outro lado, Leleu et al. (2011) observaram que a lavagem realizada sob condições ideais pode não apresentar degradação significativa da cutícula em ovos de galinhas velhas.

Os autores analisaram a ultraestrutura da casca de ovos brancos e marrons após passarem por todo o processo de lavagem e caracterizaram a cutícula de acordo com sua cobertura, presença de danos mecânicos, presença de detritos na superfície e exposição dos poros da casca. A cobertura uniforme pela cutícula estava presente em uma minoria dos ovos, independentemente da lavagem, o que se justifica, segundo os autores, pela idade avançada das aves. A maioria dos ovos tinha cobertura desigual ou muito desigual da cutícula. A presença de poros expostos, em decorrência da remoção de cutícula, não se mostrou influenciada pela lavagem neste estudo.

A fim de avaliar os efeitos da lavagem e da temperatura de estocagem sobre os parâmetros de qualidade dos ovos, Liu et al. (2016) observaram que a lavagem reduziu a área da casca coberta pela cutícula, e concluíram que a manutenção da cutícula é essencial durante o armazenamento dos ovos.

A lavagem dos ovos deve fazer parte de um processo contínuo e deve ser realizada antes das operações de classificação e embalagem. O processo consiste em quatro etapas: umedecimento, lavagem, enxague e secagem. A primeira etapa tem o objetivo de suavizar a presença de detritos e é feita através da aspersão de água aquecida. Na segunda etapa, enquanto os ovos estão girando sobre a máquina, a água aquecida em combinação com as escovas promove a lavagem dos ovos. As escovas normalmente podem ser reguladas de acordo com o tamanho dos ovos e, para facilitar a higienização, algumas máquinas são projetadas para que as escovas sejam removidas. Em média, o tempo para completar esta etapa dura 60 segundos. Na água de lavagem podem ser adicionados produtos químicos considerados seguros como sanitizantes a base de cloro ou amônia quaternária. O enxague é importante para remover algum detrito restante e o resíduo dos produtos químicos. Nesta etapa, a água utilizada também deve ser aquecida. Para finalizar, os ovos devem ser completamente secos para evitar o crescimento de fungos e bactérias (Messens, 2011).

Apesar da possibilidade de danos à cutícula dos ovos no momento da lavagem, muitos países já adotaram o processo como Estados Unidos, Austrália e Japão. Na União Europeia a lavagem é permitida para ovos da categoria B (Hutchinson et al., 2004). Nos Estados Unidos há regulações específicas para a descontaminação da casca dos ovos. São obrigatórias medidas capazes de prevenir *Salmonella* Enteritidis nas granjas e durante o transporte e armazenamento (FDA, 2009).

No Brasil a lavagem é permitida, porém, não obrigatória, e deve ser feita com os seguintes critérios: deverá ser realizada totalmente por meios mecânicos com procedimentos

que impeçam a penetração microbiana no interior do ovo, em sistema devidamente aprovado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF); a água utilizada para a operação de lavagem de ovos deverá ser renovada de forma contínua, não sendo permitida, desta forma, a recirculação da mesma, sem que passe por sistema de recuperação adequado e que permita seu retorno à condição de potabilidade; o equipamento de lavagem de ovos deverá ser higienizado ao final de cada turno de trabalho (quatro horas) ou quando se fizer necessário; a operação de lavagem deverá ser contínua e completada o mais rápido possível, não se permitindo equipamentos de lavagem de ovos do tipo de imersão; os ovos devem ser secados rapidamente após serem lavados; o local onde se encontra o equipamento de lavagem deve ser totalmente livre de odores estranhos; recomenda-se que a água de lavagem de ovos em natureza seja mantida em temperaturas de 35° à 45° C, observando-se que a temperatura da água deve ser pelo menos 10° C superior a temperatura dos ovos a serem lavados (Brasil, 1990).

A desinfecção (destruição de fungos e bactérias) ou sanitização (redução da quantidade de micro-organismos críticos para a saúde pública em níveis considerados seguros) pode ser utilizada sobre a casca de ovos. Para atingir níveis adequados de sanitização é necessário aplicar produtos corretamente registrados em concentrações adequadas e por um tempo específico (Rehs, 2001).

A sanitização dos ovos é importante tanto para os ovos de consumo quanto para os ovos férteis. Diferentes sanitizantes são comumente usados como por exemplo, derivados do cloro, amônia quaternária, carbonato dissódico, solução de sulfato de zinco, produtos da ação de peroxidase, água eletrolisada e formaldeído. Além do método químico de sanitização, outros métodos também podem ser utilizados como radiação UV, ozônio, ar quente, luz pulsada, dentre outros (Park et al., 2005; Turtoi e Borda, 2014).

A lavagem feita em condições inadequadas pode oferecer risco à qualidade dos ovos. Hutchinson et al. (2004) avaliaram os riscos envolvidos na lavagem de ovos comerciais. Quando o processo foi feito em condições não adequadas de temperatura (água de lavagem abaixo de 34° C), houve prejuízo da qualidade dos ovos e favorecimento da entrada de patógenos devido aos danos causados à cutícula do ovo. O processo sendo realizado rapidamente, e em condições ideais, pode ser capaz de evitar a entrada de *Salmonella* nos ovos. Também avaliando o processo de lavagem e sanitização com hipoclorito (200 ppm), Gole et al. (2014) não observaram diferença significativa sobre a sobrevivência de *S. Typhimurium* inoculada artificialmente na casca dos ovos. Além disso, os autores

identificaram maior penetração de *Salmonella* da casca para o conteúdo nos ovos lavados quando comparados aos não lavados.

Para que o processo de sanitização dos ovos seja satisfatório é importante controlar todo o processo, desde a coleta até a embalagem dos ovos para a comercialização. Musgrove et al. (2005) avaliaram a casca de ovos em diferentes pontos do processamento para os seguintes parâmetros: micro-organismos aeróbios, leveduras e bolores, enterobactérias, *E. coli* e *Salmonella* em três propriedades comerciais diferentes. Para todas as populações, a contagem foi superior na casca dos ovos avaliados nos aparadores (dentro do galpão). Houve redução de micro-organismos aeróbios, leveduras e bolores, enterobactérias e *E. coli* no decorrer do processamento dos ovos em todas as plantas avaliadas. Os autores questionaram o uso do sanitizante no processamento dos ovos, já que não houve redução expressiva da contaminação dos ovos que foram somente lavados para os que foram sanitizados. No início do processo 7,8% das amostras foram positivas para *Salmonella*, enquanto apenas 1,1 % foram positivas no fim do processo.

Stringhini et al. (2009) avaliaram as características microbiológicas de ovos lavados e não lavados em quatro propriedades, duas que realizavam lavagem (granjas 1 e 2) e duas que comercializavam ovos sem lavagem (granjas 3 e 4). Na granja 1, a lavagem era feita com água aquecida adicionada de hipoclorito de cálcio 65% e, na granja 2, com água aquecida e clorexidina 20%. A contagem de aeróbios mesófilos foi menor nos ovos lavados das duas propriedades, sendo a lavagem com clorexidina 20% ainda mais eficiente. As contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos nas granjas 3 e 4 foram indicativas de processamento insatisfatório. Foi observada presença de *Staphylococcus* coagulase positivo em todas as granjas, nas granjas 1 e 2, isso pode ser justificado pela recontaminação após a lavagem.

Hannah et al. (2011) também observaram que a lavagem dos ovos favoreceu a redução de aeróbios totais da casca de ovos provenientes de galinhas alojadas em gaiolas e de ovos postos nos ninhos provenientes da criação em sistema *cage-free*.

Olsen et al. (2017) investigaram o impacto de processos específicos de sanitização na microbiota da casca de ovos férteis pelo método de sequenciamento do gene 16S rRNA. Os gêneros mais abundantes encontrados foram *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Psychobacter*, *Aerococcus*, *Pseudomonas*, *Turicibacteria*, *Salinococcus*, *Corynebacterium*, *Escherichia/Shigella*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Paracoccus*. Do filo Bacteroides: *Brachybacterium*, *Micobacterium*, *Blautia* e *Anaerosporobacter* pertencente

ao filo Firmicutes. O filo Firmicutes foi mais prevalente tanto entre o grupo de ovos visivelmente limpos quanto dos ovos visivelmente sujos. Os filios Bacteroidetes e Actinobacteria foram reduzidos significativamente após o processo de sanitização nos dois grupos de ovos (limpos e sujos).

5.1 Raios ultravioleta (UV)

Métodos químicos e térmicos são utilizados rotineiramente para a descontaminação de ovos, porém, altas temperaturas podem deteriorar os produtos e o uso de produtos químicos preocupa pela possibilidade de deixar resíduos ou apresentar toxicidade (Keklik et al., 2012).

No caso dos ovos, sabe-se que existe uma correlação entre a contaminação bacteriana da casca e a contaminação do conteúdo interno dos ovos. A sanitização da superfície pode ser uma forma de prevenir a deterioração do ovo e a proliferação de micro-organismos patogênicos. Porém, a cutícula é uma barreira importante que previne a entrada de micro-organismos e pode ser danificada nesse processo, sendo assim, a sanitização por ultravioleta pode ser uma alternativa de sanitização sem comprometer a cutícula (De Reu et al., 2006).

A luz ultravioleta tem ganhado espaço nos últimos anos devido ao seu baixo custo de utilização, facilidade de uso e alterações inexistentes ou insignificantes à qualidade dos alimentos. A luz ultravioleta já é comumente utilizada como método de sanitização em diversos produtos como ar, leite, água e carne (Wells et al., 2010).

A luz é gerada por lâmpadas de mercúrio de média pressão combinada com vapor de argônio e consiste em radiação eletromagnética com curva que vai de 100 a 400 nm. O espectro da luz ultravioleta é dividido em diferentes regiões: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm), UV-C (200-280 nm) e UV-vácuo (100-200 nm). A luz UV-C é germicida e causa mudanças fotoquímicas no DNA microbiano, o que eventualmente inativa os micro-organismos (Keklik et al., 2012).

Segundo Turtoi e Borda (2014), o tratamento com UVC em alta intensidade é capaz de reduzir a população bacteriana da casca dos ovos a partir de pouco tempo de exposição. A presença de *Salmonella* spp. também pode ser reduzida a partir do tratamento. Porém, a contaminação interna dos ovos não sofre efeito da radiação ultravioleta.

As reações fotoquímicas se iniciam quando fótons, ou partículas de luz, são absorvidas por átomos ou moléculas. Os elétrons dos átomos entram em estado de excitação após absorver a luz, o que promove a formação de novos produtos com estruturas químicas

diferentes. Em bactérias, a luz UVC induz a formação de dímeros de pirimidinas que inibem a formação de um novo DNA no processo de replicação de células (Keklik et al., 2012).

Porém, os danos causados nos ácidos nucleicos não matam completamente as células. Isso significa que apesar de não conseguirem se replicar, podem ser capazes de metabolizar e executar certas funções. Alguns dos danos ao ácido nucleico podem ser reparados por mecanismos enzimáticos dentro da célula. Após a reativação, os micro-organismos tornam-se patogênicos mais uma vez. Consequentemente, o tratamento UV deve fornecer um nível suficientemente alto de interrupção para garantir que o ácido nucleico seja danificado além do estágio em que pode ser reparado (Koutchma, 2009).

As aplicações dos efeitos germicidas da radiação ultravioleta podem ocorrer de três formas: (a) inibição de micro-organismos na superfície; (b) destruição de micro-organismos no ar e (c) esterilização de líquidos (Bintsis et al., 2000). Características do processo como a alta praticidade e baixo custo, aliadas à vantagem de não produzir resíduos químicos, co-produtos ou radiação ao final do processo conferem à luz UVC uma boa alternativa para sanitização de ambientes e produtos (Gottselig, 2011).

Para a segurança do tratamento de alimentos com radiação UV, a *Food and Drug Administration* (FDA) estipulou o uso de lâmpadas de mercúrio que emitem 90% de luz a uma onda de 253,7 nm (Keklik et al., 2012).

Um dos desafios com relação ao uso da técnica está associado a capacidade limitada da luz UV em penetrar os produtos, os micro-organismos localizados nos poros ou cavidades dos alimentos podem não ser expostos à luz (Keklik et al., 2012).

O comportamento da luz em alimentos depende das suas características ópticas, da duração da exposição, de intensidade e do espectro (Keklik et al., 2012). Chavez et al. (2002) avaliaram a exposição de ovos sobre a luz UVC, com intensidade de $7,35 \text{ mW/cm}^2$, em três períodos (15, 30 e 60 segundos). A contagem de micro-organismos aeróbios totais reduziu significativamente quando os ovos foram expostos por 30 e 60 segundos quando comparados aos ovos não tratados com a luz UVC.

De Reu et al. (2005) avaliaram o processo de sanitização de ovos por radiação UV em uma classificadora comercial. Os ovos foram expostos por dois períodos diferentes aos raios UVC (4-7 segundos e 8-18 segundos). Foram testados ovos com a casca aparentemente limpa, ovos sujos e ovos inoculados com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O menor período de exposição aos raios UV (4-7 segundos) foi capaz de reduzir a presença de bactérias nos ovos com a casca limpa. Porém, para os ovos visivelmente sujos, não houve

redução significativa da contagem de bactérias. Nos ovos inoculados, os dois períodos de exposição reduziram de forma semelhante e significativa a presença dessas bactérias. Portanto não as excluíram completamente e a contaminação interna dos ovos não foi controlada pelos tratamentos.

Em um experimento realizado em ovos férteis, Wells et al. (2010) concluíram que a exposição da casca à luz UVC (11 mW/cm^2) por 4, 8, 16 ou 32 minutos foi capaz de reduzir a contagem de micro-organismos aeróbios totais, sendo que a menor contagem foi obtida com o tempo de 16 minutos de exposição. Entretanto, a temperatura interna desses ovos aumentou significativamente o que pode prejudicar o desenvolvimento do embrião e sua qualidade, sendo assim, o tempo de exposição considerado ideal pelos autores seria de oito minutos, quando houve redução de $2,07 \text{ log UFC/ovo}$. Além disso, os autores concluem também que a associação de UVC com peróxido de hidrogênio apresentou a maior redução de bactérias da casca.

Pasquali et al. (2014) avaliaram o efeito do tratamento com UVC em uma máquina de processamento de ovos de consumo comercial com intensidade de 10 mW/cm^2 , por sete segundos, sobre a contagem de aeróbios totais da casca dos ovos. Houve redução da contagem de colônias entre os ovos antes e após o tratamento (de $3,29$ para $2,25 \text{ log UFC/g}$). Não foram observados efeitos na contagem de coliformes totais. Além disso, os autores detectaram redução de aproximadamente $2,0 \text{ log UFC/g}$ na contagem de micro-organismos aeróbios totais na casca dos ovos armazenados por 28 dias. Os autores concluíram que o tratamento com UVC foi eficiente para controlar a contagem de colônias na superfície dos ovos durante o armazenamento de 28 dias a uma temperatura de 21°C .

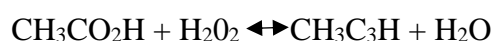
O uso de luz UVC (8 a 12 mW/cm^2) por cinco segundos associado ao peróxido de hidrogênio ($3,5\%$) apresentou a maior redução de aeróbios totais quando comparado aos tratamentos controle, cloro, amônia quaternária, ácido peracético e ácido peracético + UVC na casca de ovos tanto no dia da coleta quanto após 14 dias de armazenamento a 4°C (Al-Ajeeli et al., 2016). Clímaco et al. (2018) também encontraram redução significativa na contagem de micro-organismos aeróbios totais ao submeter ovos férteis à luz UV-C ($6,36 \text{ mW/cm}^2$), porém, o tempo de exposição foi de 60 segundos.

5.2 Ácido peracético

O ácido peracético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$) é uma solução em equilíbrio que consiste em peróxido de hidrogênio, ácido acético e água (Steiner, 1995). O ácido peracético (APA) é considerado

o componente ativo principal da solução. É um forte oxidante devido a uma série de reações que ocorrem durante a sua decomposição. Essa solução pode ser aplicada como desinfetante no setor de produção de alimentos e em ambientes de saúde, além disso, sua utilização em tratamentos de água e efluentes é destacada em diversas pesquisas (Stampi et al., 2001).

O APA é solúvel em água em qualquer proporção e sua forma em equilíbrio se apresenta como uma mistura contendo ácido acético, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e água de acordo com a equação (Kitis, 2004):



Sendo:

$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ = ácido acético

$\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$ = ácido peracético

H_2O_2 = peróxido de hidrogênio

O APA atua de forma mais potente contra micro-organismos quando comparado ao peróxido de hidrogênio. Porém, ele é menos estável. Uma solução de 40% perde de 1 a 2% de sua atividade por mês. Soluções diluídas de APA a 1% perdem metade de sua força por hidrólise em seis dias. Concentrações de 100 a 200 ppm são comumente utilizadas como sanitizantes. O APA não apresenta perigo de toxicidade ou outros perigos quando diluído em água até sua concentração eficaz como desinfetante (kitis, 2004). O APA pode agir em temperaturas que variam de 0 a 100° C. Porém, sua eficiência aumenta proporcionalmente à temperatura (Stampi et al., 2001).

Sua ação desinfetante se baseia na liberação de oxigênio ativo. É provável que as ligações sulfurosas das proteínas e outros metabólitos sejam oxidadas pelo composto, sendo assim vias bioquímicas essenciais são prejudicadas. O APA também pode atuar nas moléculas de DNA. O produto é mais eficiente em bactérias e menos eficiente em vírus e protozoários (Kitis, 2004).

Em 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA, 2004), aprovou a utilização deste composto na lavagem de ovos, carcaças, peixes e hortifrutícolas em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sem deixar resíduos no produto final.

O uso do APA foi capaz de reduzir a contagem de micro-organismos aeróbios totais presentes na casca dos ovos quando comparado aos ovos sem sanitização, porém, sua

atuação foi menos eficiente quando comparada a amônia quaternária, e associação de peróxido de hidrogênio + UVC (Al-Ajeeli et al., 2016). Em um estudo realizado por Clímaco et al. (2018), não foram observadas diferenças na contaminação da casca de ovos férteis após sanitização com APA (1300 ppm) nem para a contagem de micro-organismos aeróbios totais, nem para a contagem de Enterobactérias. Já Melo et al. (2019) utilizaram diferentes métodos de sanitização para ovos férteis, dentre eles o APA (3.000 ppm), observaram que ele foi capaz de reduzir a contagem de aeróbios totais na casca em 1,49 log UFC/mL e enterobactérias em 1,00 log UFC/mL.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Relatório anual, 2019. Disponível em: <<http://cleandrodias.com.br/wpcontent/uploads/2019/05/RELATO%20C3%ACRIO-ANUAL-ABPA-2019.pdf>> Acesso em: 15 nov. 2019.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature Pub.*, v. 422, p. 198-207, 2003.
- AL-AJEELI, M.N.; TAYLOS, T.N.; ALVARADO, C.Z. et al. Comparison of eggshell surface sanitization Technologies and impacts on consumer acceptability. *Poult. Sci.* v.95., p. 1191-1197, 2016.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, v. 59, n. 1, p.143-169, 1995.
- ANDRADE, M.A.; CAFÉ, M.B.; JAYME, V.S. et al. Avaliação da qualidade bacteriológica de ovos de galinha comercializados em Goiânia, Goiás, Brasil. *Cienc. Anim. Bra.*, v.5, n.4, p.221-228, 2004.
- ANDRADE, R.B.; GENELLI, T.; ONDER, L.P.D. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. *Arq. Inst. Biol.* v.77, n. 4, p.741-750, 2010.
- ANTON, M.; NAU, F.; NYS, Y. Bioactive egg components and their potential uses. *Worlds Poult. Sci.*, v. 62, p. 429-438, 2006.
- ANVISA. Relatório de Atividades 2008 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2009. 133 p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/institucional/anvisa/relatorios/relatorio_atividades2008.pdf Acesso: 28 ago. 2019.
- ARAGON-ALEGRO, L.C.; SOUZA, K.L.O.; SOBRINHO, P.S.C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de ovo integral pasteurizado produzido com e sem a etapa de lavagem no processamento. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 25, p. 618-622, 2005.

ARIAS, J.L.; FINK, D.J.; XIAO, S.Q. et al. Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *Int Rev Cytol*, v. 45, p. 217-250, 1993.

ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de micro-organismos. *Unincor*, v. 9, n.2, p. 344-355. 2011.

BARON, F.; JAN, S. Egg and egg product microbiology. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.*, p. 330-350, 2011.

BINTSIS, T. E.; LITOPOULOU-TZANETAKI, R.K.; ROBINSON. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. *J. Sci. Food Agric.*, v. 80, p. 637-645, 2000.

BOARD, R.G. Review Article: The course of microbiological infection of the hen's egg. *J. Appl. Bact.* V. 29., n. 2., p. 319-341, 1966.

BOARD, R.G.; HALLS, N.A. The cuticle: A barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. *Br. Poult. Sci.*, v.14, n.1, p.69-97, 1973.

BOARD, R.G.; TRANTER, H.S. The microbiology of eggs. In: STALDEMAN W.J.; COTTERILL, O.J. *Egg Science and Technology*. 4th. Binghamton: Food Products, 1995. p.81–104.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. Decreto n. 9.013/29 mar. 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal-RIISPOA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, Distrito Federal, Seção 1, p. 3.

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

CHAEMSANIT, S.; AKBAR, A. ANAL. A.K. Isolation of total aerobic and pathogenic bacteria from table eggs and its contents. *Food Appl. Bios. J.*, v. 3., p. 1-9, 2015.

CHAVEZ, C.; KNAPE, K.D.; COUFAL, C.D. et al. Reduction of eggshell aerobic plate counts by ultraviolet irradiation. *Poult. Sci.* v. 81, p. 1132-1135, 2002.

- CHOUSALKAR, K.K.; FLYINN, P.; SUTTHERLAND, M. et al. Recovery of *Salmonella* and *Escherichia coli* from commercial egg shells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. *Int. J. Food Microbiol.*, v.142, p.207-213, 2010.
- CLARK, A.E.; KALETA, E.J.; ARORA, A. et al. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.26, n.3, p.547-603, 2013.
- CLIMACO, W.L.S.; MELO, E.F.;VAZ, D.P. et al. Eggshell microbiology and quality of hatching eggs subject to different sanitizing procedures. *Pesq. Agrop. Bras.* v. 53, n.10, p. 117-1183, 2018.
- COOK, M.I.; BEISSINGER, S.R.; TORANZOS, G.A. et al. Microbial infection affects egg viability and incubation behavior in a tropical passerine. *Behav. Ecol.*, v.16, p.30–36, 2005.
- DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; HEYNDRICKX, J. et al. Bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages, and aviary housing systems for laying hens. *Br. Poult. Sci.* v. 46. p. 149-155, 2005.
- DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W. et al. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *Int. J. of Food Microbiol.*, v.112, p.253-260, 2006.
- DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, M. et al. The effect of a commercial UV disinfection system on the bacterial load of shell eggs. *Lett. Appl. Microbiol.*, p.144-148, 2006.
- DE REU, K., MESSENS, W., HEYNDRICKX, M. et al. Bacterial contamination of table eggs and the influence of housing systems. *Worlds Poult. Sci. J.* v.64, p.5-19. 2008.
- DUNCAN, I.J.H. The pros and cons of cages. In: Proceedings of the XXI World Poultry Congress, Montreal, Canada, p. 13, 2000.
- EMONET, S.; SHAH, H. N.; CHERKAOU, A.; SCHRENZE, J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 16, p. 1604-1613, 2010.

ENGLMAIEROVÁ, M, TUMOVÁ, E., CHARVATOVÁ, V. et al. Effects of laying hens housing system on laying performance, egg quality characteristics, and egg microbial contamination. *Czech J. Anim. Sci.* v.59, n.8, p.345-352, 2014.

EUROPA. Council Directive. 1999/74/EC, 19 jul. 1999. Laying down minimum standards for the protection of laying hens. Official Journal of the European Communities. p.53.

FAKRUDDIN, M.D.; MANNAN, K. S. B. Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. *Ceylon J. Sci.*, v. 42, n. 1, p. 19-33, 2013.

FAVIER, G.L.; ESCUDERO, M.E.; GUZMAN, M.S. Effect of chlorine, sodium chloride, trisodium phosphate and ultraviolet radiation on the reduction of *Yersinia enterocolitica* and mesophilic aerobic bacteria from eggshell surface. *J. Food Protec.* v.64., p. 1621-1623, 2001.

FENOLLAR, F.; RAOULT, D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS*, v. 112, n. 11-12, p.785-807, 2004.

FERNANDEZ, M.S.; MOYA, A.; LOPES, L. et al. Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation. *Mat. Bio.*, v. 19, p. 793-803, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of health and human service. 2010. Microbiological risk assessment series 1. Risk assessment of Salmonella in eggs and broiler chickens. Interpretative summary. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at: <<https://www.fda.gov/food/food-inspection-programs/egg-safety-inspections>>. Acesso em: 04 jan. 2020.

FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*, São Paulo: Atheneu, 1996.

GAST, R.K., GURAYA, R., JONES, D.R. et al. Colonization of internal organs by *Salmonella* serovars Heidelberg and Typhimurium in experimentally infected laying hens housed in enriched colony cages at diferente stocking densities. *Poult. Sci.* v.96, n.5, p.1402-1409, 2017.

GOLE, V.C.; ROBERTS, J.R.; SEXTON, M. et al. Effect of egg washing and correlation between cuticle and egg penetration by various *Salmonella* strains. v.182, p. 18-25, 2014.

- GOTTSELIG, S. M. *Microbial reduction on eggshell surfaces by the use of hydrogen peroxide and ultraviolet light*. 91p. Thesis (Master of Science). Texas A&M University. 2011.
- HANNAH, J.F.; WILSON, J.L.; COX, N.A. et al. Comparison of shell bacteria from unwashed and washed table eggs harvest from caged laying hens and cage-free floor housed laying hens. *Poult. Sci.* v.90. p.1586-1593, 2011.
- HINCKE, M.T.; NYS, Y.; GAUTRON, J. et al. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Bio.*, v.17, p. 1266-1280, 2012.
- HOLT, P.S., DAVIES, J., DEWULF, R.K. et al. The impact of diferente housing systems on egg safety and quality. *Poult. Sci.* v.90, n.1, p.251-262, 2011.
- HUTCHINSON, M.L.; GITTINS, J.; WALKER, A. Washing table eggs: a review of the scientific and engineering issues. *Worlds Poult. Sci.* v. 59, p. 233-248, 2003.
- HUTCHINSON, M.L.; GITTINS, J.; WALKER, A. et al. An assessment of the microbiological risks involves with egg washing under commercial conditions. *J. Food Prot.*, v.67, n.1, p.4-11, 2004.
- JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*, 6 ed. Porto Alegre:Artmed, 2005.
- JOHNSON, A.L. Reproduction in the female. *Sturkie's Avian Physiology*. 6 ed. Elsevier Inc., p. 635-665, 2015.
- JONES, D.R.; ANDRESON, K.E.; MUSGROVE, M.T. Comparison of environmental and egg microbiology associated with conventional and free-range laying hen management. *Poult. Sci.*, v.90, n.9, p.2063-2068, 2011.
- KARUNARATHNA, R.; POPOWICH, S.; WAWRYK, M. et al. Increased Incidence of Enterococcal Infection in Nonviable Broiler Chicken Embryos in Western Canadian Hatcherics as Detected by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Avian Dis.*, v.61, n. 4, p.472-480, 2017.
- KEKLIK, N.M.; DEMIRCI, A.; PATTERSON, P.H. et al. Pulsed UV light inactivation of Salmonell Enteritidis on eggshell and its effects on egg quality. *J. Food. Protec.* V.73, p.1408-1415, 2010.

- KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review. *Environ Int.*, v. 30, n. 1, p. 47–55, 2004.
- KNAPE, K.D.; CHAVEZ, C.; BURGESS, R.P. et al. Comparison of eggshell surface microbial populations for in-line and off-line commercial egg processing facilities. *Poult. Sci.*, v.81, n.5, p.695-698, 2002.
- KOUTCHMA, T. Advances in Ultraviolet Light Technology for Non-thermal Processing of Liquid Foods. *Food Bioprocess Technol.* v.2, p.138–155, 2009.
- LAY, J. O. MALDI-TOF Mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom. Rev.*, v. 20, n. 4, p. 172-194, 2001.
- LAY JR., D.C., FULTON, R.M., HESTER, P.Y. et al. Hen welfare in different housing systems. *Poult. Sci.* v.90, n.1, p.278-294, 2011.
- LELEU, S.; MESSENS, W.; DE REU, K. et al. Effect of egg washing on the cuticle quality of brown and White table eggs. *J. Food. Protec.* v. 74, p. 1649-1654, 2011.
- LIU, Y.C.; CHEN, T.H.; WU, Y.C. et al. Effects of egg washing and storage temperature on the quality of eggshell cuticle and eggs. *Food Chem.* v. 211, p. 687-693, 2016.
- MATURIN, L.J.; PEELER, J.T. Aerobic plate count. In: Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, 8ed. Arlington: AOAC International. 2001. cap3. p.1-10.
- MELO, E.F.; CLÍMACO, W.L.S.; TRIGINELLI, M.V. et al. An evaluation of alternative methods for sanitizing hatching eggs. *Poult. Sci.* v.0, p. 1-8, 2019.
- MESSENS, W., GRIJSPEERDT, K., HERMAN, L. Eggshell penetration by Salmonella: A review. *Worlds Poult. Sci. J.* v.61, n.1, p.71-86, 2005.
- MESSENS, W. Egg decontaminatio by washing. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.*, p. 163-180, 2011.
- MOYLE, T.; DRAKE, K.; GOLE, V. et al. Bacterial contamination of eggs and behaviour in free range enviorenment. *Comp. Immunol. Microb. Dis.*v. 49., p.88-94, 2016.
- MULLIS, K. B. The unusual origin of polimerase chain reaction. *Scientific American*, v. 262, p. 56-69, 1990.

MUSGROVE, M. T.; JONES, D. R.; NORTHCUTT, J. K. et al Impact of Commercial Processing on the Microbiology of Shell Eggs. *J. Food Prot.*, v. 68, n. 11, p. 2367-2375, 2005.

NEIRA, C.; LACA, A. LACA. A. et al. Microbial diversity on commercial eggs as affected by the production system. A first approach using PGM. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 262., p-3-7, 2017.

NYS, Y.J.; GAUTRON, J.M.; GARCIA-RUIZ, M.T. et al. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Paleovol*, v.3, p.549-562, 2004.

OKAMURA, M., KAMIJIMA, Y., MIYAMOTO, T. et al. Differences among sis Salmonella serovars in abilities to colonize reproductive organs and contaminate eggs in laying hens. *Avian Dis.* v.45, p.61-69, 2001.

OLIVERA, M.C.S.; REGITANO, L.C.A.; ROESE, A.D. et al. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32770/1/LivroProtMolecular.pdf>> Acesso em: 10 dez. 2018.

OLSEN, R.E.; KURDIKIENE, I.; THOFNER, S. et al. Impacto f egg disinfection of hatching eggs on the eggshell microbiome and bacterial load. *Poult. Sci.*, v. 96., p. 3091-3911, 2017.

PARK, C.M.; HUNG, Y.C.; LIN, C.S. et al. Efficacy of electrolyzed water in inactivating *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on shell eggs. *J. Food. Protec.* v. 68, n.5, p. 986-990. 2005.

PASQUALI, F.; ROCULLI, P.; CESARE, A. et al. New Technologies to enhance quality and safety of table eggs: ultra-violet treatments and modified atmosphere packaging. *Italian J. Food. Safe.* v. 3, p. 192-195, 2014.

REHS, A.P. Sanitizers and Disinfectants: The Chemicals of Prevention. *FoodSafety Magazine*, 2011.

RODRIGUEZ-NAVARRO, A.B.; NAZARET, D.G.; MUNHOZ, A. et al. Change in the chicken cuticle with hen age and egg freshness. *Poult. Sci.*, v. 92., p. 3026-3025. 2013.

RUIZ, J.; LUNAM, C.A. Ultrastructural analysis of the eggshell: contribution of the individual calcified layers and the cuticle to hatchability and egg viability in broiler breeders. *Br. Poult. Sci.* v. 41., p. 584-592, 2000.

SABARINATH, A.G.; GUILLAUME, V.; GUILLAUME, B. et al. Bacterial contamination of commercial chicken eggs in Grenada, West Indies. *Indian Vet. J.*, v.9, p.4-7, 2009.

SAMIULLAH, S.; ROBERTS JR; CHOUSALKAR, K.K. Effect of production system and flock age on egg quality and total bacterial load in commercial laying hens. *J. Appl. Poult. Res.*, v.23, n.1, p.59-70, 2014.

SAMIULLAH, S.; ROBERTS, J.R. The cuticle of the laying hen. *Worlds Poult. Sci. Ass.*, v. 79., p.693-708, 2014.

SENG, P.; ABAT, C.; ROLAIN, J.M. et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: Impact of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, v.51, n.7, p. 2182-2194, 2013.

SOLOMON, S.E. Egg and eggshel quality. England: Wolfe Publishing, 1991.

SPARKS, N.H.C. Shell accessory materials: structure and function. In: BOARD, R.G., FULLER, R. Microbiology of the Avian Egg, 1ed. Boston: Springer, 1994. p.25-42.

STAMPI, S.; DE LUCA, G.; ZANETTI, F. Evaluation of the efficiency of peracetic acid in the disinfection of sewage effluents. *J. Applied Microbiol.*, v. 91, p. 833-838, 2001.

STEINER N. Evaluation of peracetic acid as an environmentally safe alternative for hypochlorite. *Text. Chem. Colorist*, v. 27, n. 8, p. 29-32, 1995.

STEPIEN-PYSNIAK, D. Occurrence of Gram-negative bacteria in hen's egg depending on their source and storage condition. *Polish J. Vet. Sci.*, v. 13., p. 507-513, 2010.

STRINGHINI, M. L.; ANDRADE, M. A.; MESQUITA, T. M. et al. Características bacteriológicas de ovos lavados e não lavados de granjas de produção comercial. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 4, p. 1317-1327, 2009.

TAUSON, R. Management and housing systems for layers-effects on welfare and production. *Worlds Poult. Sci. J.* v.61, n.3, p.477-490, 2005.

TURTOI, M.; BORDA, D. Decontamination of egg shell using ultravioleta light treatment. *Worlds Poult. Sci. J.* v.70, p. 265-277, 2014.

VILJOEN, G.J.; NEL, L.H.; CROWTHER, J.R. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Dordrecht: Springer, 2005.

VLCKOVÁ, J.; TUMOVÁ, E.; KETTA, M. et al. Effect of housing system and age of laying hens on eggshell quality, microbial contamination, and penetration of microorganisms into eggs. *Czech J. Anim. Sci.*, v.63, n.2, p.51-60, 2018.

WEI, S.; MORRISON, M.; YU, Z. Bacterial censos of poultry microbiome. *Poult. Sci.*, v. 92, p. 671-683, 2013.

WELLMAN-LABADIE, O.; PICMAN, J.; HINCKE, M. Comparative antibacterial activity of avian egg White proteins extracts. *Br. Poult. Sci.*, v.49, n.2, p.125-132. 2008.

WELLS, J.B.; COUFAL, C.D.; PARKER, H.M. et al. Disinfection of eggshells using ultraviolet light and hydrogen peroxide independently and in combination, *Poult. Sci.*, v. 89, p. 2499-2505, 2010.

CAPÍTULO II - Efeitos da lavagem e da sanitização com ácido peracético ou luz ultravioleta sobre a ultraestrutura da casca e características microbiológicas de ovos de consumo

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito da lavagem e diferentes métodos de sanitização sobre a ultraestrutura da casca, avaliação microbiológica da casca, conteúdo dos ovos e conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente, foram coletados 600 ovos de consumo de galinhas da linhagem *Bovans White*[®] de 53 semanas de idade, alojadas em gaiolas e com sistema de coleta de ovos automatizado. Os ovos selecionados foram distribuídos de forma aleatória em esquema fatorial 2x3 (presença ou não de lavagem x processo de sanitização), submetidos aos tratamentos ovos não lavados (NL): sem sanitização (SS); sanitizados com ácido peracético (355 ppm; 0,5ml/ovo; APA); sanitizados com radiação ultravioleta C (254 nm; 2.067 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$, 5s; UVC) e ovos lavados (L): SS; APA e UVC. Um total de 24 ovos foi coletado para avaliação ultraestrutural da casca, sendo quatro ovos por tratamento. Foram feitas medições das camadas mamilar, paliçada, cristal vertical e da cutícula da casca nas regiões apical, equatorial e basal e o cálculo das médias das três regiões. Oito amostras compostas de quatro ovos foram coletadas para contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, Enterobacteriaceae, bolores e leveduras na casca, conteúdo após 48 horas e conteúdo após 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Após a cultura dos micro-organismos, colônias morfológicamente diferentes foram selecionadas para identificação utilizando-se o método de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e analisador por tempo de voo (TOF). A lavagem reduziu a espessura da cutícula dos ovos ($p < 0,05$) e o uso de APA reduziu a espessura da região calcificada ($p < 0,05$). Os ovos lavados e sanitizados com APA ou UVC apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) de contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos da casca quando comparados aos ovos apenas lavados. O conteúdo dos ovos L-SS apresentou a menor contaminação por aeróbios mesófilos totais ($p < 0,05$). O conteúdo dos ovos SS, independentemente da lavagem, não apresentou bactérias da família Enterobacteriaceae. Após 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente, as contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, bolores e leveduras foram menores ($p < 0,05$) no conteúdo dos ovos lavados. O conteúdo dos ovos submetidos à radiação UVC apresentou

a menor contagem de bolores e leveduras ($p < 0,05$). Ovos lavados e sanitizados com UVC apresentaram a menor contagem de Enterobacteriaceae do conteúdo após 15 dias de armazenamento. As contagens de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae, bolores e leveduras do conteúdo após 15 dias de armazenamento foram mais altas em praticamente todos os tratamentos, com exceção dos ovos submetidos ao tratamento L-UVC. Na casca os filos Firmicutes e Proteobacteria foram os mais prevalentes. Houve redução de bactérias da família Enterobacteriaceae e aumento de Staphylococcaceae após a lavagem dos ovos. No conteúdo, o filo Firmicutes foi o mais prevalente nos ovos não lavados e o filo Proteobacteria nos ovos lavados. O gênero Enterobacter foi o mais prevalente no conteúdo dos ovos lavados. Não foi identificada *Salmonella* nem na casca e nem no conteúdo dos ovos. Por apresentar as menores contagens de bactérias da casca e do conteúdo e a menor contaminação por bolores e leveduras no conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento, a lavagem associada ao uso de UVC pode ser considerada o método de escolha na sanitização de ovos de consumo.

Palavras-chave: Contagem de micro-organismos; Ácido peracético; Ultravioleta; MALDI-TOF.

INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica dos ovos é uma preocupação constante para os consumidores. A possibilidade de entrada de bactérias pela casca é determinante para o controle da qualidade e do processo de deterioração dos ovos. Muitos estudos já comprovaram que existe uma grande variação nos níveis de contaminação da casca dos ovos.

A contagem de aeróbios mesófilos e a contagem de bactérias da família Enterobacteriaceae podem ser usadas como indicador de segurança dos alimentos (Moyle et al., 2016). De Reu et al. (2008) preconizaram que a contaminação de até 5 log UFC/ovo de micro-organismos aeróbios mesófilos totais seria aceitável como parâmetro de qualidade higiênica.

A cutícula, que pode prevenir a entrada de micro-organismos no conteúdo interno do ovo, é depositada na superfície mineral da casca, momentos antes da postura e é formada por uma parte orgânica e por cristais de hidroxiapatita (Fernandez et al., 2001; Johnson, 2015). O processo de lavagem e a ação de diferentes sanitizantes podem interagir com a

cutícula causando desnaturação proteica e perda de sua integridade (Favier et al., 2001). Porém, Leleu et al. (2011) observaram que a lavagem feita sob condições ideais pode não apresentar degradação significativa da cutícula em ovos. Este processo pode ser capaz de reduzir a contagem de micro-organismos da casca dos ovos (Hannah et al., 2011).

A lavagem dos ovos, quando feita, deve fazer parte de um processo contínuo dividido em quatro etapas: umedecimento, lavagem, enxague e secagem. Na água de lavagem podem ser adicionados diversos tipos de sanitizantes (Messens, 2011). Diferentes métodos de sanitização podem ser utilizados de forma eficiente para auxiliar na remoção dos micro-organismos da casca como, por exemplo, a radiação ultravioleta na região C (UVC) com comprimento de onda até 254 nm (De Reu et al., 2006) e o ácido peracético (Al-Ajeeli et al., 2016).

O tratamento com UVC em alta intensidade é capaz de reduzir a população bacteriana e até mesmo a presença de *Salmonella* spp., da casca de ovos a partir de pouco tempo de exposição (Turtoi e Borda, 2014). O uso do ácido peracético pode reduzir a contagem de aeróbios mesófilos presentes na casca dos ovos (Al-Ajeeli et al., 2016).

A microbiota da casca dos ovos é na sua maioria composta de bactérias Gram-positivo, que são micro-organismos deteriorantes, porém as bactérias Gram-negativo também podem estar presentes em grande número, apesar de serem melhor combatidas pelas substâncias antimicrobianas presentes nos ovos (De Reu et al., 2008; Chousalkar et al., 2010).

Os gêneros de bactérias considerados importantes como patógenos e deteriorantes encontrados na superfície dos ovos, segundo Neira et al. (2017), são *Clostridium*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Staphylococcus*. *Salmonella* é considerada um dos principais agentes causadores de infecções alimentares e sua prevalência em ovos é esporádica podendo variar entre 0,3% a 1,1% dos ovos (Holt et al., 2011).

A identificação de bactérias por espectrometria de massa através de ionização/dessorção a laser assistida por matriz MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) acoplada ao analisador por tempo de voo TOF (*time-of-flight*) tem uma grande vantagem que é a rapidez e o baixo custo da análise (Lay, 2001; Aebersold e Mann, 2003; Assis et al., 2011) além de ser confiável quando comparada aos métodos de sequenciamento do gene 16 sRNA (Karunarathna et al., 2017).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da lavagem e da sanitização por luz ultravioleta (UVC) ou ácido peracético (APA) sobre a ultraestrutura da

casca dos ovos, a contagem total de aeróbios mesófilos, enterobactérias, bolores e leveduras da casca, do conteúdo dos ovos 48 horas após a postura e no conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente e os efeitos sobre a microbiota da casca e conteúdo dos ovos recém coletados utilizando-se espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de Amostras e Procedimentos de Sanitização

Um total de 600 ovos de consumo foram coletados em julho de 2019 de uma granja de postura comercial. Os ovos para o experimento foram provenientes da segunda coleta do dia de aves da linhagem *Bovans White*[®] com idade de 53 semanas alojadas em gaiolas instaladas em galpão vertical. O sistema de coleta de ovos utilizado foi automatizado e o transporte até à sala de classificação foi feito em esteira coletora. Os ovos foram selecionados manualmente com o uso de luvas descartáveis na sala de classificação. Apenas os ovos visivelmente limpos foram escolhidos. A temperatura da sala de ovos durante a coleta e o processamento dos ovos variou de 16,3 a 20,6 °C, a umidade relativa do ar foi em média 26,0%, ambas medidas com aparelho termo-higrômetro digital (Incoterm 7666, São Paulo, Brasil).

Os ovos selecionados foram distribuídos de forma aleatória em esquema fatorial 2x3 (Lavado e não lavado x sem sanitização, ácido peracético, UVC) totalizando seis tratamentos divididos da seguinte forma: ovos não lavados (NL): sem sanitização (NL-SS), sanitizados com ácido peracético (NL-APA) e sanitizados com radiação ultravioleta C (NL-UVC) e ovos lavados (L): sem sanitização (L-SS), sanitizados com ácido peracético (L-APA) e sanitizados com radiação ultravioleta C (L-UVC), sendo coletados 192 ovos para contagem microbiana na casca, 192 ovos para o conteúdo e 192 ovos para o conteúdo pós 15 dias. Após a aplicação dos tratamentos, os ovos foram imediatamente acondicionados em sacos esterilizados (*Whirl-pak*).

Procedimento de lavagem

Para os tratamentos nos quais os ovos foram submetidos à lavagem, o método utilizado seguiu os requisitos exigidos pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitários

de Produtos de Origem Animal (Brasil, 1990) para ovos em natureza. A operação foi toda realizada por meios mecânicos, de forma contínua, sem recirculação de água, em máquina comercial do modelo ATI-IL 200/6 Plasson - *In line* (Rinópolis, São Paulo, Brasil), com alimentação automática de ovos e capacidade para classificação de 200 caixas por hora. A água utilizada foi mantida à temperatura de 35 a 45 °C. Após o procedimento, os ovos foram rapidamente submetidos à secagem.

Foram realizadas as análises microbiológicas (Laboratório GMO - Centro de Pesquisas e Controle de Qualidade, Belo Horizonte) e as análises físico-químicas (Laboratório de físico-química da Escola de Veterinária da UFMG) da água utilizada na lavagem dos ovos (Tabela 1).

Tabela 1. Análises microbiológicas e físico-químicas da água utilizada para lavagem

Análises	Resultado	Unidade
<i>Análises microbiológicas</i>		
Coliformes 45° C	Ausência	/100 mL
Coliformes totais	Ausência	/100 mL
Contagem total de bactérias	<1,0 x 10	UFC/g
<i>Análises físico-químicas</i>		
Dureza (C ₂ CO ₃)	32,00	mg/L
Acidez (CO ₂)	20,00	mg/L
Alcalinidade (CaCO ₃)	44,80	mg/L
Cloretos	2,60	mg/L
Cloro residual	2,84	mg/L

Procedimentos de Sanitização

Ácido peracético

A diluição do ácido peracético P.A. (Cromoline, Química Fina, Diadema, Brasil) foi realizada imediatamente antes do processo de sanitização, com a mesma água utilizada pela granja no procedimento de lavagem. A concentração desejada final após a diluição era de 1.000 ppm. Porém, a concentração de ácido peracético da solução determinada por permanganimetria e iodometria foi de 355 ppm. A solução foi aplicada usando um borrifador manual totalizando o volume de 0,5 ml/ovo. Com o objetivo de cobrir toda a superfície dos ovos, na metade do volume, os ovos foram manualmente virados com o uso de luvas descartáveis.

Radiação UV

A sanitização com radiação UVC foi realizada na máquina comercial de UVC (ATI Plasson, Rinópolis, São Paulo, Brasil), no qual os ovos recebiam a luz enquanto rolavam pela esteira, sendo assim, toda a superfície do ovo foi exposta. A câmara era composta por sete lâmpadas UVC germicidas (15 W, 254 nm). Os ovos foram expostos à luz UVC com intensidade média de $2.067 \mu\text{w}/\text{cm}^2$ por cinco segundos. O tempo utilizado para a sanitização corresponde ao utilizado como rotina na granja. A intensidade da luz UVC foi medida com cabeçote (UM-250) acoplado ao radiômetro (Konica Minolta UM-10, São Paulo, São Paulo, Brasil).

Sem sanitização

Os ovos sem sanitização e não lavados foram coletados na chegada à sala de classificação. Já os ovos sem sanitização e lavados foram retirados após o processo de lavagem e secagem realizados na máquina.

Avaliação ultraestrutural da casca

Para as avaliações ultraestruturais das camadas da casca do ovo, foram selecionados quatro ovos de cada tratamento, totalizando 24 ovos (sendo o ovo considerado a repetição). Fragmentos de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ foram cortados em nitrogênio líquido com auxílio de bisturi e, em seguida, as amostras passaram pelos processos de fixação secundária, desidratação, secagem em ponto crítico de CO_2 para então serem montadas perpendicularmente em *stubs* de alumínio. Após a montagem foi realizada a metalização com ouro na espessura de 4 nm. As amostras foram examinadas no microscópio de feixe duplo (FEI - Quanta 3D FEG, USA). Todos os procedimentos foram realizados no Centro de Microscopia da UFMG.

As camadas foram identificadas de acordo com a descrição de Solomon (1991) e Hicke et al. (2012). A camada mamilar foi considerada como sendo múltiplas estruturas em forma de cone, enquanto a camada paliçada consistia em longos alongamentos verticais que justapõem a camada mamilar. A camada vertical foi considerada como uma estreita camada de colunas verticalmente orientadas imediatamente localizada acima da camada paliçada. A cutícula foi observada como uma fina camada sobreposta a camada cristal vertical. As

camadas mamilar e paliçada foram identificadas num aumento de 200x, a camada cristal vertical e a cutícula foram identificadas num aumento de 2000x.

Para a realização da medição dos comprimentos das camadas foi utilizado o software de domínio público *ImageJ* 1.52a, versão 64-bits (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Para as três regiões do ovo (apical, equatorial e basal), o comprimento de cada camada foi mensurado em cinco pontos e a média dos valores registrada. A região calcificada foi determinada pela soma entre as camadas cristal vertical, mamilar e paliçada. Após as medições realizadas, foi feito o cálculo da média das espessuras das camadas das três regiões do ovo.

Avaliação Microbiológica

A avaliação microbiológica foi realizada na casca e no conteúdo interno dos ovos seguindo método adaptado de Fasenko et al. (2009). A avaliação da casca foi realizada 24 horas após a coleta (temperatura de armazenamento entre 19,3° C a 22,2° C) e do conteúdo foi realizada 48 horas após a coleta (temperatura de armazenamento entre 19,3° C a 23,5° C). Para a avaliação do conteúdo feita após 15 dias da postura os ovos ficaram armazenados em temperatura ambiente (17,8 °C a 24,2 °C) dentro de sacos estéreis *Whirl-pak*. A temperatura foi monitorada com *datalogger* (Instrutherm HT-70, Freguesia do Ó, São Paulo, Brasil). Cada tratamento foi constituído por oito repetições com *pool* de quatro ovos cada. Foram adicionados 250 mL de solução salina tamponada a 0,1% para cada saco esterilizado *Whirl-pak*. O *pool* de ovos foi selado e massageado por cinco minutos a fim de remover as células de micro-organismos contaminantes de cada superfície do ovo. Para análise do conteúdo, a casca dos ovos foi higienizada com auxílio de gaze estéril umedecida com álcool 70%, em seguida quatro ovos foram quebrados e o conteúdo vertido em sacos esterilizados *Whirl-pak*. O conteúdo foi homogeneizado manualmente por cinco minutos.

Culturas de micro-organismos

Após massagear a casca dos ovos na solução salina tamponada e homogeneizar o conteúdo, foram preparadas diluições seriadas até 10^{-3} , em seguida, 0,1 mL foi semeado, pelo método *spread plate*, em ágar PCA (Oxoid LTD., Basingstone, Hampshire, Inglaterra) para crescimento de aeróbios totais e em MacConkey (BD Difcotm, Sparks, Maryland) para crescimento de Enterobacteriaceae. Ambos foram incubados a 37°C por 48 horas. Para o crescimento de bolores e leveduras, foram preparadas diluições seriadas até 10^{-3} , em seguida,

0,1 mL foi semeado em ágar batata dextrose (BDA) (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil) por 7 dias e mantidos em temperatura ambiente.

Após homogeneizar o conteúdo, foram preparadas diluições seriadas até 10^{-1} nas análises feitas 48 horas após o armazenamento e até 10^{-2} nas análises feitas com 15 dias de armazenamento, em seguida, 0,1 mL foi semeado, pelo método *spread plate*, em ágar PCA (Oxoid LTD., Basingstone, Hampshire, Inglaterra) para crescimento de aeróbios totais e em MacConkey (BD Difcotm, Sparks, Maryland) para crescimento de Enterobacteriaceae. Ambos foram incubados a 37°C por 48 horas. Para o crescimento de bolores e leveduras, foram preparadas diluições seriadas até 10^{-1} nas análises feitas 48 horas após o armazenamento e até 10^{-2} nas análises feitas com 15 dias de armazenamento, em seguida, 0,1 mL foi semeado em ágar batata dextrose (BDA) (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil) por 7 dias e mantidos em temperatura ambiente.

Para o crescimento de *Salmonella*, a alíquota retirada das amostras foi transferida para o meio de pré-enriquecimento (salina tamponada peptonada a 1,0%) por 24 horas a 35 °C. Após este período foi realizada a transferência para dois caldos seletivos, Selenito Cistina (HiMEDIA M025, Mumbai, Índia) e Rapaport Vassilidis (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil) por 24 horas a 42 °C. Em seguida, as amostras foram semeadas em três meios, Brillant Green Agar (BPLS) (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil), Hektoen Enteric (HE) (Oxoid Oxoid LTD., Basingstone, Hampshire, Inglaterra) e X.L.D. Agar (Kasvi) por 24 horas a 35 °C.

Isolamento e identificação de bactérias

Para a identificação da microbiota presente na casca dos ovos e no seu conteúdo foi utilizado método MALDI-TOF. Um total de 202 colônias da casca e 57 do conteúdo interno com características morfológicas e de pigmentação diferentes foram escolhidas de todos os meios utilizados (PCA, MacConkey, HE, BPLS e XLD.). Dos meios específicos para *Salmonella*, foram selecionadas colônias típicas e atípicas para identificação. Após a incubação das bactérias em cada um dos meios, respeitando o tempo e temperatura exigidos para cada um, as colônias frescas escolhidas foram encaminhadas para identificação. Uma amostra única da colônia fresca foi retirada da placa de origem usando um palito. Para cada amostra foram aplicados 1 µl de ácido fórmico (70%) e 1 µl da matriz MALDI-TOF-MS, consistindo em uma solução saturada de a-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os espectros foram adquiridos usando o espectrômetro de massa FlexControl MicroFlex LT (Bruker Daltonics). Antes das medições, a calibração foi

precedida de um padrão teste bacteriano (*E. coli* DH5 alfa; Bruker Daltonics). Os critérios de pontuação de identificação em tempo real utilizados foram os recomendados pelo fabricante: pontuação ≥ 2.000 indica uma identificação ao nível de espécie, pontuação ≥ 1.700 e < 2.000 indica uma identificação ao nível de gênero e uma pontuação < 1.700 indica que não há um alvo de identificação confiável para cada corrida. O método de extração com ácido fórmico foi realizado conforme descrito anteriormente (Bizzini et al., 2010) para colônias quando nenhuma identificação confiável foi obtida.

Análise de dados

Foi feito delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, sendo ovos lavados e não lavados x sem sanitização, sanitização com ácido peracético, sanitização com UVC. Para contagem microbiológica da casca, do conteúdo e do conteúdo após 15 dias foram utilizadas oito repetições, sendo cada repetição composta por *pool* de quatro ovos. Para análise ultraestrutural da casca foram utilizadas quatro repetições, sendo cada ovo considerado a repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando *software* R (*R Core Team*, 2018). A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram verificadas pelo teste Shapiro-Wilk. As contagens microbiológicas foram transformadas em \log_{10} . Os dados normais e homogêneos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Quando os dados não atenderam as premissas de normalidade e homogeneidade, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi usado o teste de Wilcoxin para pesquisar a significância da diferença entre os resultados das contagens do conteúdo dos ovos 48 horas após a coleta e quinze dias após a coleta. A significância estatística para todos os testes foi considerada em $p < 0,05$. Os resultados da identificação de bactérias foram discutidos de acordo com estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ultraestrutura da Casca dos Ovos

Através da análise ultraestrutural é possível visualizar as diferenças entre as camadas da casca dos ovos (Figura 1). As espessuras médias encontradas foram de aproximadamente 1,8 μm , 17 μm , 262 μm , 79 μm para a cutícula, cristal vertical, paliçada e mamilar, respectivamente (Tabela 2). A espessura das camadas da casca está relacionada com a

resistência do ovo a quebras e com a translocação bacteriana (Ruiz e Lunam, 2001; Messens, 2005) e pode variar de acordo com a idade das aves, temperatura ambiente, nutrição e diversos outros fatores (Samiullah e Roberts, 2014).

Ruiz e Lunam (2001) observaram em ovos férteis de matrizes pesadas (Cobb 500[®]), também com 53 semanas de idade, as espessuras médias de 2,4 μm , 14,8 μm , 239 μm e 95,6 μm (cutícula, cristal vertical, paliçada e mamilar, respectivamente).

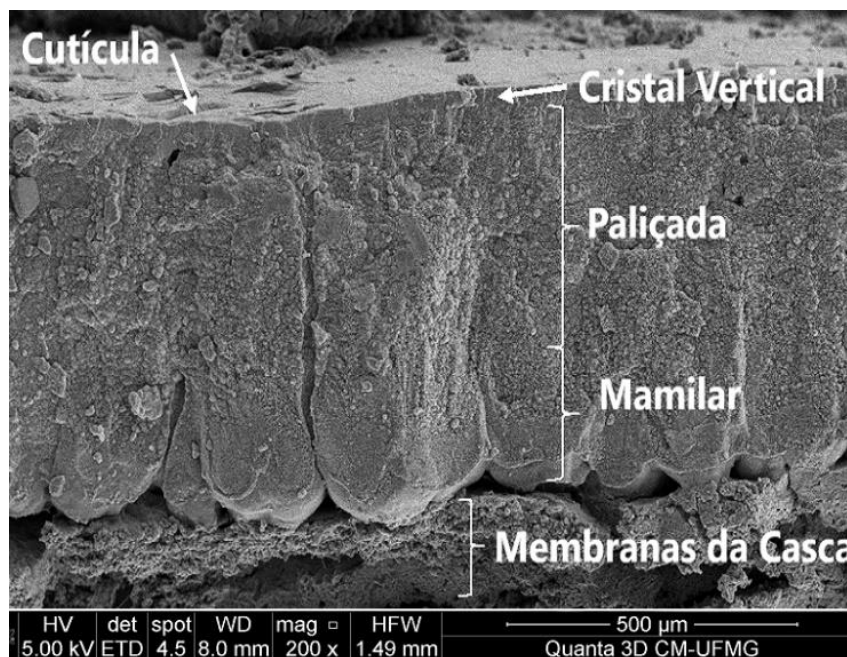


Figura 1. Fotomicrografia das camadas da casca do ovo por meio de microscopia eletrônica em aumento de 200x.

Não houve interação entre os fatores e as espessuras médias analisadas da casca dos ovos ($p > 0,05$). A sanitização afetou a região calcificada dos ovos ($p < 0,05$). O uso do APA reduziu a espessura média da casca, o que pode acabar acarretando prejuízos econômicos em decorrência do aumento de trincas e quebras. Apesar disso o seu uso é comumente empregado na sanitização de ovos comerciais. Utilizado em concentrações mais altas, 1.000 e 3.000 ppm, o APA não reduziu a espessura da casca de ovos férteis (Clímaco et al., 2018; Melo et al., 2019). Não se sabe ao certo quais as reações envolvidas entre o APA e a casca dos ovos que podem ter causado a redução da espessura da região calcificada. Como a redução foi pequena (13,12 μm), a realização da análise de resistência pode ser útil em experimentos futuros para verificar o impacto do sanitizante na qualidade da casca.

A lavagem afetou a espessura da cutícula ($p < 0,05$) causando sua redução, como era esperado. A cutícula é depositada sobre a casca no final da formação dos ovos e é formada por uma parte mineralizada (cristais de hidroxiapatita) e uma parte orgânica incluindo glicoproteínas (90%), polissacarídeos (4%) e lipídios (3%) (Fernandez et al., 2001).

Tabela 2. Médias das camadas ultraestruturais da casca de ovos lavados e não lavados submetidos a diferentes métodos de desinfecção

Tratamentos	Médias das três regiões da casca dos ovos (μm)				
	Cutícula	Cristal Vertical	Paliçada	Mamilar	Calcificada
<i>Lavagem</i>					
NÃO LAVADO	1,97 A	17,52	253,43	80,40	359,76
LAVADO	1,54 B	16,74	270,34	76,62	363,70
<i>Sanitização</i>					
SS	1,74	16,90	265,26	78,85	361,14 AB
APA	1,86	17,18	254,82	76,03	348,02 B
UVC	1,69	17,32	265,78	80,63	376,03 A
Valor de p					
<i>Lavagem</i>	<0,01	0,33	0,16	0,08	0,60
<i>Sanitização</i>	0,60	0,90	0,70	0,21	0,02
<i>Lavagem x Sanitização</i>	0,78	0,16	0,46	0,13	0,50
CV (%)	19,61	11,18	10,98	6,45	5,03

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna são diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

SS: sem sanitização; APA: ácido peracético; UVC: ultravioleta C.

CV: Coeficiente de variação

Leleu et al. (2011) avaliaram a cutícula de ovos brancos e marrons, lavados e não lavados, de galinhas com 60 semanas de idade e atribuíram escores para a cobertura, danos mecânicos, presença de detritos na superfície e poros expostos. Apesar dos autores considerarem a cobertura da cutícula insatisfatória, independente dos tratamentos, foi concluído que o procedimento de lavagem mecanizada não foi capaz de alterar o escore das cutículas.

Por outro lado, Liu et al. (2016) observaram que a cobertura da casca pela cutícula foi negativamente influenciada pela lavagem, além disso os autores concluíram que a preservação da cutícula é essencial para a manutenção dos parâmetros de qualidade dos ovos durante o período de armazenamento. Diferentes protocolos de sanitização podem acarretar diferentes níveis de degradação da cutícula e, dependendo desta alteração, a penetração de micro-organismos pode também ser alterada (Wang e Slavik, 1998).

Neste estudo, a alteração observada na cutícula pela lavagem mecanizada realizada nos ovos, não representou maior risco de contaminação do conteúdo interno dos ovos. Apesar da lavagem alterar a cutícula, Kulshreshtha et al. (2018) observaram que as proteínas que atuam como tampão cutâneo se mantêm intactas e continuam impedindo a entrada de bactérias pelos poros da casca.

Contagem de Micro-organismos Aeróbios Mesófilos Totais

As contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos totais da casca, conteúdo dos ovos após 48 horas e conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento podem ser observadas na tabela 3.

Tabela 3. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos da casca, conteúdo após 48 horas e conteúdo após 15 dias de armazenamento de ovos lavados e não lavados submetidos a diferentes métodos de sanitização

Tratamentos	Casca ¹	Conteúdo após 48 horas de armazenamento ²	Conteúdo após 15 dias de armazenamento ²
(log UFC/mL no <i>pool</i> de quatro ovos)			
<i>Lavagem</i>			
NÃO LAVADO	3,94	1,12	2,66 A
LAVADO	2,98	0,77	1,93 B
<i>Sanitização</i>			
SS	3,60	0,50	2,58
APA	3,79	1,18	1,95
UVC	2,98	1,16	2,34
Valor de p			
<i>Lavagem</i>	< 0,01	< 0,01	0,03
<i>Sanitização</i>	< 0,01	< 0,01	0,07
<i>Lavagem x Sanitização</i>	0,013	< 0,01	0,12

¹Médias não seguidas de letras maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Coeficiente de variação (CV) = 19,46%. SS: sem sanitização; APA: ácido peracético; UVC: ultravioleta C.

²Médias seguidas de letras maiúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Houve interação entre os fatores para a contagem de aeróbios mesófilos da casca ($p < 0,05$) e o desdobramento pode ser observado na Tabela 4. A contagem de aeróbios mesófilos da casca variou de 2,56 a 4,67 log UFC/ mL no *pool* de quatro ovos. Todos os

valores encontrados para aeróbios mesófilos totais estavam abaixo de 5,0 log UFC/mL o que, de acordo com De Reu et al. (2008), sugerem boas condições de higiene na produção de ovos.

Tabela 4. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos na casca de ovos lavados e não lavados em função do método de sanitização

Métodos de sanitização	Aeróbios mesófilos totais da casca	
	Não Lavado	Lavado
	(log UFC/mL no <i>pool</i> de quatro ovos)	
SS	3,74 Ba	3,46 Aa
APA	4,67 Aa	2,92 ABb
UVC	3,41 Ba	2,56 Bb

Médias seguidas de letras minúsculas diferem entre si nas linhas e médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si nas colunas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). SS: sem sanitização; APA: ácido peracético; UVC: ultravioleta C.

Dentre os ovos não lavados, a sanitização por APA teve maior contagem de aeróbios totais da casca ($p < 0,05$). O APA se mostrou um método ineficiente e até prejudicial para a qualidade microbiológica da casca dos ovos quando utilizado isoladamente, o que pode ser justificado pela baixa concentração do sanitizante utilizada neste experimento. Melo et al. (2019) utilizaram diferentes métodos de sanitização para ovos férteis, dentre eles o APA (3.000 ppm), e observaram que ele foi capaz de reduzir a contagem de aeróbios totais na casca em 1,49 log UFC/mL e enterobactérias em 1,00 log UFC/mL. Já em um estudo realizado por Clímaco et al. (2018) não foram observadas diferenças na contaminação da casca de ovos férteis após sanitização com APA em concentração mais baixa (1.300 ppm) nem para a contagem de aeróbios mesófilos totais, nem para a contagem de enterobactérias.

Nos ovos lavados, o uso de UVC foi eficaz em reduzir a contagem de aeróbios totais da casca em relação aos ovos sem sanitização, não diferindo dos ovos sanitizados pelo APA. De Reu et al. (2006 b) observaram que o uso de UVC (10.000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) por 4 a 7 segundos foi capaz de reduzir a contagem de aeróbios totais da casca de ovos visivelmente limpos em quase 1,0 log UFC/ovo, além disso, reduziu também a contaminação por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Pasquali et al. (2014) avaliaram o efeito do tratamento com UVC (10.000 mW/cm^2), por sete segundos, sobre a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos da casca dos ovos. Houve redução significativa da contagem de colônias comparando os ovos antes e após o tratamento (de 3,29 para 2,25 log UFC/g). Clímaco et al. (2018) também encontraram

redução significativa na contagem de aeróbios mesófilos ao submeter ovos férteis à luz UVC ($6.360 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), porém o tempo de exposição foi de 60 segundos. Neste experimento, mesmo com uma intensidade de luz UVC menor, após a lavagem, a casca apresentou menor contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, o que demonstra o efeito positivo da luz UVC como sanitizante.

Após a postura, a casca pode ser contaminada pelo contato com qualquer superfície, e a extensão da contaminação vai variar de acordo com as condições de higiene e limpeza do local (Board e Tranter, 1995). A contaminação do conteúdo dos ovos está principalmente correlacionada com a contaminação da casca (De Reu et al., 2006) e com a capacidade e velocidade de penetração das bactérias para o interior dos ovos (Hutchinson et al., 2004; De Reu et al., 2006).

Houve interação entre os fatores para a contagem de aeróbios mesófilos do conteúdo dos ovos após 48 horas de armazenamento ($p < 0,05$) (Tabela 5). No conteúdo dos ovos não lavados não houve efeito das sanitizações sobre a contagem de aeróbios mesófilos totais ($p > 0,05$). Ovos lavados e não sanitizados tiveram a menor contagem de micro-organismos aeróbios totais no conteúdo interno ($p < 0,05$).

Tabela 5. Contagem de aeróbios mesófilos no conteúdo após 48 horas de armazenamento de ovos lavados e não lavados em função do método de sanitização

Métodos de sanitização	Aeróbios mesófilos (log UFC/mL no <i>pool</i> de quatro ovos)	
	Não Lavado	Lavado
SS	1,00 Aa	0,00 Bb
APA	1,36 Aa	1,00 Aa
UVC	1,01 Aa	1,30 Aa

Médias seguidas de letras minúsculas diferem entre si nas linhas e médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si nas colunas pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

SS: sem sanitização; APA: ácido peracético; UVC: ultravioleta C.

A lavagem e a sanitização não são capazes de eliminar completamente os micro-organismos da casca dos ovos. Avaliando os resultados da casca isoladamente, observa-se que somente a lavagem não foi eficaz em reduzir a presença de bactérias aeróbias mesófilas, sendo necessário também utilizar algum método de sanitização. Porém, para o conteúdo interno dos ovos, somente a lavagem foi suficiente para reduzir a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais.

Hutchinson et al. (2004) observaram aumento da contagem de aeróbios mesófilos no conteúdo dos ovos após a lavagem, apesar da redução de contaminação observada na casca. Segundo esses autores, isso se justifica pela maior capacidade das bactérias atravessarem os poros da casca na presença de água, o que não foi observado neste experimento.

Apesar da sanitização ter reduzido a contagem de micro-organismos aeróbios totais da casca dos ovos, este mesmo efeito positivo não foi observado no conteúdo interno dos ovos. O processo de lavagem, sem sanitização, apresentou a menor contagem dos micro-organismos aeróbios totais no conteúdo interno dos ovos tanto após 48 horas, quanto após 15 dias de armazenamento. Como os ovos ficaram armazenados dentro de sacos estéreis durante todo o período, pode-se afirmar que a lavagem, apesar de alterar a espessura da cutícula, não favoreceu a penetração de micro-organismos já presentes na casca para o conteúdo.

Fazendo a comparação entre as contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos do conteúdo dos ovos após 48 horas e após 15 dias de armazenamento sob temperatura ambiente (Figura 2) é possível observar que a contagem de aeróbios mesófilos aumentou significativamente ($p < 0,05$) no decorrer do período de armazenamento nos ovos L-SS e nos ovos NL-SS e NL-UVC. Estudos anteriores feitos por Mayes e Takeballi (1983) demonstravam que a multiplicação de micro-organismos no conteúdo dos ovos ao longo do tempo é dificultada pela viscosidade do albúmen, pH e pela presença de lisozima e conalbumina, além da presença das membranas da casca.

Apenas o conteúdo dos ovos lavados e sanitizados com UVC permaneceram com a contagem abaixo de 1,5 log UFC no *pool* de quatro ovos após 15 dias de armazenamento sob temperatura ambiente.

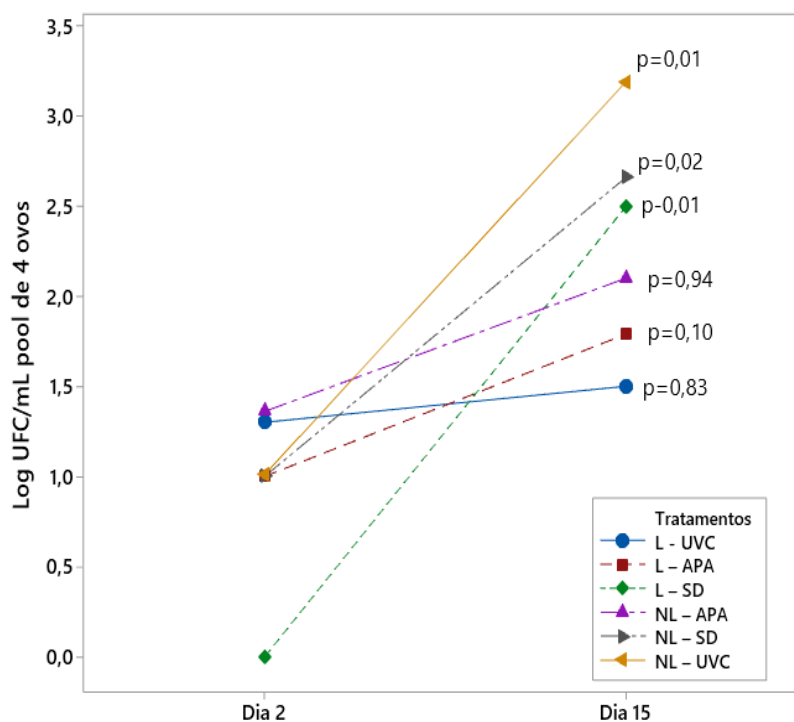


Figura 2. Comparação entre as contagens de aeróbios mesófilos totais (log UFC/mL no *pool* de quatro ovos) no conteúdo dos ovos após 48 horas e 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente pelo teste de Wilcoxin.

Contagem de Enterobacteriaceae dos Ovos

Os resultados das contagens de Enterobacteriaceae da casca, conteúdo dos ovos após 48 horas e conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento podem ser observados na Tabela 6.

A contagem de bactérias da família Enterobacteriaceae na casca variou de 1,13 a 1,53 log UFC/mL no *pool* de quatro ovos e pode ser considerada relativamente baixa. De Reu et al. (2008) observaram na casca de ovos provenientes de gaiola enriquecida a contagem de 1,51 log UFC/casca de ovo e Gole et al. (2014) identificaram em ovos de galinhas alojadas em gaiolas convencionais a contagem de 1,46 log UFC/casca de ovo.

Não houve efeito da lavagem e nem dos métodos de sanitização sobre a contagem de Enterobacteriaceae ($p > 0,05$) da casca. Avaliando a lavagem dos ovos, Jones et al. (2004) observaram diferença para a presença de Enterobacteriaceae na casca de ovos lavados (ausência) e não lavados (0,6 log CFU/mL).

Tabela 6. Contagens de Enterobacteriaceae da casca, conteúdo após 48 horas e conteúdo após 15 dias de armazenamento de ovos lavados e não lavados submetidos a diferentes métodos de sanitização

Tratamentos	Casca	Conteúdo após 48 horas de armazenamento (log UFC/mL no <i>pool</i> de quatro ovos)	Conteúdo após 15 dias de armazenamento
<i>Lavagem</i>			
NÃO LAVADO	1,35	0,36	1,54
LAVADO	1,18	0,77	1,08
<i>Sanitização</i>			
SS	1,14	0,00	1,65
APA	1,53	1,05	1,29
UVC	1,13	0,65	0,99
Valor de p			
<i>Lavagem</i>	0,35	<0,01	0,05
<i>Sanitização</i>	0,14	<0,01	0,06
<i>Lavagem x Sanitização</i>	0,21	<0,01	<0,01

Médias não seguidas de letras maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$)

SS: sem sanitização; APA: ácido peracético; UVC: ultravioleta C.

As contagens de Enterobacteriaceae no conteúdo dos ovos durante os dois períodos de armazenamento sofreram interação entre os fatores estudados ($p < 0,05$) e os desdobramentos podem ser observados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Contagem de Enterobacteriaceae no conteúdo após 48 horas de armazenamento de ovos lavados e não lavados em função do método de sanitização

Métodos de sanitização	Enterobacteriaceae (log UFC/mL no <i>pool</i> de quatro ovos)	
	Não Lavado	Lavado
SS	0,00 Ba	0,00 Ba
APA	1,09 Aa	1,00 Aa
UVC	0,00 Bb	1,30 Aa

Médias seguidas de letras minúsculas diferem entre si nas linhas e médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si nas colunas pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

SS: sem sanitização; APA: ácido peracético; UVC: ultravioleta C.

No conteúdo após 48 horas, a contagem de Enterobacteriaceae foi ausente até 1,30 log UFC/mL no *pool* de quatro ovos. Jones et al. (2004) encontraram valores que não ultrapassaram 1,0 log UFC/mL no conteúdo de ovos com ou sem lavagem. Avaliando a

presença de Enterobacteriaceae nos poros da casca dos ovos, Gole et al. (2013) obtiveram a contagem de 0,32 log UFC/mL.

A sanitização por APA, mais uma vez, se mostrou ineficiente dentre os ovos não lavados apresentando a maior contagem de Enterobacteriaceae no conteúdo dos ovos após 48 horas de armazenamento.

Tabela 8. Contagem de Enterobacteriaceae no conteúdo de ovos lavados e não lavados em função do método de sanitização após 15 dias de armazenamento

Métodos de sanitização	Enterobacteriaceae (log UFC/mL no <i>pool</i> de quatro ovos)	
	Não Lavado	Lavado
SS	1,55Aa	1,74Aa
APA	1,19Aa	1,38Aa
UVC	1,88Aa	0,11Bb

Médias seguidas de letras minúsculas diferem entre si entre as linhas e médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si entre as colunas pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

SS: sem sanitização; APA: ácido peracético; UVC: ultravioleta C.

Neste experimento, a lavagem feita em condições adequadas (sem sanitização), apesar dos danos observados à cutícula dos ovos, não favoreceu o crescimento de bactérias Enterobacteriaceae no conteúdo dos ovos após 48 horas de armazenamento. O uso de UVC e APA, associados à lavagem não foram eficientes. De Reu et al. (2005) avaliaram ovos inoculados com *Escherichia coli* e concluíram que o uso de UVC foi capaz de reduzir a presença dessas bactérias na casca, portanto não as excluíram completamente e a contaminação interna dos ovos não foi controlada pelos tratamentos.

No conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento, a lavagem associada a utilização do UVC apresentou a menor contagem de Enterobacteriaceae em relação aos demais procedimentos ($p < 0,05$). Sendo assim, para o controle de Enterobacteriaceae, considerando o armazenamento de 15 dias em temperatura ambiente, caso seja feita a lavagem, recomenda-se utilizar a sanitização.

Comparando a contagem de Enterobacteriaceae entre os períodos de armazenamento, houve aumento deste grupo de bactérias nos tratamentos NL-UVC, NL-SS e L-SS ($p < 0,05$) (anteriormente não haviam sido detectadas bactérias desta família no conteúdo) e reduziu no tratamento L-UVC se diferenciando de todo o restante do comportamento dos micro-organismos que tiveram suas contagens mantidas ou aumentadas ao longo do tempo (Figura 2).

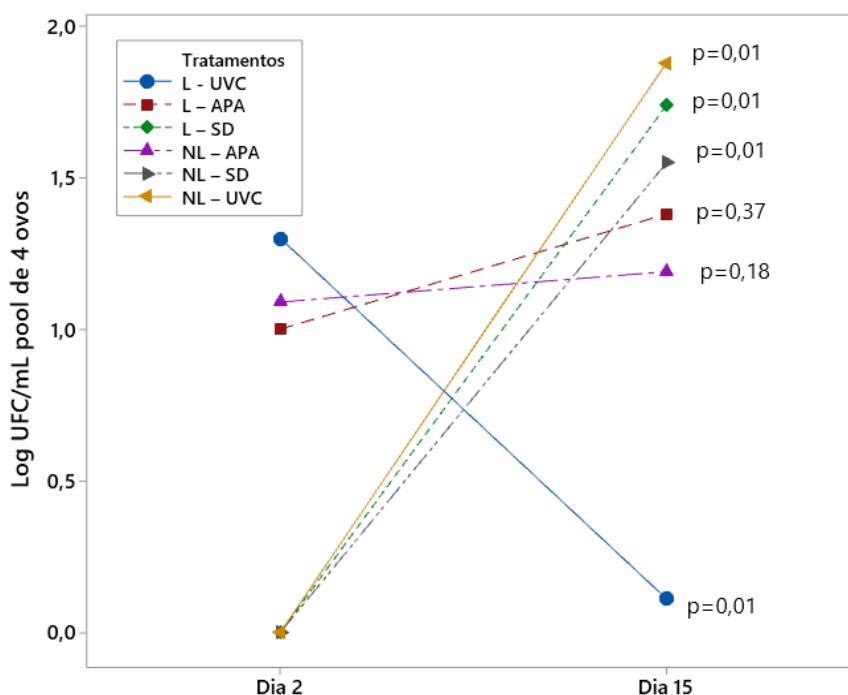


Figura 3. Comparação entre as contagens de Enterobacteriaceae (log UFC/mL *pool* de 4 ovos) no conteúdo dos ovos após 48 horas e 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente pelo teste de Wilcoxin.

A luz UVC age nas bactérias induzindo a formação de dímeros de pirimidinas que inibem a formação de um novo DNA no processo de replicação de células (Keklik et al., 2012). Apesar da luz UVC não ser capaz de penetrar nos produtos, sua atuação na casca contra esses micro-organismos, parece ter sido eficiente na redução da sua multiplicação e penetração para o conteúdo interno dos ovos ao longo do tempo.

Contagem de Bolores e Leveduras

As contagens de bolores e leveduras da casca, conteúdo dos ovos após 48 horas e conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento podem ser observadas na tabela 9.

A contagem de bolores e leveduras na casca não foi influenciada pelos tratamentos estudados ($p > 0,05$) e variou de 1,92 a 2,21 log UFC/mL no *pool* de quatro ovos. Jones et al. (2004) relataram menor contagem de bolores e leveduras na casca de ovos lavados (0,3 log UFC/mL) quando comparado aos ovos não lavados (1,5 log UFC/mL). Vinayananda et al. (2017) encontraram valores mais altos de bolores e leveduras na casca de ovos sanitizados (2,81 log UFC/mL) e não sanitizados (3,15 log UFC/mL), porém sem diferença significativa entre eles. Diante dos resultados encontrados neste experimento, a lavagem, com ou sem

sanitização, feita logo após a postura e seguindo o padrão adequado de acordo com a legislação, não foi capaz de reduzir a contagem de bolores e leveduras da casca de ovos visivelmente limpos. No conteúdo dos ovos após 48 horas, também não foram observadas diferenças nas contagens desses micro-organismos ($p>0,05$).

Tabela 9. Contagens de bolores e leveduras do conteúdo de ovos lavados e não lavados submetidos a diferentes métodos de sanitização após 15 dias de armazenamento

Tratamentos	Casca	Conteúdo após 48 horas de armazenamento		Conteúdo após 15 dias de armazenamento
		(log UFC/mL no <i>pool</i> de quatro ovos)		
<i>Lavagem</i>				
NÃO LAVADO	2,10	1,02		3,58 A
LAVADO	1,94	1,05		1,84 B
<i>Sanitização</i>				
SS	1,93	1,00		3,30 A
APA	2,21	1,03		2,39 AB
UVC	1,92	1,07		2,33 B
Valor de p				
<i>Lavagem</i>	0,38	0,48		< 0,01
<i>Sanitização</i>	0,29	0,38		0,03
<i>Lavagem x Sanitização</i>	0,15	0,71		0,16

Médias seguidas de letras maiúsculas entre as colunas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$)

SS: sem sanitização; APA: ácido peracético; UVC: ultravioleta C.

No conteúdo após 48 horas de armazenamento, a contagem de bolores e leveduras variou de 1,02 a 1,07 log UFC/mL no *pool* de quatro ovos. Concentrações mais baixas de bolores e leveduras no conteúdo foram observadas em estudos anteriores para ovos lavados e não lavados, sem diferença entre eles, não ultrapassando 0,5 log UFC/mL (Jones et al., 2004) e em ovos de galinhas alojadas em gaiolas nas diferentes estações do ano (0,0 a 0,1 log UFC/mL) (Jones et al., 2015). Avaliando a presença de bolores no conteúdo de ovos de consumo, Mansour et al. (2015) observaram a contagem de 1,11 log UFC/ovo.

Ovos lavados tiveram menor contaminação por bolores e leveduras no conteúdo após o período de armazenamento de 15 dias em temperatura ambiente ($p<0,05$) em comparação aos ovos não lavados. Dentre os processos de sanitização, o uso de UVC apresentou as menores contagens destes micro-organismos ($p<0,05$) quando comparados aos ovos sem sanitização, não diferindo dos ovos sanitizados com APA. Soares et al. (2021) observaram através de análise ultraestrutural a presença de microfissuras na cutícula da casca utilizando

o ácido peracético em concentrações que variaram de 75 a 300 ppm, segundo esses autores isso pode facilitar a penetração de fungos para o conteúdo dos ovos.

A contaminação por bolores e leveduras (Figura 3) aumentou significativamente para todos os tratamentos, com exceção dos ovos lavados e sanitizados. Esperava-se que a proliferação de bolores e leveduras fosse mais alta para os ovos lavados em decorrência do aumento da umidade e do armazenamento em temperatura ambiente, o que não ocorreu. O processo de secagem dos ovos feito na máquina após a lavagem é eficaz e não parece favorecer a proliferação desses micro-organismos.

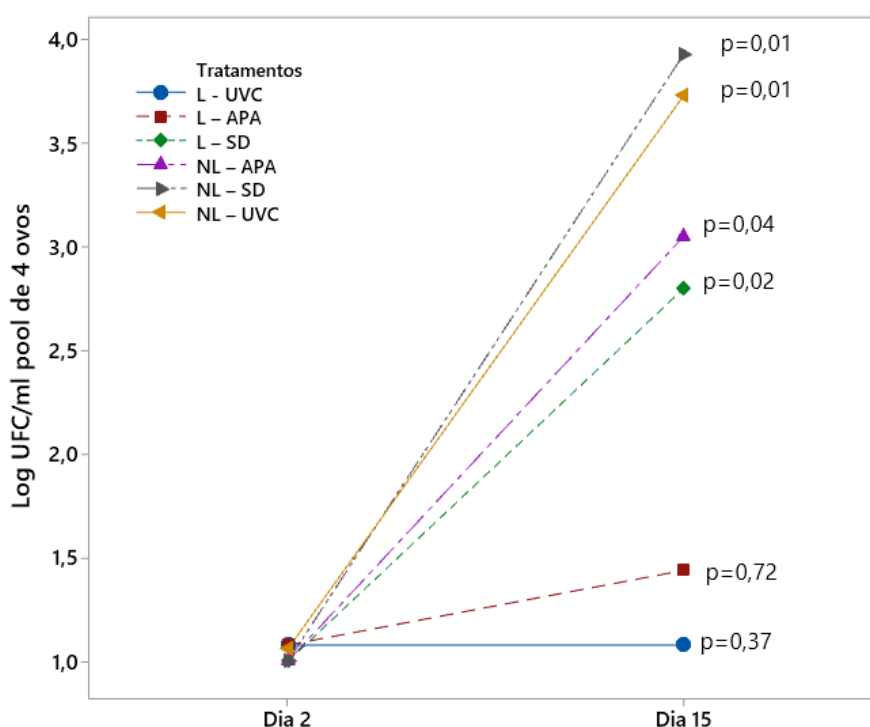


Figura 4. Comparação entre as contagens de bolores e leveduras (log UFC/mL no *pool* de quatro ovos) no conteúdo dos ovos após 48 horas e 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente pelo teste de Wilcoxin.

Neste experimento, considerando a armazenagem em sacos estéreis fechados, o aumento das contagens dos micro-organismos no conteúdo dos ovos se deve unicamente à contaminação dos ovos no dia da postura, ou seja, houve aumento das contagens de micro-organismos na maioria dos tratamentos observados devido à penetração dos micro-organismos presentes na casca para o conteúdo ao longo do tempo e devido à multiplicação desses micro-organismos diante de condições favoráveis. Estes resultados reforçam a

necessidade de maiores controles em relação à higiene de gaiolas e demais estruturas ligadas a coleta dos ovos e, mais uma vez, demonstram a necessidade de manter os ovos refrigerados logo após a coleta.

Diante de todos os resultados observados é possível concluir que, apesar de interferir nas características da cutícula dos ovos, o processo de lavagem é capaz de reduzir a contagem de aeróbios mesófilos totais e Enterobacteriaceae do conteúdo dos ovos 48 horas após a coleta e reduzir a contagem de aeróbios mesófilos totais, bolores e leveduras do conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente. O processo de lavagem associado ao método de sanitização por UVC é eficiente na redução da contaminação do conteúdo dos ovos por Enterobacteriaceae após 15 dias de armazenamento.

A relação entre a manutenção da cutícula e a correlação com a penetração dos micro-organismos apresenta resultados controversos (Messens et al., 2005; De Reu et al., 2005; De Reu et al., 2006; Samiullah et al., 2014). A lavagem é considerada prejudicial para alguns autores devido a piora na qualidade dos ovos e deterioração do conteúdo com o passar do tempo (Messens et al. 2011; Liu et al., 2016) porém, este estudo mostra que a lavagem pode reduzir a contaminação do conteúdo dos ovos durante o armazenamento, principalmente associado ao uso da sanitização por UVC.

Identificação bacteriana da casca dos ovos

O método MALDI-TOF foi capaz de identificar bactérias ao nível de gênero em 84,2% (170/202) e 60,4% (122/202) ao nível de espécie. Do total de colônias selecionadas, 15,8% (32/202) não obtiveram identificação confiável.

Karunarathna et al. (2017) também utilizaram a técnica MALDI-TOF em estudo da microbiota de ovos férteis. Das colônias bacterianas submetidas a análise, 83,13 % foram identificadas ao nível de gênero e 67,15% ao nível de espécie, 16% das bactérias não foram identificadas. Esses autores também realizaram a comparação da técnica MALDI-TOF com a técnica de sequenciamento do gene 16s rRNA para 20 amostras, cujo resultado foi 100% de compatibilidade. O uso do MALDI-TOF para identificação de bactérias em ovos de consumo ainda não é uma prática rotineira e pode ser considerada confiável.

Na casca foram identificados os filos Firmicutes, Proteobacteria Actinobacteria e Bacteroidetes (Figura 1). Os filos Firmicutes e Proteobacteria foram os mais comumente encontrados, correspondendo a 89% do total das bactérias identificadas. Firmicutes foi o mais prevalente com 45,0% e o filo Proteobacteria teve prevalência de 44,0%.

O filo Firmicutes inclui as bactérias Gram-positivo não esporulantes (Madigan et al., 2010). A microbiota mais prevalente na casca dos ovos é composta por bactérias Gram-positivo conforme foi descrito por outros autores (De Reu et al., 2008; Chousalkar et al., 2010). Neira et al. (2017) compararam a microbiologia dos ovos de consumo provenientes dos sistemas de criação em gaiola convencional e *free-range*. Em ambos os sistemas, o filo Firmicutes foi o mais prevalente, representando 50% do total dos filos encontrados na casca dos ovos. Fusobacteria e Bacteroidetes foram o segundo e o terceiro filos mais predominantes, respectivamente.

Firmicutes também foi encontrado com maior frequência na casca de ovos férteis (limpos e sujos) analisados por sequenciamento do gene 16S rRNA em um estudo realizado por Olsen et al. (2017). Os autores investigaram o impacto de processos específicos de sanitização na microbiota da casca de ovos férteis. Em geral, a microbiota foi dominada por bactérias pertencentes aos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. Os filos Bacteroidetes e Actinobacteria foram reduzidos significativamente após o processo de sanitização.

O filo Proteobacteria, segundo mais prevalente neste estudo, corresponde a maior divisão do domínio *Bacteria*. É um grande filo que inclui muitas das bactérias Gram-negativo comuns incluindo *Escherichia coli*, *Pseudomonas* e *Salmonella* (Madigan et al., 2010).

O filo Actinobacteria foi observado em menores porcentagens quando comparado aos outros dois. A maior porcentagem foi no tratamento L-APA (27,27%). Sua prevalência foi menor neste estudo quando comparado com os resultados de outros autores (Neira et al., 2017; Olsen et al., 2017).

Actinobacteria também é pouco identificado nas excretas de galinhas poedeiras (Videnska et al., 2014), o que pode justificar a baixa prevalência do filo neste estudo. Apenas nos ovos submetidos ao tratamento L-UVC foram identificadas bactérias do filo Bacteroidetes (4,0%). Porém nas excretas de aves, 22% das bactérias presentes são pertencentes a este filo (Videnska et al., 2014).

Estudos afirmam que os ovos adquirem sua primeira carga microbiana durante a passagem pela cloaca da galinha, o que pode ser comprovado pela presença dos filos Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes no ceco de aves adultas (Wei et al., 2013; Wen et al., 2021) e na casca dos ovos estudados, apesar de ocorrer variações nas proporções encontradas.

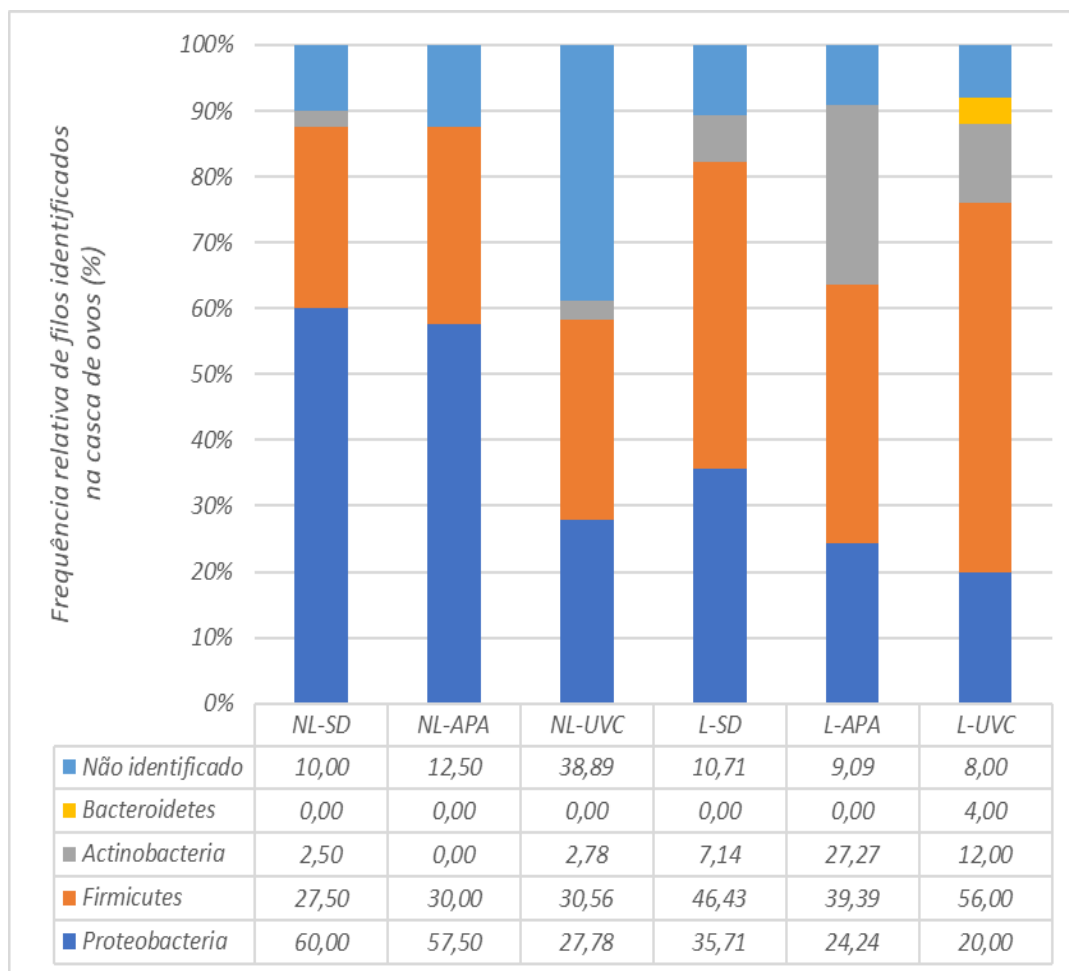


Figura 1. Composição da microbiota encontrada na casca dos ovos por filo. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC.

A frequência das famílias encontradas na casca dos ovos pode ser observada na figura 2. A família Staphylococcaceae foi observada em todos os tratamentos, principalmente nos ovos lavados. A família Enterobacteriaceae foi identificada também em todos os tratamentos, porém com maior frequência nos ovos não lavados. Houve redução da porcentagem de bactérias da família Enterobacteriaceae após a lavagem dos ovos (57,5% nos tratamentos NL-SS e NL-APA, e 27,78% no tratamento NL-UVC para 10,71%, 3,03% e 8,0% nos tratamentos L-SS, APA e UVC, respectivamente). Apesar da redução na porcentagem das bactérias identificadas da família Enterobacteriaceae, não foi possível observar redução na contagem desses micro-organismos na casca dos ovos. Jones et al.

(2004) não observaram redução de bactérias da família Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae em ovos lavados. Porém, Musgrove et al. (2005) avaliaram a casca de ovos em diferentes pontos do processamento e constataram que houve redução de enterobactérias no decorrer do processamento (lavagem e sanitização) dos ovos em todas as plantas avaliadas.

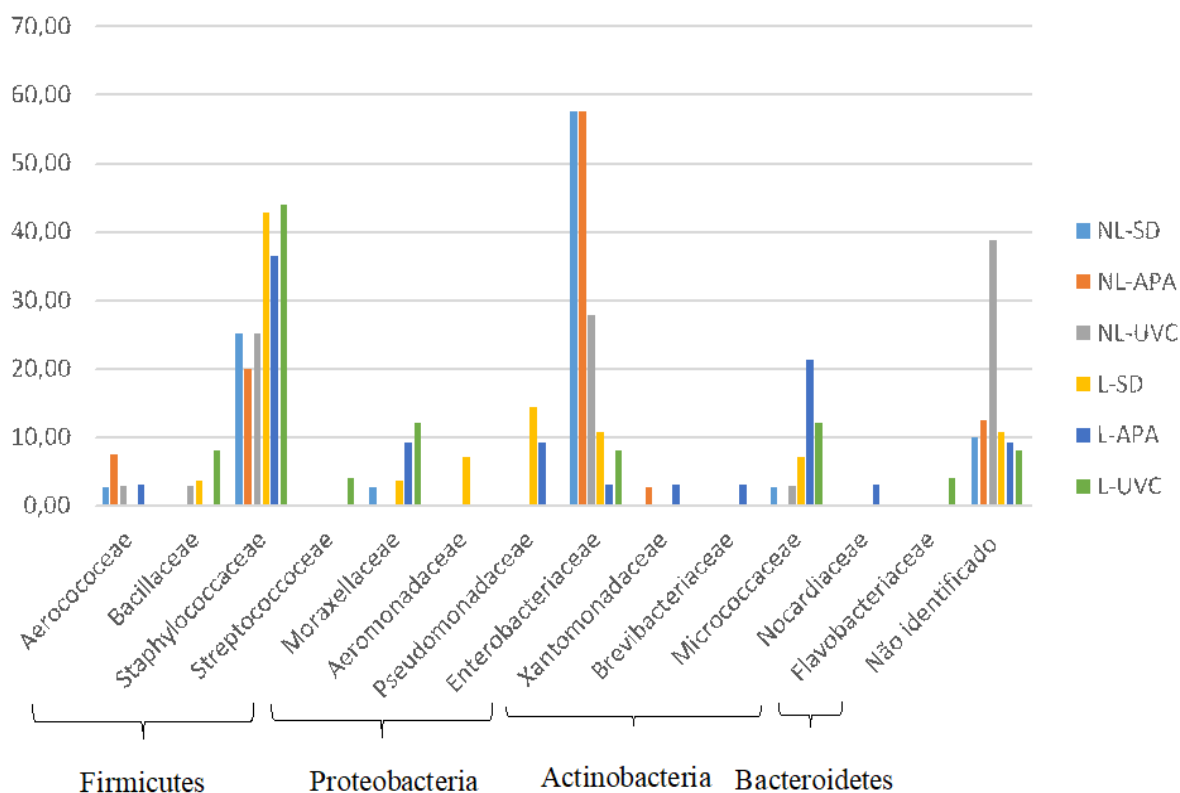


Figura 2. Composição da microbiota encontrada na casca dos ovos por família. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC.

A família Staphylococcaceae foi observada com maior frequência após o processo de lavagem, sendo 25% nos tratamentos NL-SS e NL-UVC e 20,0% no tratamento NL-APA. Nos tratamentos L-SS, L-APA e L-UVC as porcentagens foram 42,8%, 36,4% e 44,0%, respectivamente. Algumas bactérias incluídas nesta família têm a capacidade de anexar às superfícies e formar o biofilme. Sua formação em equipamentos de processamento de alimentos pode levar à contaminação de produtos. O biofilme microbiano é composto por células de micro-organismos e uma matriz extracelular, principalmente, polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Esta formação pode atuar como escudo contra vários tratamentos antimicrobianos (Tango et al., 2018). Diante disso, a falta de higienização

adequada das máquinas de lavagem pode acabar acarretando a contaminação dos ovos após a postura.

A figura 3 demonstra a porcentagem dos gêneros encontrados na casca dos ovos. Ao todo foram identificados 23 gêneros. Alawi (2018) identificou 13 gêneros de bactérias em ovos de diferentes sistemas de criação utilizando análise metagenômica. A maioria dos micro-organismos isolados são encontrados normalmente na microbiota intestinal das aves, no ambiente e em outros tipos de alimentos.

Na casca dos ovos não lavados os três gêneros mais prevalentes foram *Enterobacter*, *Escherichia* e *Staphylococcus*. Já na casca dos ovos lavados, os três gêneros mais prevalentes foram *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Escherichia*.

Karunarathna et al. (2017) encontraram que a maioria das bactérias isoladas pertenciam ao gênero *Enterococcus* sp. (29,71%) seguida do gênero *Escherichia* (19,46%).

Os gêneros mais abundantes encontrados por Olsen et al. (2017) foram *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Psychobacter*, *Aerococcus*, *Pseudomonas*, *Turicibacteria*, *Salinococcus*, *Incertae*, *Sedis*, *Corynebacterium*, *Escherichia-Shigella*, *Brevibacterium*, *Clostridium sensu stricto*, *Faecalibacterium*, *Paracoccus*, *Bacteroides*, *Brachysbacterium*, *Micobacterium*, *Blautia*, e *Anaerosporeobacter*, pertencentes ao filo *Firmicutes*.

O gênero *Enterobacter* não foi observado na casca dos ovos lavados demonstrando que a lavagem pode ser capaz de eliminar um dos gêneros mais predominantes na casca de ovos. *Escherichia* foi encontrado na casca dos ovos lavados e não sanitizados. Porém, tanto o APA quanto o UVC parecem ter sido capazes de eliminá-lo.

Os gêneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Klebsiella* e *Stenotrophomonas* foram isolados de ovos de consumo em estudos anteriores. Alawi (2018) identificou também, por análise metagenômica, os gêneros *Cryseobacterium*, *Kocuria* e *Brevundimonas*.

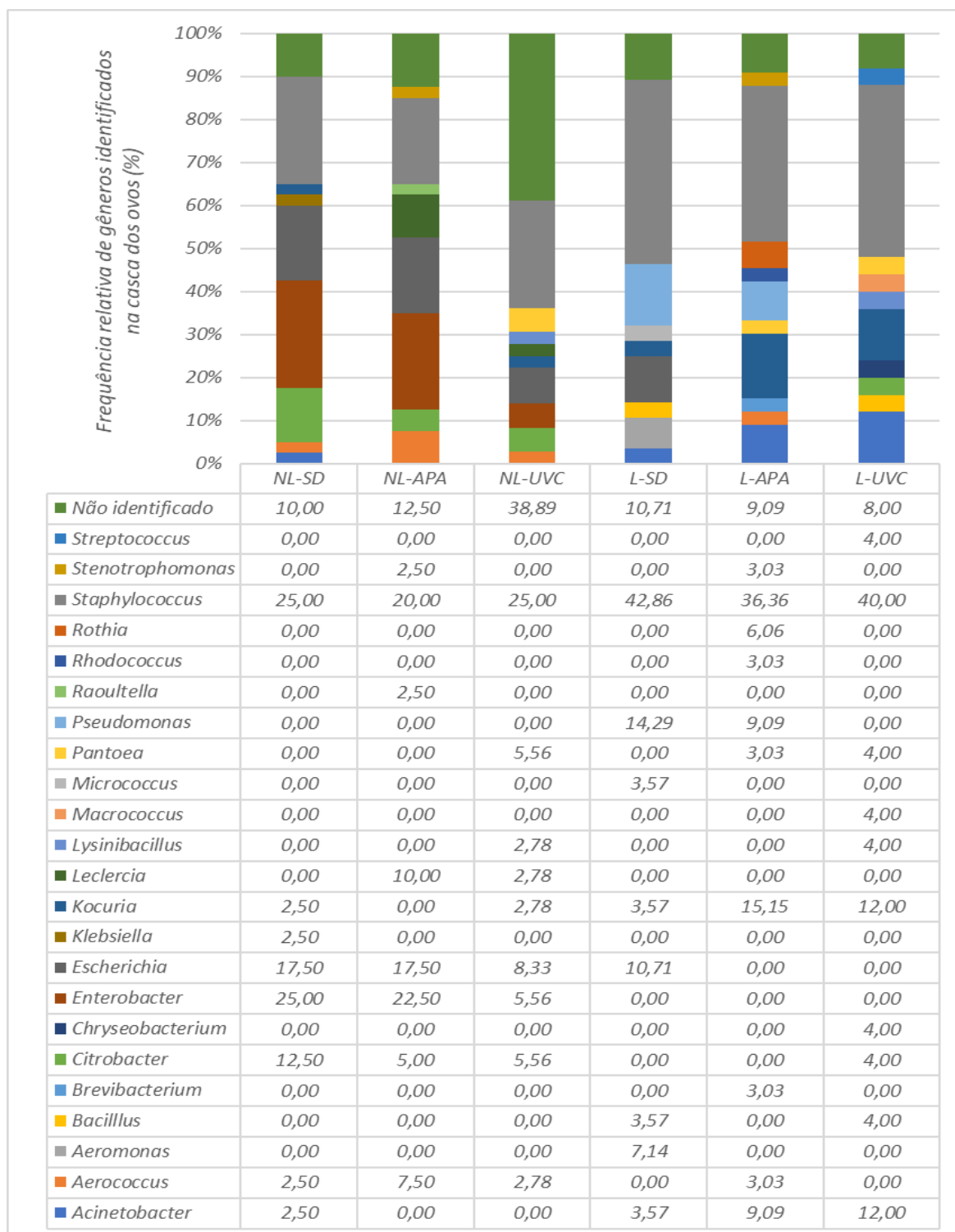


Figura 3. Composição da microbiota encontrada na casca dos ovos por gênero. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC.

Dentro do gênero *Staphylococcus*, foram identificadas sete espécies, *S. aureus* (NL-SS, NL-APA e NL-UVC), *S. equorum* (L-SS), *S. gallinarum* (NL-SS), *S. lugdunensis* (L-

APA), *S. saprophyticus* (NL-SS), *S. sciuri* (L-SS, NL-APA, L-UVC e L-APA) e *S. xylosus* (NL-SS, NL-UVC e NL-APA). Stepien-Pysniak et al. (2009) observaram a presença de doze espécies de *Staphylococcus* em ovos de consumo, dentre as mais frequentes, *S. aureus*, *S. hycus*, *S. lentus*, *S. warneri*, *S. epidermidis* e *S. xylosus*. Alawi (2018) isolou *S. equorum* em maior abundância quando comparado às demais espécies.

As espécies encontradas em maior proporção dos demais gêneros foram *Enterobacter cloacae* apenas nos tratamentos nos quais não foi feita lavagem (NL-SS, NL-APA e NL-UVC), e *Escherichia coli*, nos tratamentos (NL-SS, NL-APA e L-SS). Três espécies de *Escherichia* foram identificadas: *E. coli*, *E. hermannii* e *E. vulneris*, sendo *E. coli* mais prevalente. *E. coli* é normalmente encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais. Porém, certas variantes do agente podem causar infecções na corrente sanguínea e no sistema nervoso central. Algumas amostras de *E. coli* identificadas em ovos podem ser semelhantes aos causadores de meningite, sepse e infecções do trato urinário (Mellata et al., 2017).

A espécie *Leclercia adecarboxylata* foi identificada na casca dos ovos dos tratamentos NL-APA e NL-UVC. A bactéria é Gram-negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae e pode estar presente no intestino humano se comportando como patógeno oportunista e havia sido descrita anteriormente em ovos por Stepien-Pysniak (2010). *L. adecarboxylata* compartilha propriedades estruturais e microbiológicas semelhantes ao gênero *Escherichia*. Spiegelhauer et al. (2018) identificaram pelo método MALDI-TOF a bactéria em infecções causando quadros de diarreia, infecção do trato urinário e pneumonia em pacientes imunocomprometidos.

Mesmo após lavagem e sanitização, o gênero *Acinetobacter*, das espécies *A. berezinae*, *A. junii* e *A. towneri* estavam presentes na casca dos ovos. Do gênero *Kocuria*, apenas a espécie *K. rhizophila* foi identificada. Além disso, os métodos utilizados na sanitização também não foram suficientes para eliminar as seguintes espécies do gênero *Pseudomonas*: *P. fulva*, *P. otidis* e *P. stutzeri*.

O gênero *Pseudomonas* está comumente associado ao processo de deterioração dos ovos (Aragon-Alegro et al., 2005; Neira et al., 2017). Jones et al. (2004) observaram 3,1% da casca de ovos lavados e não lavados contaminados com *Pseudomonas*.

Identificação bacteriana do conteúdo dos ovos

No conteúdo dos ovos, o método MALDI-TOF foi capaz de identificar bactérias ao nível de gênero em 64,9% (37/57) e 38,6% (22/57) de espécie. Do total de colônias selecionadas, 35,1% (20/57) não obtiveram identificação confiável.

Os filos presentes foram Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria (Figura 3). Enquanto na casca o filo Firmicutes foi o mais prevalente, no conteúdo interno o filo Proteobacteria teve maior percentagem (44,1%). O albúmen, em geral, apresenta contaminação mais baixa por bactérias Gram-positivo, pois a lisozima presente age lisando a parede desses micro-organismos sendo a principal responsável pela proteção dos ovos (Board e Tranter, 1995; Johnson, 2015).

O filo Firmicutes, presente no conteúdo nas porcentagens (12,50, 42,86 e 25,0% para os tratamentos NL-SS, NL-APA e NL-UVC, respectivamente) foi quase inexistente no conteúdo dos ovos lavados, sendo identificado somente em 6,25% no tratamento L-UVC.

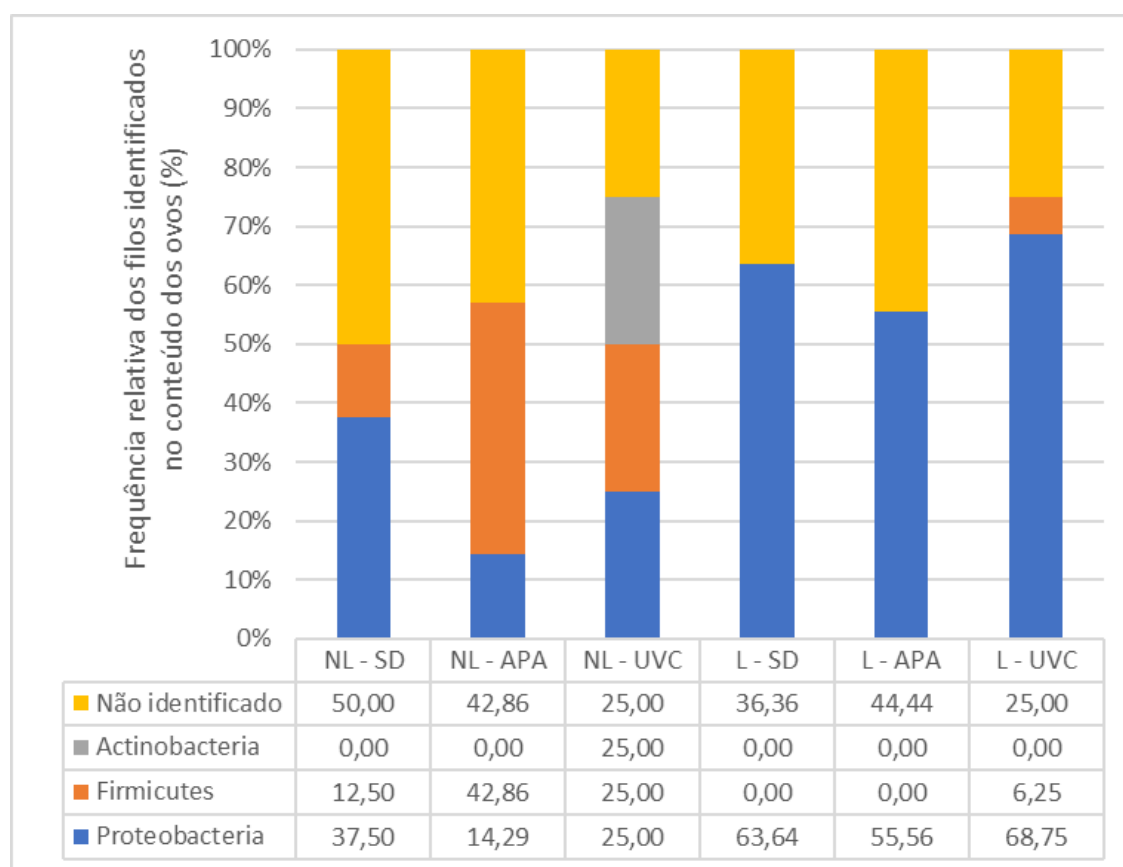


Figura 4. Composição da microbiota encontrada no conteúdo dos ovos por filo. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC.

A proporção das famílias em relação aos tratamentos pode ser observada na Figura 5. A família Enterobacteriaceae foi a mais prevalente no conteúdo dos ovos analisados, sendo ainda mais alta nos ovos lavados e sanitizados com UVC. Na casca dos ovos, a lavagem parece ter reduzido à frequência de enterobactérias. Porém isso não foi observado no conteúdo interno. A família Staphylococcaceae foi observada apenas nos ovos NL-SS e NL-APA, apesar de estar presente na casca de todos os tratamentos.

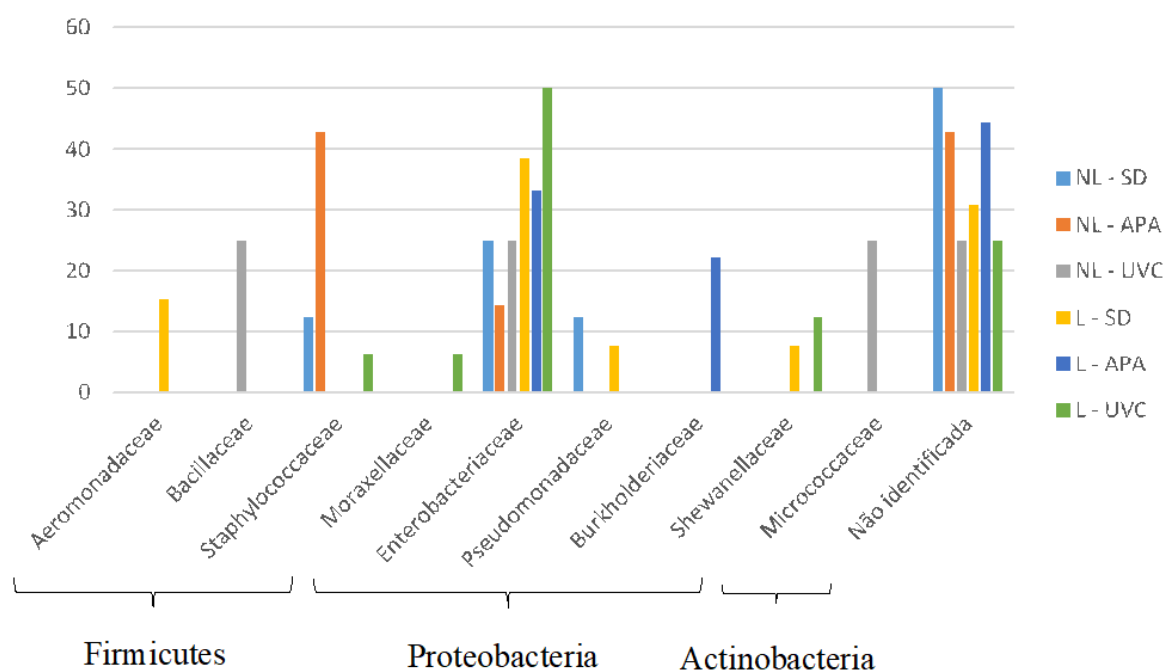


Figura 5. Composição da microbiota encontrada na casca dos ovos por família. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC.

O tempo necessário para a penetração de bactérias da casca para o conteúdo é diferente entre as espécies. É possível que o tempo decorrido entre a postura, lavagem e análise do conteúdo (48 horas) não tenha sido o suficiente para a penetração de todos os micro-organismos da casca para o conteúdo. De Reu et al. (2006) avaliaram a penetração dos ovos inoculados artificialmente com as seguintes amostras de bactérias: *Staphylococcus warneri*, *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes* sp., *Serratia marcescens*, *Cornobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. e *Salmonella* Enteritidis. Segundo os autores todas as amostras de bactérias selecionadas foram capazes de penetrar nos ovos após aproximadamente cinco

dias. Os primeiros micro-organismos a penetrarem a casca foram: *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. e *Salmonella* Enteritidis. A presença de bactérias no conteúdo dos ovos pode estar relacionada também a presença desses micro-organismos no trato reprodutivo das aves. Wen et al. (2021) observaram a presença dos gêneros *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* na vagina, istmo, útero e infundíbulo das aves, além da cloaca.

A figura 6 demonstra a porcentagem dos gêneros encontrados no conteúdo dos ovos. Ao todo foram identificados 10 gêneros.

O gênero *Escherichia*, apesar de não ter sido observado na casca dos ovos após sanitização, foi encontrado no conteúdo nas porcentagens de 11,11 e 25,0%, para os tratamentos L-APA e L-UVC, respectivamente. Observando o contrário, Chousalkar et al. (2010) relataram a presença de *E.coli* na casca e membrana interna da casca dos ovos, porém não identificaram sua presença no conteúdo pela técnica de PCR.

O gênero *Enterobacter*, ausente na casca de ovos lavados, foi observado no conteúdo interno. A espécie mais predominante foi *Enterobacter kobei*. A presença desses micro-organismos no conteúdo e não na casca dos ovos lavados pode sugerir que a penetração foi anterior ao processo de lavagem e sanitização.

O gênero *Staphylococcus* estava presente no conteúdo dos ovos NL-SS, NL-APA e L-UVC. As espécies identificadas do gênero *Staphylococcus* foram *S. xylosus* e *S. warneri*. Stepien-Pysniak et al. (2009) identificaram a presença de *S. aureus* na gema de ovos de consumo. Os autores ainda relatam que a espécie foi predominante quando comparada as espécies coagulase-negativo. Neste estudo, entretanto, todas as espécies de *Staphylococcus* encontradas foram coagulase-negativo.

A bactéria *Cupriavidus gilardii* foi identificada em 22,22% do conteúdo dos ovos do tratamento L-APA. Este agente faz parte da família Burkholderiaceae, é Gram-negativo e, até onde se foi estudado, ainda não havia sido descrito em ovos de galinha. É um agente causador de infecções em humanos, especialmente em pacientes imunocomprometidos e foi relatado também, recentemente, em paciente idoso sem imunodeficiência aparente. Além disso, a bactéria se mostrou resistente a diversos antimicrobianos (Zhang et al., 2017).

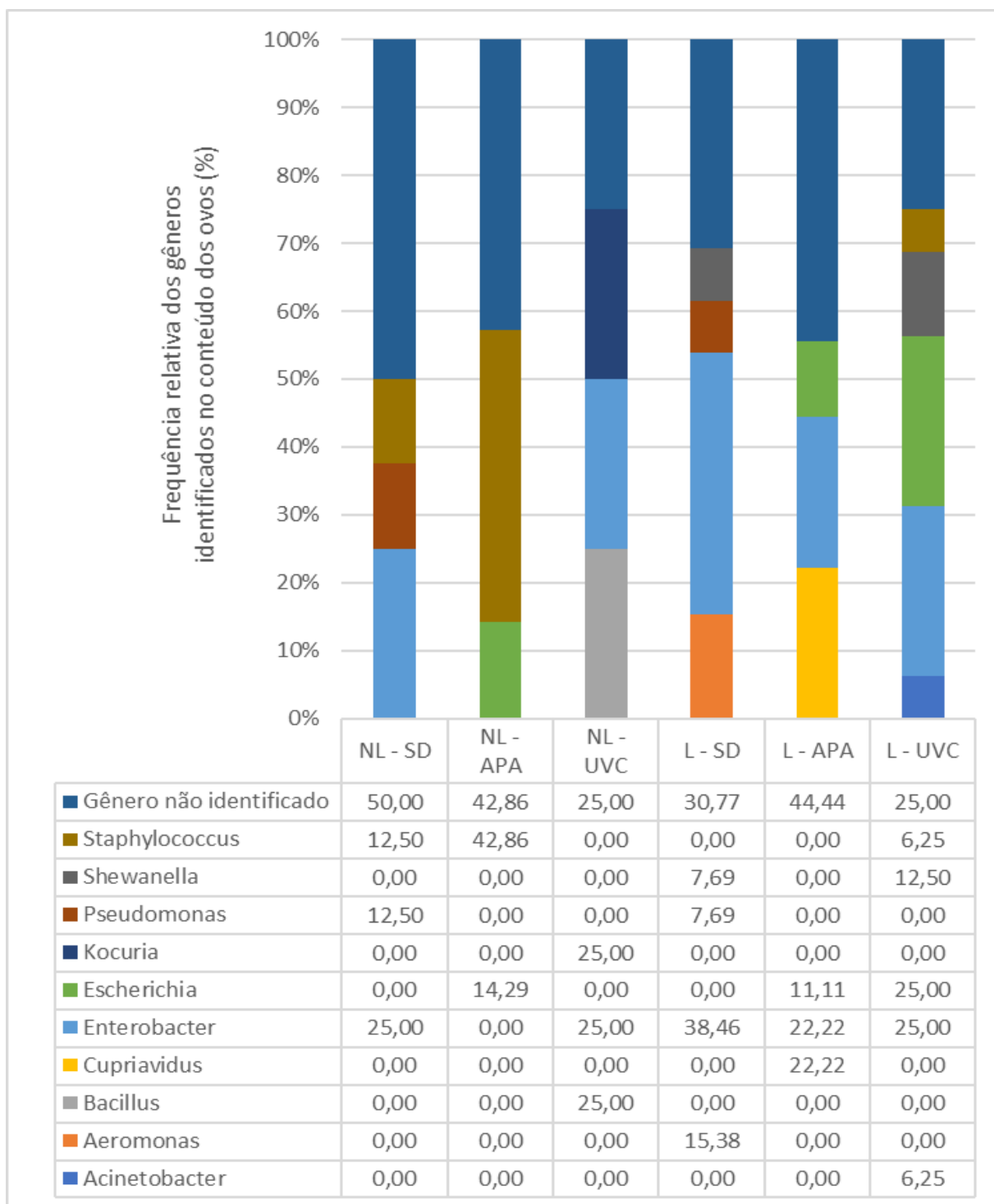


Figura 6. Composição da microbiota encontrada no conteúdo dos ovos por gênero. NL-SS: Não lavado – sem sanitização. NL-APA: Não lavado – desinfetado com ácido peracético. NL-UVC: Não lavado desinfetado com UVC. L-SS: Lavado – sem sanitização. L-APA: Lavado – desinfetado com ácido peracético. L-UVC: Lavado desinfetado com UVC.

Salmonella não foi identificada nos ovos analisados, nem na casca e nem no conteúdo interno. *Salmonella* pode entrar no conteúdo do ovo tanto durante a formação, ainda no

oviduto da galinha (Okamura et al., 2001), quanto pela invasão através dos poros (Messens et al., 2005). Em uma revisão feita por Holt et al. (2011), os autores encontraram que a prevalência de ovos com *Salmonella* Enteritidis é esporádica e varia de 0,3% a 1,1% nos estudos analisados. Apesar de ser pequena, esta porcentagem no volume total da produção de ovos ainda pode ser considerada um risco, além disso, deve-se lembrar que as condições de higiene de coleta, processamento e forma de armazenamento também impactam fortemente na qualidade microbiológica dos ovos.

Apesar do menor contato das aves com as excretas, ovos do sistema de criação em gaiolas podem estar contaminados por *Salmonella*. Van Hoorebeke et al. (2010) concluíram que o sistema de criação em gaiolas convencionais foi o que apresentou maior risco para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, o que pode ser justificado por uma série de fatores como o número de aves alojadas ser muito maior nesse sistema e a dificuldade de limpeza e sanitização desses tipos de instalações. Porém, neste estudo com galinhas alojadas em gaiolas convencionais, a bactéria não foi identificada.

Entre os patógenos mais conhecidos considerados importantes na contaminação dos ovos (*Salmonella* Thyphimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Clostridium*) (Aragon-Alegro et al., 2005; Neira et al., 2017), apenas o gênero *Staphylococcus* foi identificado, neste estudo. Porém outros gêneros como *Cupriavidus*, *Leclercia* e *Acinetobacter* merecem atenção e estão relacionados a infecções em humanos. Entre os gêneros bacterianos mais envolvidos na deterioração desse alimento estão *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Flavobacterium* (Aragon-Alegro et al., 2005). A maioria deles também foi observada neste estudo.

Bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Staphylococcoceae são as mais frequentemente observadas tanto na casca quanto no conteúdo e o processo de lavagem interfere no perfil da microbiota encontrada, sendo capaz principalmente de reduzir a proporção das enterobactérias da casca, mas não do conteúdo dos ovos. A lavagem dos ovos pode eliminar da casca parte dos micro-organismos. Porém pode haver penetração para o conteúdo antes mesmo deste processo, o que reforça atenção especial em relação a higiene de instalações e coleta de ovos. Apesar de *Salmonella* não ter sido identificada nos ovos analisados, outras bactérias potencialmente patogênicas foram observadas e devem ser controladas ou monitoradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AJEELI, M.N.; TAYLOS, T.N.; ALVARADO, C.Z. et al. Comparison of eggshell surface sanitization Technologies and impacts on consumer acceptability. *Poult. Sci.* v.95., p. 1191-1197, 2016.

ALAWI, M.A. Molecular analysis of the bacterial community in table eggs, 2018. 178 f. Thesis (PHD Food Science) - Engineering and Physical Sciences School, Heriot Watt University, Edinburg.

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

BIZZINI, A.C.; DURUSSEL, J.; BILLE, G. et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* v. 48, p. 1549–1554, 2010.

BOARD, R.G.; TRANTER, H.S. The microbiology of eggs. In: STALDEMAN W.J.; COTTERILL, O.J. *Egg Science and Technology*. 4th. Binghamton: Food Products, 1995. p.81–104.

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

CHOUSALKAR, K.K.; FLYINN, P.; SUTHERLAND, M. et al. Recovery of Salmonella and Echerichia coli from commercial eggshells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. *Int. J. Food Microbiol.*, v.142, p.207-213, 2010.

CLIMACO, W.L.S.; MELO, E.F.; VAZ, D.P. et al. Eggshell microbiology and quality of hatching eggs subject to different sanitizing procedures. *Pesq. Agrop. Bras.* v. 53, n.10, p. 117-1183, 2018.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; HEYNDRICKX, J. et al. Bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages, and aviary housing systems for laying hens. *Br. Poult. Sci.* v. 46. p. 149-155, 2005.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, M. et al. The effect of a commercial UV disinfection system on the bacterial load of shell eggs. *Lett. Appl. Microbiol.*, p.144-148, 2006.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W. et al. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella Enteritidis*. *Int. J. of Food Microbiol.*, v.112, p.253-260, 2006.

DE REU, K.; MESSENS, W.; HEYNDRICKX, M. et al. Bacterial contamination of table eggs and the influence of housing systems. *Worlds Poult. Sci. J.*, v. 64, p. 5–19, 2008.

FASENKO, G.M.; O'DEA CHRISTOPHER, E. E. e MCMULLEN, L. M. Spraying hatching eggs with electrolyzed oxidizing water reduces eggshell microbial load without compromising broiler production parameters. *Poult. Sci.*, v. 88, p.1121–1127, 2009.

FAVIER, G.L.; ESCUDERO, M.E.; GUZMAN, M.S. Effect of chlorine, sodium chloride, trisodium phosphate and ultraviolet radiation on the reduction of *Yersinia enterocolitica* and mesophilic aerobic bacteria from eggshell surface. *J. Food Protec.* v.64., p. 1621-1623, 2001.

FERNANDEZ, M.S.; MOYA, A.; LOPES, L. et al. Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation. *Mat. Bio.*, v. 19, p. 793-803, 2001.

GOLE, V.C.; CHOUSALKAR, K.K. e ROBERTS, J.R. Survey of Enterobacteriaceae of table eggs collected from layer flocks in Australia. *Int. J. of Food Microbiol.* v. 164, p. 161-165, 2013.

GOLE, V.C.; ROBERTS, J.R.; SEXTON, M. et al. Effect of egg washing and correlation between cuticle and egg penetration by various *Salmonella* strains. *Int. J. of Food Microbiol.* v.182, p. 18-25, 2014.

HANNAH, J.F.; WILSON, J.L.; COX, N.A. et al. Comparison of shell bacteria from unwashed and washed table eggs harvest from caged laying hens and cage-free floor housed laying hens. *Poult. Sci.* v.90. p.1586-1593, 2011.

HINCKE, M.T.; NYS, Y.; GAUTRON, J. et al. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Bio.*, v.17, p. 1266-1280, 2012.

HOLT, P.S., DAVIES, J., DEWULF, R.K. et al. The impact of diferente housing systems on egg safety and quality. *Poult. Sci.* v.90, n.1, p.251-262, 2011.

HUNEAU-SALAÜN, A., MICHEL, V., HUONNIC, D. et al. Factors influencing bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and free-range systems for laying hens under commercial conditions. *Br. Poult. Sci.* v.51, n.2, p.163-169, 2010.

HUTCHINSON, M.L.; GITTINS, J.; WALKER, A. et al. Na assessmente of the microbiological risks involves with egg washing under commercial conditions. *J. Food Prot.*, v.67, n.1, p.4-11, 2004.

JOHNSON, A.L. Reproduction in the female. *Sturkie's Avian Physiology*. 6 ed. Elsevier Inc., 2015, p. 635-665.

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

JONES, D.R., COX, N.A., GUARD, J. et al. Microbial impact of three commercial laying hen housing systems. *Poult. Sci.* v. 94, n. 3, p. 544-551, 2015.

KARUNARATHNA, R.; POPOWICH, S.; WAWRYK, M. et al. Increased Incidence of Enterococcal Infection in Nonviable Broiler Chicken Embryos in Western Canadian Hatcheries as Detected by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Avian Dis.*, v.61, n. 4, p.472-480, 2017.

KEKLIK, N.M.; DEMIRCI, A.; PATTERSON, P.H. et al. Pulsed UV light inactivation of Salmonell Enteritidis on eggshell and its effects on egg quality. *J. Food. Protec.* V.73, p.1408-1415, 2010.

KULSHRESHTHA, G.; RODRIGUEZ-NAVARRO, A.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, E. et al. Cuticle and pore plug properties in the table egg. *Poult. Sci.* v. 97, p. 1382-1390, 2018.

- LELEU, S.; MESSENS, W.; DE REU, K. et al. Effect of egg washing on the cuticle quality of brown and White table eggs. *J. Food. Protec.* v. 74, p. 1649-1654, 2011.
- LIU, Y.C.; CHEN, T.H.; WU, Y.C. et al. Effects of egg washing and storage temperature on the quality of eggshell cuticle and eggs. *Food Chem.* v. 211, p. 687-693, 2016.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V. et al. *Microbiologia de Brock*. 12ed. Porto Alegre:Artmed, 2010. 1160p.
- MANSOUR, A.F.A.; ZAYED, A.F.; BASHA, O.A.A. Contamination of the egg shell and internal content of table eggs with some pathogens during different storage periods. *Assiut. Vet. Med. J.* v. 61, n. 146, p. 8-14, 2015.
- MAYES, F.J.; TAKEBALLI, M.A. Microbial contamination of the hen's egg: a review. *J. Food Prot.* v. 46, p. 1092-1096, 1983.
- MELLATA, M.; JOHNSON, J.R.; CURTISS, R. Escherichia coli isolates from commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and u inary tract infection in rodent models of human infections. *Zoonoses Public Health*.v.65, p. 103-113, 2018.
- MELO, E.F.; CLÍMACO, W.L.S.; TRIGINELLI, M.V. et al. An evaluation of alternative methods for sanitizing hatching eggs. *Poult. Sci.* v.0, p. 1-8, 2019.
- MESSENS, W., GRIJSPEERDT, K., HERMAN, L. Eggshell penetration by Salmonella: A review. *Worlds Poult. Sci. J.* v.61, n.1, p.71-86, 2005.
- MESSENS, W. Egg decontaminatio by washing. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.*, p. 163-180, 2011.
- MOYLE, T.; DRAKE, K.; GOLE, V. et al. Bacterial contamination of eggs and behaviour in free range enviorenment. *Comp. Immunol. Microb. Dis.*v. 49., p.88-94, 2016.
- MUSGROVE, M. T.; JONES, D. R.; NORTHCUTT, J. K. et al Impact of Commercial Processing on the Microbiology of Shell Eggs. *J. Food Prot.*, v. 68, n. 11, p. 2367-2375, 2005.
- NEIRA, C.; LACA, A. LACA. A. et al. Microbial diversity on commercial eggs as affected by the production system. A first approach using PGM. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 262., p-3-7, 2017.

- OKAMURA, M., KAMIJIMA, Y., MIYAMOTO, T. et al. Differences among *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and contaminate eggs in laying hens. *Avian Dis.* v.45, p.61-69, 2001.
- OLSEN, R.E.; KURDIKIENE, I.; THOFNER, S. et al. Impact of egg disinfection of hatching eggs on the eggshell microbiome and bacterial load. *Poult. Sci.*, v. 96., p. 3091-3911, 2017.
- PASQUALI, F.; ROCULLI, P.; CESARE, A. et al. New Technologies to enhance quality and safety of table eggs: ultra-violet treatment and modified atmosphere packaging. *Italian J. Food. Safe.* v. 3, p. 192-195, 2014.
- R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- RUIZ, J.; LUNAM, C.A. Ultrastructural analysis of the eggshell: contribution of the individual calcified layers and the cuticle to hatchability and egg viability in broiler breeders. *Br. Poult. Sci.* v. 41., p. 584-592, 2000.
- SAMIULLAH, S.; ROBERTS JR; CHOUSALKAR, K.K. Effect of production system and flock age on egg quality and total bacterial load in commercial laying hens. *J. Appl. Poult. Res.*, v.23, n.1, p.59-70, 2014.
- SAMIULLAH, S.; ROBERTS, J.R. The cuticle of the laying hen. *Worlds Poult. Sci. Ass.*, v. 79., p.693-708, 2014.
- SOARES, C.E.S.; CARTABIANO LEITE, C.E.; FERREIRA, W.X. et al. Peracetic acid: Effect on the Chicken Eggshell Cuticle and Decontaminating Action on Filamentous Fungi. *Jokull.*, v.71, n. 4, p. 82-96, 2021.
- SOLOMON, S.E. Egg and eggshell quality. England: Wolfe Publishing, 1991.
- SPIEGELHAUER, M.R.; ANDERSEN, P.F.; FRANDSEN, T.H. et al. *Leclercia adecarboxylata*: a case report and literature review of 74 cases demonstrating its pathogenicity in immunocompromised patients. *Inf. Dis.* v.0, p. 1-10, 2018.
- STEPIEN-PYSNIAK, D. Occurrence of Gram-negative bacteria in hen's egg depending on their source and storage condition. *Polish J. Vet. Sci.*, v. 13., p. 507-513, 2010.

- STEPIEN-PYSNIAK, D.; MAREK, A.; RZEDZICKI, J. Occurrence of bacteria of the genus *Staphylococcus* in table eggs descended from different sources. *Polish J. Vet. Sci.*, v. 12, n. 4, p. 481-484, 2009.
- TANGO, C.N.; AKKERMANS, S.; HUSSAIN, M.S. et al. Modeling the effect of pH, water activity, and ethanol concentration on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol.*, v. 76, p. 287-295, 2018.
- TURTOI, M.; BORDA, D. Decontamination of eggshell using ultravioleta light treatment. *Worlds Poult. Sci. J.* v.70, p. 265-277, 2014.
- VAN HOOREBEKE, S., VAN IMMERSEEL, F., SCHULZ, J. et al. Determination of the within and between flock prevalence and identification of risk factors for *Salmonella* infections in laying hen flocks housed in conventional and alternative systems. *Prev. Vet. Med.* v.94, n.1-2, p.94-100, 2010.
- VIDENSKA, P.; SEDLAR, P.; LUKAC, K. et al. Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole life. *PLOS ONE.*, v.9., p.1-14, 2014.
- VINAYANANDA, C.O.; FAIROZE, N.; MADHAVAPRASAD, S.M. et al. Studies on occurrence, characterization and decontamination of emerging pathogenic *Escherichia coli* (STEC, ETEC and EIEC) in table eggs. *Br. Poult. Sci.* v. 58, n. 6, p. 664-672. 2017.
- WANG, H.; SLAVIK, M.F. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and storage at different temperatures and times. *J. Food Prot.* v. 61, n.3, p. 276-279, 1998.
- WEI, S.; MORRISON, M.; YU, Z. Bacterial census of poultry microbiome. *Poult. Sci.*, v. 92, p. 671-683, 2013.
- WEN, C.; LI, Q.; LAN, F. et al. Microbiota continuum along the chicken oviduct and its association with host genetics and egg formation. *Poult. Sci.* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101104>.
- ZHANG, Z.; DENG, W.; WANG, S. et al. First case report of infection caused by *Cupriavidus gilardii* in a non-immunocompromised Chinese patient. *ID Cases.* v. 10, p. 127-129, 2017.

CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A lavagem dos ovos é capaz de alterar as características da cutícula da casca. Porém, nas condições em que este experimento foi realizado, isso não contribuiu com a entrada de micro-organismos para o conteúdo interno. É importante ressaltar que os ovos ficaram armazenados dentro de sacos estéreis, pois o objetivo era avaliar a ação da lavagem e sanitização sobre a contaminação que ocorre na granja, logo após a postura.

Para a redução de micro-organismos aeróbios mesófilos totais da casca dos ovos é importante associar a lavagem com a sanitização por UVC. Porém, a lavagem e sanitização não interferem na contagem de Enterobacteriaceae, bolores e leveduras da casca.

O processo de lavagem é capaz de reduzir a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais e Enterobacteriaceae do conteúdo dos ovos dois dias após a coleta e reduzir a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, bolores e leveduras do conteúdo dos ovos após 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente. O processo de lavagem associado ao método de sanitização por UVC é eficiente na redução da contaminação do conteúdo dos ovos por Enterobacteriaceae após 15 dias de armazenamento.

O método MALDI-TOF é rápido para identificação dos micro-organismos, porém a técnica ainda não é capaz de identificar todas as bactérias isoladas. Bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Staphylococcaceae são as mais frequentemente observadas tanto na casca quanto no conteúdo interno dos ovos de consumo. O processo de lavagem reduziu a proporção das enterobactérias da casca, mas não do conteúdo dos ovos. A lavagem dos ovos pode eliminar da casca parte dos micro-organismos, porém pode haver penetração para o conteúdo antes mesmo deste processo, o que reforça a necessidade de monitorar a sanidade das aves e manter a higiene das instalações e coleta de ovos de maneira adequada. Apesar da *Salmonella* não ter sido identificada nos ovos analisados, outras bactérias potencialmente patogênicas foram observadas e devem ser controladas ou monitoradas.

Os níveis de contaminação dos ovos provenientes de aves alojadas em gaiolas, segundo comparações feitas com a literatura, não foram altos, além disso, a lavagem e a sanitização podem reduzir as contagens de micro-organismos da casca e do conteúdo dos ovos. Porém, bactérias da família Enterobacteriaceae, e outras que podem ser consideradas potencialmente patogênicas, foram identificadas no conteúdo dos ovos após dois dias de armazenamento, mesmo após lavagem e sanitização.