

**Guilherme Resende da Silva**

**ATIVIDADE DE ALFA-AMILASE COMO INDICADORA DA EFICIÊNCIA DE  
PASTEURIZAÇÃO DE OVOS E SUA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG,  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de  
Produtos de Origem Animal

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado.

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2015**

S586a Silva, Guilherme Resende da, 1987-  
Atividade de alfa-amilase como indicadora da eficiência de pasteurização de ovos e sua  
qualidade microbiológica / Guilherme Resende da Silva. – 2015.  
50 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Caçado  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

I. Ovos – Análise – Teses. 2. Qualidade – Teses. 3. Ovos – Microbiologia – Teses.  
I. Caçado, Silvana de Vasconcelos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de  
Veterinária. III. Título.

CDD – 637.5

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**GUILHERME RESENDE DA SILVA**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovada em 30 de janeiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



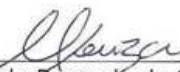
---

Prof<sup>a</sup>. Silvana de Vasconcelos Caçado  
Presidente - Orientadora



---

Dr<sup>a</sup>. Daniela Duarte de Oliveira  
Aviário Santo Antônio - ASA



---

Prof. Marcelo Resende de Souza  
Escola de Veterinária - UFMG



## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida.

Aos meus pais, Cândido e Maria de Fátima, por todo carinho e apoio em minhas decisões.

Aos meus irmãos, Cândido e Marcus, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos meus sobrinhos, Nina e João, pelos sorrisos e gargalhadas.

À professora Silvana pela disponibilidade, confiança e oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisa.

À Liliane Menezes pela amizade, pela disponibilidade, pelos ensinamentos e por toda a ajuda que foi fundamental para a execução desse trabalho.

Aos professores Marcelo e Tadeu por todas as sugestões e ensinamentos que muito me auxiliaram para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Aos amigos do IMA :Carla, Eronilda, Julieta, Taciano e Roger que contribuíram para meu crescimento profissional e me ajudaram bastante nessa pesquisa.

À Débora pela disponibilidade em me ajudar desde o início desse trabalho.

Aos meus amigos pelas conversas e todos outros momentos de descontração

Ao Aviário Santo Antônio pelo fornecimento dos ovos integrais, em especial a Daniela por toda colaboração.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária pela disponibilização do laboratório para a execução desse trabalho.

Ao Colegiado de pós-graduação em Ciência Animal da EV/UFMG.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigado!

---

## Sumário

---

Resumo.....	11
1. Introdução .....	13
2. Objetivos .....	14
3. Revisão Bibliográfica.....	14
3.1. Ovo integral pasteurizado.....	14
3.2. Verificação da eficiência da pasteurização do ovo.....	15
3.2.1. Enzima alfa-amilase .....	16
3.2.2. Complexo amido-iodo.....	17
3.2.3. Espectrofotometria e avaliação da atividade enzimática.....	18
3.3. Contaminação de ovos pasteurizados.....	19
3.4. Parâmetros microbiológicos para ovos pasteurizados.....	19
3.5. Microbiota de ovos integrais pasteurizados .....	20
3.5.1. Micro-organismos mesófilos aeróbios .....	21
3.5.2. Coliformes totais e termotolerantes.....	22
3.5.3. <i>Staphylococcus</i> spp. ....	22
3.5.4. <i>Salmonella</i> spp. ....	23
4. Material e métodos.....	24
4.1. Amostragem .....	24
4.2. Análises laboratoriais .....	24
4.2.1. Pesquisa da atividade da alfa-amilase por espectrofotometria .....	24
4.2.1.1. Soluções, reagentes e parâmetros instrumentais.....	25
4.2.1.2. Análise da atividade enzimática por espectrofotometria UV/visível.....	25
4.2.1.3. Curva padrão.....	26
4.2.1.4. Avaliação de diferentes temperaturas e tempos de pasteurização sobre a atividade enzimática .....	27

4.2.1.5. Pesquisa pela atividade da enzima alfa-amilase das amostras de ovos integrais fornecidas pela indústria .....	28
4.2.2. Preparo das amostras de ovos integrais fornecidas pela indústria para análises microbiológicas .....	28
4.3. Delineamento Experimental .....	30
4.3.1. Avaliação de diferentes temperaturas e tempos de pasteurização sobre a atividade enzimática .....	30
4.3.2. Análises das amostras provenientes da indústria.....	30
5. Resultados e discussão .....	30
5.1. Pesquisa atividade da enzima alfa-amilase .....	30
5.1.1. Curva padrão e equação de regressão.....	30
5.1.2. Análise da atividade da enzima alfa-amilase em diferentes binômios de pasteurização .....	32
5.1.3. Análise da atividade da enzima alfa amilase nas amostras de ovos integrais fornecidas pela indústria.....	35
5.2. Análises Microbiológicas .....	37
5.2.1. Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios.....	37
5.2.2. Contagem de coliformes totais e termotolerantes .....	39
5.2.3. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. ....	40
5.2.4. Frequência de <i>Salmonella</i> spp.....	42
6. Conclusões .....	44
7. Referências bibliográficas .....	45

---

---

---

## Lista de abreviaturas

---

ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEE: Comunidade Econômica Europeia

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

EFSA: Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (European Food Safety Authority)

FDA: Administração de alimentos e fármacos (Food and Drug Administration)

g: Gramas

°C: Graus Celsius

IMA: Instituto Mineiro de Agropecuária

KDa: Quilo Dalton

LSMA: Laboratório de Segurança Microbiológica de Alimentos

MAPA: Ministério da Agropecuária, Pecuária e Abastecimento

min.: Minutos

MERCOSUL: Mercado Comum do Sul

µg: Micro gramas

mL: mililitros

L: litro

NMP: Número Mais Provável

P.A.: Puro para Análise

PCR: Reação de Polimerase em Cadeia

%: Porcentagem

ppm: Parte por milhão

RIISPOA: Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal

SCP: *Staphylococcus* coagulase positivo

SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo

SE - Enterotoxinas Estafilocócicas

TCA: Ácido Tricloroacético

UFC: Unidade Formadora de Colônias

USDA: United States Department of Agriculture

UV: Ultravioleta



---

## Lista de Tabelas

---

- Tabela 1. Resultados do valor de absorvância do complexo amido-iodo de ovos pasteurizados nas temperaturas de 60°C, 62°C e 64,4°C..... 32
- Tabela 2. Resultados dos valores de absorvância do complexo amido-iodo de ovos pasteurizados a 60°C por 2,5minutos, 3,0minutos, 3,5minutos, 4,0 minutos e 4,5minutos..... 32
- Tabela 3. Resultados dos valores de absorvância do complexo amido-iodo de ovos pasteurizados a 62°C por 2,5minutos, 3,0minutos, 3,5minutos, 4,0 minutos e 4,5minutos..... 33
- Tabela 4. Resultados dos valores de absorvância do complexo amido-iodo de ovos pasteurizados a 64,4°C por 2,5minutos, 3,0minutos, 3,5minutos, 4,0 minutos, 4,5minutos..... 33
- Tabela 5. Resultados em porcentagem (%) de amido hidrolisado para análises da atividade da enzima alfa-amilase nas amostras de ovo cru, ovo pasteurizado à 60°C por 3,5 minutos e ovo pasteurizado à 68°C por 2,5 minutos..... 35
- Tabela 6. Resultados (UFC/mL) das contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios nas amostras de ovo cru, ovo pasteurizado à 60°C por 3,5 minutos e ovo pasteurizado à 68°C por 2,5 minutos..... 37
- Tabela 7. Resultados (UFC/mL) das análises de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de ovo cru, ovo pasteurizado à 60°C por 3,5 minutos e ovo pasteurizado à 68°C por 2,5 minutos..... 39
- Tabela 8. Resultados (UFC/g) das análises de *Staphylococcus* spp. nas amostras de ovo cru, ovo pasteurizado à 60°C por 3,5 minutos e ovo pasteurizado à 68°C por 2,5 minutos ..... 41
- Tabela 9. Frequência(%)de *Salmonella* spp. em amostras de ovo cru, ovo pasteurizado à 60°C por 3,5 minutos e ovo pasteurizado à 68°C por 2,5 minutos..... 43

---

### Lista de quadros

---

Quadro 1. Resultados da concentração inicial de amido (mg), média da concentração final de amido (mg) e porcentagem de amido hidrolisado em amostras de ovos pasteurizados nas temperaturas de 60°C, 62°C e 64,4°C por 2,5minutos, 3,0minutos, 3,5minutos, 4,0minutos e 4,5minutos.....	33
---	----

---

### Lista de figuras

---

Figura 1 Estrutura tridimensional da alfa amilase organizada em três domínios.....	17
Figura 2. Protocolo para pesquisa da atividade da enzima alfa amilase (adaptado Murthy, 1970) .....	26
Figura 3. Gráfico de regressão linear dos valores de absorvância do complexo amido-iodo em função da concentração de amido de ovos integrais pasteurizados a 70°C por 3,5 minutos.....	31
Figura 4. Análise da coloração visível das amostras de ovos pasteurizados a 60°C(A), 62°C(B) e 64,4°C (C) por 2,5 minutos, 3,0 minutos, 3,5minutos, 4,0minutos e 4,5minutos.....	35
Figura 5. Colorações visíveis formadas pela concentração do complexo amido-iodo em amostras duplicatas de solução padrão com iodo (A), ovo cru (B), ovo pasteurizado a 60°C por 3,5 minutos (C) e ovo pasteurizado a 68°C por 2,5 minutos (D). .....	37
Figura 6. Placa de ágar Baird Parker com colônias de <i>Proteus</i> spp. de uma amostra do tratamento de ovos crus.....	42

---

## Resumo

---

Com o objetivo de avaliar a eficiência da pasteurização do ovo integral foram utilizados 30 lotes de ovos crus submetidos a dois binômios de tempo e temperatura diferentes. Após a retirada de uma amostra de ovo cru de cada um dos lotes, os mesmos foram divididos em duas porções, sendo uma parte destinada à pasteurização a 60°C por 3,5 minutos e a outra a 68°C por 2,5 minutos. Os tratamentos foram dispostos no delineamento em blocos ao acaso utilizando 30 amostras de ovos crus, 30 amostras de ovos pasteurizados a 60°C e 30 amostras de ovos pasteurizados a 68°C. Para verificar se o processo foi conduzido nas temperaturas e tempos preconizados foi avaliada a termossensibilidade da enzima alfa-amilase pela quantificação indireta da hidrólise do amido, e para a avaliação da qualidade microbiológica dos ovos foram realizadas contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios, contagens de coliformes totais e termotolerantes, contagem de *Staphylococcus* spp. e pesquisa de *Salmonella* spp.. Os resultados da pesquisa da atividade da enzima alfa-amilase demonstraram que nos ovos crus a porcentagem de amido hidrolisado era alta evidenciando alta atividade enzimática, nos ovos pasteurizados a 60°C foram observadas grandes variações na porcentagem de amido hidrolisado, demonstrando que houve variação na temperatura de pasteurização, o que possibilitou a inativação parcial ou total da enzima. Nas amostras de ovo integral pasteurizadas a 68°C não houve hidrólise do amido em decorrência da inativação enzimática. Os resultados das análises microbiológicas demonstraram uma diminuição ( $p < 0,0001$ ) na contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios e nas contagens de coliformes totais e termotolerantes nos ovos pasteurizados nas duas temperaturas preconizadas, enquanto os ovos crus apresentaram altas contaminações ( $p < 0,0001$ ). Foram observadas diferenças nas contagens de *Staphylococcus* spp. entre todos tratamentos ( $p < 0,0001$ ) e as maiores contagens (acima de  $2,0 \times 10^5$  UFC/mL) foram observadas no ovo cru. *Salmonella* spp. estava presente em 23 (76,6%) amostras de ovo cru, no entanto, nos ovos tratados termicamente este micro-organismo só foi encontrado em uma (1,6%) amostra, que de acordo com a avaliação da atividade da enzima alfa-amilase foi submetida à temperatura inferior à 60°C. Foi concluído que a pesquisa da atividade da enzima alfa-amilase é eficiente para avaliação do processamento térmico, e que os binômios de temperatura e tempo empregados na pasteurização do ovo integral são adequados para a obtenção de ovos pasteurizados com qualidade.

**Palavras chave:** ovo integral, pasteurização, enzima alfa-amilase, qualidade microbiológica.

---

## Abstract

---

In order to evaluate the whole egg pasteurization efficiency, it was used 30 batches of raw eggs that were subjected to heat treatment in two different binomials of temperature and time. After removal of a raw egg sample of each batch, they were divided into two parts, one part being intended for pasteurization at 60 ° C for 3.5 minutes and the other at 68 ° C for 2.5 minutes. The treatments were arranged in a randomized block design using 30 samples of raw eggs, 30 samples of pasteurized eggs at 60 ° C and 30 samples of pasteurized eggs at 68°C. To verify that the pasteurization process was conducted in recommended temperatures and times, it was evaluated the thermosensitivity of alpha-amylase enzyme by indirect quantification starch hydrolysis, and to evaluate the microbiological quality of these eggs, it was made counts of aerobic mesophilic microorganisms, total and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus* spp. and research for *Salmonella* spp .. The results of the research for the activity of alpha-amylase enzyme in raw eggs demonstrated that this activity was high because the most part of starch added was hydrolyzed. In pasteurized eggs at 60 ° C for 3.5 minutes, it was observed variations in the percentage of hydrolyzed starch, and it demonstrated that there were variations in the pasteurization temperature, which allowed the partial or total inactivation of enzyme. In the samples of pasteurized whole egg to 68 ° C for 2.5 minutes no hydrolysis of starch was noted, and it could be explained by the inactivation of this enzyme that occurs in the binomial above 64.4 ° C for 2.5 minutes. The results of microbiological analyzes had significant decrease ( $p < 0.0001$ ) in the counts of aerobic mesophilic micro-organisms and total and thermotolerant coliforms in pasteurized eggs at two recommended temperatures and times, while the raw eggs showed high contamination ( $p < 0.0001$ ). There were differences in the counts of *Staphylococcus* spp. across all treatments ( $p < 0.0001$ ) and higher counts (above  $2.0 \times 10^5$  CFU / mL) were observed in the raw eggs. *Salmonella* spp. was present in 23 (76.6%) samples of raw eggs, however, in the heat-treated eggs, this micro-organism was found in only one (1.6%) sample, which according to the evaluation of the enzyme alpha-amylase activity, was subjected to a temperature lower than 60 ° C. It was concluded that the study of the enzyme alpha-amylase activity is effective for the evaluation of thermal processing in whole eggs, and that the two binomial temperature and time employed in the pasteurization of whole eggs are effective for obtaining high quality pasteurized eggs.

**Keywords:** whole egg, pasteurization, alpha-amylase enzyme, microbiological quality

## 1. Introdução

O ovo é um dos alimentos mais completos para a alimentação humana, apresentando uma composição rica em ácidos graxos e proteínas de alta qualidade que reúnem vários aminoácidos essenciais de excelente valor biológico. Além disso, o ovo também apresenta em sua composição vitaminas do complexo B e minerais, como o fósforo e o zinco (Stadelman e Cotterill, 1995). Desta maneira, o ovo é considerado uma fonte nutricional de alta qualidade, que devido ao baixo custo e a fácil aquisição pode contribuir para a melhoria da dieta de famílias de baixa renda. Porém, por ser rico em nutrientes e ser de alta digestibilidade, o ovo exige alguns cuidados para que não seja um precursor de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e para que chegue ao consumidor com um bom padrão de qualidade.

A produção brasileira de ovos no ano de 2013 foi de aproximadamente 34 bilhões de unidades, e os estados de São Paulo e Minas Gerais foram os dois maiores produtores de ovos do País, responsáveis por 34,3% e 12,4% da produção total, respectivamente. A maioria desses ovos foi comercializada *in natura* (ovo em casca), e a produção de ovos processados (líquidos ou desidratados), embora em menores proporções, foi destinada tanto a exportação, principalmente para países asiáticos, quanto para abastecimento do mercado interno (ABPA, 2014).

Na indústria de alimentos, o ovo processado é utilizado preferencialmente ao ovo *in natura*, pois, além do sabor, cor, valor nutritivo e propriedades funcionais serem semelhantes aos do ovo em casca, ele apresenta muitas vantagens operacionais, como melhor uniformidade, menor espaço para armazenamento e facilidade para medir as porções. No entanto, durante o processamento, os ovos, quando quebrados, podem ser facilmente contaminados por micro-organismos, sendo a pasteurização uma importante alternativa tecnológica para a garantia da inocuidade desta matéria prima alimentar. Desta maneira, a pesquisa por métodos que certifiquem a eficiência do tratamento térmico adequado é importante para o controle de qualidade interno das indústrias, contribuindo para garantia de um produto inócuo ao consumidor.

Existem poucos estudos sobre a presença de constituintes do ovo que possam servir como parâmetro para avaliar a eficiência da pasteurização. A termossensibilidade da enzima alfa-amilase, em temperaturas próximas a 64,4°C por 2,5 minutos foi descrita por alguns pesquisadores como sendo eficiente para verificação do binômio de pasteurização adotado por países europeus (Brooks, 1962; Murthy, 1970).

A pasteurização é um tratamento térmico que tem como objetivo destruir todos os micro-organismos patogênicos presentes, além de reduzir consideravelmente os micro-organismos deteriorantes sem que ocorram, entretanto, alterações nas constituições nutricionais e sensoriais do produto final. Embora as análises microbiológicas não sejam específicas para a avaliação da eficiência da pasteurização elas podem auxiliar, pois ao comparar a matéria-prima alimentar antes e após correto tratamento térmico espera-se que ocorra uma redução significativa na contagem dos micro-organismos presentes.

## 2. Objetivos

Verificar a eficiência de dois binômios de tempo e temperatura de pasteurização de ovos integrais (60°C por 3,5 minutos e 68°C por 2,5 minutos), pela pesquisa da atividade da enzima alfa-amilase.

Determinar a qualidade microbiológica dos ovos integrais para consumo, antes e após a pasteurização.

## 3. Revisão Bibliográfica

### 3.1. Ovo integral pasteurizado

De acordo com a Portaria nº01, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o ovo integral é o ovo em natureza desprovido de casca, que conserva as proporções naturais de gema e de clara e que, quando misturadas, ficam homogêneas. O emprego da pasteurização para a matriz ovo foi definido como o fornecimento de calor com o objetivo de destruir micro-organismos patogênicos sem alteração sensível da constituição física do ovo ou partes dele (Brasil, 1990).

As legislações do MAPA referem-se à pasteurização do ovo integral como uma alternativa para o beneficiamento de ovos que apresentem defeitos na casca e membrana interna ou que sofreram danos em uma das etapas da cadeia de processamento, assim como os ovos galados (ovos de matrizes de reprodução que não podem ser comercializados *in natura*). Porém, antes de submeter os ovos à quebra e ao tratamento térmico eles devem ser lavados com uma solução clorada em concentrações abaixo de 50ppm (Brasil, 1990; Brasil, 1991; Brasil, 1997).

A sala para a quebra de ovos deve ser climatizada e a temperatura desta deve estar próxima a 16°C, esta temperatura contribui para a redução na contaminação ambiental e, conseqüentemente, a da matriz alimentar fabricada. O processo de quebra de ovos para industrialização pode ser feito manualmente ou por máquinas específicas. As operações manuais são de baixo desempenho, pois permitem a quebra de apenas 60 a 90 dúzias de ovos por pessoa/hora e exigem muita atenção, pois nessa etapa há um contato direto das mãos de funcionários com cascas sujas e conteúdo interno do ovo, implicando em uma matéria prima de pior qualidade. Em operações mecanizadas, podem ser quebradas até 6000 dúzias de ovos por hora, algumas máquinas estão acopladas a uma sequência de lavagem, o que diminui a contaminação dos ovos por resíduos de fezes nas cascas. Após a quebra, o conteúdo interno dos ovos deve ser homogeneizado e, posteriormente, filtrado para a separação das chalazas, membranas e fragmentos de casca ainda remanescentes (Brasil,1990; Stadelman e Cotterill,1995; Oliveira e Oliveira, 2013).

A pasteurização deve ser realizada o mais rapidamente possível após as etapas de quebra, homogeneização e filtragem para que diminua os riscos de deterioração do produto. Recomenda-se um período máximo de 72 horas após a quebra dos ovos para realização do tratamento térmico, porém, durante este período, os ovos devem ser mantidos em temperatura de refrigeração (2°C a 5°C). O binômio de temperatura e tempo para pasteurização de ovo integral adotado pela legislação brasileira é de no mínimo 60°C por 3,5 minutos (Brasil, 1990). No entanto, a alta variação deste binômio pode induzir a desnaturação protéica tanto no

albúmen quanto na gema, comprometendo as propriedades espumantes e emulsificante do ovo integral.

O binômio temperatura e tempo de pasteurização preconizado pelos Estados Unidos (FDA, 1971) é o mesmo utilizado no Brasil. No entanto, no Reino Unido e em outros países europeus são recomendados valores distintos de temperatura e tempo de pasteurização do ovo integral, sendo o mínimo de 64,4°C por 2,5 minutos (Murthy, 1970, CODEX, 1974).

Segundo o Padrão de Identidade e Qualidade do Ovo Integral (Brasil, 1991) é permitida a utilização de peróxido de hidrogênio, no limite máximo de 0,1% no ovo integral, como coadjuvante de tecnologia de fabricação, com a função de auxiliar a pasteurização (função bactericida). Como aditivos intencionais, podem ser utilizados o ácido cítrico e o fosfato monossódico, ambos no limite máximo de 0,5% para a preservação da cor. Após o tratamento térmico, o produto deverá ser armazenado a uma temperatura de refrigeração (2 a 5°C) ou congelamento (-18°C).

### **3.2. Verificação da eficiência da pasteurização do ovo**

A pasteurização do ovo integral é baseada na temperatura e no tempo que são requeridos para eliminar bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp., e outros micro-organismos deteriorantes, sem que afete as propriedades nutricionais do ovo (Murthy, 1970). Dessa maneira, é importante para a garantia da inocuidade alimentar assegurar a eficiência do tratamento térmico.

Testes enzimáticos de verificação da eficiência da pasteurização são eficientes, pois apresentam resultados satisfatórios e rápidos para a indústria. Porém, para que esses testes bioquímicos baseados na inativação enzimática tenham bons resultados é necessário que a enzima seja um constituinte natural da matriz analisada, que a desnaturação da mesma pelo calor ocorra em uma reação de primeira ordem e que sejam conhecidas as possíveis interferências da metodologia executada (Brooks, 1962).

A enzima alfa-amilase é um constituinte natural do ovo e apresenta significativa concentração no ovo integral. Sua inativação ocorre pelo tratamento térmico em reações de primeira ordem, ou seja, à medida que aumenta a temperatura de pasteurização tem-se a desnaturação dessa proteína. No entanto, essa desnaturação pode ser total ou parcial dependendo do binômio de temperatura e tempo aplicado (Brooks, 1962).

Shrimpton *et al.* (1962) avaliaram as condições de aquecimento necessárias para inativar a alfa-amilase no ovo integral e eliminar *Salmonella enterica* ssp. *Enterica* sorotipo Senftenberg, que foi experimentalmente inoculada nas amostras testadas. Os pesquisadores observaram que quando as amostras de ovo eram submetidas ao binômio pasteurização de 64,4°C por 2,5 minutos ocorria a completa eliminação desse micro-organismo assim como a inativação enzimática total.

Murthy (1970) analisou a inativação da alfa-amilase em ovos integrais e gemas com adição de sal ou açúcar, quando submetidos a diferentes binômios de temperatura e tempo. O pesquisador observou que quando os ovos integrais e seus derivados eram tratados termicamente em parâmetros preconizados pelo Food and Drug Administration (FDA) (60°C por 3,5 minutos) a alfa-amilase não era totalmente inativada, exceto quando a gema estava acrescida de sais

cloretos. Sendo assim, o autor sugeriu que a inativação alfa-amilase poderia ser estimulada pela adição de íons cloretos à matriz alimentar trabalhada.

A reação para formação do complexo amido-iodo com posterior observação da coloração da solução era o método utilizado para avaliação da atividade da alfa-amilase, sendo, portanto uma análise qualitativa. Esse método tem como base a adição de amido ao ovo para que a enzima alfa-amilase quando presente possa degradá-lo. Em ovos pasteurizados a temperaturas superiores a 64,4°C por 2,5 minutos, a enzima alfa-amilase está inativa, não ocorrendo, portanto a degradação do amido. Sendo que esse substrato estará presente para complexar ao iodo e formar um composto de coloração azul-violeta. No entanto, Murthy (1970) adaptou essa técnica ao utilizar um espectrofotômetro e verificar de maneira indireta a atividade da enzima em ovos integrais não pasteurizados e pasteurizados.

Ball e Cotterill (1971) avaliaram a atividade da enzima catalase presente no albúmen mensurando a degradação de peróxido de hidrogênio. Esses autores constataram que a catalase apresenta pH ótimo de 7,8 e o binômio temperatura e tempo de 60°C por 1,5 minutos é suficiente para redução da atividade enzimática em 50%. Contudo, essa enzima é inativada ao contato com conteúdo da gema, comprometendo essa pesquisa em ovos integrais e gema.

Hansen (1971) avaliou, com auxílio de um espectrofotômetro, a atividade da enzima B-N-acetilglucaminidase frente a um substrato exógeno após pasteurização do ovo (60°C por 3,5 minutos). O autor relatou uma redução de 60% da atividade dessa enzima após o tratamento térmico, no entanto sua presença é limitada ao albúmen sendo a pesquisa prejudicada na presença da gema.

Alguns estudos relatam a presença da fosfatase alcalina no ovo. No entanto, esta enzima é desnaturada a 60°C por 20 minutos ou a 70°C por 5 minutos e, a utilização desses binômios temperatura e tempo para a pasteurização do ovo levaria ao cozimento do mesmo, o que inviabilizaria a pesquisa desta enzima como indicador da eficiência do tratamento térmico (Staldeman e Cotteril, 1995).

Não existem publicações recentes que avaliem o processamento térmico de ovos através da termossensibilidade enzimática e, a verificação da inativação da enzima alfa-amilase pela avaliação colorimétrica do complexo amido-iodo é a metodologia aceita pela comunidade científica para determinar que o tratamento térmico da matriz ovo pasteurizado foi superior a 64,4°C por 2,5 minutos.

### **3.2.1. Enzima alfa-amilase**

A alfa-amilase é uma enzima que hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas de moléculas de amido, glicogênio e outros  $\alpha$ -1,4-glucanos, liberando, primeiramente, oligossacarídeos de 6-7 unidades de glicose e, posteriormente, açúcares redutores (como por exemplo: a maltose). Essa enzima é um polipeptídeo simples com cadeia de aproximadamente 470 aminoácidos de sequência conhecida, peso molecular de 53 kDa e máxima atividade em pH de 7,5. A alfa-amilase contém um íon de  $\text{Ca}^{2+}$  por molécula, que apenas confere estabilidade secundária e terciária a molécula não havendo evidências de que o  $\text{Ca}^{2+}$  tenha função direta na transformação do substrato. A hidrólise de polissacarídeos amiláceos produz amilose, amilopectina, maltotriose e maltose (Lotterman, 2012).



A cadeia polipeptídica dessa enzima pode ser dividida em três domínios, A, B e C (Fig. 1). O domínio A é o mais conservado em todas as famílias de alfa-amilase e sua função está associada ao sítio ativo da enzima. O domínio B forma grande parte da ligação com o substrato, confere flexibilidade à molécula e presume-se que seja importante para a especificidade de substrato. O domínio C está associado à estabilização da ligação enzima-substrato (Janecek *et al.*, 1997).

A enzima alfa-amilase já foi isolada de diversos seres vivos incluindo plantas, animais e micro-organismos, como fungos e bactérias, sendo que essa enzima tem função importante sobre o metabolismo de carboidratos (Burhan *et al.*, 2003). A adição dessa enzima em ração de frango de corte é capaz de promover incrementos enérgicos tanto em energia metabolizável quanto em energia digestível aos animais. No entanto, não há estudos que retratem a importância desta enzima no ovo, contudo a sua maior concentração na gema pode evidenciar uma importante função para o fornecimento de energia durante a fase de desenvolvimento embrionário das aves (Brooks, 1962; Oliveira, 2012).

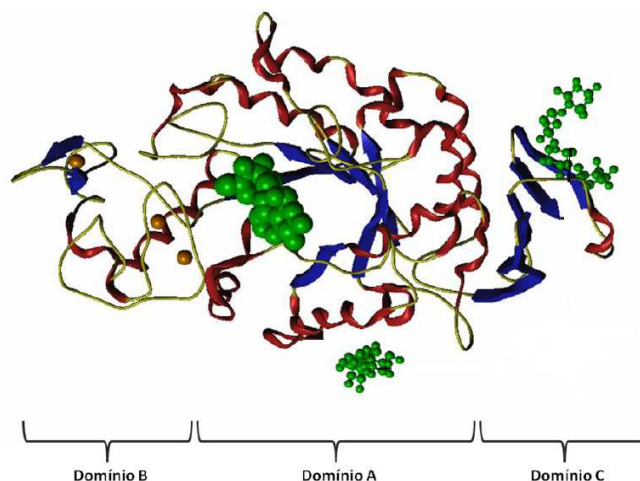


Figura 1 Estrutura tridimensional da alfa amilase organizada em três domínios.  
(adaptado Lotterman, 2012)

### 3.2.2. Complexo amido-iodo

A formação do complexo amido-iodo de coloração azul violeta se baseia nas características estruturais das moléculas de amido. O amido contém dois tipos de polímeros da glicose, a amilose e a amilopectina. O primeiro consiste de cadeias longas de alto peso molecular em estrutura helicoidal, não ramificadas de unidades de D-glicose conectadas por ligações ( $\alpha$ 1-4). A amilopectina também tem uma alta massa molecular, porém, ao contrário da amilose, ela é altamente ramificada (Nelson e Cox, 2002).

Essas moléculas de alto peso molecular podem sofrer reações de complexação, com formação de compostos coloridos. Esse é o tipo de reação que acontece entre a amilose e a amilopectina com o iodo, resultando em complexo azul e vermelho-violáceo, respectivamente, sendo a intensidade dessas cores dependente da apresentação iônica do iodo ( $I_2$ ,  $I_3^-$  e  $I_5^-$ ). O aprisionamento do iodo no interior da hélice formada pela amilose favorece a formação de composto mais estável e com coloração mais intensa quando comparado aos compostos formados a partir da ligação amilopectina e iodo, pois amilopectina não apresenta estrutura

helicoidal. A combinação das cores formadas a partir da complexação de polímeros da glicose do amido e o iodo determinam coloração final como azul-violeta (Saenger, 1984; Nelson e Cox, 2002).

A avaliação da coloração do complexo amido-iodo pelos valores de absorvância obtidos por espectrofotometria é uma metodologia indicada pelo *Codex Alimentarius* (1974) para verificação da pasteurização de ovos integrais em países que adotam o binômio tempo e temperatura superior a 64,4°C por 2,5 minutos.

### **3.2.3. Espectrofotometria e avaliação da atividade enzimática**

O princípio fundamental dos métodos de absorção quantitativos é a comparação da quantidade de energia radiante de determinado comprimento de onda, que é absorvida por uma solução do produto em análise, e a quantidade de energia que é absorvida por uma série de soluções padrões (Willard *et al.*, 1979).

A espectrofotometria é um método óptico para medição quantitativa das propriedades de reflexão e absorção de uma substância após a aplicação de um feixe de luz em comprimento de onda conhecido. Essa metodologia é fundamentada nas leis de Lambert e Beer. Segundo a lei de Lambert, a intensidade da luz emitida diminui exponencialmente quando a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente e, segundo a lei de Beer, a intensidade de um feixe de luz monocromático diminui exponencialmente quando a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente. A Lei de Lambert-Beer é a base matemática para as medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso. Dessa maneira, para a mensuração da absorção da radiação em determinado comprimento de onda, utiliza-se a seguinte fórmula:  $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$ , sendo que A é absorvância,  $I_0$  é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar ( $\epsilon$ ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cujo valor é dependente do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e b, a distância percorrida pelo feixe através da amostra (Rocha e Teixeira, 2004).

Na espectrofotometria são usados instrumentos destinados à medida da energia radiante emitida ou absorvida por cada substância pesquisada. A amostra analisada absorve certa fração da luz incidente e transmite a fração restante. A luz transmitida sensibiliza um detector que a transformará em um sinal elétrico; este é enviado a um amplificador, que vai intensificar o sinal proveniente do detector. Pelo sinal elétrico, é expressa a concentração da substância pesquisada (Willard *et al.*, 1979; Skoog *et al.*, 2002).

Os espectrofotômetros são compostos por uma fonte de radiação contínua, um monocromador para selecionar o comprimento de onda, um detector que converte a energia radiante em sinais elétricos e um dispositivo que faz a leitura do detector. A fonte mais comum empregada para a região visível é a lâmpada incandescente de filamento de tungstênio e para a região do ultravioleta é usada a lâmpada de deutério. Os monocromadores restringem a radiação que irá incidir sobre a amostra e podem ser usados para essa finalidade: prismas, grade de difração ou filtros ópticos. Os detectores podem ser seletivos ou não seletivos. Para região UV/visível do espectro, são usados detectores fotoelétricos, que são detectores seletivos, isto é, sua resposta varia com a frequência da radiação incidente (Christian, 1994, Reis, 2006).

A utilização da espectrofotometria para verificação da atividade de enzimas é uma prática comum na rotina laboratorial. Murthy (1970) analisou a atividade enzimática da alfa-amilase em ovos integrais e concluiu que a enzima estava ativa em ovos não pasteurizados. O *Codex Alimentarius* (1974) recomenda a avaliação da pasteurização de ovos, quando realizada sob binômio tempo e temperatura acima de 64,4°C por 2,5 minutos, por análise espectrofotométrica da coloração do complexo amido-iodo em um comprimento de onda de 585nm. No entanto, são poucos os trabalhos que relatam o comportamento dessa enzima em diferentes temperaturas de pasteurização.

### 3.3. Contaminação de ovos pasteurizados

A contaminação do ovo em casca pode iniciar durante a formação no ovário ou oviduto, podendo ser considerada de origem congênita (vertical) ou quando há penetração através da casca, após a postura, sendo chamada de contaminação extragenital (horizontal) (Stadelman e Cotterill, 1995).

O ovo pasteurizado pode ser contaminado de várias maneiras, incluindo contaminação microbiana da matéria prima, falta de controle higiênico sanitário no equipamento de quebra, binômios temperatura e tempo inadequados para pasteurização ou por contaminação pós-processamento. Desta maneira, combinação entre higienização, aquecimento e embalagem asséptica é que vai determinar a vida de prateleira do produto (Hara-Kudo e Takatori, 2009; Rivoal *et al.*, 2009).

### 3.4. Parâmetros microbiológicos para ovos pasteurizados

A legislação dos Estados Unidos regulamentou a exigência de uma pasteurização apropriada para todos os ovos processados (FDA, 1971) e, dessa forma, conseguiu garantir a queda da incidência de contaminação por *Salmonella* spp. e, conseqüentemente, a redução de salmonelose associada à ingestão deste produto. Além da pesquisa por *Salmonella* spp. (ausência em 25mL), os Estados Unidos também preconizam a pesquisa de micro-organismos mesófilos aeróbios, com contagens máximas de  $10^4$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, e a pesquisa de coliformes totais, com contagens inferiores a 10 UFC/mL em ovos pasteurizados (USDA, 2004). Parâmetros microbiológicos semelhantes também são preconizados pela Comunidade Europeia para essa matriz alimentar, determinando ausência de *Salmonella* spp. e de *Staphylococcus aureus* em 25mL e 1mL, respectivamente. Limites inferiores a  $10^5$  UFC/mL para micro-organismos mesófilos aeróbios e  $10^2$  UFC/mL para micro-organismos da família enterobacteriaceae (CEE, 1989).

No Brasil, são duas as legislações que preconizam parâmetros microbiológicos a serem analisados em ovos pasteurizados. A Portaria nº01 do MAPA (Brasil, 1990) determina que o ovo integral pasteurizado fornecido pela indústria deve apresentar contagem máxima de micro-organismo mesófilos aeróbios igual a  $5,0 \times 10^4$  UFC/g, ausência de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus aureus* em 1g de ovo e ausência de *Salmonella* spp. em 25g de ovo. Já a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que fiscaliza o comércio varejista, determina a contagem de  $5 \times 10^1$  UFC/mL de *Staphylococcus* coagulase positivo; 1,0 UFC/mL de coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* spp. em 25 mL (ANVISA, 2001).

Segundo Stadelman e Cotterill (1995), a qualidade bacteriológica final do ovo integral pode não ser adequada se a contagem bacteriana inicial total for acima de 5.000 micro-organismos/g e o

processo de pasteurização pode reduzir essa contagem para 1.000 a 500 micro-organismos/g. Porém, segundo os mesmos autores, se forem utilizados ovos frescos para a pasteurização, a contagem bacteriana esperada será menor do que 100 micro-organismos/g no produto final.

Jay (2005) afirmou que a resistência ao calor é maior quanto mais alta a concentração de um micro-organismo em um determinado substrato. Este fato sugere que o mecanismo de proteção térmica por grandes populações microbianas ocorre devido à produção de substâncias protetoras excretadas pelas células. O autor relatou que em elevadas concentrações microbianas aumenta-se a possibilidade de os micro-organismos resistirem ao aquecimento, pois, nesses casos, há uma maior chance da presença de bactérias com diferentes graus de resistência natural ao calor.

Com o objetivo de avaliar a eficiência da lavagem dos ovos na redução da contaminação microbiológica do ovo integral pasteurizado, Aragon-Alegro *et al.* (2005) coletaram amostras de ovos integrais, provenientes de dois tipos de processamentos (ovos lavados e ovos não lavados), em três pontos da linha de produção: máquina de quebra, tanque de estocagem e após pasteurização. Os resultados demonstraram que, independentemente do emprego da lavagem dos ovos anteriormente à quebra, o tratamento térmico foi eficiente para a inativação de *Salmonella* spp. e redução da população de micro-organismos mesófilos aeróbios.

Rêgo *et al.* (2012) avaliaram a qualidade microbiológica de ovos integrais pasteurizados refrigerados, obtidos de dois tipos de matéria-prima, o ovo comercial (ovos produzidos por galinhas poedeiras) e o ovo galado (ovos férteis produzidos por matrizes pesadas). Estes pesquisadores concluíram que os ovos integrais galados pasteurizados, por serem obtidos em condições higiênicas piores, apresentaram qualidade inferior à dos ovos integrais comerciais pasteurizados e que o período de validade destes produtos poderia ser de sete e 14 dias, respectivamente.

### **3.5. Microbiota de ovos integrais pasteurizados**

Alguns micro-organismos são comumente encontrados na microbiota de ovos integrais, como por exemplo: *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus* e *Salmonella*. O armazenamento dos ovos integrais sob refrigeração (2-5°C) antes da pasteurização tem como objetivo reduzir a proliferação de alguns micro-organismos, principalmente os mesófilos. No entanto, temperaturas de refrigeração não inibem o crescimento de micro-organismos psicrotróficos. Estes últimos apresentam a capacidade de crescerem em temperaturas inferiores a 7°C independente da temperatura ótima de desenvolvimento da bactéria. Gêneros bacterianos, como: *Pseudomonas* e *Proteus* enquadram-se nessa classificação. Esses micro-organismos são produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas termoresistentes, que interferem negativamente na composição nutricional de alimentos. Dessa maneira, a presença dessas enzimas contribui para redução da vida de prateleira dos produtos alimentares. A presença desses micro-organismos psicrotróficos em alimentos refrigerados pode ser um indicativo do processo de deterioração de alimentos refrigerados (Stadelman e Cotterill, 1995; Delves-Broughton and Board, 2000; Cox, 2001; Ricke *et al.*, 2001, Franco e Landgraf, 2008).

A pasteurização de ovos integrais é eficiente para a redução de muitos micro-organismos patogênicos e deteriorantes, entretanto, outros micro-organismos são resistentes ao calor, o que os caracteriza como a principal microbiota encontrada em ovos pasteurizados. Dentre estes micro-organismos resistentes ao calor são citados os dos gêneros *Bacillus* e *Micrococcus* (Franco e Landgraf, 2008).

A seguir são apresentados os principais micro-organismos que podem ser encontrados em ovos integrais.

### 3.5.1. Micro-organismos mesófilos aeróbios

Os micro-organismos mesófilos aeróbios são classificados como sendo um grupo de bactérias capazes de se multiplicar entre temperaturas de 10°C a 45°C, sendo o intervalo ótimo de crescimento de 20°C a 30°C. *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* e *Streptococcus* são exemplos de micro-organismos deste grupo e podem ser veiculadas por alimentos (Jay,2005, Franco e Landgraf, 2008).

Os micro-organismos mesófilos aeróbios apresentam características distintas quanto à virulência para infectar seres humanos. Dessa maneira, nesse grupo podem ser encontradas bactérias altamente patogênicas assim como outras que são simplesmente deteriorantes. Uma contagem elevada desses micro-organismos em ovos integrais pode ser consequência do uso de matéria prima contaminada, processamento insatisfatório ou armazenamento prolongado (Franco e Landgraf, 2008).

As contagens de micro-organismos mesófilos aeróbicos em ovos não pasteurizados normalmente variam de  $10^3$  a  $10^6$  UFC/g. Quando esses resultados são superiores a  $10^7$  UFC/g pode-se sugerir a ocorrência de falhas durante o processamento dos ovos. Estas falhas podem ocorrer nos processos de lavagem que permite a quebra de ovos que possuem cascas com sujidades. Por outro lado, quando a contagem padrão em placa de micro-organismo mesófilos aeróbios for superior a  $5 \times 10^4$  UFC/g em ovos pasteurizados, problemas quanto ao armazenamento do produto após o tratamento térmico devem ser verificados e solucionados (Ricke *et al.*, 2001; Oliveira e Oliveira, 2013).

As bactérias pertencentes aos gêneros *Proteus* e *Pseudomonas* são mais comumente representadas por cepas psicrotóficas. No entanto, existem relatos de cepas mesófilas desses gêneros bacterianos que quando em elevadas quantidades podem causar toxinfecção alimentar (Franco e Landgraf, 2008).

Dias *et al.*(2002) avaliaram a qualidade microbiológica de 33 lotes de ovos integrais refrigerados antes e após a pasteurização sob o binômio de 65°C por 3,5 minutos. Esses autores observaram variações nas contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios, com valores máximos de  $2,4 \times 10^7$  UFC/g e  $1,2 \times 10^4$  UFC/g em ovo cru e ovo pasteurizado, respectivamente. Os autores concluíram que a pasteurização apresentou-se eficiente para esse parâmetro microbiológico, pois as contagens desses micro-organismos mesófilos em ovos pasteurizados foram inferiores ao valor preconizado pela legislação brasileira.

Rêgo *et al.* (2012), avaliaram a qualidade microbiológica de ovos integrais pasteurizados refrigerados obtidos de dois tipos de matéria-prima: o ovo *in natura* comercial e o ovo galado em diferentes períodos de armazenamento ( um, sete, 14 e 21 dias). Os autores observaram que ao 21º dia de armazenamento 12,5% dos ovos integrais comerciais pasteurizados apresentavam contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios superiores aos limites preconizados pela legislação. Todos os ovos integrais galados pasteurizados já apresentavam contagens de mesófilos superiores a  $8,7 \times 10^5$  UFC/g após sete dias de armazenamento.

### 3.5.2. Coliformes totais e termotolerantes

Os coliformes são membros da família *Enterobacteriaceae*, que inclui bactérias Gram-negativo na forma de bastonetes retos, não esporogênicas, anaeróbias facultativas e oxidase negativo. O gênero *Escherichia*, juntamente com os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, fazem parte deste grupo. Esses micro-organismos habitam o trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente, entretanto, espécies dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* podem persistir e se multiplicar por longos períodos em ambientes não fecais. Eles são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. O índice de coliformes totais é utilizado para avaliar as condições sanitárias, sendo que altas contagens significam contaminação pós-processamento, limpezas e sanitizações deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento e estocagem (Vanderzant e Splittstoesser, 1996; Delazari, 1998; Jay, 2005; Silva *et al.*, 2007).

Os coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, fazem parte de um subgrupo dos coliformes totais. Eles apresentam forma de bastonetes, são Gram-negativo, anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos e fermentam a lactose produzindo ácido láctico e gás à temperatura de 44,5°C a 45,5°C. O gênero *Escherichia* é o melhor indicador de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias deficientes (Jay, 2005).

A contaminação do conteúdo interno do ovo pela microbiota da casca é muito comum, sendo por isso importante discriminar a grande variedade de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, incluindo coliformes que podem ser carreados pela casca. Contagens de coliformes totais superiores a 10<sup>5</sup> UFC/g em ovos integrais antes da pasteurização são indicativos de elevada contaminação do conteúdo interno do ovo por coliformes provenientes da casca, assim como altas temperaturas de estocagem deste produto antes da pasteurização. Contagens de coliformes totais em ovos pasteurizados superiores a 10 UFC/g sugerem a baixa qualidade da matéria prima utilizada, e, também, a possibilidade de uma contaminação após tratamento térmico (Stadelman e Cotterill, 1995; Ricke *et al.*, 2001; Anprasertporn, 2009)

Dias *et al.* (2002) avaliaram a microbiota de 33 lotes de ovo integral, antes e depois do tratamento térmico pela pasteurização (65°C por 3,5 minutos). Eles encontraram contagens máximas de coliformes totais superiores a 1100 NMP/g em ovos não pasteurizados, enquanto que em 53% dos ovos pasteurizados as contagens para esses micro-organismos foram de 0,3 NMP/g. Os mesmos pesquisadores relataram que as contagens de coliformes termotolerantes foram menores que 0,3 NMP/g em todas as amostras de ovos pasteurizados, diferentemente dos ovos antes da pasteurização que apresentaram contagem máxima desses micro-organismos superior a 1100 NMP/g.

### 3.5.3. *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* possui 47 espécies e 24 subespécies sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Esses micro-organismo são cocos Gram-positivo, em forma de cachos irregulares, imóveis, não formadores de esporos, catalase positivo e são anaeróbios facultativos. Geralmente, estão amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e de outros sítios anatômicos do homem e de outras espécies animais. A partir dessas localizações, o micro-organismo pode contaminar o alimento direta ou indiretamente (Klood *et al.*, 1991; Koneman *et al.*, 2001; Jay, 2005; Euzéby, 2014).

*Staphylococcus* estão divididos em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN). SCP são capazes de produzir uma enzima chamada coagulase, que é responsável pela conversão do fibrinogênio do plasma sanguíneo em fibrina. Pode-se destacar neste grupo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi* e algumas cepas de *Staphylococcus hyicus*. SCN inclui todas aquelas espécies que não produzem a enzima coagulase. Neste grupo se enquadram *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus capitis*, dentre outros (Madigan *et al.*, 2004; Bannerman e Peacock., 2007).

A intoxicação estafilocócica é resultante da ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas estafilocócicas (SE), termoestáveis, pré-formadas, produzidas por linhagens enterotoxigênicas de estafilococos coagulase positivo e negativo, principalmente *Staphylococcus aureus*, durante sua multiplicação no substrato. Uma única cepa de *S. aureus* pode produzir mais de um tipo de enterotoxinas que, em quantidades inferiores a 1µg ao chegarem ao intestino são rapidamente absorvidas, e pode implicar no aparecimento dos primeiros sintomas de intoxicação (náusea, vômitos, diarreias, espasmo intestinal, prostração, pressão baixa e temperatura subnormal) em poucas horas (Carmo, 2001; Freitas *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2006, Hennekinne *et al.*, 2007; Ombui e Mathenge, 2007; Oliveira, 2011).

Rêgo *et al.* (2012), utilizando como matéria-prima ovos galados e comerciais, avaliaram a qualidade microbiológica do ovo integral pasteurizado refrigerado armazenado por até 21 dias. Estes pesquisadores encontraram 4,16% de amostras de ovo pasteurizado positivas para *Staphylococcus* coagulase positivo em ovos comerciais, enquanto que em ovos galados a presença deste micro-organismo nas amostras foi de 16,6%.

### **3.5.4. *Salmonella* spp.**

As bactérias do gênero *Salmonella*, que são micro-organismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram-negativo, anaeróbios facultativos, mesófilos, com temperatura ótima de crescimento entre 35°C a 37°C. Essas bactérias são relativamente resistentes ao calor e às substâncias químicas, produzem ácido e gás a partir da glicose e outros carboidratos e, geralmente, não utilizam lactose e sacarose (Jay, 2005; Euzeby, 2014).

Esses micro-organismos resistem meses no ambiente, mas são sensíveis à luz solar e aos desinfetantes mais usados, tais como fenóis, clorados e iodados. São bactérias móveis, excetuando algumas cepas de *Salmonella* específicas das aves (*Salmonella enterica* sorovar Pullorum, causador da pulrose e *S. enterica* sorovar Gallinarum causador do tifo aviário) (Oliveira, 1995). Assim como outras bactérias patogênicas, as salmonelas possuem fímbrias e estruturas associadas que estão relacionadas à adesão e colonização de superfícies, sendo importantes na interação bactéria-hospedeiro, na persistência ambiental, na formação de biofilmes e na colonização e invasão de células (Gibson *et al.*, 2007).

A identificação das diferentes sorovares de *Salmonella* é bastante importante no âmbito dos estudos epidemiológicos. Isto porque, nem todos os sorovares deste micro-organismo são patogênicos para o homem. *Samonellas* que acometem exclusivamente o homem são *S. Typhie* *S. Paratyphi*, patógenos da febre tifoide e paratifoide, respectivamente. Alguns sorvares, embora sejam hospedeiros de outros animais, podem também infectar o homem, como por exemplo: *S. Enteritidis*, que é a principal *Salmonella* associada à contaminação de alimentos (Quinn *et al.*, 2005).

Estudos epidemiológicos associaram os surtos de salmonelose humana ao consumo de ovos contaminados e seus derivados e, o fato de que os ovos crus são utilizados para produção de maionese caseira, por exemplo, deve ser considerado. No estado do Paraná ocorreram 217 surtos de salmonelose no período de 1999 a 2004, sendo que a *S. Enteritidis* foi identificada em 87,0% e 89,8% das amostras isoladas de pacientes e de alimentos envolvidos nesses surtos. A constatação de que 47,0% dos surtos ocorridos nesse período foram causados por alimentos elaborados à base de ovos evidencia o risco potencial que esse alimento pode representar para a saúde pública (Kottwitz *et al.*, 2008).

Aragon-Alegre *et al.* (2005) avaliando a presença de *Salmonella* spp. em ovos integrais pasteurizados não verificaram a presença desse micro-organismo. No entanto, Hara-Kudo e Takatori (2009) encontram 1,7% de amostras positivas para *Salmonella* spp. em ovo integrais pasteurizado no período de 1992 a 2002 no Japão.

Jakočič *et al.* (2014) investigaram a influência de três parâmetros (tempo, temperatura e concentração de NaCl) sobre a sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis em ovos integrais pasteurizados. A temperatura do tratamento térmico variou entre 50°C e 58°C. O tempo de pasteurização foi avaliado no intervalo de 30 – 210 segundos e a concentração de NaCl variou de 0-12%. A melhor condição para redução na contagem da bactéria foi a 58°C com 0% de NaCl com um tempo de aquecimento de 120 segundos.

## **4. Material e métodos**

### **4.1. Amostragem**

As amostras de ovos integrais foram fornecidas por uma indústria de ovos-produtos, fiscalizada pelo Serviço de Inspeção Federal, localizada na mesorregião Sul e Sudoeste de Minas Gerais no período de julho a novembro de 2014. Após a coleta, as amostras, foram enviadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável ao Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), localizado na Central de Abastecimento de Minas Gerais, em Contagem / Minas Gerais, onde foram armazenadas sob refrigeração ( $6 \pm 2^\circ\text{C}$ ) em refrigeradores da marca Brastemp Duplex Frost Free Eletrônico 440 e posteriormente analisadas.

As amostras de ovos integrais foram provenientes de 30 lotes de produção distintos. A cada lote de produção de ovos, e antes da pasteurização dos mesmos, foram coletadas amostras de ovo não pasteurizado (ovo cru). Após a coleta, os lotes de ovos crus foram divididos em duas porções, sendo uma destinada à pasteurização, em um pasteurizador a placas, à temperatura de 60°C por 3,5 minutos e a outra parte pasteurizada sob a temperatura de 68°C por 2,5 minutos, em um equipamento tubular. Após a pasteurização, foram coletadas 60 amostras de ovos, sendo 30 amostras de cada pasteurizador e uma de cada lote de produção. Dessa maneira, o mesmo lote de ovos crus eram destinados a dois binômios de pasteurização diferentes.

### **4.2. Análises laboratoriais**

#### **4.2.1. Pesquisa da atividade da alfa-amilase por espectrofotometria**

A pesquisa da atividade da enzima alfa amilase ocorreu pela quantificação indireta da porcentagem de amido hidrolisado no ovo integral. Foi adicionada solução de amido ao ovo



integral e a quantificação do amido não hidrolisado foi realizada pela leitura espectrofotométrica UV/visível do complexo amido-iodo formado após adição de solução de iodo.

A partir da absorbância gerada pela leitura do complexo amido-iodo pôde-se mensurar a quantidade final de amido que estava complexado, e indiretamente estimar a quantidade de amido que foi hidrolisado pela enzima.

#### **4.2.1.1. Soluções, reagentes e parâmetros instrumentais**

As soluções, os reagentes e os parâmetros instrumentais utilizados durante o experimento para a pesquisa da atividade da enzima alfa-amilase foram descritos por Murthy (1970), sendo admitidas adaptações em conformidade aos parâmetros propostos pelo *Codex Alimentarius* (1974).

Os reagentes utilizados para a pesquisa da enzima alfa-amilase foram Amido solúvel P.A., Ácido Tricloroacético (TCA) P.A., Iodo P.A. ressublimado, Iodeto de Potássio P.A.. Todos esses reagentes eram da marca Synth (Diadema, Brasil).

A solução de amido 1% (pH 7,3) foi preparada dissolvendo  $0,5g \pm 0,005g$  de amido solúvel P.A. em 50mL de tampão fosfato-salino 0,02M. Esta solução foi aquecida à temperatura de  $90^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$  para a solubilização completa do amido.

O TCA, utilizado na etapa de extração, foi preparado à concentração de 15%. Para o preparo dessa solução foram dissolvidos 150g de TCA P.A. em 1L de água destilada. A solução foi armazenada sob refrigeração, a  $6^{\circ}C$  em refrigerador da marca Brastemp Duplex Frost Free Eletrônico 440(São Paulo, Brasil).

Foram preparadas duas soluções de iodo (Murthy, 1970), sendo uma solução estoque e uma de adição, em razão da sua volatilidade e possível interferência nos resultados finais. Para o preparo da solução estoque foram pesados 12,7g de iodo que foram dissolvidos em uma solução de iodeto de potássio (25g de iodeto de potássio e 30 mL de água destilada), posteriormente, o volume total foi completado para 1 L (solução 0,1N). Para a solução de adição 0,25g de iodeto de potássio foi acrescentado a 1mL da solução de iodo estoque que foi completada para 100 mL com água destilada.

O espectrofotômetro UV/visível Biospectro sp22 manual (Curitiba, Brasil) foi utilizado para obtenção das absorbâncias da curva padrão e das amostras após o preparo das mesmas.

#### **4.2.1.2. Análise da atividade enzimática por espectrofotometria UV/visível**

Para a avaliação da atividade da enzima alfa-amilase foi utilizado o protocolo proposto por Murthy, 1970 adaptado.

Foi pesado em duplicata  $0,5g \pm 0,0005g$  de cada amostra que foi acrescida de 0,250mL de solução de amido 1% (equivalendo a 2,5mg de amido/amostra) preparada em solução de PBS 0,02M com pH final 7,3. As amostras foram incubadas em banho de água quente à  $44^{\circ}C$  por 30 minutos. Esse tempo associado a um pH da solução de 7,3 são necessários para que a enzima, quando presente, consiga agir sobre o substrato (amido).

Após essa etapa, as amostras foram imediatamente colocadas em um banho de gelo sob temperatura média de  $-1^{\circ}\text{C}$  por dois minutos com o intuito de interromper a ação da enzima. Posteriormente, foi acrescentado 5 mL de ácido tricloroacético 15%, e o volume de cada amostra foi completado com 9 mL de água destilada fervente ( $90^{\circ}\text{C}$ ) e 9 mL de água destilada fria ( $5^{\circ}\text{C}$ ). De acordo com Murthy (1970) estes procedimentos subsequentes causam a inativação enzimática e uniformizam em todas as amostras a ação enzimática, ou seja, a ação da alfa-amilase sobre o amido acontece durante os 30 minutos da etapa do banho em água a  $44^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.

Após a inativação enzimática, a solução foi decantada por 15 minutos, e filtrada em papel filtro qualitativo (J.Prolab, São José dos Pinhais, Brasil). Após esse procedimento, 4 mL do filtrado foram pipetados e acrescidos de 2 mL da solução de iodo de uso imediato. As absorbâncias foram obtidas a partir da leitura em espectrofotômetro UV/visível sob comprimento de onda de 585nm (Murthy,1970 - adaptado). A figura 2 ilustra o protocolo acima descrito para avaliação da atividade da enzima alfa amilase.

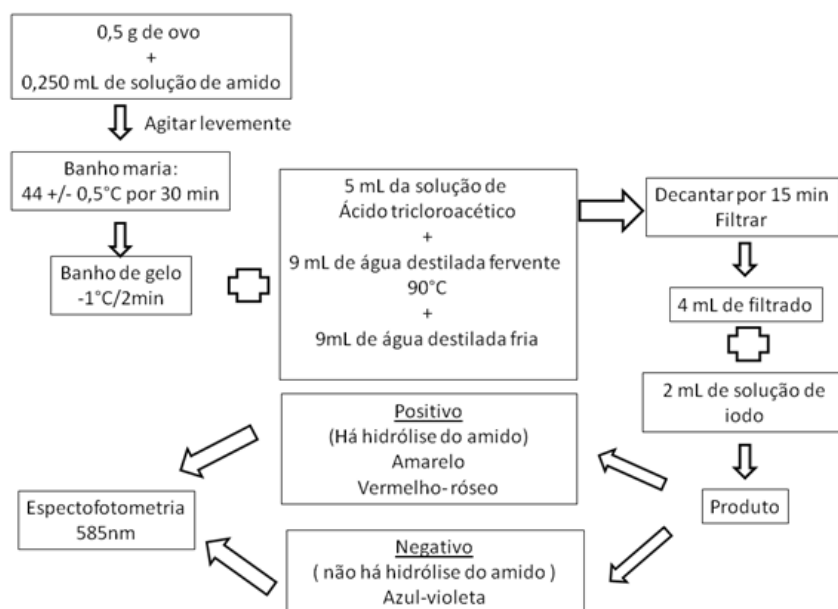


Figura 2. Protocolo para pesquisa da atividade da enzima alfa amilase (adaptado Murthy, 1970)

#### 4.2.1.3. Curva padrão

O conhecimento da absorção de luz pela matéria é a forma mais usual de determinar a concentração de compostos presentes em solução. A curva padrão corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância do complexo amido-iodo e os de concentração de amido. Com base na análise gráfica é possível verificar a linearidade da reação e calcular um fator de conversão de valores de absorbância em concentração. Portanto, o objetivo dessa curva foi de correlacionar as diferentes concentrações de amido adicionadas à amostra de ovo pasteurizado com a absorbância do complexo amido-iodo formado.

A linearidade (habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de uma substância em amostras numa dada faixa de concentração)

e o fator de recuperação (porcentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico) foram os dois parâmetros de desempenho utilizados para obtenção da curva de regressão que relaciona a concentração de amido hidrolisado à absorbância do complexo amido-iodo obtida pela espectrofotometria. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida (absorbância) e a concentração do analito (INMETRO, 2003). A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

Sendo:  $y$  = resposta medida (absorbância);  $x$  = concentração;  $a$  = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;  $b$  = interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ .

A partir dessa equação de regressão linear é possível obter o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Esse valor deve ser interpretado como a proporção de variação total da variável dependente  $Y$  que é explicada pela variação da variável independente  $X$  (CEE, 2002; INMETRO, 2003).

Para a elaboração da curva padrão foi utilizada a matriz ovo fortificada com amido. O ovo utilizado como matriz para o preparo da curva padrão foi pasteurizado a 70°C por 3,5 minutos. A escolha por esse tratamento térmico ocorreu pelo fato da enzima apresentar-se sensível a binômios de temperatura e tempo superiores a 64,4°C por 2,5 minutos.

A linearidade foi avaliada a partir da adição de seis concentrações de amido (0mg, 1mg, 2mg, 4mg, 5mg e 6mg) em ovos pasteurizados. Para cada concentração foram analisadas sete repetições e suas respectivas absorbâncias foram obtidas, após a leitura espectrofotométrica do complexo amido- iodo.

O fator de recuperação foi estimado pelas médias dos resultados das análises de três repetições em três diferentes concentrações (1mg, 3mg e 6mg) utilizadas para fortificação das amostras de ovos pasteurizados. A recuperação para cada concentração de amido adicionada foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \{(C_1 - C_2)/C_3\} * 100, \text{ sendo:}$$

$C_1$  = concentração determinada na amostra adicionada,

$C_2$  = concentração determinada na amostra branco,

$C_3$  = concentração adicionada.

#### **4.2.1.4. Avaliação de diferentes temperaturas e tempos de pasteurização sobre a atividade enzimática**

Para avaliar influência do aumento da temperatura e o aumento do tempo de pasteurização em cada temperatura sob a atividade da enzima alfa-amilase, foram utilizados ovos *in natura* (ovos em casca) provenientes do comércio varejista local que foram pasteurizados no laboratório sob condições de temperatura e tempo controlados.

Para o procedimento de pasteurização no laboratório, alíquotas de 5mL de um pool de dois ovos foram pipetadas em tubos de ensaio e incubadas em um banho de água quente com as diferentes temperaturas controladas (60°C, 62°C ou 64,4°C). A contagem do tempo de pasteurização (dois minutos e 30 segundos, três minutos, três minutos e 30 segundos, quatro minutos e, quatro

minutos e 30 segundos), iniciava quando a temperatura da amostra se igualava a temperatura do banho. Dessa maneira, alíquotas dos mesmos ovos foram pasteurizadas em todos os tratamentos térmicos avaliados. Cada alíquota representava uma repetição, totalizando quatro repetições de dois ovos em cada temperatura e cinco tempos de pasteurização diferentes. Períodos de tempo superiores a quatro minutos e 30 segundos não foram testados, pois alterações na viscosidade começam a ser facilmente evidenciadas devido a desnaturação de proteínas que ocorre quando o ovo integral é submetido a tratamentos térmicos prolongados. O controle de todas as temperaturas nesses procedimentos ocorreu com auxílio de termômetros de espetos digitais (Incoterm, Porto Alegre, Brasil) e do termorregistrador do aparelho (Banho Maria TE-056, Mag Tecnal, Piracicaba, Brasil). Todos os equipamentos utilizados estavam calibrados.

Imediatamente após a pasteurização no laboratório, foram realizadas análises da atividade da enzima alfa-amilase em duplicata de acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 4.2.1.2.

#### **4.2.1.5. Pesquisa pela atividade da enzima alfa-amilase das amostras de ovos integrais fornecidas pela indústria**

Após os testes laboratoriais para a avaliação da termossensibilidade da enzima alfa-amilase a diferentes binômios de pasteurização foi realizada a pesquisa pela atividade da enzima alfa-amilase nas 90 amostras fornecidas pela indústria (30 ovos crus, 30 ovos integrais pasteurizados a 60°C por 3,5 minutos e 30 ovos integrais pasteurizados a 68°C por 2,5 minutos). A metodologia utilizada para essas análises foi adaptada de Murthy, (1970), anteriormente descrita no item 4.2.1.2.

#### **4.2.2. Preparo das amostras de ovos integrais fornecidas pela indústria para análises microbiológicas**

A abertura das embalagens foi realizada após a assepsia dos potes plásticos com solução de álcool 70% e abertura destes em um campo estéril (próximo ao bico de bunsen). Foram pipetas 25mL em dois sacos de homogeneização estéreis. Sendo no primeiro saco foi acrescido junto aos 25mL de ovo integral 225mL de salina peptonada 0,1% e no segundo saco contendo 25mL da amostra foi adicionado 225mL de salina peptonada tamponada 1 %. Posteriormente esses dois sacos foram homogeneizados com auxílio de um Stomacher (BagMixer 400, França), por 60 segundos, obtendo dessa maneira soluções com diluições representativas de  $10^{-1}$ .

As pesquisas por micro-organismos mesófilos aeróbios (AOAC, 1990), coliformes totais e termotolerantes (AOAC, 1991) e *Staphylococcus* spp. (Brasil, 2003) foram realizadas após diluições seriadas a partir da diluição  $10^{-1}$  da amostra em salina peptonada 0,1%. Em ovos crus, a primeira diluição para análise de estafilococos em ágar Baird Parker foi de  $10^0$ . A pesquisa por *Salmonella* spp. (AOAC, 2005) teve início após diluição da amostra em salina peptonada tamponada 1%.

Para as análises de micro-organismos mesófilos aeróbios foram empregadas placas Petrifilms™ Aerobic Count Plate (3M™, St. Paul, MN, USA), essas placas foram incubadas em estufa a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. As diluições utilizadas na pesquisa por estes micro-organismos foram  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , abrangendo assim, possíveis resultados fora dos padrões da legislação. A contagem final desses micro-organismos foi realizada pela enumeração de colônias vermelhas.

As pesquisas de coliformes totais e termotolerantes foram realizadas pelo método de Petrifilm™ *E. coli*/ColiformCount Plates (3M™, St. Paul, MN, USA) validado pela AOAC 991.14. Essas placas tiveram diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup> e as placas foram incubadas a 36°C ± 1°C por 48 horas. A contagem de coliformes totais foi feita baseando-se na presença de colônias vermelhas associadas às bolhas de gás, enquanto coliformes termotolerantes apresentaram-se na forma de colônias roxas associadas às bolhas de gás.

A pesquisa de *Staphylococcus* spp. foi realizada de acordo com a Instrução Normativa nº 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A espécie de *S. aureus* se distingue das demais pela positividade em provas como a coagulase, DNase termoestável e redução do telurito (Bannerman et al., 2007). A pesquisa desse micro-organismo em alimentos se baseia na inoculação das diluições desejadas em ágar Baird Parker, em que a presença *S. aureus* reduz anaeróbia e aerobicamente o telurito de potássio, produzindo colônias negras. A suplementação desse ágar com gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolíticas e lipolíticas do *S. aureus*, devido ao aparecimento de um halo de transparência e um outro branco de precipitação ao redor de uma colônia, respectivamente (Reginald e Gayle, 2001). Embora o ágar Baird Parker apresente alta seletividade para micro-organismos do gênero *Staphylococcus*, este meio de cultura também é susceptível ao crescimento de bactérias invasoras. Essa contaminação varia conforme a microbiota inicial do produto analisado.

Para pesquisa de *Salmonella* spp. foi empregada a metodologia imunoenzimática (*Elisa Linked Fluorescent Assay*- ELFA) pelo equipamento Vidas™30 (bioMeriéux, Hazelwood, Missouri, USA). Para tanto, após incubar por 24 horas a 35°C a alíquota de 25 mL da amostra que foi adicionada a 225 mL de uma solução de salina peptonada 1%, 0,1mL desta solução foi transferido para um caldo de enriquecimento específico e incubado por 24 horas a 41,5°C. Posteriormente, 0,5mL da solução foi transferido para barretas específicas de análise de *Salmonella* spp. e analisado pelo sistema Vidas™30 que efetua duas leituras de fluorescência pelo sistema óptico para cada análise. A primeira leitura corresponde ao branco antes do contato do substrato com o cone. A segunda leitura é efetuada após a incubação do substrato com a enzima presente no cone. O cálculo do Valor de Fluorescência Relativo (RFV) é o resultado da diferença das duas medidas. O RFV obtido de cada amostra é interpretado pelo sistema Vidas®30 da seguinte forma:

$$\text{Valor do Teste} = \frac{\text{RFV}_{\text{amostra}}}{\text{RFV}_{\text{calibrador}}}$$

O valor teste quando inferior ao limite de detecção (0,10) classifica a amostra como negativa, sugerindo-se baixas concentrações, ou mesmo, ausência de antígenos bacterianos.

Uma vez confirmadas, uma alçada do conteúdo incubado em caldo seletivo das amostras positivas para *Salmonella* spp. foram estriadas em placas de ágar Rambach. Posteriormente, as placas foram incubadas a 36±1°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi verificada a presença de colônias com coloração vermelhas típicas de *Salmonella* spp. As colônias típicas foram estriadas em ágar Sangue com alça calibrada e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, as colônias foram coletadas com o auxílio de uma alça descartável de 0,1 mL e suspensas em solução fisiológica (0,45%) estéril até atingir a turbidez correspondente aos valores entre de 0,50 a 0,63 e então transferidas para cartões GN de testes bioquímicos do equipamento VITEK 2®. Para o ajuste de turbidez, fez-se necessário o emprego do equipamento DensiCheck (bioMeriéux, Hazelwood, Missouri, USA). As colônias típicas

também foram testadas quanto à prova do Anti-soro para antígenos somáticos (Difco *Salmonella* O antiserio).

### **4.3. Delineamento Experimental**

#### **4.3.1. Avaliação de diferentes temperaturas e tempos de pasteurizaçãosobre a atividade enzimática**

O ensaio das análises foi conduzido no delineamento experimental em blocos ao acaso em parcelas subdivididas 3 x 5, sendo três temperaturas (60°C, 62°C e 64,4°C) na parcela e em cinco tempos (dois minutos e 30 segundos, três minutos, três minutos e 30 segundos, quatro minutos e, quatro minutos e 30 segundos) de pasteurização na subparcela. Para análise da influência temperatura sobre a absorbância do complexo amido-iodo foi realizada a transformação dos dados e como os mesmos não apresentaram homocedasticidade, foram submetidos à análise estatística não paramétrica, sendo os resultados comparados pelo teste de Friedman em nível de significância de 0,01%. Em cada temperatura, foram comparados os tempos de pasteurização, e os resultados da absorbância do tempo na mesma temperatura apresentaram distribuição normal sendo realizada a análise estatística paramétrica, com as médias comparadas pelo teste de SNK em nível de significância de 5% (Sampaio, 2002).

#### **4.3.2. Análises das amostras provenientes da indústria**

O ensaio das análises foi conduzido no delineamento experimental em blocos ao acaso, sendo que os blocos foram representados pelos diferentes ovos integrais utilizados. Foram avaliados três produtos, ovo integral não pasteurizado (ovo cru), ovo integral pasteurizado a 60°C por 3,5 minutos e ovo integral pasteurizado a 68°C por 2,5 minutos, com 30 repetições cada. Para a pesquisa da atividade da enzima alfa-amilase e para avaliação das contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios, coliformes totais e termotolerantes e estafilococos foi realizada a transformação dos dados e como os mesmos não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade foram submetidos à análise estatística não paramétrica, sendo os resultados comparados pelo teste de Friedman em nível de significância de 0,01%. Para avaliação da frequência de *Salmonella* spp., os resultados foram distribuídos em uma tabela de contingência e interpretados pelo teste do Qui-quadrado (Sampaio, 2002).

## **5. Resultados e discussão**

### **5.1. Pesquisa atividade da enzima alfa-amilase**

#### **5.1.1. Curva padrão e equação de regressão**

As sete repetições de cada uma das seis concentrações de amido (0mg, 1mg, 2mg, 4mg, 5mg e 6mg) utilizadas para fortificação das amostras de ovo pasteurizado a 70°C por 3,5 minutos foram analisadas quanto a absorbância do complexo amido-iodo formado. Ao relacionar as absorbâncias com as respectivas concentrações de amido foi possível realizar a análise de regressão e observar que essas variáveis apresentaram comportamento linear quando correlacionadas (Fig.3). Portanto, à medida que se aumentou a concentração de amido maior foi o valor de absorbância encontrado para o complexo formado junto ao iodo.

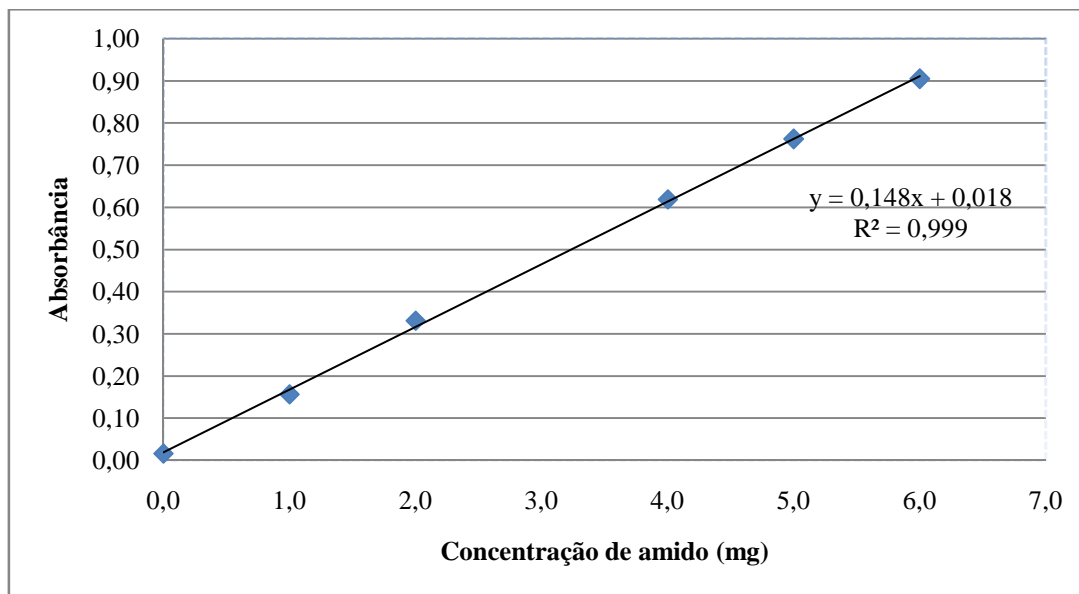


Figura 3. Gráfico de regressão linear dos valores de absorvância do complexo amido-iodo em função da concentração de amido de ovos integrais pasteurizados a 70°C por 3,5 minutos.

A equação da reta  $y = 0,148x + 0,018$  obtida a partir dos resultados de absorvâncias do complexo amido-iodo e respectivas concentrações de amido apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,999. Com esse valor, o modelo de regressão obtido conseguiu justificar 99,9% da variação da concentração de amido no intervalo de 0mg a 6mg a partir da absorvância do complexo amido-iodo. Dessa maneira, pôde-se obter estimativas confiáveis da concentração do amido complexado ao iodo e indiretamente avaliar a atividade da enzima alfa-amilase, quando presente, em decorrência a hidrólise desse substrato (diferença entre a concentração de amido adicionada inicialmente e aquela obtida ao final da análise).

Admitindo-se que parte do amido adicionado a matriz ovo pasteurizado poderia sofrer perdas durante as análises da atividade enzimática e para aumentar a confiabilidade da equação de regressão linear foi calculado o fator de correção. Esse fator determina com maior precisão a porcentagem real de amido que estava presente após a verificação da absorvância do complexo amido-iodo. O fator de correção encontrado foi igual a 90,9%, sendo calculado a partir da média das absorvâncias de três repetições de cada uma das três concentrações testadas (1mg, 3mg e 6mg). Com essa porcentagem pode-se estimar que cerca de 9% do amido adicionado foi perdido durante o processo de análise da atividade da enzima alfa-amilase. Portanto, a equação obtida pela curva linear da absorvância do complexo amido-iodo em função da concentração final do amido em ovos integrais pasteurizados a 70°C por 3,5 minutos foi adaptada de acordo com o fator correção.

Após a análise desses dois parâmetros de desempenho, foi possível determinar a equação:  $y = (0,148x + 0,018) * 0,909$  para o cálculo de amido restante nas amostras analisadas. Com a mensuração mais precisa dessa concentração de amido pode-se compreender as características da atividade enzimática da alfa-amilase diante dos tratamentos térmicos usados em ovos integrais e diferenciá-las dos resultados obtidos a partir de ovos crus.

Essa enzima apresenta sensibilidade ao calor e sua atividade é inversamente proporcional a concentração final de amido complexado ao iodo (Shrimpton *et al.*,1962). Diante dessas características, a atividade da alfa-amilase se torna importante para a avaliação da eficiência de diferentes métodos de pasteurização aplicados em ovos integrais.

### 5.1.2. Análise da atividade da enzima alfa-amilase em diferentes binômios de pasteurização

Os resultados da absorvância do complexo amido-iodo obtidos a partir das alíquotas dos ovos pasteurizados em diferentes temperaturas (60°C, 62°C e 64,4°C) demonstraram que o aumento da temperatura de pasteurização leva ao aumento do valor da absorvância do complexo amido-iodo. As medianas das absorvâncias do complexo amido-iodo formado em cada temperatura de pasteurização quando comparadas apresentaram diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) entre elas (Tab.1).

Tabela 1. Resultados do valor de absorvância do complexo amido-iodo de ovos pasteurizados nas temperaturas de 60°C, 62°C e 64,4°C

Tratamento	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Ovo pasteurizado 60°C	0,19 A	0,12	0,25
Ovo pasteurizado 62°C	0,33 B	0,20	0,48
Ovo pasteurizado 64,4°C	0,46 C	0,41	0,50

\*Medianas seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Friedman ( $p < 0,0001$ )

O aumento do valor da absorvância gerado a partir do aumento da temperatura é justificado pela inativação da enzima alfa-amilase que ocorre em temperaturas de pasteurização superiores a 64,4°C por um período de 2,5 minutos (Brooks, 1962; Murthy, 1970). A atividade da enzima alfa-amilase sobre a degradação do amido é menor à medida que a temperatura de pasteurização se aproxima de sua temperatura de desnaturação. Desta maneira, uma maior concentração de amido fica disponível para complexação ao iodo.

Os resultados das avaliações das absorvâncias obtidas nos tempos de pasteurização (2,5 min., 3,0 min., 3,5 min., 4,0 min. e 4,5min.) analisados em uma mesma temperatura de aquecimento encontram-se nas Tabs. 2, 3 e 4. Para estas avaliações foi observado que a alteração no tempo de pasteurização em intervalo de 2,5 minutos a 4,5 minutos não interfere significativamente ( $P > 0,05$ ) na absorvância obtida a partir do complexo amido-iodo de ovos pasteurizados.

Tabela 2. Resultados dos valores de absorvância do complexo amido-iodo de ovos pasteurizados a 60°C por 2,5minutos, 3,0minutos, 3,5minutos, 4,0 minutos e 4,5minutos.

Tratamento	Média ± Desvio padrão	Coefficiente de variação
2,5 minutos	0,17 ± 0,05	26,85
3,0 minutos	0,18 ± 0,05	29,10
3,5 minutos	0,20 ± 0,05	24,61
4,0 minutos	0,18 ± 0,05	27,46
4,5 minutos	0,20 ± 0,04	20,48

\*Médias semelhantes entre si pelo teste de SNK ( $p > 0,05$ )



Tabela 3. Resultados dos valores de absorvância do complexo amido-iodo de ovos pasteurizados a 62°C por 2,5minutos, 3,0minutos, 3,5minutos, 4,0 minutos e 4,5minutos.

Tratamento	Média ± Desvio padrão	Coefficiente de variação
2,5 minutos	0,29 ± 0,09	29,73
3,0 minutos	0,32 ± 0,08	23,60
3,5 minutos	0,33 ± 0,06	18,87
4,0 minutos	0,31 ± 0,07	21,99
4,5 minutos	0,38 ± 0,08	22,12

\*Médias semelhantes entre si pelo teste de SNK (p>0,05)

Tabela 4. Resultados dos valores de absorvância do complexo amido-iodo de ovos pasteurizados a 64,4°C por 2,5minutos, 3,0minutos, 3,5minutos, 4,0 minutos, 4,5minutos.

Tratamento	Média ± Desvio padrão	Coefficiente de variação
2,5 minutos	0,46 ± 0,03	6,05
3,0 minutos	0,46 ± 0,02	3,77
3,5 minutos	0,46 ± 0,03	7,16
4,0 minutos	0,46 ± 0,02	4,84
4,5 minutos	0,46 ± 0,02	4,40

\*Médias semelhantes entre si pelo teste de SNK (p>0,05).

As absorvâncias obtidas pela coloração do complexo amido-iodo permitiram calcular a concentração final de amido que estava complexado. Ao subtrair da concentração inicial de amido adicionada essa concentração final foi obtido o resultado indireto da quantidade de amido que foi hidrolisado (Quadro 1). Portanto, quanto maior a concentração de amido restante (complexado ao iodo), menor a atividade da enzima alfa-amilase e maior a absorvância gerada pela coloração do complexo amido-iodo.

Temperatura (°C)	Número de repetições	Tempo (min.)	Concentração inicial de amido (mg)	Média da concentração final de amido (mg)	Porcentagem de amido hidrolisado
60	04	2,5	2,50	0,92	63,24
	04	3,0	2,50	1,00	60,02
	04	3,5	2,50	1,10	55,81
	04	4,0	2,50	1,01	59,65
	04	4,5	2,50	1,09	56,65
62	04	2,5	2,50	1,69	32,47
	04	3,0	2,50	1,87	25,13
	04	3,5	2,50	1,90	24,06
	04	4,0	2,50	1,78	28,78
	04	4,5	2,50	2,15	14,11
64,4	04	2,5	2,50	2,47	1,36
	04	3,0	2,50	2,50	0,00
	04	3,5	2,50	2,49	0,53
	04	4,0	2,50	2,50	0,00
	04	4,5	2,50	2,50	0,00

Quadro 1. Resultados da concentração inicial de amido (mg), média da concentração final de amido (mg) e porcentagem de amido hidrolisado em amostras de ovos pasteurizados nas temperaturas de 60°C, 62°C e 64,4°C por 2,5minutos, 3,0minutos, 3,5minutos, 4,0minutos e 4,5minutos.

As médias das absorbâncias do complexo amido-iodo dos ovos pasteurizados a 60°C estiveram próximas a 0,2; esses valores quando inseridos na equação de regressão linear demonstraram uma variação de 0,92 mg a 1,10mg de amido complexado ao iodo. Dessa maneira, pode-se sugerir que a enzima alfa-amilase apresentou atividade expressiva, com porcentagem média de amido hidrolisado de 58,98% (Quadro 1). As concentrações finais de amido complexado das amostras de ovos pasteurizados a 62°C em períodos diferentes de aquecimento demonstraram uma variação de 1,69mg a 2,15mg com porcentagens de 14,11% a 32,47% de amido hidrolisado (Quadro 1). Os resultados das concentrações de amido complexado das amostras pasteurizadas a 64,4°C foram próximos a 2,5 mg, ou seja, porcentagens próximas a 0% de amido hidrolisado (Quadro 1). Essa porcentagem de amido hidrolisado é justificada pela desnaturação da enzima alfa-amilase no ovo integral após essa matriz alimentar ser submetida a binômios de pasteurização superiores a 64,4°C por 2,5 minutos.

As variações nas absorbâncias encontradas entre as diferentes temperaturas dos binômios de pasteurização de ovos integrais analisados podem ser explicadas pela inativação parcial ou total da enzima alfa-amilase à medida que as temperaturas aumentavam. Sobre as temperaturas de pasteurização de 60°C e 62°C ainda foi observada a ação da enzima, pois parte do amido estava hidrolisado. No entanto, a menor concentração de amido complexado a iodo no tratamento térmico sob temperatura de 60°C justifica a maior atividade da enzima alfa-amilase do que no tratamento a 62°C, que apresentou uma menor concentração de amido hidrolisado.

Essa atividade parcial da alfa-amilase obtida em temperaturas de pasteurização de ovos integrais abaixo de 64,4°C pode ocorrer em função de mudanças estruturais na enzima que interferem negativamente na formação do complexo enzima-substrato, nesse caso alfa-amilase e amido. Isso porque, temperaturas de pasteurização da matriz ovo mais próximas de 64,4°C reduzem a atividade da enzima alfa-amilase, sendo que binômios de pasteurização superiores a 64,4°C por 2,5 minutos levam desnaturação dessa enzima. Essas mudanças nas estruturas enzimáticas acarretam a maior ou menor complexação ao substrato, o que influencia na quantidade final de amido disponível e, conseqüentemente, na formação de complexos de amido-iodo com diferentes colorações e leituras à espectrofotometria.

As temperaturas dos binômios de pasteurização 60°C, 62°C e 64,4°C apresentaram colorações visivelmente diferentes entre elas. No entanto, a variação no tempo de pasteurização (2,5 minutos, 3,0 minutos, 3,5 minutos, 4,0 minutos e 4,5 minutos) quando avaliada em uma mesma temperatura pouco influenciou nas alterações das cores visíveis obtidas (Fig.4). Essas colorações visíveis apenas confirmaram os resultados da quantificação de amido hidrolisado obtidos indiretamente pelas absorbâncias do complexo amido-iodo. Dessa maneira, tornou-se notável que a variação das temperaturas do tratamento térmico apresentou-se mais eficiente para a inativação da enzima alfa-amilase do que a variação do tempo da pasteurização.

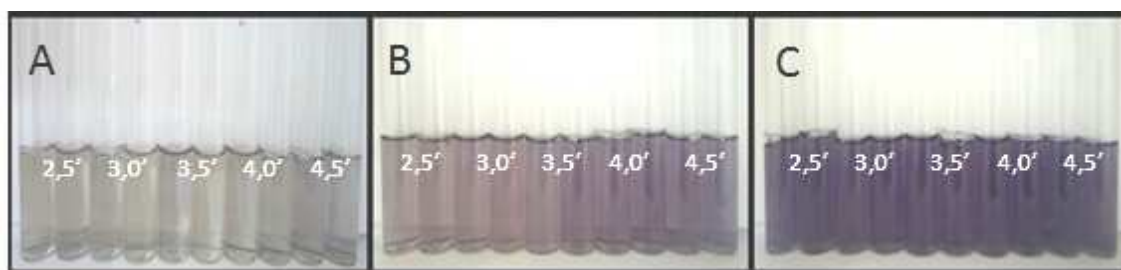


Figura 4. Análise da coloração visível das amostras de ovos pasteurizados a 60°C(A), 62°C(B) e 64,4°C (C) por 2,5 minutos, 3,0 minutos, 3,5minutos, 4,0minutos e 4,5minutos

### 5.1.3. Análise da atividade da enzima alfa amilase nas amostras de ovos integrais fornecidas pela indústria

As absorbâncias do complexo amido-iodo obtidas após leitura por espectrofotometria UV/visível possibilitaram o cálculo da porcentagem de quanto amido inicialmente adicionado foi hidrolisado nas amostras de ovos integrais fornecidas pela indústria de ovoprodutos. Dessa maneira, foi avaliada indiretamente a atividade da enzima-amilase presente no ovo antes e após o tratamento térmico (Tab.5).

Tabela 5. Resultados em porcentagem (%) de amido hidrolisado para análises da atividade da enzima alfa-amilase nas amostras de ovo cru, ovo pasteurizado à 60°C por 3,5 minutos e ovo pasteurizado à 68°C por 2,5 minutos

Tratamento	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Ovo cru	85,63 A	69,90	97,30
Ovo pasteurizado 60°C/3,5min.	28,02 B	0,00	87,96
Ovo pasteurizado 68°C/2,5min.	0,00 C	0,00	8,18

\*Medianas seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Friedman ( $p < 0,0001$ )

Os três tratamentos analisados apresentaram resultados distintos quanto a porcentagem de amido hidrolisado, sendo que os ovos crus apresentaram os maiores percentuais, enquanto os ovos submetidos ao tratamento térmico de 68°C por 2,5 minutos os menores. Estes resultados demonstraram que a enzima alfa-amilase apresentou atividade reduzida à medida que aumentou a temperatura de pasteurização.

O tratamento ovo cru apresentou porcentagem mínima de amido hidrolisado igual a 69,90% e porcentagem máxima de 97,30% (Tab.5). Evidenciando dessa forma a ação da enzima frente ao substrato, no entanto, diferentes proporções de gema e clara nos 0,5g das amostras utilizados para a análise da atividade enzimática podem justificar essa variação na hidrólise do amido. Isso porque, a enzima alfa amilase apresenta-se em maior concentração na gema do ovo quando comparada com a clara (Brooks,1962).

As amostras que foram pasteurizadas a 60°C por 3,5 minutos apresentaram as maiores variações entre as porcentagens de amido hidrolisado, com porcentagem mínima de 0,00% e porcentagem máxima igual a 87,96% (Tab.5). Essa variação na porcentagem de amido hidrolisado pode ser justificada pela inativação parcial da enzima que ocorre em maior ou menor frequência em decorrência a pequenas alterações na temperatura de pasteurização que podem ocasionar a desnaturação enzimática. Os testes realizados com ovos pasteurizados no laboratório

confirmaram a hipótese de que o aumento da temperatura durante o processo de pasteurização do ovo aumenta a disponibilidade de amido para complexação com o iodo. Com isso, pode-se aferir que o aumento da temperatura contribui para redução da atividade da enzima alfa-amilase, pois a mesma degrada o amido.

Dessa maneira, as variações encontradas na porcentagem de amido hidrolisado no tratamento de ovo pasteurizado a 60°C por 3,5 minutos evidenciaram uma alta variação nas temperaturas de pasteurização. Sendo possível afirmar que em algumas amostras as temperaturas foram superiores a 64,4°C, pois a enzima alfa-amilase estava inativa, pois não foi evidenciado a hidrólise do amido. Por outro lado, outras amostras apresentavam atividade enzimática próxima àquela observada em ovos crus. Isso apenas confirma que o tratamento térmico não atingiu temperaturas de pasteurização suficientes para a degradação, mesmo que parcial, da enzima. Os resultados da porcentagem de amido hidrolisado desse grupo demonstraram a importância da análise da atividade da enzima alfa-amilase para verificação a eficiência do tratamento térmico aplicado à matriz ovo integral.

O controle sobre o binômio temperatura e tempo é importante para garantia da inocuidade de ovos pasteurizados, sendo esse parâmetro determinado em função da eliminação da *Salmonella* spp. Shrimpton *et al.* (1962) demonstraram correlação positiva entre a eliminação de *Salmonella* Senftenberg e a inativação da enzima alfa-amilase em amostras de ovos integrais após o tratamento térmico em binômio de 64,4°C por 2,5 minutos.

A associação da atividade da enzima alfa-amilase à qualidade microbiológica final do produto pode ser facilmente relacionada para verificação da eficiência da pasteurização em ovos integrais. Isso porque a sensibilidade térmica, mesmo que parcial, dessa enzima permite estimar se temperatura de pasteurização atingida é suficiente para eliminação de micro-organismos patogênicos mais resistentes como, por exemplo; a *Salmonella* spp.

As amostras de ovo pasteurizado a 68°C por 2,5 minutos apresentaram menores variações quanto à quantidade de amido hidrolisado, sendo valor mínimo de 0,00 % e máximo de 8,18% (Tab.5). Essas pequenas variações podem ser explicadas, pois a alfa-amilase é inativada quando submetida a binômios de pasteurização superiores a 64,4°C há 2,5 minutos. Quanto a hidrólise de amido observada em algumas amostras desse tratamento, tal fato pode ser explicado pela existência de fatores interferentes na metodologia estudada. Brooks (1962) alertou sobre possíveis interferências nos resultados de absorvância do complexo amido-iodo devido a ligações de amido insolúvel a proteínas da matriz ovo integral durante a pesquisa pela atividade da enzima alfa-amilase. Dessa maneira, a solubilização da solução de amido quando não for eficiente poderá contribuir para perdas deste substrato durante a metodologia. Com intuito de aumentar essa solubilidade, as soluções de amido foram aquecidas a 90°C. Outro fator que deve ser considerado para justificar a presença de hidrólise de amido é a porcentagem de impurezas presente no amido utilizado como substrato, uma vez que essas diminuem a quantidade real de amido adicionado.

Com estes resultados foi possível observar a diminuição da atividade da enzima alfa-amilase a quaisquer aumentos de temperatura durante a pasteurização do ovo integral. Sendo que essa pesquisa é fundamental para o auxílio da verificação de uma pasteurização eficiente. Isso porque, em baixas temperaturas de pasteurização foi possível verificar alta atividade enzimática.

A pesquisa da atividade da enzima alfa-amilase apenas pela comparação visual entre as cores se mostrou mais eficiente para diferenciação dos ovos pasteurizados a 68°C por 2,5 minutos e os ovos crus. As amostras de ovos crus apresentaram a coloração visível amarela. Indicando que, aproximadamente, todo o amido adicionado à matriz foi hidrolisado o que impossibilitou a formação do complexo amido-iodo. A coloração visível entre as amostras de ovos pasteurizados a 60°C por 3,5 minutos não se apresentou uniforme, sendo encontradas as cores: amarela, violeta-róseo e azul-violeta. Essas variações de cores são justificadas pela quantidade de amido não hidrolisado que se ligou ao iodo. Para os ovos pasteurizados a 68°C por 2,5 minutos, todas as amostras apresentaram coloração azul- violeta. A formação dessa coloração azul-violeta foi observada, nesse tratamento, em virtude a maior concentração de amido final, uma vez que a enzima alfa-amilase se apresentava inativa (Fig.5).

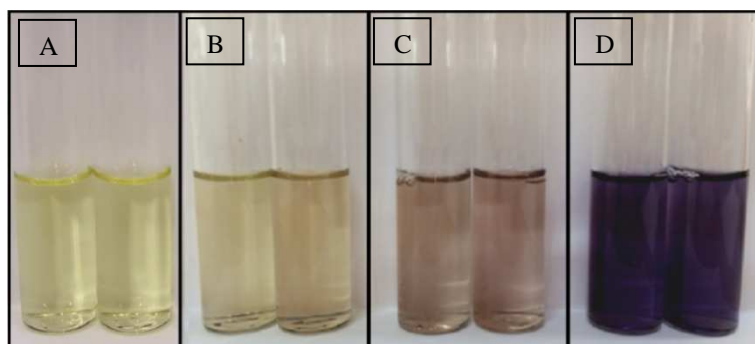


Figura 5. Colorações visíveis formadas pela concentração do complexo amido-iodo em amostras duplicatas de solução padrão com iodo (A), ovo cru (B), ovo pasteurizado a 60°C por 3,5 minutos (C) e ovo pasteurizado a 68°C por 2,5 minutos (D).

## 5.2. Análises Microbiológicas

### 5.2.1. Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios

Nas amostras de ovos crus, as contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios variaram bastante e apresentaram uma contagem mínima de  $1,0 \times 10^3$  UFC/mL e máxima superior a  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL. No entanto, após os tratamentos térmicos, ocorreram reduções significativas na frequência destes micro-organismos, com contagem máxima de  $4,0 \times 10^3$  UFC/mL para os ovos pasteurizados a 60°C por 3,5 minutos e de  $5,0 \times 10^3$  UFC/mL para os ovos pasteurizados a 68°C por 2,5 minutos (Tab.6).

Tabela 6. Resultados (UFC/mL) das contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios nas amostras de ovo cru, ovo pasteurizado à 60°C por 3,5 minutos e ovo pasteurizado à 68°C por 2,5 minutos

Tratamento	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Ovo cru	$6,5 \times 10^4$ A	$1,0 \times 10^3$	$>1,5 \times 10^6$
Ovo pasteurizado 60°C/3,5min.	$1,0 \times 10^2$ B	$<1,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^3$
Ovo pasteurizado 68°C/2,5min.	$2,0 \times 10^1$ B	$<1,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^3$

\*Medianas seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Friedman ( $p < 0,0001$ )

Essas contagens elevadas de micro-organismos mesófilos aeróbios encontradas nos ovos crus são justificadas pela qualidade da matéria prima que é destinada a industrialização. A Portaria nº01 do MAPA (Brasil, 1990) autoriza a pasteurização de ovos trincados e com outros defeitos na casca, sendo também permitida a utilização de ovos galados, provenientes de matrizeiros. Essas práticas são adotadas para o beneficiamento de produtos que seriam descartados, pois os mesmos não podem ser comercializados *in natura*, aumentando, desta forma, rendimento industrial. No entanto, esses ovos integrais reduzem a qualidade microbiológica da matéria prima alimentar visto que esses ovos são mais susceptíveis a contaminação externa.

As amostras de ovos integrais pasteurizados independentemente do tratamento térmico utilizado apresentaram resultados semelhantes, e os valores de todas as contagens foram inferiores ao limite preconizado pelo MAPA, que é de  $5,0 \times 10^4$  UFC/mL para micro-organismos mesófilos aeróbios (BRASIL, 1990). Esses resultados demonstraram que os binômios de temperatura e tempo utilizados (60°C por três minutos e meio e 68°C por dois minutos e meio) são eficientes para a melhoria da qualidade microbiológica da matriz ovo integral.

As medianas dos três tratamentos revelaram a redução da contaminação microbiana por micro-organismos mesófilos aeróbios em dois ciclos logarítmicos para ovos pasteurizados a 60°C por 3,5 minutos e em três ciclos logarítmicos após tratamento térmico a 68°C por 2,5 minutos. Portanto, as reduções das contagens desses micro-organismos nos dois tratamentos de ovos pasteurizados foram superiores a 99% quando comparada com a carga microbiana inicial da matriz ovo cru. Dessa maneira, pode-se ressaltar a importância do tratamento térmico na redução da microbiota inicial e, conseqüentemente, para garantia da inocuidade alimentar.

Altas contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios também foram descritas por Dias *et.al.*(2002) ao avaliarem a microbiota do ovo integral antes do tratamento térmico de 65°C por 3,5 minutos. Os autores relataram contagens máximas para esses micro-organismos de  $2,4 \times 10^7$  UFC/g.

Aragon-Alegre *et.al.*(2005) ao avaliar a qualidade microbiológica de ovos integrais em tanques de estocagem antes da pasteurização observaram contagens microbianas médias de  $1,8 \times 10^5$  UFC/g. Estes autores também avaliaram os ovos após o tratamento térmico e encontraram resultados em conformidade com a legislação vigente, com a média da contagem padrão em placas de  $4,6 \times 10^2$  UFC/g em ovos integrais coletados nas primeiras nas primeiras horas após pasteurização. Esses resultados corroboram com os encontrados nesse experimento.

Devido ao tratamento térmico a que os ovos integrais foram submetidos os principais micro-organismos que fazem parte da microbiota remanescente são aqueles resistentes a altas temperaturas; micro-organismos termodúricos. Esses micro-organismos, quando presente, indicam deficiência nas etapas de higienização de equipamentos. Além desses micro-organismos, formas esporuladas de micro-organismos psicrotróficos podem resistir à pasteurização e, após término do estresse térmico, voltarem à forma vegetativa, produzindo enzimas proteolíticas e lipolíticas que contribuem para a redução do tempo de prateleira de ovo pasteurizados (Jay, 2005, Franco e Landgraf, 2008).

Embora as contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios estejam abaixo dos parâmetros exigidos pela legislação para ovos integrais pasteurizados, essas contagens podem aumentar durante o período de estocagem do ovo no comércio varejista e na casa dos consumidores. Isso porque, o ovo apresenta em sua composição físico-química altas concentrações de ácidos graxos

e aminoácidos que favorecem a proliferação de alguns micro-organismos. Rêgo *et al.* (2012) avaliaram a qualidade de ovos integrais pasteurizados, e observaram contagens médias de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL para micro-organismos mesófilos no primeiro dia após o tratamento térmico. Porém, ao avaliar a vida de prateleira destes produtos, os autores encontraram contagens médias desses micro-organismos de  $8,7 \times 10^7$  UFC/mL com sete dias de armazenamento.

### 5.2.2. Contagem de coliformes totais e termotolerantes

As contagens de coliformes totais foram diferentes ( $p < 0,0001$ ) para todos os tratamentos analisados, sendo que valores superiores a  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL foram observadas em ovos integrais crus. Após a pasteurização ocorreu redução significativa no número desses micro-organismos. No entanto, os dois binômios de pasteurização testados apresentaram eficiências distintas. Nos ovos pasteurizados a  $60^\circ\text{C}$  por 3,5 minutos as contagens foram inferiores a  $1,0 \times 10^1$  UFC/mL, enquanto para os ovos pasteurizados a  $68^\circ\text{C}$  por 2,5 minutos a contagem máxima foi de  $9,0 \times 10^1$  UFC/mL (Tab.7). Mesmo apresentando essa diferença estatística entre os dois tratamentos térmicos dos ovos integrais, foi possível observar uma redução em três ciclos logarítmicos quando as medianas desses tratamentos são comparadas a mediana do tratamento de ovos crus. Essas reduções logarítmicas foram suficientes para obtenção de ovos com qualidade microbiológica.

Quanto aos coliformes termotolerantes os resultados obtidos em ovos crus variaram desde valores inferiores a  $1,0 \times 10^1$  UFC/mL até valores superiores a  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL. No entanto, após o tratamento térmico todas as amostras, independentemente do binômio de pasteurização utilizado, apresentaram reduções significativas de até quatro ciclos logarítmicos nas contagens desses micro-organismos ( $p < 0,0001$ ), sendo que todos os valores eram inferiores a  $1,0 \times 10^1$  UFC/mL (Tab.7).

Tabela 7. Resultados (UFC/mL) das análises de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de ovo cru, ovo pasteurizado à  $60^\circ\text{C}$  por 3,5 minutos e ovo pasteurizado à  $68^\circ\text{C}$  por 2,5 minutos

Tratamento	Mediana		Valor mínimo		Valor máximo	
	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes
Ovo cru	$1,3 \times 10^4$ A	$5,0 \times 10^2$ A	$1,8 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^1$	$> 1,5 \times 10^5$	$> 1,5 \times 10^5$
Ovo pasteurizado $60^\circ\text{C}/3,5\text{min.}$	$< 1,0 \times 10^1$ C	$< 1,0 \times 10^1$ B	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$
Ovo pasteurizado $68^\circ\text{C}/2,5\text{min.}$	$9,0 \times 10^1$ B	$< 1,0 \times 10^1$ B	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$9,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$

\*Medianas seguidas de letras distintas, nas mesmas colunas, diferem entre si pelo teste de Friedman ( $p < 0,0001$ )

As altas contagens de coliformes totais e termotolerantes em ovos crus demonstraram que a matéria prima utilizada para pasteurização apresentava uma baixa qualidade microbiológica. Essas contagens podem ser justificadas, pois durante o processo de quebra de ovos, o conteúdo interno tem contato com a superfície externa da casca e, conseqüentemente, com resquícios de fezes (Stadelman e Cotterill, 1995). Nas fezes das galinhas e de outros animais de sangue quente é comum encontrar esses micro-organismos, visto que eles fazem parte da microbiota intestinal. Além disso, como citado anteriormente, no Brasil é permitido que ovos com defeitos em casca e/ou em membranas, ou até mesmo aqueles provenientes de matrizeiros sejam pasteurizados. Esses ovos estão mais susceptíveis a contaminação horizontal, o que contribui para a redução da qualidade microbiológica dos lotes de ovos destinados a industrialização.

Os maiores valores nas contagens de coliformes totais entre os ovos pasteurizados foram observados no binômio de pasteurização de 68°C por 2,5 minutos, favorecendo ao aparecimento da diferença estatística entre os dois tratamentos térmicos testados. Essa diferença pode estar relacionada com o processo de higienização do pasteurizador. Isso porque, quando não há uma frequência adequada de higienização assim como a utilização coerente dos detergentes alcalinos e ácidos pode ocorrer o crescimento de micro-organismos e, posteriormente, formação de biofilmes na tubulação do pasteurizador. Segundo Davey (2000), os biofilmes são comunidades biológicas com um elevado grau de organização, onde as bactérias formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais. Estas comunidades biológicas encontram-se organizadas em matrizes poliméricas. A associação de diferentes micro-organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao desenvolvimento, favorecendo relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis.

A pesquisa por coliformes totais em ovos integrais pasteurizados, embora não seja preconizada pela legislação brasileira, é importante para avaliar a qualidade da matéria prima utilizada, e também para caracterizar o processamento industrial a que a matriz alimentar foi submetida. Avaliando, dessa maneira, os parâmetros higiênico-sanitários instituídos por programas de qualidade aplicados à indústria.

Órgãos internacionais preconizam a pesquisa por micro-organismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* para ovos pasteurizados. Nos Estados Unidos (USDA, 2004) foi determinado o limite de decisão para não conformidade de uma amostra igual 10 UFC/mL, enquanto a Comunidade Europeia instituiu 10<sup>3</sup> UFC/mL (CEE, 1989).

Dentre os parâmetros microbiológicos exigidos pela legislação brasileira para fiscalização de ovos pasteurizados a contagem de coliformes termotolerantes deve ser inferior a 1UFC/g ou mL. Esses micro-organismos quando encontrados em alimentos de origem animal não determinam apenas falhas nas condições higiênico-sanitárias do processamento industrial, mas também um fator de risco ao aparecimento de doenças patogênicas ao consumidor, visto que alguns micro-organismos desse grupo são produtores de enterotoxinas e outros fatores de virulência.

Altas variações nas contagens de coliformes totais e termotolerantes, também, foram observadas por Dias *et al.* (2002) em ovos integrais antes da pasteurização, com valor mínimo inferior a 0,3NMP/g e máximo superior a 1100 NMP/g.

Dias *et al.* (2002) e Rêgo *et al.* (2012) ao avaliarem a qualidade microbiológica de ovos comerciais pasteurizados encontraram concentrações de coliformes termotolerantes inferiores a 0,3NMP/g e 0,3NMP/mL, respectivamente, em todas as amostras analisadas, demonstrando dessa maneira, a eficiência da pasteurização para obtenção de produtos com qualidade.

### **5.2.3. Contagem de *Staphylococcus* spp.**

Os ovos crus apresentaram contagens de *Staphylococcus* spp. desde 2,0 x10<sup>1</sup> UFC/mL a valores superiores a 2,0 x 10<sup>5</sup> UFC/mL. Reduções nessas contagens foram observadas após o tratamento térmico nos dois binômios de pasteurização utilizados. No entanto, os dois tratamentos de ovos pasteurizados apresentaram comportamentos distintos (p<0,0001), sendo que as contagens máximas de 5,5 x10<sup>1</sup> UFC/mL e 1,4 x10<sup>2</sup> UFC/mL foram obtidas nos grupos de ovos pasteurizados a 60°C por 3,5 minutos e a 68°C por 2,5 minutos, respectivamente (Tab.8). Em



nenhum dos três grupos analisados foi observada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva.

Tabela 8. Resultados (UFC/g) das análises de *Staphylococcus* spp. nas amostras de ovo cru, ovo pasteurizado à 60°C por 3,5 minutos e ovo pasteurizado à 68°C por 2,5 minutos

Tratamento	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Ovo cru	1,1 x10 <sup>4</sup> A	2,0 x10 <sup>1</sup>	>2,0 x 10 <sup>5</sup>
Ovo pasteurizado 60°C/3,5 min.	6,5 x10 <sup>0</sup> C	<1,0 x10 <sup>0</sup>	5,5 x10 <sup>1</sup>
Ovo pasteurizado 68°C/2,5 min.	1,2 x10 <sup>2</sup> B	<1,0 x10 <sup>0</sup>	1,4 x10 <sup>2</sup>

\*Medianas seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Friedman (p<0,0001)

As altas contagens de *Staphylococcus* spp. em ovos crus confirmaram os resultados obtidos pelos demais micro-organismos pesquisados que caracterizaram a matéria prima utilizada como sendo de baixa qualidade microbiológica. Essa contaminação pode ser justificada por possíveis falhas no processamento industrial durante a seleção, lavagem e quebra dos ovos, ou mesmo por problemas na implementação de boas práticas de fabricação, o que contribuem para aumentar o risco de contaminação do conteúdo interno do ovo.

Nos ovos pasteurizados, foi possível observar baixas contagens de *Staphylococcus* spp., contudo os dois binômios apresentaram comportamentos distintos, com contagens superiores nos ovos pasteurizados a 68°C por 2,5 minutos. Na Tab. 8 pode-se observar a redução de quatro ciclos logarítmicos na mediana das contagens desse micro-organismo em ovos integrais pasteurizados a 60°C por 3,5 minutos quando comparada a mediana das contagens nos ovos crus, enquanto que no outro tratamento de ovos pasteurizados a redução logarítmica foi de apenas dois ciclos. Como já foi dito, as pasteurizações dos ovos integrais em dois binômios temperatura e tempo ocorreram em equipamentos diferentes. Possivelmente, a presença de biofilmes no pasteurizador tubular contribuiu para os resultados obtidos no binômio de pasteurização de 68°C por 2,5 minutos.

A Portaria nº01 de 1990 determina a pesquisa por *Staphylococcus* coagulase positiva com o intuito de identificar a presença de *S. aureus*. No entanto, a intoxicação estafilocócica é resultante da ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas estafilocócicas (SE) termoestáveis pré-formadas, produzidas por linhagens enterotoxigênicas de estafilococos independente da atividade frente à prova da coagulase (Cunha *et al.*, 2006; Ombui e Mathenge, 2007).

Algumas espécies desses micro-organismos são comumente encontradas na pele e nas mucosas orais e nasais de seres humanos sob interações comensais, como é o caso de *S.epidermidis* e *S.aureus*(Jay,2005). Dessa maneira, o monitoramento das concentrações desses micro-organismos em produtos de origem animal auxilia na prevenção de doenças transmitidas por alimentos, e, também, indica falhas em procedimentos de boas práticas de fabricação, principalmente na higiene dos trabalhadores.

Aragon-Alegron *et al.* (2005) observaram contagens de *S.aureus* inferiores a 1,0 x 10<sup>2</sup> UFC/g em amostras de ovos não pasteurizados coletados na máquina de quebra e durante a estocagem. No entanto, esses autores não reportaram a contagem de *Staphylococcus* spp.

Rêgo *et al.* (2012) não encontraram a presença de *S.aureus* nas amostras de ovos comerciais pasteurizados. No entanto, eles relataram contagem média de 4,7 x10<sup>1</sup> UFC/mL de

*Staphylococcus* spp. nessas amostras após sete dias da realização do tratamento térmico, permanecendo com baixas contagens até o 21º dia de armazenamento.

Durante a pesquisa por *Staphylococcus* spp. foi possível observar a contaminação do ágar Baird Parker por micro-organismos do gênero *Proteus* (Fig. 6), que foi confirmada por provas bíquímicas realizadas pelo aparelho Vitek 2® (bioMérieux, Hazelwood, Missouri, USA) em todas as amostras de ovo cru. No entanto, nos ovos pasteurizados, independentemente do tratamento térmico aplicado, não foi observado o crescimento desse micro-organismo. Estes micro-organismos são classificados como psicrotróficos, sendo que algumas cepas mesófilas foram descritas por Franco e Landgraf (2008) como agentes causadores de toxiinfecções alimentares. Além disso, *Proteus* spp. são produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas, que aceleram o processo de deterioração do alimento. Essas enzimas não são desnaturadas pelo calor, ou seja, resistem a tratamentos térmicos. Dessa maneira, mesmo não tendo sido encontrado esse micro-organismo nos ovos pasteurizados, a presença dessas enzimas podem contribuir para a redução da vida de prateleira do produto.

Dias *et.al.* (2002) encontraram altas contagens de micro-organismos psicrotróficos, que variaram de  $5,7 \times 10^3$  UFC/g a  $7,6 \times 10^7$  UFC/g em ovos não pasteurizados, sendo que após o tratamento térmico foi observada por esses autores uma redução na contagem máxima desses micro-organismos para  $5,9 \times 10^1$  UFC/g

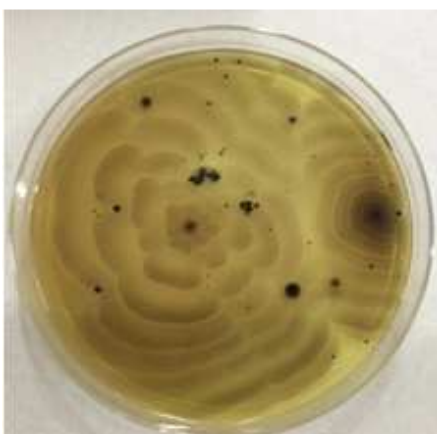


Figura 6. Placa de ágar Baird Parker com colônias de *Proteus* spp. de uma amostra do tratamento de ovos crus.

#### **5.2.4. Frequência de *Salmonella* spp.**

Dos 30 lotes de ovos crus 23 (76,63%) apresentaram-se positivos para *Salmonella* spp. Porém, após o tratamento térmico por diferentes binômios de pasteurização apenas uma amostra que foi pasteurizada a 60°C por 3,5 minutos teve a presença dessa bactéria confirmada (Tab. 9).

Tabela 9. Frequência(%)de *Salmonella* spp. em amostras de ovo cru, ovo pasteurizado à 60°C por 3,5 minutos e ovo pasteurizado à 68°C por 2,5 minutos

Tratamento	Positivo	Negativo
Ovo cru	76,67% (23) A	23,33% (7)
Ovo pasteurizado 60°C/ 3,5min.	3,33% (1) B	96,67% (29)
Ovo pasteurizado 68°C/ 2,5min.	0,00% (0) B	100,00% (30)

\*Porcentagem de amostras positivas seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si pelo Qui-quadrado ( $p < 0,0001$ )

Alguns micro-organismos do gênero *Salmonella* fazem parte da microbiota do trato intestinal dos animais de sangue quente, dentre estes pode-se destacar a *Salmonella* Enteritidis nas galinhas (Quinn *et al.*, 2005). Sendo, portanto, esperado encontrar essa bactéria em ovos crus, visto que contaminações fecais para dentro do conteúdo interno do ovo são passíveis de ocorrerem durante as etapas do processamento industrial. No entanto, em ovos pasteurizados, de acordo com a legislação brasileira, o parâmetro microbiológico exigido para *Salmonellaspp.* é ausência em 25g ou mL.

A baixa frequência desse micro-organismo em ovos pasteurizados é esperada devido a sua sensibilidade ao tratamento térmico. Jakočiūnė *et al.* (2014) ao estudar a viabilidade da *Salmonella* Enteritidis em ovos pasteurizados verificaram que esse micro-organismo apresentava-se ativo quando submetido ao tratamento térmico em temperaturas inferiores a 58°C.

A presença desse micro-organismo em uma das repetições do tratamento de ovos integrais pasteurizados a 60°C por 3,5 minutos pode ser explicada pela variação nas temperaturas de pasteurização. Essa variação foi confirmada pelo teste que avaliou a atividade da enzima alfa-amilase. Após a análise dessa atividade enzimática, nesta repetição específica, foi constatado que a enzima ainda estava ativa, pois cerca de 80% do amido adicionado foi hidrolisado. Sendo assim, ao relacionar a viabilidade de alguns sorovares de *Salmonella* em temperaturas de pasteurização inferiores a 58°C e o resultado obtido pela análise da enzima alfa-amilase, pôde-se sugerir que essa amostra de ovo integral foi submetida a um tratamento térmico com temperaturas mais baixas, próxima de 57°C.

Aragon-Alegron *et al.* (2005), avaliando a presença de *Salmonella* spp. em ovos antes e após a pasteurização, com e sem a etapa de lavagem, verificaram a presença desse micro-organismo apenas em algumas amostras de ovos não pasteurizados, na sendo identificada após o tratamento térmico.

Hara-Kudo e Takatori (2009) encontram 1,7% de amostras positivas para *Salmonella* spp. em ovo integrais pasteurizado no período de 1992 a 2002 no Japão, resultado semelhantes ao encontrado neste trabalho, que foi de 1,67%.

## **6. Conclusões**

A inativação da enzima alfa-amilase em ovos integrais é dependente da temperatura de pasteurização utilizada, e a pesquisa pela atividade dessa enzima por meio da quantificação indireta do amido hidrolisado demonstra ser uma metodologia eficaz para a verificação da eficiência do tratamento térmico.

O ovo cru apresenta baixa qualidade microbiológica, no entanto, após o tratamento térmico a 60°C por 3,5 minutos ou a 68°C por 2,5 minutos é possível observar redução nas contagens dos micro-organismos patogênicos pesquisados, o que classifica a matriz ovo pasteurizado conforme diante dos parâmetros microbiológicos exigidos pela legislação brasileira.

## 7. Referências bibliográficas

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. *Relatório anual 2014*. Disponível em < <http://www.ubabef.com.br/publicacoes> > Acesso em 21 de agosto 2014.

ANPRASERTPORN,A. *Microbiological analyses of eggs and egg products using the microfoss system*. 2009. 337f. Tese (doutorado) -School of chemical sciences and engineering, University of Western Sydney, Hawkesbury, Australia.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial*. Brasília, DF.

AOAC Official Method 990.12. Aerobic count plate, dry rehydratable film Petrifilm™ aerobic plate method. *J. AOAC Int.*, v. 83, p.635, 1990.

AOAC Official Method 991.14 C Coliforms and E. coli count plate, dry rehydratable film Petrifilm™ coliform plate method. *J. AOAC Int.*, v. 74, p.635, 1991.

AOAC Official Method 997.02 Yeast and Mold Counts in Foods, dry rehydratable film method (Petrifilm™ Method), *J. AOAC Int.* v.80,p.806,1997.

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

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*. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v.25, p.618-622, 2005.

REGINALD W. B.; GAYLE A. *BAM: Bacteriological Analytical Manual: Staphylococcus aureus*. 2001. Disponível em:<[www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/.../ucm071429.htm](http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/.../ucm071429.htm)> Acessado dia 30 de setembro de 2014.

BANNERMAN, T.L., PEACOCK, S. *Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen J et.al.. *Manual of Clinical Microbiology*. Manual of Clinical Microbiology, Washington, p. 390-411, 2007.

BALL , H. R.; COTTERILL, O. J. Egg white catalase: catalic reaction. *Poult. Sci.* v. 50, n. 2, p.435-46, 1971.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Resolução Nº 005 de 05 de julho de 1991. - *Padrão de Identidade e Qualidade para o Ovo Integral*. Brasília, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, e alterações*. DOU. Brasília atualizado em 1997.

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

BROOKS, J.  $\alpha$ - Amylase in whole egg and its sensitivity to pasteurization temperatures. *J. Hyg.*, v 60, p. 145-151, 1962.

BURHAN A.; NISA U.; GÖKHAN C. *et al.* Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Proc. Biochem.*, vol. 38, no. 10, p. 1397–1403, 2003.

CARMO, L.S. *Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e TSST-1 para uso em ensaios imuno-enzimáticos*. 2001.254f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CHRISTIAN, G. D. *Analytical chemistry*. 5. ed. Nova York: John Wiley & Sons, 1994. 812p.

COMUNIDADE ECONÔMICA EUROPÉIA. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002 dá execução ao disposto na Directiva 2002/657/CE do conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 2002, p. L 221/8 – L 221/36

COMUNIDADE ECONÔMICA EUROPEIA. Decisão da comissão de 20 de Junho de 1989 dá execução ao disposto na Directiva 1989/437/CEE relativa aos problemas de ordem higiénica e sanitária respeitantes à produção e à colocação no mercado dos ovoprodutos. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 1989, p. L 212/87 – L 212/100.

CODEX *Alimentarius*, Report of the eleventh Session of the Codex Committee on Food Hygiene, Washington, D.C., USA, June 1974.

COX, J. M., 2001. Eggs and egg products. In: *Spoilage of Processed Foods: Causes and Diagnosis*, Australian Institute of Food Science and Technology (AIFST) Incorporated, NSW Branch, Food Microbiology Group, Waterloo DC, p. 167-175

CUNHA, M.L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R.A.O. *et al.* Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Braz. J. Microbiol.* v. 37, p.70-74, 2006.

- DAVEY, M. E. E O'TOOLE, G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol Biol. Rev.*, 64, 847-867, 2000.
- DELAZARI, I. Aspectos microbiológicos ligados a segurança e qualidade da carcaça de aves. In: *Semana Acadêmica Veterinária*, São Paulo: n. 8, p. 71-77, 1998.
- DELVES-BROUGHTON, J., BOARD, R.G. Microbiology of egg products. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, San Diego, p. 569-573, 2000.
- DIAS, A.P.; AJZENTAL, A.; CALIL, R.M. Avaliação da microbiota pré e pós-pasteurização do ovo integral líquido. *Hig.aliment.*, v.16, p.127-133, 2002.
- EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em < <http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html> >. Acessado em 20 de agosto de 2014.
- FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION ( FDA). The egg products inspection act. *Federal Register*, 1971.
- FRANCO, B. D. G. M. F; LANDGRAF, M. Microorganismos indicadores. In: *Microbiologia dos alimentos*. Ed. Atheneu, cap.3, p. 27-31, 2008.
- FREITAS, M. F. L. de; LEÃO, A. E. D. de S.; STAMFORD, T. L. M. *et.al.* A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango. *B.CEPA*. Curitiba, v.. 22, p. 227, julho a dezembro, 2004.
- GIBSON,D.L., et al. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Microbiology-Sgm*, v.153, p.1131-1140, 2007.
- HANSEN, L.P. Automation study of  $\beta$ -N- acetylglucosaminidase activity as an indicator for egg white pasteurization. *J. Food. Sci.*, v.36,p.600-603,1971.
- HARA-KUDO, Y.; TAKATORI, K. Microbial quality of liquid egg and *Salmonella* infection status in japan. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, v.50, p.35-40, 2009.
- HENNEKINNE, J. A.; GUILLIER, F.; PERELLE, S. et.al. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products.*J. Appl.Microbiol.*, v. 102, p. 1261–1272, 2007.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMETRO). *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. 2003. 36p.
- JAKOČIŪNĚ, D.; BISGAARD, M.; HERVÉ, G. *et.al.*. Effects of environmental conditions on growth and survival of *Salmonella* in pasteurized whole egg.*Int J. Food Microbiol.* V.1, n.184, p.27-30, 2014.

JANECEK, S.; SVENSSON, B.; HENRISSAT, B.. Domain evolution in the alpha-amylase family. *J. Mol. Evol.* v. 45, n.3, p.322-31, 1997.

JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed .Las Vegas. Editora Artmed. 2005. 711p.

KLOOD, W. E.; SCHLEIFER, K.H.; GÖTZ, F. *The genus Staphylococcus*. In: The prokaryotes, 1369-1420, Springer, New York, 1991.

KONEMAN, E. *Diagnóstico microbiológico*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001,1760p.

KOTTWITZ, L. B. M.; BACK, A.; LEÃO, J. A.*et.al.* Contaminação por *Salmonella* spp. em um cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.60,n.2, p.496-498,2008.

LOTTERMANN, M. T. *Purificação e caracterização estrutural de uma  $\alpha$ -amilase de *Cryptococcus flavus* expressa em *Saccharomyces cerevisiae* "MFL"*.2012.92f. Dissertação Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília, Brasília.

MADIGAN, M.t.; MARTINKO, J.M.; PARKER *et.al.**Biology of microorganisms*, 10 ed. Prentice-Hall, New Jersey, 2004,1019p.

MURTHY,G.K. Thermal inactivation of alpha-amylase in various liquid egg products. *J. Food Sci.* , v. 35, p 352-356,1970.

NELSON, D. L.; COX, M. *Lehninger – Princípios de Bioquímica*. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

OLIVEIRA, S.J. *Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária*. Ed. da Ulbra: Canoas, RS, 1995, 142p.

OLIVEIRA, A. V. B.; SILVA, R. A.; ARAÚJO, A. S.; BRANDÃO, P. A.; SILVA, F . B. Padrões microbiológicos da carne de frango de corte - Referencial teórico. *Revista Verde* (Mossoró – RN – Brasil) v.6, n.3, p. 01 – 16 julho/setembro de 2011.

OLIVEIRA, H. B. *Uso de uma Alfa-amilase exógena em ração de frango de corte*. 2012.42f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Lavras 2012

OLIVEIRA, B. L.; OLIVEIRA, D. D. *Qualidade e tecnologia de ovos*. Lavras, UFLA, 2013, 224p.

OMBUI, J.N.; MATHENGE, J.M. A Comparison of the Reverse Passive Latex Agglutination and Enzyme Linked Immunosorbent Assay Techniques for Detection of Staphylococcal Enterotoxins. *A Journal of the Kenya Veterinary Association*, Nairobi, Quênia, v.31, n. 1, p. 20-25, 2007.



QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. *et al. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Artmed, São Paulo, 2005, 512p.

REIS, P. B.. *Validação de método espectrofotométrico para determinação de nitrito em patê de presunto*. 2006. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RÊGO, I. O. P.; CANÇADO, S. V. ; FIGUEIREDO, T. C. *et al. Influência do período de armazenamento na qualidade do ovo integral pasteurizado refrigerado*. 2010. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RÊGO, I. O. P.; CANÇADO, S. V. ; FIGUEIREDO, T. C. *et al. Influência do período de armazenamento na qualidade do ovo integral pasteurizado refrigerado*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.3, p.735-742, 2012.

RICKE, S.C., BIRKHOFF, S.G., GAST, R.K.. Eggs and egg products. In: Downes, F.P., Ito, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4ed, American Public Health Association, Washington, D.C., p. 473-481, 2001

RIVOAL, K.; ROATIS, J.; QUÉGUINER, S.; *et al.* Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of Salmonella serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtain from whole liquid eggs. *J. Food Microbiol.* V. 129, p. 180-186, 2009

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria uv-vis. *Quim. Nova.* v.27, p. 807,2004.

SAENGER, W. The structure of blue starch-iodine complex. *Naturwiss.* V.77, p-31-36, 1984.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552 p..

SHRIMPTON, D.H.; MONSEY, J.B.; HOBBS, B.C.; SMITH, M.E. A laboratory determination of the destruction of  $\alpha$ -amylase and salmonellae in whole egg by heat pasteurization. *J. Hyg.* v.60, p. 153-161, 1962.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NUMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). *Commodity Specification whole eggs*. Maio de 2004. Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3016336>> . Acessado dia 20 de outubro de 2014.

VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* n. 3, 1996. Washington: American Public Health Association (APHA), 873 p, 1996.

WILLARD, H; MERRITT, L. JR.; DEAN, J. *Análise instrumental*. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 986p, 1979.