

PAULA SPINHA DE TOLEDO

DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO DA CEPA DE *Salmonella* ENTERITIDIS PT4 FRENTE AO TRATAMENTO TÉRMICO A 60,0°C POR TRÊS MINUTOS E MEIO, EM OVO INTEGRAL PASTEURIZADO DESIDRATADO RECONSTITUÍDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian

SÃO PAULO

2003

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1314
FMVZ

Toledo, Paula Spinha de

Descrição do comportamento da cepa *Salmonella* enteritidis PT4 frente ao tratamento térmico a 60,0°C por três minutos e meio, em ovo integral pasteurizado desidratado reconstituído / Paula Spinha de Toledo. – São Paulo : P. S Toledo, 2003.

95 f. : il.


Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian.

1. *Salmonella*. 2. Ovo. 3. Termorresistência. 4. Pasteurização.
I. Título.




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da termorresistência da cepa de *Salmonella Enteritidis* em ovo integral pasteurizado desidratado, frente ao tratamento térmico à 59,5°C por três minutos e meio" Protocolo nº 292/2003, não envolvendo o uso de animais, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Simone de Carvalho Balian, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Survey of termorresistance of *Salmonella Enteritidis* in integral pasteurized dried egg, treated in a temperature of 59.5°C for 3.5 minutes" protocol number 292/2003, animals won't be utilized, under the responsibility of Prof^a Dr^a Simone de Carvalho Balian, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Biotic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum").

São Paulo, 29 de abril de 2003


Prof^a Dr^a Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: TOLEDO, Paula Spinha de

Título: Descrição do comportamento da cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4 frente ao tratamento térmico a 60,0°C por três minutos e meio, em ovo integral pasteurizado desidratado reconstituído

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais **Aroldo de Toledo e Marlene Spinha de Toledo** por todo amor, carinho, paciência, dedicação, compreensão, incentivo e apoio; pela experiência de vida, pelo exemplo de integridade...

Ao meu querido **Miguel**, pelo amor, pela paciência, pela compreensão, pela cumplicidade, pelo companheirismo, pela pessoa maravilhosa que é;

A minha irmã **Daniela** e ao meu cunhado **Alan** por toda ajuda, pela amizade, e pelos agradáveis momentos;

A minha segunda família **Tia Graça, Tio Miguel, Fabíola, Eduardo e Lucas** pelo acolhimento e pelos momentos agradáveis;

As minhas amigas **Aline e Maria do Carmo (Loly)** por todos os momentos em que passamos juntas, pelo carinho e amizade;

A toda minha família e amigos, por todos os momentos agradáveis;

A Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian, por quem eu tenho profunda admiração e respeito, pelo acolhimento, pela confiança em mim depositada, pela experiência, pela sabedoria, pela paciência e serenidade, pelo exemplo de caráter e dignidade, pela amizade.

AGRADECIMENTOS

A **Dra. Dilma Gelli e Dra. Mioko**, do Instituto Adolfo Lutz, pela atenção e colaboração no desenvolvimento deste trabalho, cedendo a cepa de *Salmonella*;

Ao **Prof. Dr. Sebastião Timo Iaria**, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), pelos preciosos ensinamentos;

Ao **Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain**, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, pelas informações e instruções para a realização deste ensaio;

A **Profa. Dra. Evelise O. T. R. Silva**, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, pelos sábios ensinamentos, pela experiência, pela amizade;

Ao **Ricardo Augusto Dias** por toda ajuda na análise estatística, pelas inúmeras explicações, pelo tempo dispensado, e, principalmente, pela amizade;

Aos pós-graduandos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, **Fábio Gregori e Paulo Brandão**, por toda ajuda na padronização do piloto;

Aos funcionários do laboratório de Higiene Alimentar, **Orlando Bispo de Souza e Sandra Abelardo Sanches**, por toda ajuda na execução deste trabalho;

Aos funcionários **Maria Cristina Paick, Ana Virgínia P. A. Prado, Danival e Jucélia de Jesus Pereira** por todo suporte técnico e por toda ajuda;

Aos amigos pós-graduandos do laboratório de Higiene Alimentar **Esther, Ezequiel, Flávia e Paula Praxedes** pelo companheirismo, pelos dias de árduo trabalho, pelas conversas, pela amizade;

A todos os pós-graduandos e professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal pelas informações, pelas explicações, pelas trocas de experiência, pelos ensinamentos,

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a execução e realização deste trabalho meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

TOLEDO, P. S. **Descrição do comportamento da cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4 frente ao tratamento térmico a 60,0°C por três minutos e meio, em ovo integral pasteurizado desidratado reconstituído.** [Description the behavior of *Salmonella* Enteritidis PT4 undergoing thermal treatment at 60°C for 3 ½ minutes, in reconstituted dried-wole egg]. 2003. 95 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

O presente trabalho objetivou descrever o comportamento da cepa *Salmonella* Enteritidis (S. Enteritidis) PT4, frente ao tratamento térmico a 60,0° C por três minutos e meio, em ovo integral pasteurizado desidratado reconstituído, interrelacionando a termorresistência com temperatura prévia de incubação e concentração de microrganismos. Foram realizadas 150 análises, das quais 75 foram trabalhadas com cepa previamente incubada à 35°C e 75 com cepa incubada à 43°C. Cada um destes grupos foi subdividido em três subgrupos, inoculado-se as concentrações de 10^3 , 10^5 e 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL de caldo BHI. Após inoculação, foi simulada pasteurização do ovo, a 60,0°C por 3,5 minutos, em banho-maria, e, posteriormente, realizadas contagem em placa (UFC) e Número Mais Provável (NMP), para verificação da concentração de S. Enteritidis sobrevivente. O tempo de redução decimal (valor *D*) foi de 2,54 e 2,57 minutos para S. Enteritidis previamente incubada à 35°C e inoculada nas concentrações de 10^5 e 10^8 UFC/mL de caldo BHI, respectivamente. Para S. Enteritidis previamente incubada à 43°C e inoculada nas concentrações de 10^5 e 10^8 UFC/mL de caldo BHI, o valor *D* foi de 2,58 e 2,40 minutos, respectivamente. Não foi possível o cálculo do valor *D* para a concentração 10^3 UFC/mL de caldo BHI, visto que não houve população

sobrevivente. Não houve diferença significativa entre os resultados de contagem e NMP, comparando-se as duas temperaturas de incubação, entretanto, os resultados de contagem e NMP das três concentrações inoculadas foram diferentes entre si. Concluiu-se que a cepa pré incubada a 43°C não apresentou maior resistência ao calor, em relação à cepa incubada a 35°C; e não houve maior resistência ao calor, comparando-se as diferentes concentrações.

Palavras-chave: *Salmonella*. Ovo. Termorresistência. Pasteurização.

ABSTRACT

TOLEDO, P. S. **Description the behavior of *Salmonella* Enteritidis PT4 undergoing thermal treatment at 60°C for 3 ½ minutes, in reconstituted dried-wole egg.** [Descrição do comportamento da cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4 frente ao tratamento térmico a 60,0°C por três minutos e meio, em ovo integral pasteurizado desidratado reconstituído]. 2003. 95 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonose) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

The purpose of this study was to describe the behavior of *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) PT4 undergoing thermal treatment at 60°C for 3 ½ minutes in reconstituted dried-whole egg, correlating the heat resistance with a previous temperature of incubation and microorganism concentration. 150 analyses were conducted, 75 with *S. Enteritidis* PT4 previously incubated at 35°C and 75 with *S. Enteritidis* PT4 previously incubated at 43°C. Each of these two groups was subdivided in 3 sub-groups, adding the inoculum at concentrations of 10^3 , 10^5 , 10^8 CFU/mL of BHI broth. After the inoculation, pasteurization of the egg was simulated at 60°C for 3,5 minutes in a water bath. Then colony count and Most Probable Number (MPN) were carried out to check the concentration of surviving *S. Enteritidis*. The decimal reduction time (D-value) was 2.54 and 2.57 minutes for *S. Enteritidis* previously incubated at 35°C and inoculated in the concentration of 10^5 and 10^8 CFU/mL of BHI broth, respectively. Concerning the *S. Enteritidis* previously incubated at 43°C and inoculated in concentrations of 10^5 and 10^8 CFU/mL of BHI broth, the D-value was 2.58 and 2.40 minutes, respectively. It was not possible to calculate the D-Value for the 10^3 CFU/mL concentration of BHI broth, because there was no surviving population. There was no significant

difference between the results of colony count and MPN, comparing the two incubation temperatures, however the results of colony count and MPN of the three inoculated concentrations were different from each other. It was possible to conclude that the *S. Enteritidis* PT4 previously incubated at 43°C hadn't shown more heat resistance if compared with the *S. Enteritidis* PT4 incubated at 35°C; and there wasn't more heat resistance, comparing the different concentrations.

Key-words: *Salmonella*. Egg. Heat resistance. Pasteurization.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Curva de destruição térmica..... 41
- Gráfico 2 - Curva de resistência térmica..... 41
- Gráfico 3 - Sobrevivência da *Salmonella* Enteritidis PT4 após tratamento térmico a 60,0°C/3,5min, quantificada através do método de contagem, em UFC/mL, comparando-se os resultados obtidos a partir das amostras de ovo integral desidratado reconstituído, inoculadas com cepas previamente incubadas à temperatura de 35°C e 43°C, nas diferentes concentrações inoculadas (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL) –São Paulo – 2003..... 71
- Gráfico 4 - Sobrevivência da *Salmonella* Enteritidis PT4 após tratamento térmico a 60,0°C/3,5min, quantificada através do método de enumeração, em NMP/mL, comparando-se os resultados obtidos a partir das amostras de ovo integral desidratado reconstituído, inoculadas com cepas previamente incubadas à temperatura de 35°C e 43°C, nas diferentes concentrações inoculadas (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL) –São Paulo – 2003..... 72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultados de contagem e enumeração encontrados para as diferentes concentrações inoculadas provenientes de cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4, previamente incubada à temperatura de 35°C - São Paulo - 2003..... 69
- Tabela 2 - Resultados de contagem e enumeração encontrados para as diferentes concentrações inoculadas provenientes de cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4, previamente incubada à temperatura de 43°C - São Paulo - 2003..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BHI	Brain Heart Infusion
BVB	Bile Verde Brilhante
mL	mililitro
nm	Namômetros
NMP	Número Mais Provável
PT4	phage type 4
S. Enteritidis	<i>Salmonella</i> Enteritidis
SIPA	Secretaria de Inspeção de Produto
SS	Salmonella Shigella
TSI	Triple Sugar Iron
UFC	unidades formadoras de colônias
%	porcentagem
°C	graus Celsius
<	menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	IMPORTÂNCIA DA <i>Salmonella</i> NA SAÚDE PÚBLICA	22
2.2	OCORRÊNCIA DE <i>Salmonella</i> EM SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	26
2.3	EPIDEMIOLOGIA DAS SALMONELOSES	32
2.4	TRATAMENTO TÉRMICO E TERMORRESISTÊNCIA	35
3	OBJETIVOS	44
4	MATERIAL E MÉTODO	46
4.1	CEPA DE <i>Salmonella</i>	46
4.2	AMOSTRA DE OVO	46
4.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE <i>Salmonella</i> EM CALDO BHI, ATRAVÉS DA ESPECTROFOTOMETRIA	48
4.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	50
4.4.1	Pré preparo da cepa de <i>Salmonella</i>	51
4.4.2	Tratamento térmico e inoculação da cepa de <i>Salmonella</i> na amostra de ovo	51
4.4.3	Diluições seriadas do ovo tratado termicamente	52
4.4.4	Número Mais Provável (NMP)	53
4.4.4.1	<u>Pré-enriquecimento</u>	53
4.4.4.2	<u>Plaqueamento seletivo diferencial</u>	54
4.4.4.3	<u>Confirmação</u>	55
4.4.5	Contagem	56
4.5	CONTROLES	57
4.5.1	Verificação da conformidade do substrato ovo integral pasteurizado desidratado para utilização no experimento	57
4.5.2	Viabilidade da cepa de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4	59
4.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS	60
4.6.1	Análise estatística	60
4.6.2	Cálculo do valor <i>D</i>	62
4.6.3	Cálculo do valor <i>kappa</i>	62
5	RESULTADOS	65

5.1	ESTUDO COMPARATIVO DAS DUAS TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO E DAS TRÊS CONCENTRAÇÕES INOCULADAS.....	65
5.2	CÁLCULO DO VALOR <i>D</i>	67
5.3	CÁLCULO DO VALOR <i>Kappa</i>	68
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO	92

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a *Salmonella* é um dos microrganismos mais freqüentemente envolvidos em casos e surtos de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive no Brasil (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Significativo aumento de *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) foi detectado, no Brasil, a partir de 1993, tornando-se desde 1994, o sorotipo de *Salmonella* mais freqüentemente isolado de casos de infecções humanas e também de materiais de origem não humana, principalmente de alimentos destinados ao consumo humano (EDUARDO et al., 2003a).

Embora uma gama muito grande de alimentos esteja envolvida na sua transmissão ao homem, merecem destaque os produtos de origem animal, principalmente os ovos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Entretanto, a qualidade dos produtos de ovos é muito sensível ao aquecimento, e os limites de tempo-temperatura para a pasteurização, a fim de produzir um produto tanto de qualidade quanto microbiologicamente livre de patógenos infecciosos são muito reduzidos, uma vez que alimento apresenta grande instabilidade ao calor na faixa de temperatura de pasteurização efetiva (STADELMAN; COTTERILL, 1995).

Sabe-se ainda que, embora, atualmente, a elevação da temperatura por curtos períodos de tempo ainda seja a forma mais utilizada de preservação de alimentos e garantia de segurança, na maioria dos casos, as variáveis do processo derivam de conhecimentos empíricos do efeito da temperatura e tempo

na sobrevivência microbiana, com atenção voltada para a qualidade do alimento. Porém, o conhecimento que se tem é insuficiente para gerar um modelo universal de inibição e morte microbiana devido ao calor para todos os microrganismos, considerando os parâmetros físico-químicos que refletem as condições do meio (alimento) (EARNSHAW; APPLEYARD; HURST, 1995).

Além disso, faz-se necessário ressaltar que a temperatura de destruição da *Salmonella* depende de inúmeros fatores, mas está, fundamentalmente, relacionada ao substrato (FRANCO; LANDGRAF, 1996; GERMANO; GERMANO, 2003), havendo um aumento da resistência térmica dos microrganismos na presença de gordura e proteínas, que exercem um efeito protetor sobre estes (JAY, 2000; STADELMAN; COTTERILL, 1995).

Há de se enfatizar, ainda, a composição do ovo, que possui, na gema, 32% de lipídeos e 17% de proteínas, e, na clara, 10,6% de proteínas, garantindo proteção aos microrganismos frente ao aquecimento.

Além das características dos alimentos, outros fatores também afetam a tolerância da *Salmonella* frente ao aquecimento. A resistência ao calor aumenta conforme aumenta a concentração de microrganismos em um determinado substrato, e conforme aumenta a temperatura de incubação da *Salmonella* (JAY, 2000).

Portanto, tendo em vista a importância do gênero *Salmonella* para saúde pública, o constante envolvimento de ovos e produtos a base de ovos em surtos, a importância de se estabelecer limites de tempo-temperatura para pasteurização adequadamente ajustados e, a necessidade de se ampliar o conhecimento sobre termorresistência da *Salmonella* no substrato ovo, o presente trabalho objetivou a observação do comportamento da *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 (PT4), frente

ao tratamento térmico a 60,0°C por três minutos e meio, em ovo integral pasteurizado desidratado reconstituído, interrelacionando a termorresistência com temperaturas prévias de incubação e concentrações de microrganismos.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA *Salmonella* NA SAÚDE PÚBLICA

A *Salmonella* constitui um gênero bacteriano pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo composto por bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativas, catalase-positivo, oxidase-negativos, redutores de nitratos e nitritos, não formadores de esporos, e móveis, através de flagelos peritríquios, com exceção de *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, que são aflagelares (FRANCO; LANDGRAF, 1996; JAY, 2000).

O esquema de classificação mais recente propõe a divisão do gênero em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo a primeira constituída por seis subespécies (*S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica*). A maioria dos sorotipos responsáveis por causar enfermidades no homem e nos animais está contida na espécie *enterica*, subsp. *enterica*. Existem, atualmente, 2.324 sorotipos de *Salmonella*, dos quais 1.387 pertencem a esta subespécie (EDUARDO et al., 2003a; JAY, 2000).

As salmonelas são responsáveis por três grandes síndromes:

- a) Febre Tifóide: tem como agente etiológico o sorotipo *Salmonella Typhi*, e só acomete o ser humano, sendo este o único reservatório da bactéria. A doença

normalmente é transmitida por água e alimentos contaminados com material fecal humano. Os sintomas são muito graves e incluem septicemia, febre alta (entre 39 e 40°C), diarreia, vômitos, letargia, câibras abdominais, cefaléia, perda de apetite e erupções cutâneas achatadas, com duração de uma a oito semanas, e taxa de letalidade em torno de 10%. O período de incubação é relativamente longo (15 dias). Algumas pessoas podem se tornar portadoras durante meses, mesmo após o desaparecimento dos sintomas, tornando-se importantes fontes de infecção, uma vez que continuam a excretar o microrganismo nas fezes (EDUARDO et al., 2003b; FORSYTHE, 2002; JAY, 2000).

b) Febre Paratífóide: tem como agentes etiológicos os sorotipos *Salmonella* Paratyphi A e C, que causam doença semelhante à febre tifóide, mas com sintomas mais brandos. Geralmente ocorre septicemia, febre, vômitos e diarreia, com duração máxima de três semanas. Também só acomete os seres humanos, sendo igualmente transmitida pelo consumo de água e alimentos contaminados (GERMANO; GERMANO, 2003; JAY, 2000).

c) Salmoneloses ou Enterocolites: causadas pelos demais sorotipos, com exceção dos espécie-específicos; caracterizam-se por um quadro clínico que inclui febre, diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos, calafrios e cefaléia. O período de incubação situa-se em torno de 12 a 36 horas, e a doença, normalmente, dura 4 a 5 dias. De um modo geral, as enterocolites por *Salmonella* são autolimitantes, não necessitando de tratamento com antibióticos, embora para determinados grupos de risco, tais como crianças, idosos e imunodeprimidos, a enfermidade possa vir a se agravar, já que as salmonelas podem atingir a corrente circulatória e provocar infecção e lesões em outros órgãos. Durante o período da doença, a pessoa infectada excreta grandes

quantidades de *Salmonella* pelas fezes, quantidade esta que diminui com o tempo. Em alguns casos, entretanto, a excreção do microrganismo pode persistir por até três meses. Nas infecções crônicas, podem ser observados sintomas de artrite, 3 a 4 semanas após o início da manifestação do quadro agudo. Nos animais, as manifestações clínicas são bastante semelhantes. No gado bovino, a doença é caracterizada por febre, fezes diarreicas, anorexia, depressão e redução da produção de leite. Animais infectados podem excretar elevados números de *Salmonella* nas fezes, e também no leite e no sangue. As aves, principalmente jovens, são susceptíveis às infecções por *Salmonella*, sendo este microrganismo responsável por grande perda de animais em granjas (EDUARDO et al., 2003a; FORSYTHE, 2002; GERMANO; GERMANO, 2003; JAY, 2000).

A natureza dos sintomas de salmonelose, bem como a sua gravidade, dependem do sorotipo de *Salmonella* envolvido, da competência dos sistemas de defesa do indivíduo afetado e das características do alimento envolvido (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A dose infectante é variável de acordo com a idade e a saúde da vítima, com o alimento envolvido, e, ainda, com a linhagem de *Salmonella*, variando de 20 até 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) / grama do alimento (FORSYTHE, 2002). Deve-se salientar que, em alimentos com elevado teor lipídico, como os ovos e o chocolate, as salmonelas ficam “protegidas” dentro dos glóbulos de gordura, não sendo afetadas pelas enzimas digestivas ou pela acidez gástrica, fato que acaba por reduzir a dose infectante (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Os alimentos envolvidos normalmente são aqueles com alto teor de umidade e com alta porcentagem de proteína, principalmente ovos e produtos à base de ovos (maioneses, gemadas, licores de ovos, pudins, entre outros), carnes de aves, bovinos e suínos, e produtos derivados, e produtos lácteos (leite e queijos cremosos) (GERMANO; GERMANO, 2003).

O ovo, alimento mais associado aos surtos por *Salmonella*, é um dos poucos alimentos consumidos em todo o mundo, e tem sido importante na alimentação humana desde os primórdios da história (STADELMAN; COTTERILL, 1995). O ovo tem importância muito grande no contexto alimentar de várias faixas etárias, especialmente crianças, jovens e idosos. É um alimento rico em proteína alimentar da mais alta qualidade que se conhece, contém 13 vitaminas e vários minerais. É o segundo melhor alimento, superado apenas pelo leite materno, e, ao contrário do que se pensava, não aumenta o nível de colesterol no organismo (TERRA, 2001).

O consumo de ovos, entretanto, freqüentemente diminui em função da associação do alimento com a *Salmonella*. Gast e Beard (1993) relatam que o envolvimento de ovos em surtos por *Salmonella* Enteritidis, no Reino Unido, resultou em uma queda no consumo, com conseqüências econômicas devastadoras para a indústria britânica de ovos. Rodrigues (1995) cita que, só na Grã-Bretanha, houve uma expressiva queda na produção de ovos, de aproximadamente 60%, devido à queda da demanda deste alimento pela população, face à problemática da salmonelose. No Brasil, entretanto, devido a não notificação da doença, os dados, na maior parte das vezes, restringem-se à descrição de alguns casos isolados.

2.2 OCORRÊNCIA DE *Salmonella* EM SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Atualmente a *Salmonella* é um dos microrganismos mais freqüentemente envolvidos em casos e surtos de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive o Brasil. Embora uma gama muito grande de alimentos esteja envolvida na sua transmissão ao homem, merecem destaque os produtos de origem animal, principalmente os ovos, as carnes de aves, bovinas e suínas, bem como os seus derivados. Nos últimos anos tem-se observado um aumento na incidência de salmonelose causada por *Salmonella* Enteritidis envolvendo ovos e produtos à base de ovos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A *Salmonella* é adquirida através da ingestão de alimentos contaminados com fezes animais ou humanas, ou produtos derivados de animais infectados (HOPE et al., 2002). Segundo estes autores, desde que os ovos crus ou mal cozidos foram identificados como via de transmissão da *Salmonella*, sua importância vêm aumentando, tendo se tornado o veículo predominante, responsável por 82% dos surtos por *S. Enteritidis*, quando o alimento incriminado foi identificado. Além disso, a *S. Enteritidis* é o único sorotipo freqüentemente isolado do conteúdo de ovos intactos.

A *Salmonella* é uma das causas predominantes de surtos de enfermidades veiculadas por alimentos de origem bacteriana nos Estados Unidos, totalizando 9,7% de todas as doenças bacterianas transmitidas por alimentos, e 30,6% das mortes (HOPE et al., 2002).

Segundo Hope et al. (2002), na maioria dos países, dois sorotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* são os mais freqüentemente relatados, *S. Enteritidis* e *S.*

Typhimurium. Os autores ainda referem que, nos Estados Unidos, a proporção de casos de salmonelose causados por *S. Enteritidis* aumentou de 5% em 1976 para 26% em 1994.

Confirmando sua importância, a *Salmonella* Enteritidis foi responsável pelo maior surto de salmonelose até então descrito, que ocorreu em 1994 e envolveu mais de 224.000 pessoas. O alimento incriminado foi sorvete produzido com leite que foi transportado em caminhões tanques, que haviam transportado, anteriormente, ovo líquido. Os casos foram observados em pelo menos 41 estados dos Estados Unidos (JAY, 2000). O segundo maior surto de salmonelose, que ocorreu em 1985 e envolveu 200.000 pessoas, foi causado por *Salmonella* Typhimurium, através de leite contaminado de um único rebanho em Illinois, EUA. O terceiro maior surto de salmonelose foi causado por *Salmonella* Newport, tendo ocorrido em 1974 na reserva indígena Navajo, com adoecimento de 3.400 pessoas que ingeriram salada de batata em um churrasco (JAY, 2000).

No Brasil, significativo aumento de *S. Enteritidis* foi detectado a partir de 1993, tornando-se desde 1994, o sorotipo de *Salmonella* mais frequentemente isolado de casos de infecções humanas e também de materiais de origem não humana, principalmente de alimentos destinados ao consumo humano (EDUARDO et al., 2003a). Segundo essa mesma fonte, o ovo de galinha é a principal via de transmissão do agente para o homem causando doença, tendo sido implicado na maioria dos surtos ocorridos nos EUA, nas últimas décadas.

Humphrey (1990 e 1994) e St. Louis et al. (1988) também relatam a recente emergência da *Salmonella* Enteritidis como um importante problema para a saúde pública. No começo da década de 80, a incidência de surtos causados por *S. Enteritidis* em humanos aumentou drasticamente no Norte dos EUA e

Europa; a maioria dos surtos foi associada ao consumo de ovos de galinha crus ou mal-cozidos.

Segundo Forsythe (2002), em diversos países, a *Salmonella* Enteritidis predomina entre os agentes causadores de infecções de origem alimentar, e, entre os casos de salmonelose, o fagotipo 4 (PT4) de *S. Enteritidis* é o mais comum.

A incidência precisa dos casos de infecção de origem alimentar causados por *Salmonella* não é conhecida, pela falta de notificação às autoridades sanitárias dos casos ocorridos, principalmente, em surtos envolvendo pequeno número de pessoas (JAY, 2000). Entretanto, estima-se que 1,4 milhões de casos de salmonelose ocorram anualmente nos Estados Unidos, dos quais, segundo pesquisas do *Center of Disease Control* (CDC), 40.000 são confirmados através de cultura, com aproximadamente 500 mortes, e uma perda econômica, associada apenas aos casos de salmonelose humana, estimada entre 150 e 870 milhões de dólares por ano (HOPE et al., 2002; JAY, 2000).

Em 1973, dez de 69 pessoas adoeceram após ingerirem ovos em um restaurante de um sanatório localizado em Ontário. No alimento incriminado, detectou-se a presença de *Salmonella* Enteritidis. A mesma bactéria foi responsável por dois outros surtos em restaurantes na mesma província, nos anos de 1990 e 1991, acometendo 20 e 9 pessoas, respectivamente; ambos os surtos foram causados por molho a base de ovos (TODD, 1996).

Nos EUA, entre 1973 e 1984, 44% dos surtos causados por *Salmonella* Enteritidis estavam associados a alimentos contaminados com ovos (ST. LOUIS et al., 1988).

No período de 1975 a 1987, em 26 estados dos EUA, ocorreram, entre enfermeiras que trabalhavam nas casas dos pacientes, 4.944 casos de doença causada por alimentos, com 51 mortes, sendo a *Salmonella* o agente incriminado em 52% dos surtos e em 81% de mortes. *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo mais prevalente, responsável por 81% das mortes causadas por *Salmonella* (LEVINE et al., 1991).

Em 1985, em Maryland (EUA), o surto ocorrido em um restaurante resultou no adoecimento de 71 pessoas, das quais 17 foram hospitalizadas. Ovos mexidos servidos no café da manhã foram implicados como o alimento responsável pelo surto (LIN et al., 1988). Os dados, segundo os autores, apontam para o risco da manipulação inadequada de ovos em estabelecimentos que fornecem alimentos.

Salmonella Enteritidis foi o sorotipo mais comum isolado de ovos na Espanha (PERALES; AUDICANA, 1988), e o mais predominante como causa de surtos por salmonelas na Inglaterra e País de Gales em 1988 (HINTON; THRELFALL; ROWE, 1990).

Ovos quebrados obtidos ilegalmente e utilizados sem tratamento térmico para produção de creme para recheio de bolos foram responsáveis pela ocorrência de mais de 90 casos de salmonelose por *Salmonella* Enteritidis em Burnaby, British Columbia em 1988 (KHAKHRIA; DUCK; LIOR, 1991) e mais de 53 casos em Thunder Bay, Ontário em 1991 (TODD, 1996).

Entre os anos de 1985 e 1995, nos EUA, *Salmonella* Enteritidis proveniente de ovos crus foi responsável por 582 surtos, com 34.058 casos e 70 mortes (JAY, 2000).

Em Quebec, 1990, seis idosos de um lar para idosos adoeceram após ingestão de tapioca, pudim de limão e chocolate, feitos com ovos mal cozidos. O agente etiológico foi a *Salmonella* Enteritidis (TODD, 1996). Outro surto, ocorrido em um lar para idosos na Alemanha, envolveu 87 pessoas, levando dez idosos a óbito. O alimento incriminado foi pudim preparado com ovos contendo 10^7 UFC de *Salmonella* Enteritidis/mL (TODD, 1996).

No Brasil, no estado de São Paulo, em 1995, a *Salmonella* foi responsável por 26 surtos, envolvendo 1.673 casos, com dois óbitos; destes, 12 surtos e 631 casos ocorreram devido a *Salmonella* Enteritidis. Em 1996, foram 22 surtos e 2.142 casos devido a *Salmonella* sp, dos quais, nove surtos e 1.517 casos foram causados pela *Salmonella* Enteritidis. Em 1997, dos dez surtos ocorridos por *Salmonella* sp, envolvendo 358 pessoas, quatro foram causados pela *Salmonella* Enteritidis, envolvendo 130 indivíduos. Em 1998, ocorreram 22 surtos e 472 casos por *Salmonella*, correspondendo, respectivamente, a 34,9% e 14,1% do total notificado. *Salmonella* sp foi responsável por 25 surtos e 785 casos no ano de 1999, o que corresponde a 23,8% dos surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos e 25% dos casos ocorridos. Desses 25 surtos, dez foram causados por *Salmonella* Enteritidis, envolvendo 584 pessoas. A *Salmonella*, nesses cinco anos, foi o agente etiológico mais frequentemente incriminado como causa de doença de origem alimentar (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2003).

Ainda neste mesmo estado, no ano de 2000, dos 49 surtos de doenças transmitidas por alimentos de origem bacteriana, 27 foram causados por *Salmonella*, sendo *S. Enteritidis* responsável por 14 deles, envolvendo 211 pessoas. Em 2001, dos 123 surtos de origem bacteriana veiculados por

alimentos, 46 foram causados por *Salmonella* sp, dos quais 23 foram associados a *S. Enteritidis*, envolvendo 173 pessoas. No ano de 2002, dos 52 surtos de origem bacteriana, 23 foram salmonelose, e destes, 12 foram causados por *S. Enteritidis*, com 192 casos. Nos meses de janeiro a maio de 2003, foram notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) dez surtos de enfermidades de origem bacteriana veiculadas por alimentos, dos quais sete foram causados por *Salmonella*. Ainda é válido ressaltar que os ovos e os alimentos à base de ovos (maionese, mousse, entre outros) foram os veículos de transmissão de *Salmonella* sp e *S. Enteritidis* na maioria dos surtos, em todos os anos considerados (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2003).

Neste contexto de ocorrência de surtos por *Salmonella* é importante considerar que a qualidade dos produtos de ovos é muito sensível ao aquecimento, e os limites de tempo-temperatura para a pasteurização, a fim de produzir um produto tanto de qualidade quanto microbiologicamente livre de patógenos infecciosos são muito reduzidos, especialmente em relação aos patógenos de elevada resistência térmica (FOEGEDING; LEASOR, 1990; FOEGEDING; STANLEY, 1990; HUMPHREY et al., 1995; PALUMBO et al., 1995; SHAH; BRADSHAW; PEELER, 1991). Stadelman e Cotterill (1995) afirmam que a pasteurização do ovo é um problema considerável, visto que este alimento apresenta grande instabilidade ao calor na faixa de temperatura de pasteurização efetiva, desnaturando-se, e o produto deve apresentar-se não apenas seguro do ponto de vista microbiológico, mas também satisfatório do ponto de vista comercial.

Além disso, pesquisas ainda demonstram uma alta prevalência no consumo de ovos crus, ressaltando a importância e participação desse produto

na alimentação humana. Segundo Klontz et al.(1995), em pesquisa com 1.620 pessoas nos Estados Unidos, 53% assumiram que consomem freqüentemente alimentos feitos com ovos crus, incluindo maionese caseira.

2.3 EPIDEMIOLOGIA DAS SALMONELOSES

As salmonelas apresentam distribuição mundial, com ocorrência de sorotipos regionais, sendo reconhecidas universalmente como agentes causadores de zoonoses. Os reservatórios mais importantes são as aves e os suínos (GERMANO; GERMANO, 2003).

O habitat primário da *Salmonella* spp é o trato gastrointestinal das aves em geral, mamíferos domésticos e silvestres, répteis, humanos, e, ocasionalmente, insetos, sendo excretada pelas fezes. Entretanto, apesar de se localizarem primordialmente no trato gastrointestinal, as salmonelas podem ser encontradas em outras partes do corpo, como baço, fígado, bile, linfonodos e diafragma (JAY, 2000).

Segundo Germano e Germano (2003), apesar da *Salmonella* colonizar o trato intestinal, não provoca, na maioria das espécies hospedeiras, manifestação de sintomas. Isto ocorre, por exemplo, com a *S. Enteritidis* PT4, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* em aves e a *S. Choleraesuis* em suínos. Gast e Beard (1993) ainda ressaltam que a *Salmonella* *Enteritidis* ultrapassa os tecidos intestinais, provoca uma reação imune específica, e contamina o conteúdo do ovo, sem evidências de doença clínica nas aves.

Entretanto, em frangos de corte jovens, a *Salmonella* Enteritidis PT4 é invasiva (HUMPHREY, 1990). Segundo Lister (1988), infecções por *Salmonella* Enteritidis PT4 são responsáveis por aumento na morbidade e mortalidade de frangos de corte. Por outro lado, em aves de postura, a infecção por *S. Enteritidis* PT4 é diferente, sem qualquer evidência de aumento na mortalidade ou alterações de comportamento, alimentação ou postura, embora ovários e ovidutos estejam contaminados, produzindo ovos com o microrganismo em seu conteúdo (Humphrey, 1990). Porém, em infecção experimental com *S. Enteritidis* em galinhas, Geast e Beard (1990), encontraram redução no total de ovos produzidos.

Segundo Jordan (1990), uma vez estabelecida a infecção por *Salmonella* sp num lote de aves reprodutoras, outras aves podem ser infectadas, tanto por transmissão vertical (ocorre infecção do ovário via hemática, levando à contaminação do ovo quando este ainda está no ovário, antes da formação da casca) quanto por horizontal (transmissão de ave para ave, principalmente pelas fezes). Humanos, roedores, aves silvestres, insetos, água e ração podem introduzir o agente numa unidade avícola e as salmonelas podem se disseminar amplamente pelo trânsito de veículos, equipamentos e utensílios e pessoas.

A transmissão ao homem ocorre pelo contato com fezes, água e alimentos contaminados, particularmente os de origem animal, bem como aqueles submetidos a irrigação, com águas contaminadas por esgotos, ou diretamente com matéria fecal utilizada como fertilizante nas culturas de produtos de origem vegetal (GERMANO; GERMANO, 2003).

Gast e Beard (1993) relatam que aproximadamente 82% dos surtos de salmonelose por *Salmonella* Enteritidis nos Estados Unidos entre 1985 e 1989

nos quais se atribuía uma origem alimentar, foram associados aos ovos; e em muitas destas circunstâncias, foi traçado o caminho da contaminação, chegando-se a lotes de galinhas de postura infectados.

A *Salmonella* está presente no ambiente e nas aves, e as superfícies dos ovos podem estar contaminadas pelas fezes ou cama. Em estudos de três granjas dos EUA, *Salmonella* sp foi isolada entre 30 e 72% das amostras ambientais, como água, ventilador e coletores de ovos (JONES; RIVES; CAREY, 1995). Em avaliação de 300 galpões de postura no Canadá, Poppe et al. (1991) encontraram *Salmonella* em amostras ambientais de 53% dos galpões. Em adição, sete (7,8%) de 90 cascas de ovos continham *Salmonella* sp antes da lavagem (JONES; RIVES; CAREY, 1995).

Em estudo experimental, Cox et al. (1973) administrando três sorotipos de *Salmonella*, via oral, em aves de postura, encontraram contaminação da casca do ovo entre 6,3 e 9,5%. Timoney et al. (1989) constataram a contaminação do conteúdo do ovo em 15% dos ovos postos na segunda semana após inoculação de *Salmonella* Enteritidis PT4. Gast e Beard (1990), após inoculação oral de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 13a em aves, observaram que a frequência do microrganismo recuperado das cascas dos ovos foi consideravelmente menor que a frequência de recuperação em gema e clara, sugerindo que a penetração por *Salmonella* Enteritidis através da casca não é a principal causa de contaminação do conteúdo do ovo.

Em Ontário, D'Aoust, Stotland e Randall⁽¹⁾ (1980 apud TODD, 1996, p. 127) isolaram *Salmonella* sp, tanto na casca quanto no conteúdo interno, em

⁽¹⁾ D'AOUST, J. Y.; STOTLAND, P.; RANDALL, C. J. *Salmonella* in 'grade cracks' shell eggs. **Canadian Institute of Food Science Technology Journal**, v. 13, p. 184-187, 1980.

13% dos ovos quebrados e em 2% dos ovos intactos, e apenas no conteúdo interno, em 8% dos ovos quebrados. No Havaí, em 1989, Ching-Lee et al. (1991) encontraram 9,4% dos ovos contaminados por *Salmonella* sp.

Perante a problemática da presença de *Salmonella* nos ovos, a importância deste microrganismo na saúde pública, a importância dos ovos na alimentação humana, além do receio da população em consumir este produto em função dos surtos de salmonelose, faz-se necessário implantar medidas de controle eficazes, visando garantir a segurança do alimento para o consumo humano. Neste contexto, destaca-se a relevância da pasteurização na industrialização do ovo, como uma forma efetiva de inativar a *Salmonella* potencialmente presente no alimento. É válido ressaltar, ainda, que estratégias efetivas para redução da incidência de *Salmonella* nas aves devem ser estudadas e implantadas.

2.4 TRATAMENTO TÉRMICO E TERMORRESISTÊNCIA

Atualmente, a elevação da temperatura por curtos períodos de tempo ainda é a forma mais utilizada de preservação de alimentos, além de ter grande importância na segurança alimentar, uma vez que inativa patógenos de interesse para a saúde pública (EARNSHAW; APPLEBYARD; HURST, 1995).

Antigamente, os processos térmicos eram determinados por tentativas, sem qualquer base científica, disso resultando freqüentes casos de deterioração e mesmo de doenças (GAVA, 1984). Gava (1984) afirma que atualmente essa

determinação é baseada em ciência relativamente desenvolvida, envolvendo medidas acuradas, as quais são interpretadas por cálculos matemáticos. Earnshaw, Appleyard e Hurst (1995), entretanto, afirmam que, na maioria dos casos, as variáveis do processo derivam de conhecimentos empíricos do efeito da temperatura e tempo na sobrevivência microbiana, com atenção voltada para a qualidade do alimento, relacionando o efeito térmico e as alterações na composição e estrutura do alimento. Afirmam, ainda, que não há exemplos de processos considerados modelos que são baseados no entendimento dos efeitos do calor sobre os microrganismos. Esta situação, para os autores, é lógica, se considerada a aplicação de elevada temperatura e tempo como as duas únicas variáveis do processo. Earnshaw, Appleyard e Hurst (1995) ainda referem que o conhecimento que se tem é insuficiente para gerar modelos de inibição e morte microbiana devido ao calor para os diversos microrganismos, considerando os parâmetros físico-químicos que refletem as condições do meio (alimento).

É sabido, que a alta temperatura, a qual às células microbianas são expostas na pasteurização, afeta não apenas um alvo específico das células microbianas nem a célula como um todo, mas sim seus constituintes e suas estruturas individualmente, interferindo nas estruturas, moléculas e reações químicas. As células contém vários alvos para a ação do calor, e isto pode sugerir que a resistência térmica basal dos microrganismos está relacionada à estabilidade intrínseca das macromoléculas como o RNA, ribossomos, ácidos nucléicos, enzimas e proteínas citoplasmáticas e de membrana (EARNSHAW; APPLEYARD; HURST, 1995). A causa primária da morte celular decorrente de injúria térmica não está claramente definida (EARNSHAW; APPLEYARD; HURST, 1995), embora se acredite que a destruição dos microrganismos pelo

calor úmido é devida à coagulação de suas proteínas e especialmente à inativação dos sistemas enzimáticos, necessários ao metabolismo (GAVA, 1984).

A pasteurização de ovo líquido integral e gema líquida foi utilizada pela primeira vez na indústria de ovos na década de 1930, utilizando-se equipamentos para pasteurização do leite, com temperatura superior a 60°C. Embora o principal objetivo não fosse a eliminação da *Salmonella*, as condições de tempo e temperatura utilizados eram suficientes para destruir efetivamente as salmonelas potencialmente presentes nos ovos (STADELMAN; COTTERILL, 1995). Atualmente, no Brasil, preconiza-se pasteurização, por 3,5 minutos, a 60,0° C para ovo integral, a 56,7° C para clara de ovo, e 61,0° C para gema de ovo, ou combinações de tempo e temperatura, conforme Portaria SIPA nº 01, de 21 de fevereiro de 1990.

Germano e Germano (2003) afirmam que a temperatura de destruição da *Salmonella* depende do sorotipo contaminante, de inúmeros outros fatores, mas está, fundamentalmente, relacionada ao substrato. Franco e Landgraf (1996) ressaltam que algumas salmonelas são mais resistentes ao calor, e que a composição do alimento é extremamente importante na inativação deste microrganismo.

Segundo Blackburn et al. (1997), a resistência de uma bactéria ao calor pode aumentar na dependência de diversos fatores, como atividade de água, pH, concentração de cloreto de sódio, entre outros.

Stadelman e Cotterill (1995) afirmam que as diferenças na composição dos produtos de ovos justificam o amplo limite das condições de pasteurização recomendadas, e, ainda ressaltam a existência de diferenças na sensibilidade ao calor entre os sorotipos de *Salmonella*.

Segundo Jay (2000) e Stadelman e Cotterill (1995), há um aumento da resistência térmica dos microrganismos na presença de gordura, pelo fato desta exercer um efeito protetor. Há de se enfatizar, ainda, que a gema do ovo, possui em sua composição 32% de lipídeos, fazendo com que o ovo garanta proteção aos microrganismos frente ao aquecimento.

Sabe-se, também, que as proteínas oferecem alguma proteção perante ao calor, conseqüentemente, compostos protéicos extracelulares são capazes de garantir certa proteção (JAY, 2000). Neste contexto, é válido lembrar que a clara do ovo, em relação aos sólidos totais, é composta basicamente por proteínas (9,7 a 10,6%), e a gema possui 16 a 17% de proteínas em sua composição, reforçando o efeito protetor que o substrato ovo oferece aos microrganismos perante o calor.

Outros fatores, além das características dos alimentos, também afetam a tolerância frente ao aquecimento. Jay (2000) afirma que a resistência ao calor é maior quanto mais alta a concentração de microrganismos 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. Ainda em relação ao aumento da resistência térmica em elevadas concentrações microbianas, Jay (2000) ressalta o fato de haver, nesses casos, maior chance da presença de organismos com diferentes graus de resistência natural ao calor.

Já foi observado que aumentando a temperatura de incubação de cultivos microbianos consegue-se um aumento na resistência térmica das referidas cepas. Embora o mecanismo exato deste efeito não esteja totalmente esclarecido, é

aceito que a seleção genética favorece o crescimento de cepas mais resistentes ao calor em temperaturas elevadas (JAY, 2000).

Ng, Bayne e Garibaldi (1969), em ensaio sobre termorresistência, encontraram que as células de *Salmonella* Senftenberg 775W que cresceram a 44°C foram mais resistentes ao calor que aquelas que cresceram a 15°C ou 35°C, utilizando como substrato meio de cultura Trypticase Soy Broth com extrato de levedura (TSB-YE) tratado termicamente a 55°C por 30 minutos.

Jackson, Hardin e Acuff (1996) referem que a morte térmica de microrganismos respeita uma curva log-linear, entretanto, admitem que divergências, que não são facilmente explicadas por fatores experimentais, estão sendo observadas freqüentemente.

Segundo Gava (1984), na morte em ordem logarítmica, se a temperatura for constante, a mesma porcentagem de microrganismos será destruída num dado intervalo de tempo, não importando o número de bactérias sobreviventes. Em outras palavras, se uma certa temperatura destrói 90% da população em 1 minuto, 90% da população remanescente serão destruídos no segundo minuto, 90% do que resta serão destruídos no terceiro minuto, e assim por diante.

Forsythe (2002) e Gava (1984) afirmam que a destruição dos microrganismos ocorre em ordem logarítmica, ou seja, plotando valores, em gráfico que possui, na ordenada, em escala logarítmica, o número de células vivas remanescentes, e, na abscissa, o tempo de aquecimento a uma temperatura constante, obtém-se uma linha reta, cuja inclinação é chamada de “tempo de redução decimal”, conhecido como valor D , conforme Gráfico 1.

O tempo de redução decimal (valor D) pode ser definido como o tempo, em minutos, a uma certa temperatura, necessário para destruir 90% dos

organismos de uma população, ou para reduzir uma população a um décimo do número original. Também pode ser definido como o tempo em minutos necessário para a curva atravessar um ciclo logarítmico na escala de sobrevivência térmica (GAVA, 1984).

O valor D pode ser determinado através da fórmula: $D = t / (\log A - \log B)$, onde t é o tempo de aquecimento em minutos, A é o número inicial de organismos (UFC/mL), e B é o número final de células que sobreviveram após aquecimento, em UFC/mL (GAVA, 1984).

Existem, ainda, outros parâmetros utilizados para descrever a morte microbiana e determinar o comportamento dos microrganismos perante o aquecimento:

- Valor z : aumento de temperatura necessário para aumentar a taxa de morte em 10 vezes, ou, em outras palavras, reduzir o valor D 10 vezes;
- Valor F : tempo necessário, em minutos, a 121°C, para destruição “completa” dos microrganismos, incluindo esporos e células vegetativas. .

O valor z é utilizado para cálculo de resistência relativa de um microrganismo em diferentes temperaturas, sendo numericamente igual ao número de °C requeridos para a curva de resistência térmica atavessar um ciclo logarítmico (GAVA, 1984).

O valor F representa a capacidade de um processo térmico em reduzir o número de esporos ou células vegetativas de um dado organismo (FORSYTHE, 2002).

Os valores z e F são extraídos plotando valores em gráfico que possui, na ordenada, o tempo em minutos, em escala logarítmica, e, na abscissa, a temperatura, em escala linear, conforme gráfico 2 (GAVA, 1984).

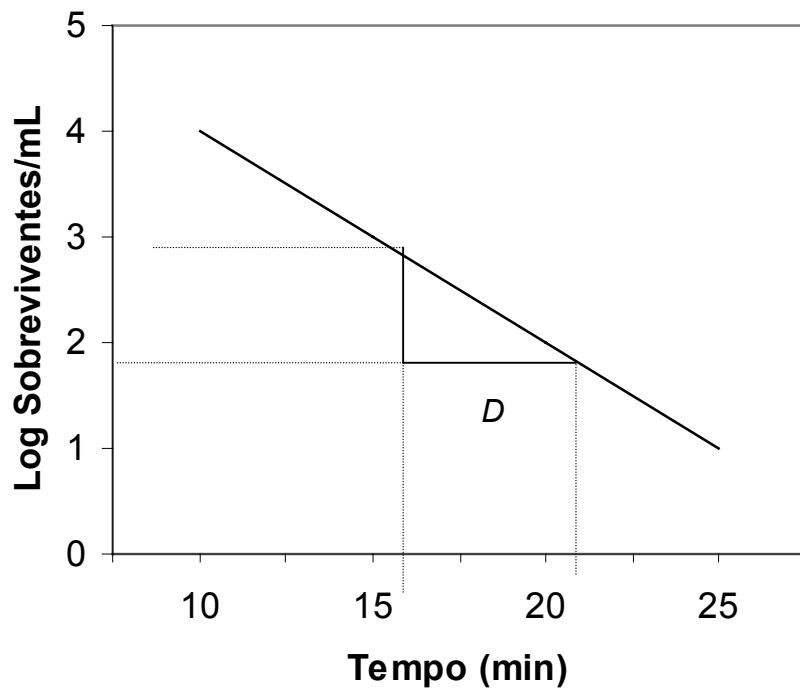


Gráfico 1 - Curva de destruição térmica

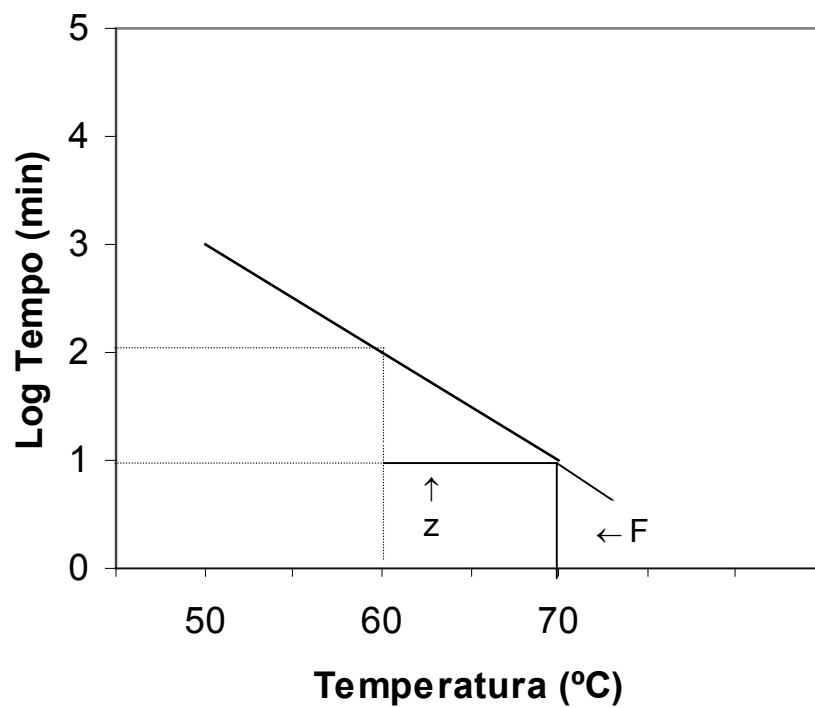


Gráfico 2 - Curva de resistência térmica

Considerado o comportamento da *Salmonella* Enteritidis no ovo integral pasteurizado desidratado reconstituído sob o binômio tempo-temperatura de pasteurização, o estudo da termorresistência desse agente possibilita explorar o conhecimento científico na busca de produtos saudáveis e inócuos, com seus aspectos de qualidade preservados.

Tendo em vista a importância do gênero *Salmonella* para saúde pública, o constante envolvimento de ovos e produtos a base de ovos em surtos, a importância de se estabelecer limites de tempo-temperatura para pasteurização adequadamente ajustados e, a necessidade de se ampliar o conhecimento sobre termorresistência da *Salmonella* no substrato ovo, o presente trabalho objetivou descrever o comportamento da *Salmonella* Enteritidis PT4, frente ao tratamento térmico a 60,0°C por três minutos e meio, em ovo integral pasteurizado desidratado reconstituído, interrelacionando a termorresistência com diferentes temperaturas prévias de incubação da cepa e diferentes concentrações do microrganismo.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Descrever o comportamento da cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4, isolada de surto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (SP), frente ao tratamento térmico a 60,0°C por três minutos e meio, em ovo integral pasteurizado desidratado reconstituído, considerando as temperaturas prévias de incubação da cepa (35°C e 43°C) e as diferentes concentrações microbianas inoculadas no substrato ovo (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL de caldo BHI) no desenvolvimento da termorresistência.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 CEPA DE *Salmonella*

Foi utilizada *Salmonella* Enteritidis PT4 isolada de surto pelo Instituto Adolfo Lutz, mantida em ágar gelose conservação, sob temperatura de refrigeração (entre 2°C e 8°C).

4.2 AMOSTRA DE OVO

Foi utilizado, como substrato para a determinação da termorresistência da cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4, ovo integral pasteurizado desidratado, devidamente acondicionado em embalagem plástica, envolta por invólucro de papel, contendo 20 quilogramas (Kg), com fabricação em 10 de janeiro de 2003 e vencimento em 10 julho de 2003, obtida de uma indústria de processamento de ovos situada na Grande São Paulo.

A amostra de ovo desidratado foi fracionada, no laboratório de Higiene Alimentar, em fluxo laminar e com auxílio de colheres estéreis, de forma a manter a qualidade microbiológica de origem do produto. Foram colocadas 120 gramas de ovo desidratado em cada saco estéril para Stomacher, posteriormente vedado

com seladora apropriada para este fim (marca Dumack, modelo MS de bancada Dumack 40), e armazenado em local adequado, livre de umidade e exposição ao sol, à temperatura ambiente, até a sua utilização, respeitando o prazo de validade do produto. As amostras porcionadas foram utilizadas no período de fevereiro à maio de 2003.

Imediatamente antes da utilização, foi realizada a reconstituição do ovo, sem prejuízo da qualidade microbiológica do mesmo. Para tanto, em fluxo laminar, o saco de Stomacher foi limpo com álcool 70% em seu canto superior esquerdo, e cortado com auxílio de uma tesoura banhada também com álcool 70% e posteriormente flambada. Através desta abertura, foi acrescentado, em cada saco de Stomacher, contendo 120 gramas de ovo desidratado, 380 mL de água destilada estéril, totalizando 500 gramas de ovo integral reconstituído. O saco foi novamente vedado com seladora e colocado em Stomacher (marca Seward, modelo SLO-BLO FUSES) por 120 segundos em velocidade média, para homogeneização da amostra.

Após a homogeneização, o ovo reconstituído foi transferido, assepticamente, do saco de Stomacher para erlenmeyers estéreis. Para esta etapa, em fluxo laminar, o saco de Stomacher foi limpo com álcool 70%, e seu canto superior direito, cortado com tesoura banhada também com álcool 70% e posteriormente flambada. Através desta abertura, com auxílio de pipetas estéreis de 20 mL, o ovo reconstituído foi transferido para cinco erlenmeyers estéreis, totalizando 100 mL de ovo reconstituído em cada erlenmeyer.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE *Salmonella* EM CALDO BHI, ATRAVÉS DA ESPECTROFOTOMETRIA

Para determinação da concentração de *Salmonella* Enteritidis PT4, fez-se necessário um método rápido e exato que permitisse a identificação das concentrações desejadas, quais sejam: 10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL de caldo BHI, para posterior inoculação no ovo. O método convencional, que utiliza somente a semeadura em meios sólidos e aguardo do período de incubação, é demasiadamente longo (aproximadamente 24 horas), tornando-o inviável, se realizado isoladamente, visto que a concentração de *Salmonella* Enteritidis poderia ser alterada em decorrência da multiplicação e morte das células.

Nesse sentido, o espectrofotômetro, aparelho que mede a absorção/reflexão da radiação luminosa, lendo e decodificando a cor de uma amostra em função da concentração de sólidos, permitiu a determinação real e imediata da concentração do agente em caldo BHI. Para tal, foi realizado um estudo prático correlacionando as contagens obtidas a partir de diferentes diluições, utilizando método convencional, em UFC/mL, com a leitura das mesmas diluições em espectrofotômetro.

As mesmas etapas do pré-preparo da cepa de *Salmonella* foram seguidas, mantendo-se um tubo com cultura do microrganismo em caldo BHI à 35°C e, outro tubo à 43°C, por 24 horas, e, posteriormente, colheu-se 0,1 mL de cada uma das culturas, semeou-se em um novo tubo com caldo BHI e incubou-os à 35°C por 24 horas. Após a incubação, estas culturas em caldo BHI foram

submetidas à leitura em espectrofotômetro e à contagem em placas de Petri com ágar BHI.

Para a leitura em espectrofotômetro, as culturas foram transferidas para cubetas de vidro, próprias para este fim. Em um comprimento de onda de 600 nm, utilizou-se caldo BHI estéril, sem cultura de microrganismos, como branco, zerando o equipamento. Foi, então, realizada leitura das culturas de *Salmonella*.

Para a contagem em placas, as culturas sofreram diluições seriadas até 10^{-10} em água peptonada 0,1% e, com estas diluições, fez-se semeadura em superfície em ágar BHI, em duplicata, incubando à 35°C por 24 horas. Foi realizada contagem na diluição onde se obteve entre 25 e 250 colônias, calculando-se a média entre as duas placas, multiplicando pelo inverso da diluição e multiplicando por 10, visto que foi semeado 0,1 mL e o resultado apresenta-se em UFC por mL.

Os resultados da leitura em espectrofotômetro e da contagem em placas foram confrontados, com o objetivo de se determinar uma correlação ou uma faixa de leitura no espectrofotômetro que correspondesse a uma determinada concentração de *Salmonella*, podendo-se dispensar, posteriormente, o método convencional de contagem.

Foram realizadas 20 repetições, encontrando-se uma concentração de 10^9 UFC/mL de caldo BHI correspondendo a uma leitura em espectrofotômetro, a 600 nm, entre 1,2 e 1,4, e, quando de uma concentração de 10^8 UFC/mL de caldo BHI, a leitura correspondente permaneceu na faixa de 0,6 a 0,8. Concentrações iguais ou menores do que 10^7 UFC/mL de caldo BHI forneceram valores em espectrofotômetro próximos de zero, não sendo possível, portanto, a

identificação dessas concentrações através da espectrofotometria. Estes resultados foram semelhantes em outros comprimentos de onda testados (480 nm e 540 nm). Testou-se também a centrifugação da cultura de *Salmonella* em caldo BHI e ressuspensão do precipitado em água peptonada 0,1% na tentativa de obter valores de leitura em espectrofotômetro para concentrações iguais ou menores do que 10^7 UFC/mL, entretanto, os valores permaneceram semelhantes ao teste inicial, com caldo BHI e comprimento de onda de 600 nm.

Dessa forma, foi realizada leitura em espectrofotômetro apenas na cultura de *Salmonella* em caldo BHI, após as etapas de pré-preparo da cepa, encontrando-se as concentrações desejadas de 10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL através de correlação com a concentração na cultura original, que, usualmente apresentava-se com concentração de 10^8 ou 10^9 UFC/mL de caldo BHI. A partir desta concentração-referência, admitiu-se que a próxima diluição corresponderia à concentração de 10^8 UFC/mL, e a diluição posterior, à concentração de 10^7 UFC/mL, e, assim sucessivamente até a obtenção das concentrações desejadas para a realização do trabalho.

4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Foram realizadas as seguintes etapas (esquematizadas em Fluxograma – Anexo A):

4.4.1 Pré-preparo da cepa de *Salmonella*

A cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4, mantida em ágar gelose conservação, foi semeada, com alça de platina, em dois tubos contendo 9 mL de caldo BHI cada, um incubado à 35°C e outro, à 43°C, por 24 horas. De cada uma das culturas, foi transferido 0,1 mL para um novo tubo contendo 9 mL de caldo BHI, e este incubado à 35°C por 24 horas. Decorrido este período, estas culturas em caldo BHI foram parcialmente transferidas para cubetas de vidro, e realizada leitura em espectrofotômetro a 600 nm. Através desta leitura, determinou-se a concentração das culturas de *Salmonella* Enteritidis em caldo BHI. Com estas culturas foram realizadas diluições em água peptonada tamponada 0,1%, e identificadas as concentrações desejadas de 10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL, através de correlação com a concentração na cultura original.

4.4.2 Tratamento térmico e inoculação da cepa de *Salmonella* na amostra de ovo

Cada erlenmeyer contendo 100 mL de ovo integral reconstituído foi submerso em banho-maria, com agitação constante, a uma profundidade acima do nível do ovo. Foi mantido, em paralelo, outro erlenmeyer, nas mesmas condições, com termômetro do tipo bulbo de mercúrio para controle da temperatura. Quando atingido o equilíbrio térmico na temperatura de 60,0°C,

1 mL da suspensão de *Salmonella* Enteritidis PT4, na concentração desejada, foi adicionada ao ovo. Terminado o intervalo de tempo pré determinado de três minutos e meio, o erlenmeyer foi retirado do banho-maria e imerso em gelo, para resfriamento rápido do ovo, mantendo-se o controle de temperatura.

Este procedimento foi realizado para as diluições onde se tinha as concentrações 10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL de ambas as culturas de *Salmonella* Enteritidis PT4, isto é, aquela proveniente de incubação à 35°C e aquela oriunda de incubação à 43°C.

Após tratamento térmico e resfriamento rápido, verificou-se a sobrevivência da *Salmonella*, através dos métodos de enumeração - Número Mais Provável (NMP) e contagem em placas (UFC).

4.4.3 Diluições seriadas do ovo tratado termicamente

Após o tratamento térmico, 1 mL do conteúdo do erlenmeyer foi transferido para um tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, realizando-se assim a diluição 10^{-1} . Adicionou-se 1 mL dessa diluição (10^{-1}) a 9 mL de água peptonada 0,1%, e assim sucessivamente, até a diluição desejada.

É importante considerar que, ao se fazer a inoculação de 1 mL da cultura de *Salmonella* Enteritidis com concentração de 10^3 UFC/mL em 100 mL de ovo integral desidratado reconstituído, obteve-se uma concentração final de 10^1 UFC por mililitro de ovo. Da mesma forma, quando se fez a inoculação das

concentrações de 10^5 e 10^8 UFC/mL de caldo BHI em 100 mL de ovo reconstituído, obteve-se como concentrações finais no ovo, 10^3 e 10^6 UFC por mililitro de ovo, respectivamente. Sob este raciocínio, quando da inoculação das culturas de *Salmonella* Enteritidis nas concentrações de 10^3 UFC/mL, 10^5 UFC/mL e 10^8 UFC/mL, realizou-se, respectivamente, diluições até 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6} no ovo após tratamento térmico.

4.4.4 Número Mais Provável (NMP)

4.4.4.1 Pré-enriquecimento

O pré-enriquecimento, fase inicial do procedimento de isolamento, fornece nutrientes para multiplicação, recuperação das células injuriadas, reidratação, e diluição de substâncias tóxicas inibitórias.

Para esta fase, transferiu-se 1 mL de cada diluição realizada com o ovo após tratamento térmico (inclusive 10^0 – ovo pasteurizado, não diluído) para um tubo contendo 9 mL de água peptonada 1%, em série de três tubos. Os tubos foram incubados em estufa à 35°C por 24 horas, e, considerados positivos aqueles que apresentaram turvação, e, negativos, aqueles que não o apresentaram.

A fase de enriquecimento seletivo, que objetiva inibir a multiplicação da potencial microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella*, foi dispensada visto que o trabalho foi realizado com ovo pasteurizado, portanto, com níveis mínimos ou nulos de outros microrganismos (fato observado pela pesquisa de mesófilos, psicotróficos, bolores, leveduras e coliformes, realizada previamente, à utilização da amostra de ovo).

4.4.4.2 Plaqueamento seletivo diferencial

O plaqueamento seletivo diferencial objetiva promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella*, com características típicas que as distingüam dos competidores, para posterior confirmação (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

A partir dos tubos da fase de pré-enriquecimento que apresentaram turvação após incubação à 35°C por 24 horas, foram feitas semeaduras em estrias nos ágares Bile Verde Brilhante (BVB) e Salmonella-Shigella (SS), com auxílio de alça de platina. As placas de Petri foram incubadas em estufa à 35°C por 24 horas.

Decorrido este período, verificou-se o crescimento de colônias características em ágar Bile Verde Brilhante (colônias transparentes, que causam alcalinização do meio, mudando a cor original alaranjada para cor rósea

escuro / vermelha), e, em meio Salmonella-Shigella (transparentes com produção de ácido sulfídrico (H₂S), que causam acidificação do meio, alterando sua cor rósea claro inicial para amarelada).

4.4.4.3 Confirmação

Decorridas as 24 horas de incubação da fase de plaqueamento seletivo diferencial, realizou-se leitura das placas, identificando as colônias características e repicando-as, com agulha, em profundidade, em tubo contendo ágar Triple Sugar Iron (TSI) inclinado. Os tubos de ágar TSI foram incubados em estufa à 35°C por 24 horas.

Após o período de incubação, foi realizada leitura dos tubos de TSI, identificando a *Salmonella* por suas características bioquímicas, quais sejam: fermentação de glicose com produção de gás, não utilização de lactose e sacarose, e produção de H₂S, portanto, bisel alcalino (cor rósea escuro / vermelha) e fundo ácido (cor amarelada) e enegrecido, com produção de gás.

O cálculo do NMP/mL foi feito anotando-se os tubos de TSI positivos e negativos de cada diluição, escolhendo uma seqüência de três diluições, incluindo, quando possível, uma diluição em que os três tubos foram negativos, consultando o resultado obtido na tabela de NMP (ANDREWS et al., 1995) e multiplicando o valor pelo fator da diluição.

4.4.5 Contagem

Em paralelo com a técnica de enumeração, foi realizada semeadura em superfície em ágar BVB, dispensando-se 0,1 mL de cada uma das diluições realizadas com o ovo reconstituído após tratamento térmico e espalhado com auxílio de alça de Drigalsky até total absorção do material, em duplicata. Após, as placas de Petri foram incubadas a 35°C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, realizou-se contagem das placas, calculando-se a média entre as duas placas, multiplicando pelo inverso da diluição e por 10, uma vez que a semeadura foi realizada com 0,1 mL.

Quando possível, a contagem foi realizada na diluição onde houve crescimento entre 25 a 250 colônias, entretanto, em alguns casos, houve crescimento de colônias em número inferior a 25. Sendo importante considerar que, nesses casos, houve a sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis, essa contagem também foi considerada, devendo-se, entretanto, ressaltar uma maior possibilidade de erro.

Faz-se necessário esclarecer a utilização de dois métodos de quantificação do agente – contagem, em UFC/mL, e enumeração, em NMP/mL – após a injúria térmica. A técnica de contagem foi mantida por ter sido utilizada para correlacionar a leitura em espectrofotômetro com a concentração de microrganismo a ser inoculada, sendo importante utilizar a mesma metodologia de quantificação pós tratamento, padronizando e realizando as mesmas técnicas antes e depois do tratamento térmico. Além da vantagem da padronização dos

métodos utilizados, a técnica de contagem fornece um número real, diferente da técnica de NMP, que é uma estimativa. A técnica de enumeração foi também realizada pois, valendo-se de meios líquidos de cultivo, possibilita a recuperação de células possivelmente injuriadas, que, apesar de viáveis poderiam não ser cultiváveis em meios sólidos, em especial em situações de estresse, como após tratamento térmico.

A realização das duas técnicas simultaneamente possibilitou ainda um estudo comparativo dos resultados obtidos pelos dois métodos, objetivando verificar se há concordância entre eles ou se a técnica de enumeração realmente permite maior recuperação das células injuriadas.

4.5 CONTROLES

4.5.1 **Verificação da conformidade do substrato ovo integral pasteurizado desidratado para utilização no experimento**

As amostras de ovo não inoculadas e não tratadas termicamente, além da pesquisa de *Salmonella* spp (controle negativo), também foram submetidas à contagem de mesófilos e psicrotróficos, bolores e leveduras e coliformes totais e fecais, para controle da qualidade microbiológica do produto.

Para tal, efetuou-se diluições seriadas, através da transferência de 1 mL da amostra para um tubo contendo 9 mL de água peptonada tamponada 0,1%,

obtendo-se, desta forma, a diluição 10^{-1} . Adicionou-se, então, 1 mL desta diluição em 9 mL de água peptonada tamponada 0,1%, e assim subsequentemente, até a diluição 10^{-4} .

Para contagem de mesófilos e psicrotróficos, foi realizada semeadura em profundidade em Plate Count Agar (PCA), transferindo-se, em duplicata, 1 mL de cada diluição em placas de Petri, adicionando o meio posteriormente, e incubando à 35°C por 48 horas e 10°C por 7 dias, respectivamente.

Para a contagem de bolores e leveduras, fez-se semeadura em profundidade, adicionando ágar Batata acidificado com ácido tartárico a 10% após transferir, em duplicata, 1 mL de cada diluição em placas de Petri, e incubando à temperatura ambiente por 5 dias.

Para a pesquisa de coliformes foi utilizado o método de Número Mais Provável (NMP), transferindo 1 mL de ovo reconstituído para tubos contendo caldo Lauril, em série de três tubos. Após incubação à 35°C por 48 horas, os tubos positivos para turbidez e produção de gás, observada através de tubos de Durhan, foram repicados em caldo Verde Brilhante (BVB), caldo Triptona e ágar Levine, com auxílio de alça de platina. Para coliformes totais, a positividade é indicada pelo crescimento de colônias verdes metálicas, alaranjadas mucóides, ou roxas no ágar Levine, após incubação à 35°C por 48 horas. Para coliformes fecais, após 48 horas em banho-maria à $44,5^{\circ}\text{C}$, a positividade é indicada pela turvação e produção de gás, observada através de tubos de Durhan, no caldo BVB, e, nos tubos de caldo Triptona, pela formação de um anel cor de rosa na superfície do meio, após adição do reativo de Kovacs, que indica a produção de indol.

O cálculo do NMP/mL foi feito anotando-se os tubos de caldo BVB e caldo Triptona positivos e negativos de cada diluição, assim como as placas de Petri que apresentaram crescimento de colônias características em ágar Levine. Escolheu-se uma seqüência de três diluições, incluindo, sempre que possível, uma diluição em que os três tubos foram negativos, consultou-se o resultado obtido na tabela de NMP (ANDREWS et al., 1995) e multiplicou-se o valor pelo fator da diluição.

Todas as análises para pesquisa de mesófilos e psicrotróficos, bolores e leveduras, coliformes totais e fecais, realizadas para controle da qualidade microbiológica do ovo utilizado, foram negativas ou apresentaram crescimento inferior a 25 colônias.

4.5.2 Viabilidade da cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4

Foram realizados controles negativos e positivos.

Como controle negativo, utilizou-se ovo reconstituído em água destilada estéril, não inoculado e não aquecido, objetivando verificar a presença de *Salmonella* spp independente da inoculação da cepa. Como o ovo utilizado em todas as amostras foi proveniente de uma única partida, um único lote pasteurizado desidratado, foram realizados três controles negativos, sendo um no início, um no meio e um no fim do período de desenvolvimento do trabalho. Para a pesquisa de *Salmonella* spp nos controles negativos, foram executadas todas as etapas, incluindo a fase de enriquecimento seletivo.

Para os controles positivos, utilizou-se ovo inoculado, porém não tratado termicamente, para verificar a viabilidade da cepa de *Salmonella* Enteritidis inoculada no ovo.

Nos controles negativos, não houve crescimento de *Salmonella* sp, demonstrando a ausência deste microrganismo no ovo utilizado como substrato para o desenvolvimento do trabalho. Por outro lado, em todos os controles positivos houve crescimento de *Salmonella*, indicando que o microrganismo utilizado para inoculação no ovo estava viável e cultivável.

4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.6.1 Análise estatística

Cada amostra de ovo foi subdividida em duas sub-amostras. Cada uma das sub-amostras foi novamente dividida em mais três sub-amostras.

Um conjunto de três sub-amostras foi inoculado com 1 mL de caldo BHI contendo *Salmonella* Enteritidis, previamente incubada à 35°C, por 24h, nas concentrações "teste" de 10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL e o outro conjunto de três sub-amostras foi inoculado com 1 mL de caldo BHI contendo *Salmonella* Enteritidis, previamente incubada à 43°C, por 24h, nas concentrações "teste" de 10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL.

Foram realizadas 25 repetições para cada uma das situações experimentais estudadas, totalizando 150 análises.

Foram comparados os resultados obtidos na contagem e enumeração a partir da inoculação da *Salmonella* proveniente de incubação nas duas temperaturas (35°C e 43°C), para cada uma das concentrações inoculadas, utilizando-se o teste não-paramétrico Mann-Whitney, que compara 2 grupos independentes (SIEGEL, 1975). Esta comparação teve como objetivo avaliar se a temperatura prévia de incubação da *Salmonella* Enteritidis interfere na sua sobrevivência após a pasteurização do ovo, e, conseqüentemente, na sua termorresistência.

Além disso, os resultados de contagem e enumeração das três diferentes concentrações inoculadas, para cada uma das temperaturas de incubação (35°C e 43°C), foram comparados entre si, utilizando-se o teste não-paramétrico chamado Kruskal-Wallis, que compara k grupos independentes, onde $k > 2$ (SIEGEL, 1975), com o objetivo de averiguar se a concentração de *Salmonella* Enteritidis inoculada no ovo interfere na sua sobrevivência após o tratamento térmico. Havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos comparados pelo método de Kruskal-Wallis, utiliza-se o teste pos-roc de Kruskal-Wallis para verificar entre quais concentrações houve diferença.

Partindo do pressuposto que o fenômeno de inativação estudado não apresenta distribuição normal, fez-se a escolha pelos testes não-paramétricos (SIEGEL, 1975).

4.6.2 Cálculo do valor *D*

O tempo de redução decimal (valor *D*) foi determinado, para cada uma das concentrações inoculadas (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL) e para cada uma das temperaturas de incubação da cepa de *S. Enteritidis* (35°C e 43°C), pela fórmula: $D = t / (\log A - \log B)$, onde *t* é o tempo de aquecimento em minutos, *A* é o número inicial do microrganismo (UFC/mL), e *B* é o número final de células que sobreviveram em UFC/mL (GAVA, 1984).

Faz-se necessário enfatizar que o número inicial de *Salmonella* (*A*) utilizado para o cálculo do valor *D* foi de 10^1 , 10^3 e 10^6 UFC/mL de ovo correspondendo, respectivamente, às concentrações inoculadas de 10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL de caldo BHI em 100 mL de ovo. Tanto os valores *A* (número inicial do microrganismo) quanto os valores *B* (número de células recuperadas) são referentes a concentração do microrganismo no substrato ovo, e não no inóculo de caldo BHI.

4.6.3 Cálculo do valor *kappa*

Os resultados obtidos através dos métodos de contagem e enumeração realizados após o tratamento térmico foram confrontados, através do programa SPSS 9.0, calculando-se o valor *kappa*, que avalia a concordância entre dois

testes, apresentando valores entre 0 e 1, que indicam pouca concordância para valores próximos de 0, e elevada concordância para valores próximos de 1.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Confrontou-se os resultados obtidos a partir das técnicas de contagem, em UFC/mL (Gráfico 3), e enumeração, em NMP/mL (Gráfico 4), após pasteurização do ovo reconstituído inoculado, nas diferentes concentrações testadas (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL), com cepa de *S. Enteritidis* PT4 previamente incubada a 35°C (Tabela 1) e a 43°C (Tabela 2).

5.1 ESTUDO COMPARATIVO DAS DUAS TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO E DAS TRÊS CONCENTRAÇÕES INOCULADAS

PARTE 1 Resultados obtidos a partir do estudo comparativo das duas temperaturas de incubação (35°C e 43°C) da cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4

O confronto dos resultados obtidos na contagem, em UFC/mL, e na enumeração, em NMP/mL, relativos à recuperação da *Salmonella*, oriunda de cultivo incubado a 35°C (Tabela 1) e a 43°C (Tabela 2), no substrato ovo desidratado reconstituído, após o tratamento térmico a 60°C/3,5min, apresentou as seguintes situações:

- A partir da inoculação da concentração 10^3 UFC/mL, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos nas contagens ($p = 1,00$) e na enumeração ($p = 0,522$), comparando-se as diferentes

temperaturas de incubação;

- A partir da inoculação da concentração 10^5 UFC/mL, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos nas contagens ($p = 0,285$) e na enumeração ($p = 0,771$), comparando-se as diferentes temperaturas de incubação;
- A partir da inoculação da concentração 10^8 UFC/mL, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos nas contagens ($p = 0,838$) e na enumeração ($p = 0,386$), comparando-se as diferentes temperaturas de incubação.

PARTE 2 Resultados obtidos a partir do estudo comparativo das diferentes concentrações inoculadas (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC de *Salmonella*/mL de caldo BHI), da cepa incubada previamente a 35°C

Constatou-se diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos nas contagens, em UFC/mL, e na enumeração, em NMP/mL, no estudo realizado com a cepa de *Salmonella* cultivada sob temperatura de 35°C ($p < 0,001$), comparando as diferentes concentrações inoculadas. O teste pos-roc de Kruskal-Wallis mostrou que houve diferença significativa entre as três concentrações.

PARTE 3 Resultados obtidos a partir do estudo comparativo das diferentes concentrações inoculadas (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC de *Salmonella*/mL de caldo BHI), de cepa incubada previamente a 43°C

Constatou-se diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos a partir das contagens, em UFC/mL, e da enumeração, em NMP/mL ($p < 0,001$). O teste pos-roc de Kruskal-Wallis, mostrou que há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos a partir das três concentrações estudadas.

5.2 CÁLCULO DO VALOR *D*

Os valores *D* obtidos foram:

- $D = 2,54$ minutos quando da inoculação de 10^5 UFC/mL, proveniente de cepa previamente incubada a temperaturas de 35°C;
- $D = 2,57$ minutos quando da inoculação de 10^8 UFC/mL, proveniente de cepa previamente incubada a temperaturas de 35°C;
- $D = 2,58$ minutos quando da inoculação de 10^5 UFC/mL, proveniente de cepa previamente incubada a temperaturas de 43°C;
- $D = 2,40$ minutos quando da inoculação de 10^8 UFC/mL, proveniente de cepa previamente incubada a temperaturas de 43°C.

Na concentração 10^3 UFC/mL, tanto para a cepa previamente incubada a 35°C quanto para a cepa incubada a 43°C, não foi possível o cálculo do valor D , visto que, em 48 das 50 amostras realizadas, não houve recuperação de células na contagem, ou seja, o valor B foi zero. Como $\log 0$ é um valor que não existe, não foi possível o cálculo do valor D nessa condição.

5.3 CÁLCULO DO VALOR $kappa$

O estudo comparativo dos resultados obtidos utilizando a quantificação da recuperação da *Salmonella* pelo método de contagem, em UFC/mL, e de enumeração, em NMP/mL, geraram o valor $kappa = 0,68$ ($p < 0,001$). Este valor indica que houve concordância estatisticamente significativa entre os métodos de quantificação do agente - contagem e enumeração - demonstrada pelo valor de $kappa$ próximo de 1 e por $p < 0,001$.

Tabela 1 - Resultados de contagem, em UFC/mL, e enumeração, em NMP/mL, obtidos após pasteurização, para as diferentes concentrações inoculadas provenientes de cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4, previamente incubada à temperatura de 35°C - São Paulo - 2003

CONCENTRAÇÃO DE <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS PT4 INOCULADA (EM UFC/mL DE CALDO BHI)						
Amostra	10 ³		10 ⁵		10 ⁸	
	UFC	NMP	UFC	NMP	UFC	NMP
1	(1) -	(3) < 0,3	-	0,7	1,4 x 10 ³	9,3 x 10 ²
2	-	< 0,3	-	< 0,3	-	0,4
3	-	< 0,3	-	< 0,3	-	2,4 x 10 ²
4	-	< 0,3	-	4,3	1,0 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁴
5	-	< 0,3	1,6 x 10 ²	0,7	2,0 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴
6	-	0,4	(2) 6,5 x 10 ¹	4,3 x 10 ¹	9,1 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁵
7	-	0,4	(2) 4,0 x 10 ¹	9,3	8,6 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁵
8	-	< 0,3	(2) 0,5 x 10 ¹	9,3	2,6 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵
9	-	0,9	(2) 1,0 x 10 ¹	9,3	3,6 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴
10	-	0,4	(2) 1,0 x 10 ¹	2,4 x 10 ¹	1,4 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴
11	-	< 0,3	(2) 1,0 x 10 ¹	0,4 x 10 ¹	3,2 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴
12	-	< 0,3	-	< 0,3	8,6 x 10 ³	2,4 x 10 ³
13	-	0,4	2,9 x 10 ²	2,4 x 10 ²	1,9 x 10 ⁵	9,3 x 10 ⁴
14	-	0,4	(2) 5,0 x 10 ¹	7,5 x 10 ¹	4,8 x 10 ⁴	4,6 x 10 ⁴
15	-	< 0,3	(2) 7,5 x 10 ¹	7,5 x 10 ¹	1,1 x 10 ⁵	4,6 x 10 ⁵
16	(2) 0,5 x 10 ¹	0,4	(2) 5,5 x 10 ¹	9,3 x 10 ¹	7,4 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁵
17	-	< 0,3	-	2,4 x 10 ¹	5,2 x 10 ³	4,3 x 10 ³
18	-	< 0,3	(2) 1,5 x 10 ¹	9,3	5,9 x 10 ³	9,3 x 10 ³
19	-	2,3	(2) 1,0 x 10 ¹	0,9	1,3 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵
20	-	0,9	(2) 0,5 x 10 ¹	2,3	4,4 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴
21	-	0,4	-	0,2 x 10 ¹	1,0 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴
22	-	< 0,3	(2) 0,5 x 10 ¹	0,9	3,8 x 10 ³	2,4 x 10 ²
23	-	< 0,3	-	< 0,3	-	9,3 x 10 ¹
24	-	< 0,3	(2) 2,0 x 10 ¹	1,5	7,2 x 10 ³	4,6 x 10 ³
25	-	< 0,3	(2) 5,0 x 10 ¹	2,3	9,0 x 10 ³	2,4 x 10 ³

(1) -: Sem crescimento de colônias pelo método de contagem

(2) Contagens com valores inferiores a 25 colônias por placa.

(3) < 0,3: Resultado da enumeração, de acordo com tabela, quando nenhum tubo apresentou crescimento.

Tabela 2 - Resultados de contagem, em UFC/mL, e enumeração, em NMP/mL, obtidos após pasteurização, para as diferentes concentrações inoculadas provenientes de cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4, previamente incubada à temperatura de 43°C - São Paulo - 2003

CONCENTRAÇÃO DE <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS PT4 INOCULADA (EM UFC/mL DE CALDO BHI)						
Amostra	10 ³		10 ⁵		10 ⁸	
	UFC	NMP	UFC	NMP	UFC	NMP
1	(1) -	(3) < 0,3	-	< 0,3	2,1 x 10 ³	9,3 x 10 ²
2	-	< 0,3	-	0,4	5,0 x 10 ²	9,3 x 10 ¹
3	-	< 0,3	-	< 0,3	-	2,4 x 10 ¹
4	-	0,4	(2) 1,2 x 10 ²	9,3 x 10 ¹	1,3 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁴
5	(2) 0,5 x 10 ¹	< 0,3	(2) 6,0 x 10 ¹	1,1 x 10 ²	5,6 x 10 ³	9,3 x 10 ³
6	-	< 0,3	(2) 2,0 x 10 ¹	2,4 x 10 ¹	1,8 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵
7	-	< 0,3	(2) 1,6 x 10 ²	2,4 x 10 ²	1,4 x 10 ⁵	9,3 x 10 ⁴
8	-	0,9	(2) 2,5 x 10 ¹	2,1 x 10 ¹	1,8 x 10 ⁵	9,3 x 10 ⁴
9	-	< 0,3	-	2,4 x 10 ¹	6,5 x 10 ³	4,3 x 10 ³
10	-	0,4	(2) 0,5 x 10 ¹	2,1	2,2 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴
11	-	0,4	(2) 0,5 x 10 ¹	9	3,4 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴
12	-	0,4	-	4	9,0 x 10 ²	2,4 x 10 ²
13	-	< 0,3	-	9	3,8 x 10 ³	2,4 x 10 ³
14	-	0,4	(2) 2,0 x 10 ¹	4,3 x 10 ¹	1,2 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵
15	-	< 0,3	(2) 1,1 x 10 ²	1,5 x 10 ¹	3,6 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴
16	-	< 0,3	(2) 9,5 x 10 ¹	4,3 x 10 ¹	1,3 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵
17	-	0,4	-	9,3	5,4 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴
18	-	< 0,3	-	0,9	1,4 x 10 ³	9,3 x 10 ²
19	-	< 0,3	-	1,5	9,8 x 10 ³	2,1 x 10 ⁴
20	-	0,9	-	2,3	7,0 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴
21	-	< 0,3	-	1,5 x 10 ¹	4,4 x 10 ⁴	4,3 x 10 ³
22	-	< 0,3	-	0,9	2,6 x 10 ³	2,4 x 10 ³
23	-	< 0,3	(2) 0,5 x 10 ¹	< 0,3	9,4 x 10 ²	2,4 x 10 ³
24	-	< 0,3	(2) 1,5 x 10 ¹	2,4 x 10 ¹	1,5 x 10 ³	1,1 x 10 ³
25	-	< 0,3	-	0,4	4,0 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴

(1) -: Sem crescimento de colônias pelo método de contagem

(2) Contagens com valores inferiores a 25 colônias por placa.

(3) < 0,3: Resultado da enumeração, de acordo com tabela, quando nenhum tubo apresentou crescimento.

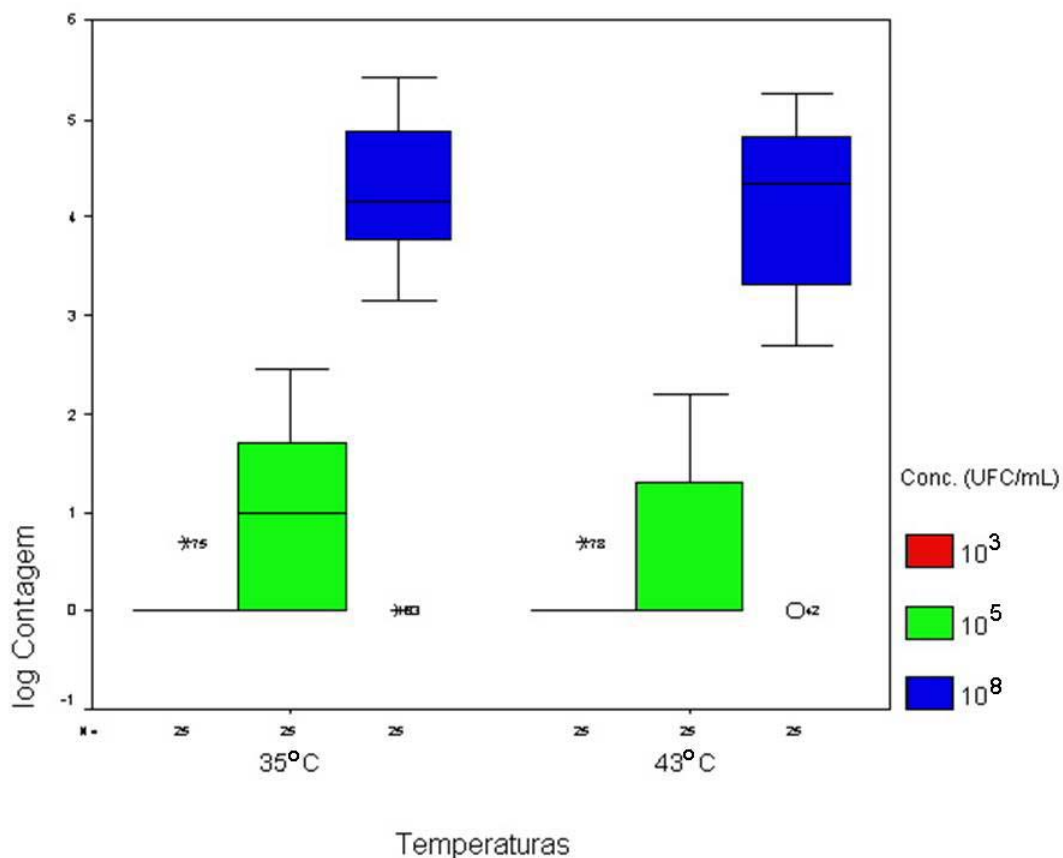
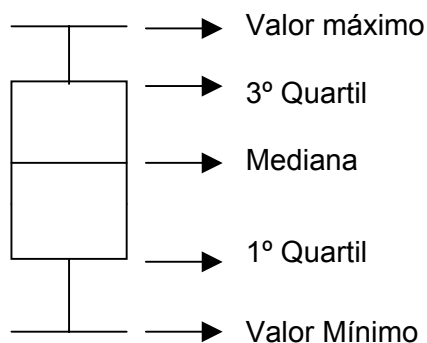


Gráfico 3 - Sobrevivência da *Salmonella* Enteritidis PT4 após tratamento térmico a 60,0°C/3,5min, quantificada através do método de contagem, em UFC/mL, comparando-se os resultados obtidos a partir das amostras de ovo integral desidratado reconstituído, inoculadas com cepas previamente incubadas à temperatura de 35°C e 43°C, nas diferentes concentrações inoculadas (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL) – São Paulo – 2003

Nota: Não houve sobrevivência de *Salmonella* quando da inoculação da concentração 10^3 UFC/mL, tanto para cepa previamente incubada à temperatura de 35°C quanto para cepa previamente incubada à temperatura de 43°C.

No eixo da abscissa, os valores 25 indicam o número de amostras utilizadas para cada uma das concentrações (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL).

Os blocos dos gráficos devem ser interpretados da seguinte forma:



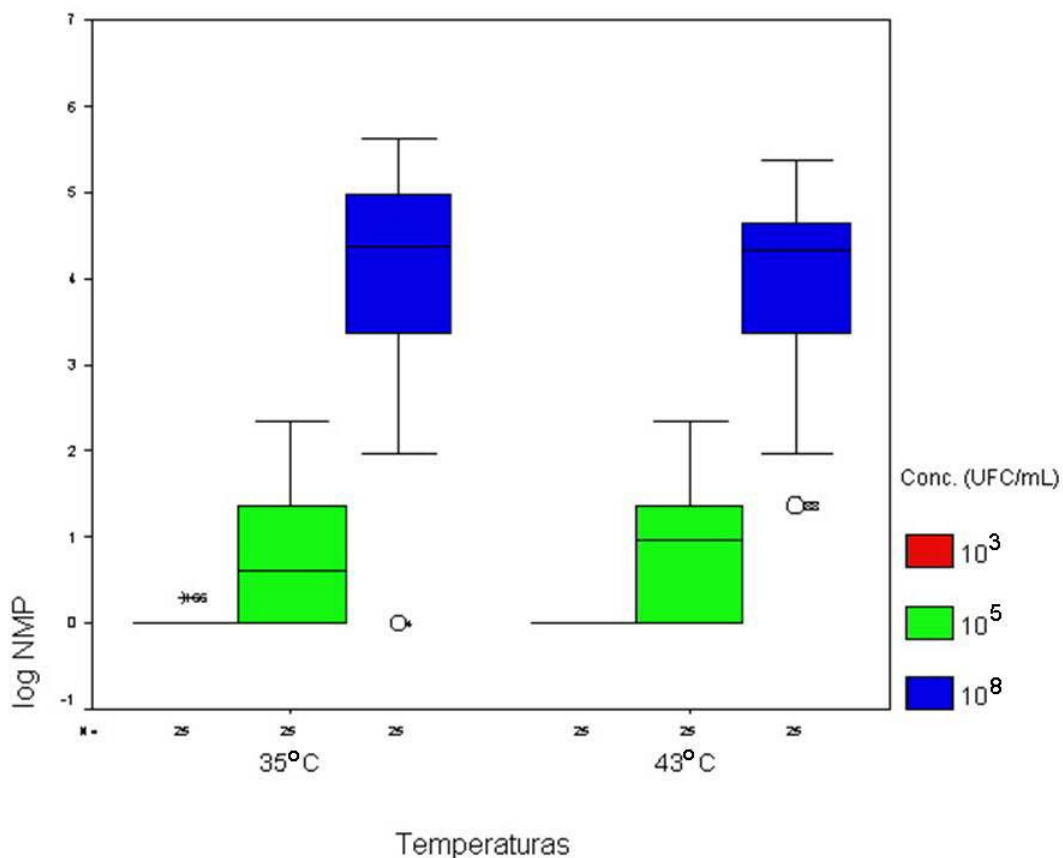


Gráfico 4 - Sobrevivência da *Salmonella* Enteritidis PT4 após tratamento térmico a 60,0°C/3,5min, quantificada através do método de enumeração, em NMP/mL, comparando-se os resultados obtidos a partir das amostras de ovo integral desidratado reconstituído, inoculadas com cepas previamente incubadas à temperatura de 35°C e 43°C, nas diferentes concentrações inoculadas (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL) –São Paulo – 2003

Nota: Não houve sobrevivência de *Salmonella* quando da inoculação da concentração 10^3 UFC/mL, tanto para cepa previamente incubada à temperatura de 35°C quanto para cepa previamente incubada à temperatura de 43°C.

No eixo da abscissa, os valores 25 indicam o número de amostras utilizadas para cada uma das concentrações (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Segundo Jay (2000), vários fatores são capazes de interferir na resistência dos microrganismos ao calor, entre eles, a presença de gordura e proteínas no substrato, a concentração de microrganismos, a temperatura de tolerância de multiplicação destes, a condição celular em que se encontram (fase lag, log, multiplicação exponencial), entre outros.

Em relação à temperatura de multiplicação microbiana, Jay (2000) afirma que a resistência térmica dos microrganismos tende a aumentar conforme aumenta a temperatura de incubação. Neste estudo, entretanto, a cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4 pré incubada à 43°C não apresentou maior resistência ao calor, em relação à cepa pré incubada à 35°C. É possível que a intensidade térmica oferecida a 43°C, em uma única passagem, por 24 horas, não tenha representado estresse suficiente para desencadear mecanismos de resistência e adaptação.

Earnshaw, Appleyard e Hurst (1995), concordando com o relatado por Jay (2000), referem que é possível encontrar vários trabalhos na literatura sobre aumento da termotolerância após choque térmico subletal com diversos microrganismos: *Escherichia coli*; *Salmonella typhimurium*; *Salmonella thompson*; *Legionella pneumophila*; *Listeria monocytogenes* Scott A; *E. coli* O157:H7; *Salmonella* Enteritidis PT4; e *L. monocytogenes* 19915.

Este estudo também discorda dos resultados relatados por Ng, Bayne e Garibaldi (1969), que, em ensaio sobre termorresistência, encontraram que as

células de *Salmonella* Senftenberg 775W que cresceram à 44°C foram mais resistentes ao calor que aquelas que cresceram à 15°C ou 35°C, utilizando como substrato meio de cultura Trypticase Soy Broth com extrato de levedura (TSB-YE) tratado termicamente a 55°C por 30 minutos.

Com referência à concentração de microrganismos, Jay (2000) afirma que a resistência ao calor é maior quanto mais alta a concentração de microrganismos em um determinado substrato. Os resultados obtidos neste estudo, entretanto, não são suficientes para afirmar que há concordância com o exposto pelo autor supracitado.

A inativação da *Salmonella* Enteritidis PT4, neste estudo, respeitou a curva log linear, portanto, quando da inoculação da maior concentração utilizada (10^8 UFC/mL) houve maior número de células vivas remanescentes, explicando a diferença estatisticamente significativa constatada entre os resultados obtidos nas contagens, em UFC/mL, e na enumeração, em NMP/mL, comparando-se as diferentes concentrações inoculadas, tanto com cepa de *Salmonella* cultivada sob temperatura de 35°C, quanto para a cepa cultivada a 43°C.

Faz-se necessário ressaltar que o valor *D* foi semelhante nas diferentes concentrações inoculadas (valor *D* = 2,54, 2,57, 2,58 e 2,40 para as concentrações 10^5 e 10^8 UFC/mL de cepas previamente incubada a 35°C e 43°C, respectivamente), indicando que o tempo necessário para reduzir a população um ciclo da escala logarítmica foi praticamente o mesmo, apesar das diferentes concentrações utilizadas, portanto, a maior recuperação de células na maior concentração inoculada (10^8 UFC/mL) ocorreu em função de grande quantidade de *Salmonella* inoculada, e não devido a maior resistência ao calor.

Diversos autores ressaltam a sensibilidade da *Salmonella* ao calor. É sabido que todas as salmonelas são prontamente destruídas em temperatura de pasteurização do leite (JAY, 2000), usualmente realizada utilizando os binômios temperatura / tempo de 62°C por 30 minutos (pasteurização lenta) e 72°C por 15 segundos (pasteurização rápida) (GAVA, 1984), e que a pasteurização do ovo integral assegura um produto livre de *Salmonella* (JAY, 2000). Forsythe (2002) afirma que, por não formar esporos, a *Salmonella* é relativamente termossensível, podendo ser destruída a 60°C, por 15 a 20 minutos. Franco e Landgraf (1996) referem que o calor é uma forma eficiente para a destruição de salmonelas nos alimentos.

Mazzotta (2001) relata que o aumento de resistência ao calor em cepas ácido-adaptadas foi maior para *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* que para *Salmonella*. Os sorotipos de *Salmonella* utilizados (Gaminara, Rubislaw, Hartford, Enteritidis, e Typhimurium) apresentaram a menor resistência térmica em todas temperaturas testadas (56°C, 60°C e 62°C). Nas condições do estudo, *Salmonella* foi o organismo mais sensível ao calor.

Casadei et al. (2001) referem que a *Salmonella* Typhimurium foi a espécie mais sensível ao calor comparada com as espécies testadas de *Bacillus cereus* e *Lactobacillus delbrueckii*, utilizando-se diferentes meios de cultura, temperaturas e pH para cada um dos microrganismos testados.

Baird-Parker, Boothroyd e Jones (1970) referem que algumas cepas de *Salmonella* Senftenberg e *Salmonella* Bedford podem ser mais resistentes ao calor, mas, enfatizam que, de forma geral, isto não é típico das salmonelas.

Franco e Landgraf (1996) ressaltam que algumas salmonelas são mais resistentes ao calor, e que a composição do alimento é extremamente importante

na inativação deste microrganismo. Neste sentido, faz-se necessário enfatizar que, apesar da incubação prévia da cepa de *Salmonella* a 35°C e 43°C, o tipo de substrato utilizado conferiu certa proteção e/ou a situação de estresse proporcionado neste estudo, talvez não tenha imposto intensidade ou duração suficiente para que a *Salmonella* desenvolvesse mecanismos de adaptação e resistência frente ao tratamento térmico.

Segundo Stadelman e Cotterill (1995) e Jay (2000), há um aumento da resistência térmica dos microrganismos na presença de substratos ricos em gordura e proteínas, pois exercem efeito protetor sobre estes, o que faz com que o ovo, alimento rico nestes componentes, garanta proteção aos microrganismos frente ao aquecimento.

Blackburn et al. (1997) também enfatizam que variações de cepa para cepa e diferenças na fisiologia e bioquímica das células, também podem influenciar a resistência térmica, embora não sejam facilmente quantificáveis, e ressaltam, ainda, que as características do meio também influenciam significativamente na resistência ao calor.

Germano e Germano (2003) afirmam que a temperatura de destruição da *Salmonella* depende de inúmeros fatores, mas está, fundamentalmente, ligada ao substrato, além do sorotipo.

Neste contexto, faz-se necessário comparar os resultados deste estudo, trabalhando-se com ovo, onde o menor valor *D* obtido foi 2,40 minutos, com aqueles obtidos por Mazzotta (2001), que encontrou 0,21, 0,28 e 0,44 minutos como tempo de redução decimal a 60,0°C para *Salmonella* em sucos de laranja, maçã e uva, respectivamente. Ou seja, o tempo de redução decimal (valor *D*) foi maior no presente estudo, utilizando-se o substrato ovo, que, além de ser mais

rico em proteínas e gordura, ainda apresenta pH mais adequado à sobrevivência dos microrganismos, demonstrando a interferência da natureza e composição do substrato no comportamento da *Salmonella*, quando submetida ao tratamento térmico. É possível que o substrato ovo garanta proteção aos microrganismos, e estes não precisem desenvolver mecanismos de resistência ao calor.

Forsythe (2002) relata que o tempo de redução decimal a 62,8°C foi de 0,06 minutos, para *Salmonella* Enteritidis em ovo líquido integral.

Humphrey (1990) e Shah, Bradshaw e Peeler (1991), em estudo sobre tempo de redução decimal da *Salmonella* Enteritidis em ovo integral, obtiveram, respectivamente, valor *D* a 55°C entre 7,8 e 8,5 minutos e valor *D* a 57,2°C de 1,21 a 2,81 minutos.

Faz-se necessário enfatizar as expressivas diferenças no tempo de redução decimal utilizando-se diferentes temperaturas. Comparando os trabalhos supra citados com os resultados obtidos no presente estudo, com valor *D* de aproximadamente 2,5 minutos para temperatura de 60,0°C utilizando-se o mesmo agente e o mesmo substrato, constata-se que o tempo de redução decimal aumenta conforme diminui a temperatura utilizada.

Humphrey et al. (1990), trabalhando com *Salmonella* Enteritidis em ovo integral encontraram, como valor *D* a 60,0°C, 0,21 a 0,62 minutos, enquanto Baker (1990), em ensaio com os mesmos microrganismos, substrato e temperatura, obteve 0,31 a 0,69 minutos.

Garibaldi, Straka e Ijichi (1969), trabalhando com *Salmonella* Typhimurium em ovo integral, obtiveram valor *D* a 60°C entre 0,25 e 0,45 minutos. Lategan e Vaughn (1964) encontraram valor *D* a 57,8°C de 2,3 minutos, em estudo com *Salmonella* Typhimurium em ovo integral.

Para Buchanan e Whiting (1996), o tempo de redução decimal a 60,0°C para *Salmonella* sp em carne de ave foi de 0,4 minutos.

Blackburn et al. (1997) ainda citam vários autores que estudaram o tempo de redução decimal para *Salmonella*: Jäckle, Geiges e Schmidt-Lorenz (1988) que encontraram valor *D* a 59,5°C de 0,85 minutos para *Salmonella* Typhimurium em gema de ovo; e, Corry e Barnes (1968) e Jäckle e Schmidt-Lorenz (1989) que obtiveram, respectivamente, valor *D* a 56,7°C entre 0,63 e 0,66 minutos e valor *D* a 58,5°C de 0,23 minutos, com *Salmonella* Typhimurium em clara de ovo.

Cabe comparar estes últimos ensaios, utilizando-se clara de ovo como substrato, com o presente estudo, que, trabalhando ovo integral, obteve valor *D* entre 2,40 e 2,58, enfocando, mais uma vez, para a importância do substrato no tempo de redução decimal.

Faz-se necessário enfatizar que nem sempre é possível fazer comparações concordando ou discordando dos resultados encontrados em outros ensaios, em função dos diferentes substratos, das diferentes cepas ou sorotipos utilizados, e das diferentes temperaturas testadas.

É importante considerar, ainda, que a qualidade dos produtos de ovos é muito sensível ao aquecimento, visto que este alimento apresenta grande instabilidade ao calor na faixa de temperatura de pasteurização efetiva, e o produto deve apresentar-se não apenas seguro do ponto de vista microbiológico, mas também satisfatório do ponto de vista comercial. Portanto, os limites de tempo-temperatura para a pasteurização, a fim de produzir um produto tanto de qualidade quanto microbiologicamente livre de patógenos infecciosos são muito reduzidos.

Neste contexto, é interessante comentar sobre as diferentes temperaturas

recomendadas pela legislação brasileira para pasteurização de produtos de ovos, 56,7°C/3,5min para clara, 60,0°C/3,5min para ovo integral, 61,0°C/3,5min para gema, enfatizando que as condições de tempo e temperatura preconizadas pela legislação brasileira levam em consideração a interferência do substrato na inativação dos microrganismos, assim como a qualidade do produto do ponto de vista comercial.

É válido salientar, entretanto, que os ovos contaminados naturalmente por *Salmonella* Enteritidis geralmente contém baixas concentrações do agente (HUMPHREY et al., 1991). Entretanto, como o presente ensaio teve como objetivo descrever o comportamento da *Salmonella*, no substrato ovo integral interrelacionando a termorresistência com altas populações microbianas, foram inoculadas crescentes concentrações de *S. Enteritidis*, apesar de se ter naturalmente presente nos ovos concentrações muito menores de *Salmonella*, que aquelas utilizadas neste experimento.

Portanto, considerando os resultados obtidos no presente estudo e os diversos trabalhos mencionados, constata-se que a *Salmonella* é sensível ao calor, e, somando esta informação ao fato de se ter, naturalmente, ovos infectados com baixas concentrações de *Salmonella*, conclui-se que as condições de tempo e temperatura preconizadas e utilizadas para pasteurização do ovo são suficientes para destruição deste microrganismo, e, conseqüentemente, para produção de um alimento seguro.

Dessa forma, a pasteurização do ovo é uma maneira segura de garantir a qualidade microbiológica do produto, e o acesso e utilização do ovo industrializado deve ser expandido para os diversos segmentos que produzem e preparam alimentos, inclusive em ambiente doméstico, diminuindo drasticamente

o risco de ocorrência de doenças veiculadas por este alimento, principalmente salmonelose. O uso de ovos e produtos de ovos pasteurizados é, portanto, bastante interessante, e recomendado para garantir maior segurança alimentar, apresentando grande relevância para a saúde pública.

O confronto dos resultados obtidos, utilizando-se os métodos de contagem e enumeração durante o desenvolvimento do presente trabalho revelou valor *kappa* igual a 0,68, e expressa concordância entre os dois métodos. Entretanto, deve-se enfatizar que essa concordância é válida para as condições do ensaio, podendo ser útil quando da utilização de protocolos semelhantes, mas não deve ser estendida para qualquer situação de quantificação de microrganismos.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Perante os resultados do presente estudo, pode-se concluir:

- A cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4 pré incubada a 43°C não apresentou maior resistência ao calor, em relação à cepa pré incubada a 35°C;
- Não se observou diferenças na resistência térmica da *S. Enteritidis* PT4 quando da inoculação das diferentes concentrações (10^3 , 10^5 e 10^8 UFC/mL) no substrato ovo;
- Houve concordância estatisticamente significante entre os métodos de quantificação contagem, em UFC/mL, e enumeração, em NMP/mL.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ANDREWS, W. H.; JUNE, G. A.; SHERROD, P. S.; HAMMACK, T. S.; AMAGUANA, R. M. *Salmonella*. In: **FDA bacteriological analytical manual**. 8. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1995. cap. 5, p. 1-20.

BAIRD-PARKER, A. C.; BOOTHROYD, M.; JONES, E. The effect of water activity on the heat resistance of heat sensitive and heat resistant strains of salmonellae. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 33, p. 515-522, 1970.

BLACKBURN, C. W.; CURTIS, L. M.; HUMPHESON, L.; BILLON, C.; MCCLURE, P. J. Development of thermal inactivation models for *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 31-44, 1997.

BOZIARIS, I. S.; HUMPHESON, L.; ADAMS, M. R. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT4. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 7-13, 1998.

BRASIL. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Portaria nº 01, de 21 de fevereiro de 1990. Aprova as Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 6 mar. 1990. Sec. I.

BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C. Risk assessment and predictive microbiology. **Journal of Food Protection**, p. 31-36, 1996. Suplemento.

CASADEI, M. A.; INGRAM, R.; HITCHINGS, E.; ARCHER, J.; GAZE, J. E. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 125-134, 2001.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Dados de surtos de doenças transmitidas por alimentos e água**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/dta_estat.htm>. Acesso em: 04 nov. 2003.

CHING-LEE, M. R.; KATZ, A. R.; SASAKI, D. M.; MINETTE, H. P. *Salmonella* egg survey in Hawaii: evidence for routine bacterial surveillance. **American Journal of Public Health**, v. 81, p. 764-766, 1991.

COX, N. A.; DAVIS, B. H.; WATTS, A. B.; CALMER, A. R. *Salmonella* in the laying hen. I. *Salmonella* recovery from viscera, feces, and eggs following oral inoculation. **Poultry Science**, v. 52, p. 661-666, 1973.

EARNSHAW, R. G.; APPELYARD, J.; HURST, R. M. Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 197-219, 1995.

EDUARDO, M. B. P.; MELLO, M. L. R.; KATSUYA, E. M.; MORAES, I. R.; FERNANDES, S. A.; GUARNIERI, C. E. Manual de doenças transmitidas por alimentos e água: *Salmonella* Enteritidis / Salmoneloses. **Centro de Vigilância Epidemiológica**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/IF_59Sen.htm>. Acesso em: 04 nov. 2003a.

EDUARDO, M. B. P.; MELLO, M. L. R.; MORAES, I. R.; FERNANDES, S. A.; GUARNIERI, C. E. Manual de doenças transmitidas por alimentos e água: *Salmonella* Typhi / Febre Tifóide. **Centro de Vigilância Epidemiológica**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/IF_510FT.html>. Acesso em: 04 nov. 2003b.

FOEGEDING, P. M.; LEASOR, S. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in liquid whole egg. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 9-14, 1990.

FOEGEDING, P. M.; STANLEY, N. W. *Listeria monocytogenes* F5069 thermal death times in liquid whole egg. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 6-8, 1990.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

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

GARIBALDI, J. A.; STRAKA, R. P.; IJICHI, K. Heat resistance of *Salmonella* in various egg products. **Applied Microbiology**, v. 17, p. 491-496, 1969.

GAST, R. K.; BEARD, C. W. Production of *Salmonella* enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens. **Avian Disease**, v. 34, p. 438-446, 1990.

GAST, R. K.; BEARD, C. W. Research to Understand and Control *Salmonella* Enteritidis in Chickens and Eggs. **Poultry Science**, v. 72, p. 1157-1163, 1993.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. São Paulo. Nobel, 1984. 284 p.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2003. 655 p.

HINTON, M.; THRELFALL, E. J.; ROWE, B. The invasive potential of *Salmonella* Enteritidis phage types for young chickens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 10, p. 237-239, 1990.

HOPE, B. K.; BAKER, A. R.; EDEL, E. D.; HOGUE, A. T.; SCHLOSSER, W. D.; WHITING, R.; MCDOWELL, R. M.; MORALES, R. A. An Overview of the *Salmonella* Enteritidis Risk Assessment for Shell Eggs and Egg Products. **Risk Analysis**, v. 22, p. 203-218, 2002.

HUMPHREY, T. J. Public health implications of the infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **World's Poultry Science**, v. 46, p. 5-13, 1990.

HUMPHREY, T. J. Contamination of eggshell and contents with *Salmonella* Enteritidis. A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 31-40, 1994.

HUMPHREY, T. J.; WHITEHEAD, A.; GAWLER, A. H. L.; HENLEY, A.; ROWE, B. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. **Epidemiology and Infection**, v. 106, p. 489-496, 1991.

HUMPHREY, T. J.; SLATER, E.; ALPINE, K.; ROWBURY, R. J.; GILBERT, R. J. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3161-3164, 1995.

JACKSON, T. C.; HARDIN, M. D.; ACUFF, G. R. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage and holding temperatures. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 230-237, 1996.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6. ed. Gaithersburg: An Aspen Publication, 2000. 679 p.

JONES, F. T.; RIVES, D. V.; CAREY, J. B. *Salmonella* contamination in commercial eggs and an egg production facility. **Poultry Science**, v. 74, p. 753-757, 1995.

JORDAN, F. T. W. **Poultry Diseases**. 3. ed. London: Baillière Tindall, 1990.

JUNG, Y. S.; BEUCHAT, L. R. Survival of multidrug-resistance *Salmonella typhimurium* DT104 in egg powders as affected by water activity and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 49, p. 1-8, 1999.

KHAKHRIA, R.; DUCK, D.; LIOR, H. Distribution of *Salmonella* Enteritidis phage types in Canada. **Epidemiology and Infection**, v. 106, p. 25-32, 1991.

KITAGAWA, M.; MATSUMURA, Y.; TSUCHIDO, T. Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 184, p. 165-171, 2000.

KLONTZ, K. C.; TIMBO, B.; FEIN, S.; LEVY, A. Prevalence of selected food consumption and preparation behaviors associated with increased risks of food-borne disease. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 927-930, 1995.

LATEGAN, P. M.; VAUGHN, R. H. The influence of chemical additives on the heat resistance of *Salmonella* Typhimurium in liquid whole egg. **Journal of Food Science**, v. 29, p. 339-344, 1964.

LEVINE, W. C.; SMART, J. F.; ARCHER, D. L.; BEAN, N. H.; TAUXE, R. V. Foodborne disease outbreaks in nursing homes, 1975 through 1987. **Journal of the American Medical Association**, v. 266, p. 2105-2109, 1991.

LIN, F Y; MORRIS, J G, JR; TRUMP, D; TILGHMAN, D; WOOD, P K; JACKMAN, N; ISRAEL, E; LIBONATI, J P. Investigation of an outbreak of *Salmonella* Enteritidis gastroenteritis associated with consumption of eggs in a restaurant chain in Maryland. **American Journal Of Epidemiology**, v. 128, p. 839-844, 1988.

LISTER, S. A. *Salmonella* Enteritidis infection in broilers and broilers breeders. **Veterinary Record**, v. 123, p. 350, 1988.

MAZZOTA, A. S. Thermal inactivations of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 3, p. 315-320, 2001.

NG, H.; BAYNE, H. G.; GARIBALDI, J. A. Heat resistance of *Salmonella*. The uniqueness of *Salmonella* Senftenberg 775W. **Applied Microbiology**, v. 17, p. 78-82, 1969.

PALUMBO, M. A.; BEERS, S. M.; BHADURI, S.; PALUMBO, S. A. Thermal resistance of *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* in liquid egg yolk and egg yolk products. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 960-966, 1995.

PERALES, I.; AUDICANA, A. *Salmonella* Enteritidis and eggs. **Lancet**, v. 2, p. 1133, 1988.

POPPE, C.; IRWIN, R. J.; FORSBERG, C. M.; CLARKE, R. C.; OGGEL, J. The prevalence of *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* spp among Canadian registered commercial flocks. **Epidemiology and Infection**, v. 106, p. 259-270, 1991.

QUINTAVALLA, S.; LARINI, S.; MUTTI, P.; BARBUTI, S. Evaluation of the thermal resistance of different *Salmonella* serotypes in pork meat containing curing additives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 107-114, 2001.

RAY, B. **Injured index and pathogenic bacteria: Occurrence and detection in foods, water and feeds**. Florida: CRC Press, 1989. 231 p.

RODRIGUES, T. O inimigo número um. **Avicultura e Suinocultura Industrial**, v. 85, n. 1019, 1995.

SHAH, D. B.; BRADSHAW, J. G.; PEELER, J. T. Thermal resistance of egg-associated epidemic strains of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Food Science**, v. 56, p. 391-393, 1991.

SHU-ER YANG; ROCH-CHUI YU; CHENG-CHUN CHOU. Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp and *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin in egg products. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p. 99-107, 2001.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica**. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 350 p.

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

STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg Science and Technology**. 4. ed. Nova Iorque: The Haworth Press, 1995. 591 p.

ST. LOUIS, M. E.; MORSE, D. L.; POTTER, M. E.; DEMELFI, T. M.; GUZEWICH, J. J.; TAUXE, R. V.; BLAKE, P. A. The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella* Enteritidis infections. New implications for the control of salmonellosis. **Journal of the American Medical Association**, v. 259, p. 2103-2107, 1988.

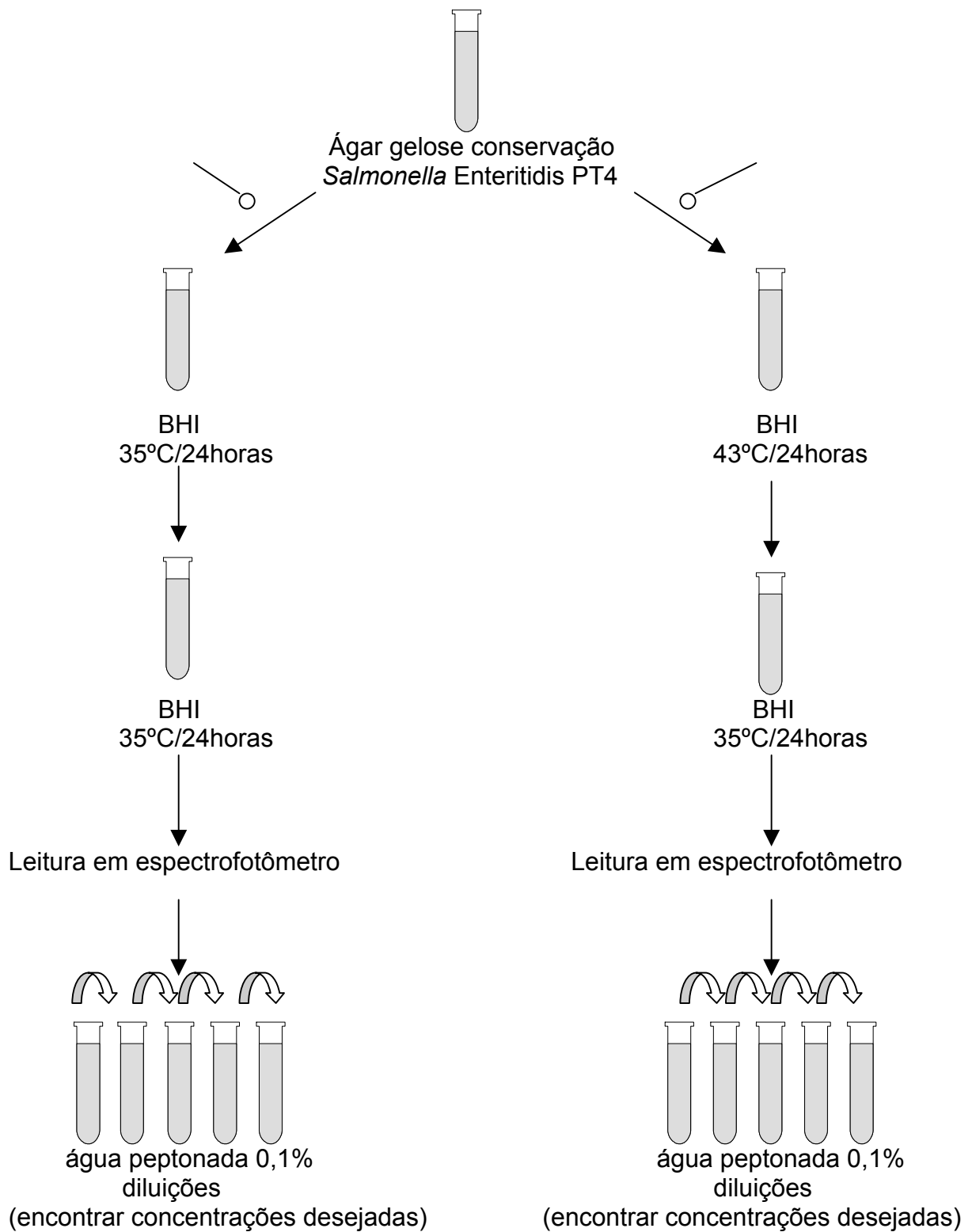
TERRA, C. O ovo é saudável. **Aves e Ovos**, v. 16, n. especial, p. 36, 2001.

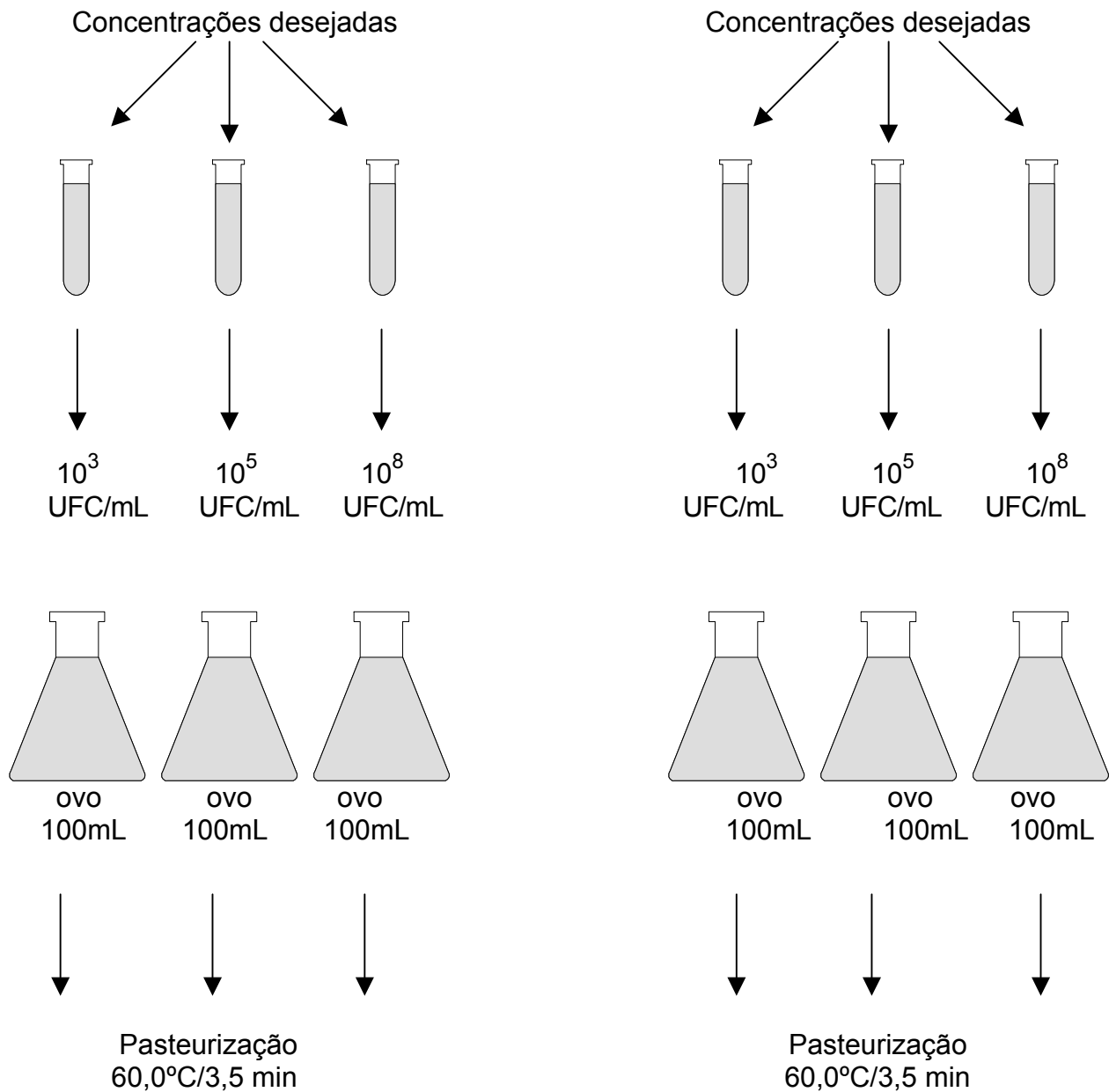
TIMONEY, J. F.; SHIVAPRASAD, H. L.; BAKER, R. C.; ROWE, B. Egg transmission after infection of hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **Veterinary Record**, v. 125, p. 600-601, 1989.

TODD, E. C. D. Risk assessment of use of cracked eggs in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 125-143, 1996.

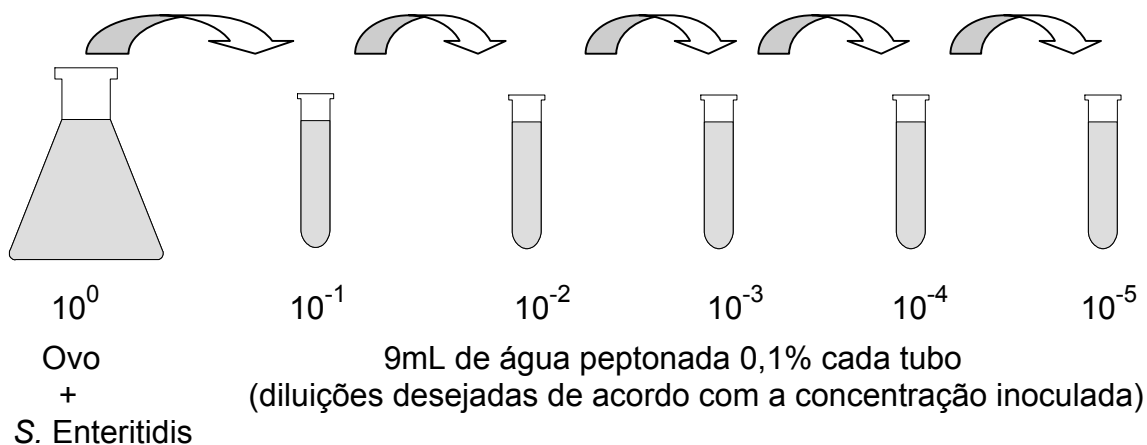
WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella* Enteritidis in pasteurized liquid eggs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 111-125, 1997.

ANEXO

ANEXO A - FLUXOGRAMA

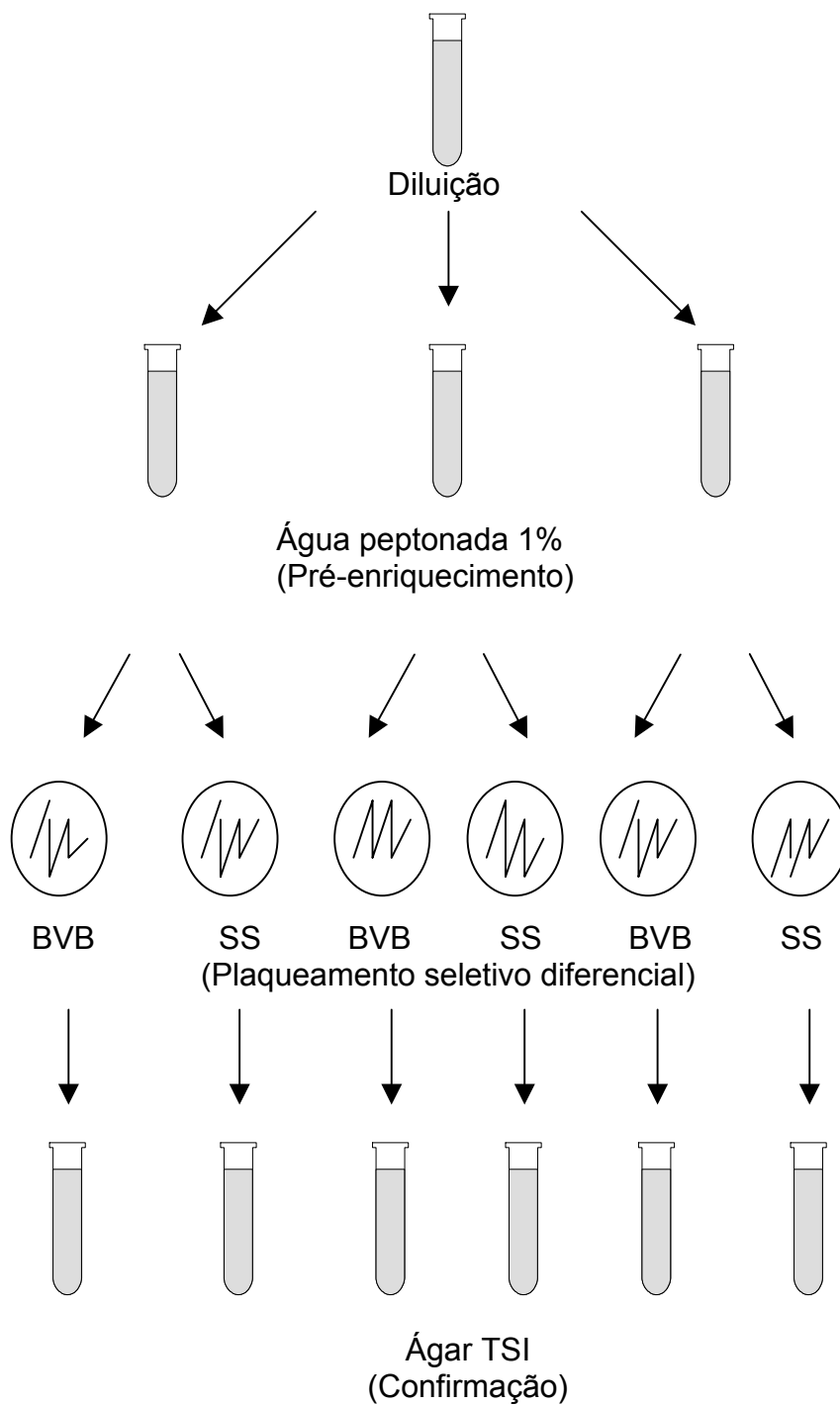


Para cada erlenmeyer (diluição):



Para cada diluição (incluindo 10^0):

NMP:



Para cada diluição (incluindo 10^0):

Contagem:

