



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química

2012

**Susana Esteves  
Davim**

**Metodologias laboratoriais para controlo  
da qualidade de ovoprodutos**



Universidade de Aveiro Departamento de Química

2012

**Susana Esteves  
Davim**

**Metodologias laboratoriais para controlo  
da qualidade de ovoprodutos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Engenheira Cecília Gaspar, Diretora do Departamento de Qualidade do Grupo Derovo.

## **O júri**

Presidente

**Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**

Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva**

Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Ivonne Delgadillo Giraldo**

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Eng<sup>ra</sup> Cecília Gaspar**

Diretora do Departamento de Qualidade da Derovo Group

## **Agradecimentos**

Para a elaboração deste trabalho tive o apoio e a ajuda de várias pessoas a quem gostaria de expressar o meu mais sincero agradecimento.

À minha orientadora, Professora Doutora Ivonne Delgadillo, pela orientação e apoio sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Diretora da Qualidade do Grupo Derovo, Engenheira Cecília Gaspar pela proposta que me fez ao convidar-me para um projeto que se tornou muito importante para o meu enriquecimento pessoal e profissional, e por toda a paciência, simpatia e carinho demonstrados ao longo dos 6 meses de estágio.

A todo o grupo do departamento de qualidade da Ovofoods pelas lembranças dos momentos passados.

À minha família, por sempre acreditarem que este projeto seria possível.

Aos meus amigos, pela força e ajuda incondicional quando mais precisava.

**Palavras-chave**

Ovos, ovoprodutos, qualidade alimentar, métodos de análise.

**Resumo**

Com este trabalho pretendeu-se estudar quais os métodos de análise de microbiologia, de funcionalidade e físico-químicas que mais se adequam ao tipo de produtos analisados assim como estudar as características de alguns dos ovoprodutos produzidos.

Foram estudadas e implementadas as técnicas necessárias e disponíveis, tendo sido estabelecidos métodos para medição de parâmetros de caracterização e controlo da qualidade.

No geral não se observaram diferenças significativas de pH, °Brix e extrato seco entre as amostras reidratadas com água destilada e com água da rede pública.

Os lotes analisados em termos microbiológicos, apresentaram resultados satisfatórios

A capacidade espumante é melhor a pH inferior a 7,22 e mínima a pH 7,67 e 8,17. Volta a aumentar para pH maior que 9. Os lotes de clara com pH inferior a 8 apresentam volumes de espuma mais baixos do que os lotes de pH mais altos. Verifica-se, igualmente, que a estabilidade é maior a pH entre 6,5 e 8,5.

Foram verificadas maiores forças de gel na salsicha de clara e na clara em pó pasteurizada.

Ao longo do estágio também se criaram e organizaram documentos importantes que permitiram um funcionamento seguro e eficaz do laboratório dentro das regras de higiene e segurança aplicadas a indústrias alimentares.

**Keywords**

Eggs, eggproducts, food quality, methods of analysis.

**Abstract**

This work aims to study the methods of microbiological analysis, functional and physicochemical properties that best fit this type of products. Another purpose is the study and analysis of important features of the eggproducts.

The required techniques for this study were analyzed and implemented. Methods were established for measuring and characterizing the quality control parameters.

There were not found significant differences in pH, ° Brix and solids between samples rehydrated with distilled water and tap water.

Batches that were analyzed microbiologically, showed satisfactory results.

The foaming capacity of the egg white is better at pH lower than 7.22 and minimum at pH 7.67 and 8.17. Increases again at pH higher than 9. Batches of egg white with a pH below 8 showed lower foam volume than batches with the highest pH. It appears also that the stability is greater at pH between 6.5 and 8.5.

Larger gel forces were observed in egg white sausages and egg white powder pasteurized.

Important documents were also created and organized throughout the internship. These documents have contributed for a safe and efficient function of the laboratory, according to standard hygiene and safety rules applied to food industries.

# Índice

Palavras-chave .....	i
Resumo .....	i
Keywords.....	ii
Abstract.....	ii
Índice de Figuras .....	vi
Índice de Tabelas .....	ix
Lista de Siglas.....	x
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Ovofoods</i> – caracterização da empresa .....	1
1.1.1. História da empresa .....	1
1.1.2. Descrição das instalações .....	2
1.1.3. Tipos de produtos produzidos na <i>Ovofoods</i> .....	3
1.2. Características da matéria-prima utilizada - o ovo de galinha .....	3
1.3. Tipos de ovoprodutos e sua forma de produção.....	7
1.3.1. Processo de produção de ovoprodutos líquidos e congelados.....	8
1.3.2. Processo produtivo de ovoprodutos desidratados (em pó) .....	11
1.3.3. Processo de produção de ovoprodutos cozidos .....	12
1.4. Características microbiológicas, físico-químicas e funcionais de ovoprodutos líquidos e desidratados .....	14
1.4.1. Características microbiológicas de ovoprodutos líquidos e desidratados	14
1.4.2. Características físico-químicas de ovoprodutos líquidos e desidratados	16
1.4.3. Características funcionais de ovoprodutos líquidos e desidratados.....	17
1.5. Legislação e regulamentação relativa a ovos em casca e ovoprodutos .....	21
1.6. Orgânica de funcionamento do laboratório .....	23

1.6.1.	Diretrizes para organização do laboratório segundo algumas ISO's....	23
1.6.2.	Validação do processo de pasteurização de ovoprodutos líquidos.....	25
1.6.3.	Validação do tempo de vida útil de ovoprodutos .....	25
1.6.4.	Validação e verificação das limpezas realizadas nas diferentes áreas de produção e manipuladores de ovoprodutos .....	26
1.6.5.	Controlo periódico de águas de consumo e de águas de efluentes produzidos .....	26
1.6.6.	Análises de rotina realizada a ovoprodutos durante a produção .....	26
1.7.	Princípios dos métodos de análise de microbiologia, físico-químicas e de funcionalidade .....	27
1.7.1.	Métodos de análises das características microbiológicas de amostras de ovoprodutos, água de consumo ou zaragatoas .....	27
1.7.2.	Métodos de análise das características físico-químicas de amostras de ovoprodutos, água de consumo ou zaragatoas .....	39
1.7.3.	Métodos de análise da funcionalidade de ovoprodutos.....	44
2.	Materiais e métodos.....	49
2.1.	Material e métodos para análises de microbiologia .....	49
2.1.1.	Esterilização de material e meios de cultura .....	50
2.1.2.	Refrigeração e incubação de amostras e meios de cultura .....	51
2.1.3.	Recolha, preparação e caracterização das amostras para análise .....	51
2.1.4.	Método de isolamento e identificação de <i>Listeria</i> com caldos de enriquecimento seletivos .....	53
2.1.5.	Método de isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> com caldos de enriquecimento seletivos .....	54
2.1.6.	Método de identificação de <i>E. coli</i> , aeróbios totais e enterobactérias com 3M™ Petrifilm™ Count Plates .....	55
2.2.	Material e métodos para análises físico-químicas.....	57
2.2.1.	Recolha, preparação e caracterização das amostras .....	59
2.2.2.	Métodos de determinação do °Brix e do pH.....	59



2.2.3.	Método de determinação do extrato seco com balança de halogénio...	60
2.2.4.	Método de determinação da viscosidade .....	60
2.2.5.	Método de determinação da condutividade com condutivímetro de bancada.....	61
2.2.6.	Método de determinação da quantidade de ATP com o <i>Luminometer</i> .	61
2.2.7.	Método de determinação da percentagem de NaCl .....	61
2.3.	Material e métodos para análises de funcionalidade .....	62
2.3.1.	Recolha, preparação e caracterização das amostras .....	63
2.3.2.	Método de reidratação da clara em pó.....	63
2.3.3.	Preparação de amostras para determinação da força de gel .....	64
2.3.4.	Método de determinação da capacidade espumante.....	64
2.3.5.	Determinação da força de gel .....	65
3.	Resultados e Discussão .....	67
3.1.	Análises físico-químicas.....	67
3.1.1.	Determinação do extrato seco de ovoprodutos líquidos.....	67
3.1.2.	Determinação do pH de clara líquida não pasteurizada e clara em pó reidratada .....	68
3.1.3.	Determinação do °Brix de clara e clara em pó pasteurizada reidratada	71
3.1.4.	Determinação do extrato seco de clara em pó pasteurizada e não pasteurizada .....	72
3.1.5.	Determinação do extrato seco da clara em pó não pasteurizada antes e depois de reidratação .....	73
3.1.6.	Determinação de pH, extrato seco e °Brix depois da reidratação de clara em pó com água destilada (D) e com água de rede (R).....	75
3.2.	Análises de microbiologia .....	78
3.2.1.	Análises realizadas a diferentes ovoprodutos .....	78
3.2.2.	Folha de registo de produto terminado .....	81
3.2.3.	Verificação de limpezas.....	82

3.3. Análises de funcionalidade da clara .....	84
3.3.1. Densidade da espuma .....	84
3.3.2. Capacidade espumante .....	85
3.3.3. Estabilidade da espuma .....	86
3.3.4. Comparação de resultados .....	92
3.3.5. Força de gel .....	93
3.4. Composição e organização do laboratório de análises .....	97
4. Conclusões.....	101
5. Referências Bibliográficas.....	103
Anexos .....	101

## Índice de Figuras

Figura 1- Corte longitudinal de um ovo de galinha.....	4
Figura 2 – Optibreaker.....	9
Figura 3 – Pasteurizador.....	10
Figura 4 - Equipamento de ultrafiltração e Spray Drying. ....	12
Figura 5 - (a)Gráfico representativo comportamento da viscosidade da gema dependendo da concentração em Sacarose e NaCL; (b) Gráfico representativo do comportamento da viscosidade da gema depois de determinado tempo em congelação. ....	17
Figura 6 - Roche Yolk Colour Fan .....	44
Figura 7 - Equipamentos utilizados: (a) refratômetro <i>Atago® pocket PAL-α</i> (0 – 85%); (b) refratômetro <i>Atago® palett Pr-201α</i> (0 – 60 %); (c) medidor de pH e temperatura <i>HI 2221 - Hanna® Instruments</i> ; (d) analisador de humidade <i>Sartorius® - MA 35</i> ; (e) analisador de humidade <i>HR 73- Metter® Toledo</i> ; (f) viscosímetro <i>Brookfield® DV-II+Pro</i> ; (g) condutivímetro <i>Serie® InLab 738</i> ; (h) luminômetro <i>3M™ Clean Trace™</i> ; (i) titulador automático <i>848 Titrino Plus – Metrohm®</i> .....	58
Figura 8 - Batedeira industrial Sinmag Mixer SM-200C (Cap. 20L).....	65
Figura 9 -Texturômetro <i>Brookfield CT3 Texture analyzer</i> .....	65
Figura 10 - Gráfico correspondente aos ensaios de determinação de % de extrato seco em ovo líquido não pasteurizado.....	67
Figura 11 - Gráfico correspondente aos ensaios de determinação de % de extrato seco em clara líquida não pasteurizada.....	68
Figura 12 - Gráfico de valores de pH obtidos para os diferentes lotes de clara líquida não pasteurizada .....	69
Figura 13 - Gráfico de valores de pH obtidos para os diferentes lotes de clara em pó pasteurizada reidratada .....	69
Figura 14 - Gráfico de valores de pH obtidos para diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada reidratada .....	70
Figura 15 - Gráfico dos valores de °Brix obtidos nos vários lotes de clara em pó pasteurizada reidratada .....	71

<b>Figura 16 - Gráfico de valores de °Brix obtidos nos diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada reidratada .....</b>	<b>71</b>
Figura 17 - Gráfico de valores de % de extrato seco obtidos nos vários lotes de clara em pó não pasteurizada.....	72
Figura 18 - Gráfico de valores de % de extrato seco obtidos nos diferentes lotes de clara em pó pasteurizada.....	73
Figura 19 - Gráfico de valores de % de extrato seco obtidos nos diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada antes de reidratar .....	74
Figura 20 - Gráfico de valores obtidos de % de extrato seco de diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada depois de reidratar. ....	74
Figura 21 - Gráfico de valores de pH obtidos nos diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada; pH D corresponde a reidratação com água destilada e pH R corresponde a reidratação com água da rede. ....	75
Figura 22 - Gráfico de valores de % de extrato seco obtidos nos diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada depois de reidratada; ext.seco % D corresponde a reidratação com água destilada e est.seco % R corresponde a reidratação com água de rede.....	76
Figura 23 - Gráfico de valores de °Brix obtidos nos diferentes lotes depois da reidratação; °Brix D corresponde a reidratação com água destilada e °Brix R corresponde a reidratação com água de rede .....	76
Figura 24 - Boletim de registo de resultados (com exemplo na primeira coluna) ..	81
Figura 25- Gráfico correspondente aos valores de densidade determinados para os diferentes lotes de clara .....	84
Figura 26 - Gráfico de valores de capacidade espumante determinados para os diferentes lotes de clara .....	86
Figura 27 - Gráfico da estabilidade da clara nos diferentes lotes analisados .....	87
Figura 28 - Gráfico de estabilidade da clara nos diferentes lotes analisados .....	87
Figura 29 - Gráfico representativo da estabilidade da espuma do lote B046 nos sete batidos efetuados .....	88
Figura 30 – a) Estabilidade da clara de lote B088 nos 3 ensaios; b) Estabilidade da clara de lote B072 nos 3 ensaios; c) Estabilidade da clara de lote B046 nos 3 ensaios .....	89

Figura 31 - a) Estabilidade da clara de lote B167 nos 3 ensaios; b) Estabilidade da clara de lote B159 nos 3 ensaios; c) Estabilidade da clara de lote B042 nos 3 ensaios. ....	90
Figura 32 – Gráfico que relaciona a capacidade espumante com o pH.....	92
Figura 33 - a) Relação entre pH e volume de espuma; b) Relação entre estabilidade (quantidade de líquido perdido) e pH.....	92
Figura 34 – Gráfico que relaciona a densidade da espuma com a capacidade espumante.....	93
Figura 35 -a) Força de gel obtida nos ensaios da clara de lote T068 ; b) Força de gel obtida nos ensaios da clara de lote T072 .....	94
Figura 36 - a) Força de gel obtida nos ensaios da clara de lote T075; b) Força de gel obtida nos ensaios da clara de lote T072 .....	94
Figura 37 – a) força de gel obtida nos diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada; b) força de gel obtida nos diferentes lotes de clara em pó pasteurizada .....	95
Figura 38 - Gráfico dos valores de força de gel obtidos nos diferentes lotes de salsichas de clara .....	96

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Composição Nutritiva de um Ovo de Galinha Grande.....	6
Tabela 2 - Classificação de Ovoprodutos .....	8
Tabela 3 – Parâmetros de Análise de Ovoprodutos .....	22
Tabela 4 - Sondas e velocidades utilizadas na determinação da viscosidade.....	61
Tabela 5 –Resultados das análises microbiológicas realizadas a clara líquida, Gema com 11% de sal, Gema com 8% de sal, ovo inteiro, ovo inteiro HS, clara em pó, ovo cozido e salsicha.....	78
Tabela 6 - Resultados das análises de verificação de limpeza nos vários setores de produção .....	83

## **Lista de Siglas**

ADN – Ácido Desoxiribonucleico

ATP – Adenosina Trifosfato

B-P – Meio De Cultura Baird Parker

BGLB – Brilliant Green Lactose Bile

BRC – British Retail Consortium

CIP – Clean In Place

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EMB – gelose Eosin Methilen Blue (azul de metileno e iosina)

ETAR – Estação De Tratamentos De Águas Residuais

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points (Análise de riscos e pontos críticos de controlo)

HS – Heat Stable (estabilizado por calor)

HTST – High Temperature Short Time (altas temperaturas menos tempo)

IFS - Internacional Food Standard

IMM – Iron Milk Medium (meio de ferro e leite)

ISO – International Standard Organization (organização internacional de standardização)

KG –Kim e Goepfert agar

LIC – Limite Inferior de Controlo

LSC – Limite Superior de Controlo

LST – Light Sensitive Tube

MRS –De Man, Rogosa and Sharp agar

MYP –Mannitol-egg-Yolk-Polymyxin agar

NMP – Número Mais Provável

PCR – Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

PEMBA – Polymyxin-Pyruvate-Egg-Yolk-Mannitol-Bromothymol-Blue Agar (gelose de gema de ovo-polimixina-piruvato-manitol-azul de- bromotimol)

PEMPA – Polymyxin-Pyruvate-Egg-Yolk-Mannitol-Bromocresol-Purple-Agar (gelose de gema de ovo-polimixina-piruvato-manitol-púrpura-de-bromocresol)

PET – Embalagens PurePack Ultra-Higiénicas

PLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub>

PVC – Polyvinyl Chloride (policloreto de vinilo)

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomático

RLU – Relative Light Units

RPM – Rotações Por Minuto

TMAO – Óxido De Trimetilamina

TSN – Gelose Trypton Sulfite Neomycin

TTC – Trifenil tetrazólio

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

VRBL – Violet Red Bile Agar with Lactose (gelose de vermelho-violeta com lactose)



## 1. Introdução

O tema deste trabalho baseia-se na implementação de métodos laboratoriais necessários num laboratório de análises de uma fábrica de ovoprodutos. Este tema foi desenvolvido durante um estágio numa fábrica de produção de ovoprodutos, ao longo do qual foram implementadas metodologias que virão a ser utilizadas no controlo de qualidade da unidade.

Antes da implementação e validação dos métodos de trabalho é necessário um conhecimento aprofundado sobre matérias-primas utilizadas e produtos finais obtidos, assim como os processos de fabrico envolvidos e as exigências legais associados à segurança alimentar dos mesmos.

Um método de análise, para poder ser implementado, deve ser anteriormente testado e validado de forma a ser possível interpretar os resultados que esse método providencia e também saber quais os parâmetros a aplicar para cada tipo de amostra e análise utilizada. Assim, devem ser postos à prova vários métodos, realizando-se diversos ensaios para que seja possível chegar a conclusões satisfatórias.

### 1.1. *Ovofoods* – caracterização da empresa

#### 1.1.1. História da empresa

Em Maio de 2010, o Grupo Derovo, constituído por várias empresas reconhecidas nacional e internacionalmente pelo fabrico de ovoprodutos e derivados de ovo, inaugurou uma nova unidade de produção industrial em Espanha – a *Ovofoods*. Esta empresa, localizada em Mieres del Camino (Astúrias), foi desenhada para conseguir processar três milhões de ovos por dia. Possuindo a mais moderna tecnologia de transformação de ovoprodutos, representa um forte investimento e uma grande aposta na internacionalização do Grupo. Com o aumento crescente do número de clientes e, conseqüentemente, de encomendas, a *Ovofoods* tem vindo a desenvolver e a otimizar as suas linhas de produção e processos de fabrico, assim como a implementar regras e normas de segurança alimentar que garantem a qualidade dos seus produtos. Em Janeiro de 2012 a

empresa foi certificada pela IFS (Internacional Food Standard) e BRC (British Retail Consortium). Por volta da mesma altura começou o funcionamento do laboratório de análises.

### **1.1.2. Descrição das instalações**

Entre escritórios e área de produção, a fábrica ocupa cerca de 10 000 m<sup>2</sup>. A área restrita à manipulação e fabrico dos ovoprodutos é constituída por um cais de receção com 5 câmaras de armazenamento de ovo em casca e 1 câmara de armazenamento de aditivos. É aqui que os produtos são rececionados e armazenados depois de inspecionados e, no caso do ovo em casca, avaliados em termos de qualidade.

A área de produção de ovo líquido é constituída por 3 linhas de partidoras, 6 tanques de produto cru (não pasteurizado), dois pasteurizadores e três zonas de enchimento. A zona de produção de ovo cozido está dividida em área de alimentação, com 2 cozedoras, área de seleção e inspeção, com 2 tapetes de inspeção e área de embalamento. A área de produção de ovo em pó está dividida em zona de filtração e fermentação, secador (*Box Dryer*) e tamisador, enchimento e pasteurização.

É na Sala de Controlo Operacional, que se pode ter acesso aos programas de controlo dos processos de produção de ovo líquido, ovo cozido e de ovo em pó. Situada a meio da planta está desenhada de forma a permitir o acesso fácil e rápido a qualquer uma destas áreas de produção.

Ainda fazem parte das instalações a zona de CIP (*Clean In Place*) de contentores, o laboratório de análises internas, o cais de expedição de produto terminado com uma câmara refrigerada de produto final, a centrífuga de cartão usado, a sala de armazenamento de embalagens, e a sala de manutenção.

Encontra-se em desenvolvimento uma zona destinada à picagem de ovo cozido.

### 1.1.3. Tipos de produtos produzidos na *Ovofoods*

A *Ovofoods* comercializa quatro tipos de ovoprodutos: líquidos, congelados, cozidos e em pó.

Os ovoprodutos líquidos podem ser compostos por ovo inteiro, apenas gema ou apenas clara de ovo. As características de cada um destes produtos líquidos pode ser alterada de acordo com o pretendido para o produto final, ou seja, a cada um destes podem ser acrescentados aditivos, como sal ou açúcar, para que o produto final esteja pronto para ser utilizado na preparação de produtos específicos (por exemplo: tortilhas, massas ou gelados).

Para além do *ovo cozido* como se conhece usualmente, são produzidos outros ovoprodutos cozidos de forma não tão convencional. As *salsichas de ovo* ou *salsichas de clara* são feitas a partir de ovo ou clara líquida que depois se coze em tripas sintéticas adquirindo uma forma semelhante a salsichas.

Os *ovoprodutos em pó* representam uma inovação importante para a empresa, tanto em termos de produção como também em termos de descoberta das suas capacidades funcionais. Neste momento, a produção está mais direcionada para clara de ovo em pó em detrimento do ovo inteiro ou gema de ovo.

O processo produtivo dos diferentes produtos será descrito com mais pormenor no ponto 3.

## 1.2. Características da matéria-prima utilizada - o ovo de galinha

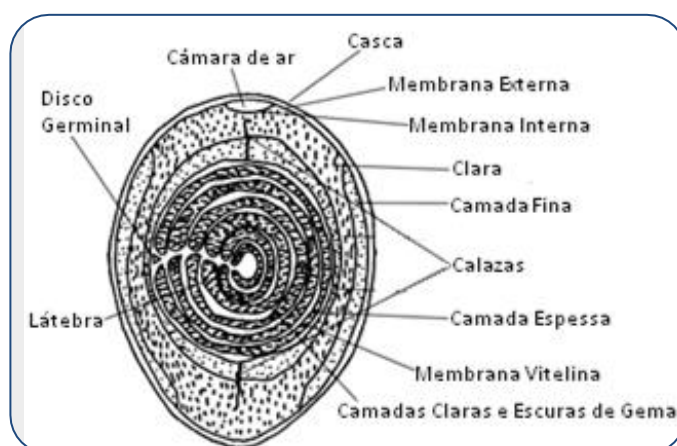
Ao longo de muitos anos e em muitos países, os ovos de galinha têm representado uma importante parte da dieta humana<sup>1, 2, 3</sup>. Em termos nutricionais são de fácil digestão e possuem uma grande quantidade de nutrientes essenciais para o crescimento e manutenção dos tecidos corporais<sup>1</sup>. As suas diversificadas capacidades funcionais, tais como absorção de água, emulsificação e formação de espuma, fazem com que sejam muito utilizados na indústria alimentar<sup>1,2</sup>.

O esquema apresentado na figura 1 representa a estrutura de um ovo de galinha. Para um ovo de peso médio, a casca representa 9,5 % do total do ovo, enquanto a clara representa 63% e a gema 27,5%<sup>4, 5</sup>. Começando do interior para o exterior, os principais elementos são a gema, a clara e a casca.

No centro da gema encontra-se o l tebra que mant m o disco germinal   superfície da gema, local onde ocorrem as divisões celulares e a forma o do embrião. A gema   disposta no centro em anéis conc tricos de cor variada dependendo do tipo de alimenta o da galinha e, encontra-se rodeada por uma membrana semipermeável, a membrana vitelina<sup>1,6</sup>.

A camada fina de clara rodeia a gema e, nos seus extremos, transforma-se em calazas que se estendem para camada grossa de clara<sup>1, 6</sup>. As calazas assemelham-se a duas cordas retorcidas e funcionam como âncora, mantendo a gema no centro do ovo<sup>1, 2,5</sup>.

A casca do ovo   composta por uma camada interna ou mamil ria e, depois, uma camada externa esponjosa revestida por cutícula. Inúmeros poros estendem-se pela casca formando passagem entre a membrana da casca e a cutícula<sup>5,6</sup>. A cutícula tem a fun o de selar parcialmente os poros impedindo a penetra o de microrganismos mas mantendo a permeabilidade gasosa<sup>5,6</sup>. A c mara-de-ar   formada pouco tempo depois da postura, devido   contra o de volume do conteúdo do ovo causado pelo arrefecimento deste. O ar entra pelo extremo mais largo do ovo, pois este apresenta maior concentra o de poros fazendo com que as membranas se separem nesta zona, formando assim a c mara-de-ar<sup>1,2, 5,6</sup>



**Figura 1- Corte longitudinal de um ovo de galinha.**  
Adaptado de Macrae R., 1993 <sup>(7)</sup>

Relativamente   composi o nutritiva da clara, sabe-se que esta   uma soluço aquosa rica nas mais variadas proteínas, entre as quais, a ovoalbumina, a avidina, a lizosima e a ovomucoide<sup>1</sup>. A natureza antibacteriana da maioria das proteínas constitui uma defesa contra o ataque microbiano durante a incuba o<sup>4,6</sup>.  

ainda de salientar a presença de hidratos de carbono (aproximadamente de 1%) que se encontram no estado livre ou ligados a proteínas. Dos primeiros, destaca-se a glucose, manose, galactose, arabinose, xilose, ribose e desoxirribose que representam cerca de 98% dos hidratos de carbono presentes<sup>1</sup>. Por ser riquíssima em aminoácidos essenciais e devido ao equilíbrio que existe entre eles, a clara de ovo é utilizada muitas vezes como referência para validar a qualidade das proteínas de outros alimentos<sup>5</sup>.

É na gema que se encontram as principais vitaminas, lípidos e minerais do ovo. Esta consiste numa mistura de lipoproteínas com exceção da fosvitina que não contém material lipídico e é uma fosfoproteína. O teor em proteínas é de 16% aproximadamente e a fração lipídica varia entre os 32 e os 35% dependendo da espécie de galinha. A fração lipídica é composta na sua maioria por triglicerídeos (66%), fosfolípidos (28%) e apenas 5% de colesterol e o restante 1% de outros lípidos<sup>1,6</sup>. O teor em colesterol é cerca de 2,5%, comparativamente com o teor em sólidos totais da gema<sup>1</sup>.

A Tabela 1 apresenta um resumo dos principais constituintes de um ovo grande (70g aproximadamente) e do seu correspondente de clara e de gema.

**Tabela 1- Composição Nutritiva de um Ovo de Galinha Grande.**  
**Adaptado de Nutrient Data Laboratory Home Page <sup>(8)</sup>**

Componente (unidades)	Ovo inteiro	Clara de ovo	Gema de ovo
<b>Composição genérica</b>			
Calorias (kcal)	72	17	55
Proteínas (g)	6,3	3,6	2,7
Hidratos de Carbono (g)	0,36	0,24	0,61
Matéria gorda (g)	4,8	0,06	4,5
Gordura monoinsaturada (g)	1,8	0	2
Gordura poliinsaturada (g)	1	0	0,72
Gordura Saturada (g)	1,6	0	1,6
Gorduras trans (g)	0,02	0	0,02
<b>Vitaminas</b>			
Riboflavina (mg)	0,2	0,15	0,09
Vitamina B12 (mcg)	0,45	0,03	0,33
Folato (mcg)	24	1	25
Vitamina D (IU)	41	0	37
Vitamina A (IU)	270	0	245
Vitamina B6 (mg)	0,09	0	0,06
Tiamina (mg)	0,02	0	0,03
Vitamina E (mg)	0,5	0	0,44
<b>Minerais</b>			
Selénio (mcg)	15,4	6,6	9,5
Fósforo (mg)	99	5	66
Ferro (mg)	0,88	0,03	0,46
Zinco (mg)	0,65	0,01	0,39
Cálcio (mg)	28	2	22
Sódio (mg)	71	55	8
Potássio (mg)	69	54	19
Magnésio (mg)	6	4	1
<b>Outros</b>			
Colina (mg)	126	0,4	116
Colesterol (mg)	186	0	184

### 1.3. Tipos de ovoprodutos e sua forma de produção

Tradicionalmente, as indústrias agroalimentares que necessitavam de ovos nas suas produções [pastelarias e doçarias, fabricantes de “*dressings*” (acompanhamentos de saladas), produtores de massas alimentícias, entre outras] recebiam os ovos encascados fazendo com que fosse necessário parti-los manualmente. A necessidade imposta pelas grandes empresas fez com que o aparecimento de ovoprodutos fosse inevitável. Para além disso, as normativas sobre segurança alimentar estão cada vez mais direcionadas para que, no futuro, estas indústrias substituam ovos por ovoprodutos pasteurizados<sup>9</sup>. Em Espanha, o Real Decreto 1254/1991 proíbe o uso de ovos frescos na restauração coletiva para qualquer prato cozinhado a uma temperatura inferior a 75°C<sup>5</sup>.

Devido a estes fatores o mercado de ovoprodutos encontra-se em pleno crescimento; por exemplo, em França representa mais de 30% da utilização de ovos, valor este que está em constante evolução<sup>5, 9</sup>. É um sector agro-alimentar onde as perspetivas de desenvolvimento económico são relativamente importantes<sup>3, 9</sup>. Aproximadamente 15% da produção espanhola de ovos tem como destino a transformação em ovoprodutos. Os principais países europeus produtores de ovoprodutos são França, Alemanha, Bélgica, Holanda e Itália. No caso da França 26% dos ovos são destinados ao fabrico de ovoprodutos<sup>5</sup>.

Segundo o Regulamento (CE) n.º 853/2004 do parlamento europeu e do conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, os ovoprodutos são definidos como produtos transformados resultantes da transformação dos ovos ou de vários componentes ou misturas de ovos ou ainda de outra transformação desses mesmos produtos.

As vantagens técnicas destes produtos prendem-se a fatores tais como a possibilidade de ajustar a composição para as proporções de gema/clara/aditivos conforme desejado; a possibilidade de controlar a qualidade microbiologia, limitando a contaminação inicial pela matéria-prima, eliminando contaminações com pasteurização e impedindo o desenvolvimento de microrganismos por estabilização e refrigeração; é ainda de referir a possibilidade de poder controlar as propriedades funcionais dos produtos<sup>3, 5, 9</sup>.

Os ovoprodutos podem ser classificados segundo vários critérios. A Tabela 2 apresenta quatro classificações possíveis.

**Tabela 2 - Classificação de Ovoprodutos Adaptado de Gallego, 2002<sup>(9)</sup>**

Tipo de Classificação	Designação	Descrição
Por componentes	Primários (Líquidos)	Ovo inteiro, gema clara e misturas.
	Compostos	Com outros ingredientes mas com 50% de ovo no mínimo (ex. tortilhas de batata).
Por forma física e tratamento	Líquidos refrigerados	Pasteurizados ou não pasteurizados.
	Líquidos concentrados	Pasteurizados ou não pasteurizados.
	Congelados	Normalmente ultracongelados.
	Secos	Concentrados (20 a 25% de humidade) ou desidratados (3 a 5% de humidade).
Por forma de uso	Ingredientes	Como matérias-primas na elaboração de outros produtos.
	Produtos de valor acrescentado	Preparados pre-cozinhados em que o ovo é o ingrediente principal.
	Componentes isolados separados	Por fracionamento da clara ou da gema.
Por duração de vida comercial	Curta	Líquidos pasteurizados convencionalmente (5 a 12 dias)
	Média	Líquidos ultrapasteurizados (4 a 6 semanas) e concentrados (vários meses).
	Longa	Desidratados e congelados (1 ano ou mais).

### **1.3.1. Processo de produção de ovoprodutos líquidos e congelados**

A produção de ovoprodutos líquidos começa com a seleção das matérias-primas. Os ovos em casca ou líquidos devem ser inspecionados aquando da sua receção de forma a garantir que se encontram nas condições ideais para a produção, isto é, os ovos devem ser analisados visualmente quanto ao seu aspeto exterior, se se encontram sujos ou fissurados, e também quanto à sua frescura<sup>3</sup>. No caso do ovo líquido recebido como matéria-prima, este deve ser analisado em termos microbiológicos e físico-químicos para se poder decidir o seu destino na produção.

Os ovos são lavados a temperaturas elevadas e secos para não chegarem à partidora com humidade.



A Optibreaker (Figura 2) é uma partidora que separa automaticamente as cascas da gema e da clara. O reconhecimento da quantidade de gema presente na clara permite fazer uma separação de acordo com as proporções de clara/gema pretendidas no produto que se está a produzir.

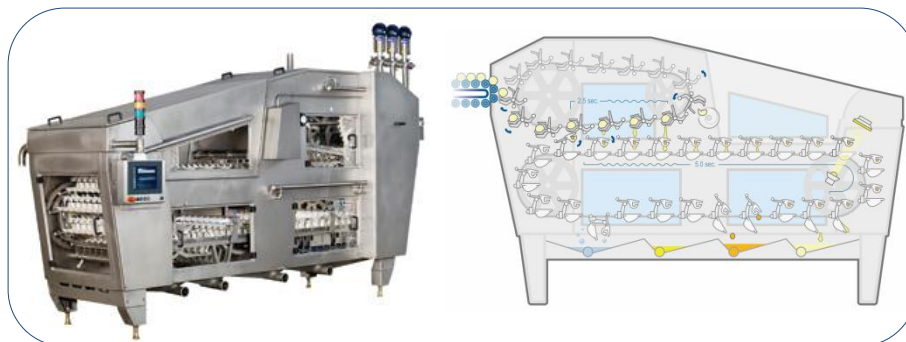


Figura 2 – Optibreaker. Adaptado de <http://www.sanovogroup.com> <sup>(18)</sup>

A partir deste ponto, os produtos separados seguem diferentes caminhos. A gema e a clara após a separação, seguem para os tanques de produto cru enquanto as cascas, por sua vez, são secas e compactadas antes de serem recolhidas por um sistema de recolha de resíduos.

A filtração é um processo fundamental e ocorre antes da homogeneização e pasteurização dos produtos líquidos. Aqui eliminam-se as pequenas partículas que possam ter permanecido, como por exemplo calazas ou coágulos de sangue. Como é um ponto frequente de contaminação microbiana, ao longo do dia é efetuada várias vezes a limpeza (CIP) destes filtros.

Os produtos, depois de filtrados e antes do processo de pasteurização, são mantidos em tanques refrigerados a temperaturas entre os 3 e os 4 °C. É nesta fase que são acrescentados os aditivos (quando desejado) e, em seguida, homogeneizados facilitando assim o processo de pasteurização.

A pasteurização é o passo mais importante do fabrico de ovoprodutos. A sua finalidade é eliminar a *Salmonella* e reduzir a carga microbiana que possa existir nos produtos sem danificá-los do ponto de vista funcional<sup>10, 11, 3</sup>. O fator tempo/temperatura empregue é diferente consoante o produto que se está a pasteurizar, existindo valores mínimos fixos pelas autoridades em alguns países<sup>5</sup>. Para conseguir esses valores, é necessário partir de uma matéria-prima com carga microbiológica aceitável e garantir procedimentos de CIP eficazes em toda a linha de produção<sup>10,11,12</sup>.

O processo de pasteurização é realizado em equipamentos que podem ser permutadores de placas ou tubulares (Figura 3) onde se atingem as temperaturas necessárias. Em seguida o produto passa para tubos de retenção onde ficam durante o tempo pretendido.



Figura 3 – Pasteurizador. Adaptado de <http://www.sanovogroup.com><sup>(18)</sup>

Alguns produtores usam o teste da  $\alpha$ -amilase da gema a fim de verificar a eficácia da pasteurização. A enzima deve ser destruída pelo calor a temperaturas de 64,4°C durante 2 a 5 minutos. Não se pode utilizar este teste se for adicionado ao produto sal ou açúcar<sup>13, 14</sup>.

Imediatamente após a pasteurização é necessário assegurar que os produtos são arrefecidos a 4°C. Daqui, os produtos podem ter vários destinos possíveis: o embalamento, para serem vendidos como produtos líquidos; o embalamento seguido de congelação originando assim, ovoprodutos congelados; a secagem para produção de ovo em pó, ou então, a cozedura (produção de salsichas de ovo ou clara).

O acondicionamento pode ser realizado antes do enchimento, em contentores de inox esterilizados que podem levar de 200 até 1000kg de ovo líquido, caixas de cartão com bolsas plásticas asséticas (*bag-in-box*) para consumidores menores (20kg, 10kg ou 5kg) ou embalagens PurePack ultra-higienicas (PET)<sup>3</sup>.

Antes de serem congelados os produtos líquidos são embalados geralmente em bolsas plásticas. É importante que o processo de congelação ocorra de forma rápida em túneis de congelação e as temperaturas internas dos produtos atinjam entre 15 e 18 graus negativos.<sup>3</sup> A descongelação dos produtos antes da sua utilização deve ser controlada por parte do consumidor, pois deve ser realizada a

temperaturas de refrigeração evitando assim crescimentos microbianos indesejáveis<sup>3</sup>.

### 1.3.2. Processo produtivo de ovoprodutos desidratados (em pó)

Os ovoprodutos desidratados oferecem um leque de vantagens ao consumidor, tais como maior tempo de vida útil, que pode ser de 2 anos para clara de ovo em pó; facilidade de armazenamento e transporte por não necessitarem de refrigeração e por ocuparem um espaço reduzido quando comparado com outros produtos. Apresentam também funcionalidade interessante a nível tecnológico<sup>15,16</sup>.

O método de “*Spray Drying*” (secagem por atomização), é o método mais utilizado atualmente na produção de ovo, gema ou clara em pó, sendo que o produto com maior interesse comercial é a clara em pó. A reconstituição para o estado líquido não apresenta muitos problemas. No entanto, quando comparado com ovo líquido, pode haver perda de frescura e de algumas características funcionais.

O processo de secagem é realizado em equipamentos que possuem torres de atomização. À medida que o produto passa é submetido à ação de uma forte corrente de ar quente a temperaturas que variam entre os 160°C (no caso da clara) e os 200°C (para a gema)<sup>1, 3</sup>. O produto, depois, é imediatamente arrefecido com correntes de ar de temperaturas entre os 25 e os 30°C<sup>1</sup>. Como apresenta elevada higroscopicidade deve ser imediatamente embalado, evitando que o seu teor em humidade aumente<sup>17</sup>. Depois de embalado o produto é submetido a pasteurização numa sala fechada, processo designado por pasteurização em “Hot Room”<sup>3, 9</sup>.

No caso da clara de ovo, o processo difere ligeiramente. A clara líquida ainda crua sofre um processo de fermentação realizado por adição de leveduras ou de enzimas, com o objetivo de remover a glucose presente. Esta, ao ser removida, evita a ocorrência de reações de acastanhamento não enzimático durante a secagem do produto, para além de aumentar a resistência do produto a ataques microbianos<sup>3,16,18</sup>. As consequências seriam o escurecimento do produto, diminuição da solubilidade e, também aparecimento de odores desagradáveis. A fermentação pode ser realizada utilizando fermentação bacteriana “natural”, fermentação bacteriana controlada, fermentação por leveduras ou fermentação enzimática. A primeira trata-se de um processo que ocorre durante 3 a 7 dias onde a

contaminação natural e a diminuição do pH favorecem a desnaturação da ovomucina. Esta ao flocular na superfície é depois facilmente retirada por filtração. Este processo pode originar odores desagradáveis e apresenta inúmeros riscos bacteriológicos e organoléticos<sup>9</sup>. O processo de fermentação bacteriana controlado é realizado em 24h com diferentes cepas de *Streptococcus* e *Lactobacillus* que conseguem eliminar a glucose<sup>9</sup>. A fermentação com leveduras é a mais rápida e económica, demora 2 a 4 horas e a levedura mais frequentemente utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*<sup>9</sup>. A fermentação enzimática é feita mediante a utilização da glucose oxidase. Esta catalisa a oxidação da  $\beta$ -d-glucose pelo  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogénio) em D-glucono-1,5- lactona<sup>18</sup>.

A clara de ovo em pó é um produto muito mais estável do que ovo ou gema em pó que geralmente não sofrem fermentação devido aos defeitos organoléticos finais que surgem, assim como perda de cor<sup>3,9</sup>.

Antes do processo de fermentação, a clara de ovo pode, em alguns casos, sofrer um processo de ultrafiltração. Este processo tem como finalidade aumentar a matéria seca total da clara antes da fermentação. Consiste na filtração de produtos líquidos utilizando pressão hidroestática sob uma membrana semipermeável. Os sólidos suspensos e os solutos de alto peso molecular ficam retidos enquanto a água e os solutos de baixo peso molecular passam pela membrana<sup>19</sup>. Com este processo, a matéria seca da clara aumenta de 10 a 12% para 20 a 24%, reduzindo assim a energia necessária para a secagem do produto líquido<sup>1,19</sup>. A Figura 4 representa um equipamento de ultrafiltração (esquerda) e de Spray Drying (direita).



Figura 4 - Equipamento de ultrafiltração e Spray Drying. Adaptado de: <http://www.sanovogroup.com><sup>(18)</sup>

### 1.3.3. Processo de produção de ovoprodutos cozidos

A produção de ovo cozido têm vindo a aumentar nos últimos anos, o que se deve principalmente ao facto de serem muito utilizados pela indústria hoteleira e

de *catering*. O cozimento é feito por imersão dos ovos em água quente (90°C aproximadamente) durante 12 a 15 minutos dependendo das características do ovo utilizado na produção. O ovo é arrefecido imediatamente a seguir em água gelada (cerca de 3°C). Este choque térmico vai ajudar à fase seguinte - o descasque. É a fase mais sensível do processo pois implica o manuseamento direto do produto pelos operadores. O embalamento é feito em embalagem plásticas que são seladas e onde os ovos cozidos ficam submersos numa solução de salmoura, ácido cítrico e ácido acético a fim de os proteger do desenvolvimento microbiano. A refrigeração, juntamente com a salmoura, faz com que estes produtos tenham um tempo de vida útil mais alargado<sup>9</sup>.

Os principais problemas relacionados com a produção de ovos cozidos são: a possibilidade de explosão da casca durante o cozimento, a dificuldade ao descascar os ovos depois de arrefecidos e a formação de um círculo verde na junção entre a gema e a clara<sup>3,9</sup>. Este último deve-se à degradação de aminoácidos com enxofre presentes na clara de ovo, produzindo H<sub>2</sub>S que reage com o ferro libertado da gema, formando, então, sulfeto de ferro de coloração esverdeada.<sup>3</sup> Esta reação é favorecida pelo arrefecimento lento e pH elevado<sup>9</sup>.

Para além dos tradicionais ovos cozidos, existem novas soluções no mercado de ovoprodutos cozidos cada vez mais apelativas. Um exemplo disso são as salsichas de ovo e salsichas de clara. São feitas a partir de ovoprodutos líquidos pasteurizados com um processo de cozimento e arrefecimento semelhante ao utilizado para os ovos em casca. Para o formato de salsicha utiliza-se um material sintético semelhante a uma tripa que se enche com o produto (ovo ou clara) líquido conforme pretendido. No final obtém-se uma “*salsicha*” que pode ser cortada em fatias ou picada para ser utilizada em sanduiches ou saladas.

Em anexo encontram-se os diagramas de produção de ovoprodutos líquidos (anexo1), ovoprodutos em pó (anexo 2) e ovoprodutos cozidos (anexo3)

## 1.4. Características microbiológicas, físico-químicas e funcionais de ovoprodutos líquidos e desidratados

Aqui serão abordadas as diferentes características microbiológicas, físico-químicas e funcionais dos ovoprodutos líquidos e desidratados que vão ser analisados.

### 1.4.1. Características microbiológicas de ovoprodutos líquidos e desidratados

A flora inicial de ovo líquido cru (não pasteurizado) é constituída por uma flora de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que podem ser provenientes da matéria-prima inicial, da casca dos ovos, do processamento inicial de partição e filtração ou então provenientes da manipulação durante a produção.<sup>13</sup> Um único ovo podre, para além de acrescentar milhões de bactérias ao produto, também vai contaminar os equipamentos das linhas de produção. Os ovos com sujidade ou com fissuras ou aqueles que foram incubados ou armazenados durante bastante tempo também vão aumentar significativamente o nível de contaminação inicial de ovo cru<sup>13</sup>.

Muitos estudos demonstram que a resistência térmica da *Salmonella* varia dependendo da espécie e da estirpe e também das características físico-químicas particulares de cada ovoproduto<sup>13</sup>. Esta consegue crescer rapidamente na gema de ovo, tanto em aero como anaerobiose<sup>14, 20</sup>.

Os *Staphylococcus aureus* crescem a temperaturas próximo de 15,6°C e são capazes de crescer em  $a_w$  (atividade da água) reduzidos, o que significa que pode haver desenvolvimento em ovoprodutos com aditivos (por exemplo gemas de ovo salgadas)<sup>14</sup>.

A ocorrência de *E.coli* entero-hemorrágica é muito baixa. Devido ao seu predomínio em ovos em casca ser diminuto e as temperaturas de pasteurização aplicadas serem suficientes para inativar este patogénico<sup>13,14,21</sup>.

A *Listeria monocitogenes* é um microrganismo psicotrópico (que cresce a temperaturas inferiores a 7°C) patogénico que merece alguma atenção. Investigações sobre a resistência térmica deste microrganismo revelam que a

pasteurização empregue na produção de ovoprodutos é suficiente, para a sua destruição quando os níveis de contaminação iniciais são baixos<sup>13,14,21</sup>.

A pasteurização também destrói microrganismos como *Pseudomonas*, *Acinetobacterias* e *Enterobacterias* que crescem na clara crua de ovo. Elimina micrococcos, estafilococos, algumas espécies de *Bacillus*, *Enterococcus* e bacilos catalase-positiva<sup>14, 21</sup>. Deve ter-se em conta que a presença de alguns microrganismos pode indicar re-contaminação depois da pasteurização dos produtos durante as restantes fases de produção<sup>14</sup>.

Os sobreviventes do processo de pasteurização são geralmente *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e alguns Gram-negativos, no entanto, maioria destes sobreviventes são incapazes de resistir a temperaturas inferiores a 5°C. A estirpe psicotrópica de *Bacillus cereus* pode, no entanto, causar alguns problemas. Assim, por vezes é adicionada nisina com a finalidade de controlar o crescimento desta bactéria formadora de esporos, assim como para prolongar o armazenamento do produto refrigerado<sup>13, 14</sup>.

Normalmente, o processo de pasteurização tem de ser mais severo para ovoprodutos líquidos com sal ou açúcar adicionado, já que a resistência bacteriana aumenta com os solutos adicionados<sup>13,14</sup>. Por outro lado, os ovoprodutos pasteurizados aos quais se adicionou sal ou açúcar apresentam um tempo de vida significativamente maior devido à diminuição da  $a_w$  provocada por essa aditivação<sup>13,14</sup>.

No caso de ovoprodutos desidratados, as bactérias que predominam são *Enterococcus* e os *Bacillus spp.* A contagem microbiana de *Salmonella* é reduzida 10 000 vezes com a secagem, mas deve ter-se atenção ao processo de secagem. O problema pode existir no caso de a *Salmonella* crescer durante a fermentação para remoção da glucose. No entanto, a *Salmonella* pode ser destruída mais tarde, depois, no processo de pasteurização realizado na “*Hot Room*”, como comprovam algumas pesquisas, ou então por irradiação<sup>13,14</sup>.

A *L. monocitogenes* também é capaz de sobreviver durante bastante tempo em ovo em pó e em gema em pó armazenados em refrigeração, mas diminui com o tempo quando se armazena a 20°C<sup>14, 22</sup>.

Tanto para ovoprodutos líquidos como em pó, a pasteurização deve garantir que microrganismos como *Salmonella*, coliformes, *E.coli* e enterobactérias sejam

eliminados. Assim, consideram-se estes como os principais microrganismos indicadores da integridade do processo de pasteurização<sup>14</sup>.

#### **1.4.2. Características físico-químicas de ovoprodutos líquidos e desidratados**

O controle do pH de ovoprodutos líquidos está diretamente relacionado com as alterações relativamente à qualidade microbiana. Quando ocorre fermentação microbiana o ácido formado vai provocar uma diminuição no pH nos produtos. Assim, considera-se que, no caso do ovo inteiro, um pH inferior a 7,1 indica ocorrência de fermentação do produto enquanto para gema e clara os valores de referência são inferiores a 6,2 e 8,2, respetivamente.

Os índices de qualidade mais utilizados para ovoprodutos líquidos são o conteúdo em sólidos totais e a matéria gorda. A fração de clara e gema são caracterizadas por extratos secos, sólidos totais muito distintos<sup>23</sup>. Estes índices estão diretamente correlacionados com as suas propriedades funcionais<sup>24</sup>. Os seus valores são influenciados pela composição de clara/gema que os constitui. O conteúdo em sólidos pode ser corrigido durante o processo de produção<sup>25,26</sup>. Por exemplo, em Itália os valores estabelecidos para a razão clara/gema na preparação de massa (*pasta*) encontram-se entre 23,5 e 25,5%, enquanto, para produtos como maionese e gelados devem apresentar teores totais de 22,5 a 23,5% e 23,5 a 24,5% respetivamente<sup>24</sup>.

Estudos sobre as características reológicas de ovo líquido foram realizados por vários autores que tanto o consideram um fluido Newtoniano como um fluido não Newtoniano dependente do tempo<sup>27</sup>. A clara de ovo congelada fica nitidamente mais espessa (ou seja, menos fluida) depois de descongelada, enquanto no caso da gema a viscosidade aumenta irreversivelmente para temperaturas de congelação menores que 6°C negativos<sup>1, 28</sup>. A sua consistência de gel depois de descongelada pode dificultar a sua utilização em processos produtivos<sup>1, 28</sup>.

O ovo líquido descongelado apresenta problemas similares mas com uma extensão menor do que a gema. Se for aplicado um tratamento mecânico depois da descongelação a viscosidade pode diminuir. A gelificação também pode ser evitada adicionando 2 a 10% de cloreto de sódio ou 8 a 10% de sacarose à gema. A consistência de ovoprodutos congelados é influenciada pelos gradientes de



temperatura durante a congelação e descongelação assim como o tempo de duração da congelação<sup>1,5</sup>.

Assim, deve se garantir que estes processos ocorram de forma rápida. Os processos moleculares que levam à formação de gel com a congelação não são ainda totalmente conhecidos. Provavelmente, a formação de cristais de gelo causam uma desidratação parcial das proteínas acopladas a lipoproteínas<sup>1</sup>. Na Figura 5 pode-se observar um gráfico representativo do comportamento da viscosidade da gema dependendo da concentração em sacarose e cloreto de sódio (a) e um gráfico representativo da viscosidade da gema depois de algum tempo de congelação (b).

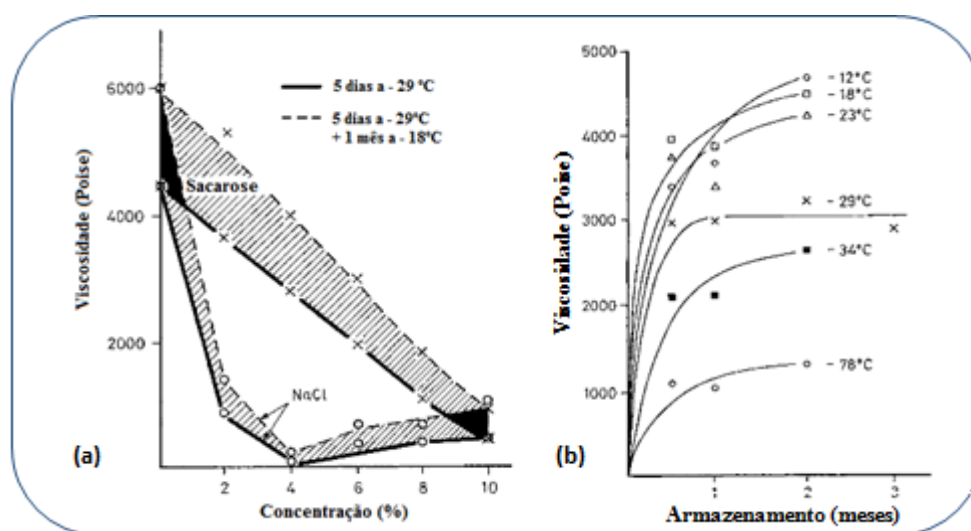


Figura 5 - (a)Gráfico representativo comportamento da viscosidade da gema dependendo da concentração em Sacarose e NaCl; (b) Gráfico representativo do comportamento da viscosidade da gema depois de determinado tempo em congelação. Adaptado de Belitz, et al. 2009<sup>1</sup>

As propriedades funcionais dos ovoprodutos têm sido o alvo de estudo de alguns cientistas nos últimos anos. Em especial destaque estão as proteínas de clara de ovo e as suas capacidades de formação de espumas, emulsão e formação de gel<sup>1,2,3,14</sup>.

É importante assegurar que as capacidades destes produtos permaneçam inalteradas ou então que sejam melhoradas com os processos térmicos para que o produto final obtido contenha as características desejadas.

#### 1.4.3. Características funcionais de ovoprodutos líquidos e desidratados

As diferentes capacidades funcionais apresentadas pelos ovos são o que fazem deles uns dos produtos mais interessantes a nível de indústria alimentar. Ao

transformá-los em ovoprodutos, estas capacidades devem ser tidas em conta de modo a não serem diminuídas durante o processamento.

#### **1.4.3.1. Constituição da espuma e estudos da capacidade espumante da clara de ovo**

A capacidade espumante é uma funcionalidade importante, por exemplo, para produtos como merengues ou molotofes que necessitam de claras-em-castelo no seu fabrico. As propriedades espumantes das proteínas são influenciadas por vários parâmetros incluindo as características de pré-processamento térmico ou químico, método e tempo de batadura e características químicas das proteínas, assim como de fatores ambientais como força iónica e pH<sup>29,30</sup>.

A espuma (claras-em-castelo) consiste num sistema de duas fases em que a fase dispersa é composta por ar e a fase superficial é composta por uma fina camada de proteínas desnaturadas<sup>31</sup>. As proteínas da clara de ovo são desnaturadas mecanicamente no processo de batadura. Nessas moléculas proteicas existem grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. As hidrofílicas estão direcionadas diretamente para a fase líquida enquanto o grupo hidrofóbico está direcionado para a fase de ar.<sup>16</sup> Durante a batadura ocorrem alterações que provocam uma diminuição da tensão e da energia que vão influenciar a formação e estabilidade da espuma<sup>1,31</sup>.

A ovomucina forma uma película de material insolúvel entre a fase líquida e as bolhas de ar, estabilizando a espuma.<sup>1</sup> As globulinas presentes também contribuem para este efeito através do aumento da viscosidade e diminuição da tensão superficial, dois fatores importantes para a fase inicial do processo de batadura<sup>30,31</sup>.

As proteínas funcionam como surfatantes devido às capacidades de adsorção que apresentam na interface criada de ar-água durante a formação de espuma<sup>31,32</sup>. Esta adsorção diminui a tensão interfacial, promovendo a formação de bolhas. Imediatamente depois da adsorção, as atrações proteína-proteína podem levar à formação de uma rede que promove a estabilidade das bolhas<sup>31,32</sup>.

Por exemplo, na produção de *angel-cake* (pão-de-ló), uma clara de ovo sem ovomucina nem globulinas faz aumentar do tempo de batadura e diminuição do volume final<sup>33,34</sup>. Por outro lado, um teor demasiado elevado de ovomucina vai diminuir a elasticidade da película de ovomucina e, como consequência, diminuir a

expansão das bolhas de ar da espuma<sup>35</sup>. A estabilidade da espuma pode ser aumentada por polímeros de conalbumina e ovoalbumina<sup>1,32</sup>. A presença de pequenas quantidades de gema na clara de ovo pode reduzir o volume final de espuma<sup>1</sup>.

No caso da clara em pó, segundo um estudo realizado por Lechevalier et al (2007)<sup>15</sup>, as propriedades espumantes da clara são seriamente danificadas durante o processo de secagem por aspersão (*spray drying*)<sup>15</sup>. Assim, as propriedades da clara em pó podem ser melhoradas através da adição de proteínas de soro de leite, caseínas e soro de albumina bovina. Também se pode aumentar a capacidade espumante com uma ligeira proteólise e hidrólise parcial dos oligossacarídeos das glicoproteínas por tratamento com amílases<sup>1</sup>.

Podem produzir-se espumas estáveis com gema de ovo apenas quando esta se aquece a temperaturas ideais de 72°C. O volume final é cerca de seis vezes maior. Acima da temperatura ideal o volume diminui e as proteínas coagulam. Para prevenir a coagulação, o pH é reduzido por exemplo por adição de ácido acético. Este processo é muito usado na produção de *dressings* altamente estáveis<sup>1</sup>.

#### **1.4.3.2. Capacidade coagulante das proteínas da clara de ovo**

As proteínas da clara de ovo são muito estudadas devido à sua capacidade de gelificação. Foram conduzidos muitos estudos com o fim de estudar a correlação entre as propriedades estruturais das proteínas da clara (principalmente ovoalbumina) e as suas propriedades funcionais. Nesses estudos foi dada grande atenção às alterações induzidas pelo tratamento térmico nas propriedades estruturais das proteínas, levando a alterações das características funcionais<sup>36, 37, 38, 39</sup>.

Os géis de proteínas tridimensionais são estabilizados por ligações intermoleculares tais como ligações de hidrogénio e ligações cruzadas de dissulfito<sup>40</sup>.

A clara de ovo coagula a partir dos 62°C enquanto a gema coagula a 65°C. A temperatura de coagulação é influenciada pelo pH. Quando o pH se encontra acima ou igual a 11,9 a clara gelifica mesmo a temperatura ambiente, apesar de liquidificar passado algum tempo. Todas as proteínas de ovo coagulam,

exceto a ovomucina e fosvitina. A conalbumina é particularmente sensível mas pode estabilizar por complexação com iões metálicos<sup>1</sup>.

A capacidade de coagulação das proteínas de clara apresenta grande interesse comercial para a indústria de subprodutos de peixe, como por exemplo na produção de *surimi*.

#### **1.4.3.3. Capacidade emulsionante apresentada pela gema de ovo e sua estabilização com recurso a processos tecnológicos**

A capacidade de emulsão da gema de ovo pode ser melhorada enzimaticamente. Alguns estudos realizados demonstraram que o poder emulsionante da gema está altamente dependente das condições ambientais (pH e força iónica) e que esse poder é intensificado pelo tratamento térmico<sup>41, 42</sup>. Como a gema líquida deve ficar a temperaturas baixas (0 a 6 °C), a sua capacidade emulsionante é menor. Considerando que os fosfolípidos são importantes para o poder emulsionante da gema, se estes forem modificados vão alterar a estrutura da fração lipídica especialmente localizada na interfase aquosa, alterando também a emulsão da gema<sup>41,42</sup>. A fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA2) é uma enzima que hidrolisa o grupo acilo na posição 2, convertendo os fosfolípidos em lisofosfolípidos que apresentam maior solubilidade em água. A conversão dos fosfolípidos vai melhorar, não apenas o poder de emulsão, mas também a estabilidade ao tratamento térmico. Esta estabilização térmica vai até aos 80°C, ao contrário da gema não tratada (estável apenas até 60°C)<sup>41,43</sup>.

Num estudo, realizado por Guilmineau et al. (2006), foi avaliado o impacto dos tratamentos térmicos na capacidade de emulsão da gema de ovo e verificaram que a desnaturação térmica da gema de ovo pode alterar as suas funcionalidades como emulsionante e, por consequência as propriedades da emulsão óleo/água são modificadas<sup>44</sup>. Nesse estudo, foi verificado que a atividade emulsionante da gema desnaturada termicamente é similar ou ainda melhor do que a gema normal, dependendo das características ambientais<sup>44</sup>.

Outro estudo realizado pelos mesmos autores demonstrou que o comportamento emulsionante depende muito das condições ambientais (pH e força iónica) assim como o tratamento térmico da gema consegue melhorar as propriedades emulsionantes, também verificado por Damier et al. (2009)<sup>41, 45</sup>.

As proteínas parcialmente desnaturadas conseguem ser melhores adsorventes na interfase água/óleo e nas emulsões estabilizadas do que as proteínas da gema normais. Emulsões preparadas com gemas estabilizadas por aquecimento são menos sensíveis à variação de pH e força iónica. O efeito positivo foi atribuído ao aumento da repulsão entre as gotas de óleo quando os agregados compostos por proteínas desnaturadas cobrem a interfase óleo/água. Os resultados demonstram claramente que as gemas tratadas com PLA2 melhoram as propriedades emulsionantes a pH baixo e que este efeito pode ser atribuído à melhor solubilidade proteica<sup>41, 45</sup>.

Apenas em condições em que as proteínas da gema são completamente solúveis de qualquer forma (pH 6,5 e 0,52 M de NaCl) é que a estabilidade da emulsão não é aumentada pelo pré-tratamento enzimático da gema<sup>41</sup>.

X. Zhao et al. (2010)<sup>43</sup> estudou as propriedades reológicas de massa de bolo contendo gema de ovo tratada com fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA2) na sua constituição para fornecer dados úteis a indústrias com fabrico de pão ou pastelaria<sup>43</sup>. Demonstraram que a incorporação desta gema estabilizada aumenta a estabilidade da massa, a resistência à tensão, a resistência da estrutura em rede de glúten da massa, entre outras características<sup>43</sup>.

## 1.5. Legislação e regulamentação relativa a ovos em casca e ovoprodutos

Neste ponto serão apresentados os principais regulamentos da união europeia, legislação nacional e espanhola relativa à produção e comercialização de ovoprodutos.

O Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, para além de definir “ovoprodutos” também estabelece os requisitos aplicáveis aos estabelecimentos de fabrico de ovoprodutos, as condições das matérias-primas para o fabrico, os requisitos especiais de higiene, as especificações analíticas, e também, a marcação e rotulagem destes produtos.

Relativamente à matéria-prima principal, o Regulamento (CE) N.º 589/2008 da Comissão de 23 de Junho de 2008 refere a forma de conservação dos ovos e as principais características apresentadas por estes para que estejam aptos

para o consumo público. Também o Regulamento (CE) N.º 1020/2008 da Comissão se refere à possibilidade de utilização de ovos fendidos para produção de ovoprodutos em determinadas condições e referindo ainda o modo de armazenamento e transporte de ovos.

Também as galinhas poedeiras se encontram protegidas pelo Decreto-Lei n.º 72-F/2003, de 14 de Abril, segundo o qual, todas as galinhas poedeiras devem ser mantidas em “gaiolas melhoradas”, com mais espaço para fazer ninho, esgravatar e empoleirar-se. Nos termos da diretiva, só podem ser utilizadas gaiolas que prevejam, para cada galinha, pelo menos 750 cm<sup>2</sup> de superfície da gaiola, um ninho, uma cama, poleiros e dispositivos adequados para desgastar as garras, que permitam às galinhas satisfazer as suas necessidades.

Os critérios microbiológicos, assim como a quantidade de resíduos e outros critérios físico-químicos, foram definidos pelo Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da comissão de 15 de Novembro de 2005 e revistos no Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da comissão de 5 de Dezembro de 2007. Esses parâmetros encontram-se resumidos na Tabela 3.

**Tabela 3 – Parâmetros de Análise de Ovoprodutos (adaptado dos reg. N.ºs 1441/2007 e 853/2004 do parlamento)**

Critérios Microbiológicos	Resíduos	Outros Parâmetros
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Salmonella</i>: ausência em 25g ou mL;</li> <li>• Enterobactérias: 10 a 100 UFC/g ou mL.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cascas, membranas e outras partículas de ovos: não superior a 100 mg/kg de ovoproduto (não aplicável a ovo cozido).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3-OH-butírico: inferior a 10mg/Kg de matéria seca de ovoprodutos não modificado;</li> <li>• Ácido láctico nas matérias-primas: inferior a 1g/kg de matéria seca.</li> </ul>

A água que entra em contacto com os ovoprodutos ou que é utilizada durante a higienização de equipamentos e instalações deve estar, também, dentro dos parâmetros legais para as águas de consumo humano, relativamente a presença de metais pesados, valor de pH ou carga microbiana (*E.coli*, enterococos e clostrídios), cloro, valor da condutividade, entre outros fatores que estão determinados no Real Decreto 140/2003 de 7 de Fevereiro que define os critérios sanitários de qualidade da água de consumo humano.

É ainda de referir o regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, que estabelece as regras de higiene em produtos alimentares no seu geral e que refere todos os procedimentos que

devem ser estabelecidos de forma a ser possível implementar um sistema HACCP adequado.

## 1.6. Orgânica de funcionamento do laboratório

Para que o laboratório possa operar de forma eficaz devem seguir-se algumas regras de funcionamento que permitem que este se encontre devidamente organizado.

É também importante salientar que o trabalho a realizar deve encontrar-se definido a fim de poder decorrer da melhor forma possível.

### 1.6.1. Diretrizes para organização do laboratório segundo algumas ISO's

Algumas das normas consultadas a fim de se conseguir organizar o laboratório foram a ISO/ IEC 17025, que especifica os requisitos fundamentais para testes de calibração e, também, a ISO/IEC Guide 25 e a EN 45001 que são referentes às competências que o laboratório deve apresentar a fim de ser certificado. Resumidamente apresentam-se as principais diretrizes aí encontradas.

Relativamente ao pessoal de laboratório, este deve apresentar qualificação e formação adequada e deve existir um arquivo dos registos das formações, das qualificações académicas e eventuais artigos publicados<sup>46</sup>.

O material de laboratório deve ser usado de forma correta e a sua limpeza e higienização deve ser realizada sempre que necessário. Os instrumentos de medição devem ser calibrados periodicamente e essas calibrações devem ser devidamente documentadas<sup>46</sup>.

Relativamente aos reagentes, o armazenamento deve ocorrer de forma a garantir a sua integridade e também deve restringir-se o acesso a “pessoal não autorizado” de forma a evitar contaminações de amostras<sup>46</sup>. A qualidade dos reagentes deve ser assegurada pelos fabricantes e os reagentes devem ser referidos nos métodos utilizados pelo laboratório, nas quantidades e concentrações em que são utilizados. Todos os reagentes preparados no laboratório devem ser devidamente identificados e datados, de forma a serem utilizados dentro do seu tempo de vida útil<sup>46</sup>.

As amostras devem ser representativas daquilo que se pretende estudar e também devem ser em quantidade suficiente para as análises que se pretendem realizar. Deve ter-se sempre em conta a volatilidade, reatividade e sensibilidade à luz e à temperatura das amostras. É necessário um especial cuidado na recolha para evitar a contaminação da amostra<sup>46</sup>. Aquando da análise é necessário ter em atenção a variabilidade das características específicas inerentes ao processamento do produto. Assim, deve considerar-se sempre a natureza da amostra tomada para a análise, a representatividade da amostra e também a quantidade de amostras analisada<sup>46,47</sup>.

Relativamente aos registos de documentação necessários no laboratório, as ISO salientam que o registo de dados faz parte do plano de HACCP e é um elemento essencial para que seja possível uma rastreabilidade de tudo o que é utilizado assim como para detetar quaisquer erros ou falhas que ocorram.

Todos os procedimentos que se efetuam no laboratório de análises devem ser documentados e registados. Para tal, foram criadas e aprovadas instruções de trabalho aplicadas em análise de microbiologia, físico-químicas e de funcionalidade assim como instruções de trabalho de uso de equipamentos e outras instruções que sejam relevantes para o correto funcionamento do laboratório. Também as folhas de registo de resultados obtidos devem ser aprovadas e atualizadas periodicamente.

Numa instrução de trabalho devem constar os seguintes pontos: objetivo do documento, princípios ou fundamentos, campos de aplicação da instrução, materiais, equipamentos, reagentes, métodos, preparação da amostra, procedimento, cálculos, expressão de resultados, notas e referências bibliográficas<sup>46</sup>.

Ainda no que diz respeito à documentação necessária, é de referir a importância da existência de um arquivo das fichas técnicas de segurança de todos os reagentes utilizados contendo as suas propriedades químicas e as suas perigosidades, precauções a ter aquando do manuseamento, estabilidade ao calor, ar e luz e reatividade com outros reagentes. Também os livros de instruções de todos os equipamentos assim como os respetivos certificados de calibração periódica, devem ser arquivados, depois de devidamente carimbados e assinalados com a data da sua aquisição/realização.

No que diz respeito à validação de produtos e processos<sup>46</sup>, este passo é fundamental para garantir o controlo de qualidade necessário em qualquer laboratório que pretenda obter resultados fiáveis e precisos. O processo de



validação é variável consoante o teste aplicado e deve ter em conta os vários métodos possíveis, assim como a sua aplicabilidade e custos de pessoal e materiais necessários<sup>48,10</sup>.

### **1.6.2. Validação do processo de pasteurização de ovoprodutos líquidos**

A pasteurização, tal como referido anteriormente, deve ser suficiente para garantir ao consumidor a eliminação de *Salmonella spp*<sup>12, 49</sup>. Para conseguir a pasteurização eficaz de um produto em particular, é essencial ter conhecimento dos seus microrganismos patogénicos associados, assim como as características de resistência térmica desses microrganismos no produto<sup>50</sup>. As propriedades físicas e químicas dos ovoprodutos são importantes para determinar as condições de pasteurização. Deve ter-se em conta que a densidade dos produtos é alterada durante os processos de mistura, bombagem e libertação de gases resultantes de processos químicos. Outro parâmetro importante é a viscosidade que vai influenciar a velocidade de fluxo durante o processamento<sup>50</sup>.

Existem várias proteínas termo-sensíveis que requerem atenção, principalmente na pasteurização de clara de ovo. A ovotransferrina é uma das proteínas mais sensíveis da clara de ovo, ou seja, com maior facilidade de desnaturação por calor<sup>50</sup>.

### **1.6.3. Validação do tempo de vida útil de ovoprodutos**

Com a pasteurização pretende-se obter produtos seguros microbiologicamente para o consumidor desde o início até ao final da sua validade. Para tal é necessário garantir que o tempo de validade atribuído a cada produto é real, ou seja, que no fim de vida do produto, a carga microbiológica ainda se encontra dentro dos parâmetros de qualidade estipulados.

Para verificar o tempo de vida dos produtos são realizadas análises de microbiologia durante o tempo de vida de um determinado lote de um determinado produto. Os resultados obtidos são, então, acompanhados de forma a verificar que o lote analisado sob condições conhecidas se encontra microbiologicamente aceitável até à data da sua caducidade.

#### **1.6.4. Validação e verificação das limpezas realizadas nas diferentes áreas de produção e manipuladores de ovoprodutos**

A periodicidade de execução das limpezas é um ponto importante no que diz respeito à contaminação cruzada que possa ocorrer durante a produção. A limpeza e desinfecção de materiais, equipamentos e superfícies devem ser executadas com uma regularidade que garanta que durante esse período de tempo a carga microbiana não vai contaminar os produtos. Da mesma forma, também é importante a correta higienização das mãos por parte dos manipuladores. Por isso é importante validar as limpezas das diferentes zonas de produção dos produtos.

Deve ser implementado um plano de monitorização das limpezas efetuadas nas linhas de produção, equipamentos, contentores/embalagens e instalações para verificar que estas são realizadas de forma correta e eficaz. A verificação da higienização das mãos e limpeza de fardas de manipuladores deve ser realizada periodicamente.

#### **1.6.5. Controlo periódico de águas de consumo e de águas de efluentes produzidos**

A água que entra em contacto direto com os produtos, por exemplo, água de cozedura e arrefecimento de ovo cozido, assim como a água que não está em contacto direto (a que é utilizada nas limpezas e higienizações), deve ser controlada através de análises internas e externas de forma a garantir a sua potabilidade.

Antes de serem enviadas para a estação de tratamentos de águas da zona industrial, os efluentes são tratados na ETAR da fábrica. Assim, é necessário um controlo dos valores de condutividade e pH da água recolhida diariamente para análise.

#### **1.6.6. Análises de rotina realizada a ovoprodutos durante a produção**

O controlo da qualidade dos produtos produzidos passa por análises de rotina que são realizadas durante a produção e aos produtos finais.

De forma a poder garantir a uniformidade do produto final, devem ser realizadas análises físico-químicas ao longo do processo de fabrico dos ovoprodutos líquidos que permitam verificar as suas características (por exemplo

em termos de pH, °Brix, extrato seco e/ou viscosidade) e assim conseguir-se chegar a um produto com as características desejadas.

As qualidade microbiológica do produto final deve ser garantida através de um plano de análises direcionado especificamente para cada tipo de produto. Também, da mesma forma, a capacidade funcional dos produtos deve ser analisada.

## **1.7. Princípios dos métodos de análise de microbiologia, físico-químicas e de funcionalidade**

Existem diversos métodos de análise que podem ser utilizados em indústrias de ovoprodutos. Neste ponto serão discutidos os métodos implementados no laboratório assim como outros métodos existentes também relevantes.

### **1.7.1. Métodos de análises das características microbiológicas de amostras de ovoprodutos, água de consumo ou zaragatoas**

Os métodos de microbiologia clássica apresentam vantagens em termos de custos para o laboratório quando comparado com as técnicas mais recentes de análise. No entanto, apresentam a desvantagem de serem mais morosos do que estes.

As técnicas de cultura clássicas envolvem, por vezes, o enriquecimento das culturas e isolamento com meios seletivos antes da identificação através de análises genotípicas ou fenotípicas. Podem ser por contagem do número mais provável (NMP) ou por contagem de placas<sup>51,52</sup>.

À semelhança das placas de contagem, os testes rápidos (*Petrifilm<sup>TM</sup> Count Plates*) também permitem isolar e identificar microrganismos, sendo que estes se tornam mais vantajosos por dispensarem a preparação de meios e poder-se obter resultados num espaço de tempo mais reduzido (1 a 3 dias de incubação)<sup>51, 52</sup>.

Outros métodos de análise mais recentes estão relacionados direta ou indiretamente com as sequências de bases do genoma dos microrganismos e a especificidade desta informação pode permitir a identificação de géneros, espécies ou estirpes de microrganismos<sup>52,53</sup>. Exemplos destes métodos são PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

O método PCR tem vindo a ser muito usado na deteção de várias bactérias e patogénicos em alimentos. Consiste na replicação de um segmento de ADN, ou seja, na sua amplificação, sem a necessidade de restringir enzimas, vetores ou células hospedes. No entanto, a sequência nucleotídica do segmento tem de ser conhecida. São necessários dois oligonucleótidos (os *primers*), cada um hibridiza com uma cadeia em cada uma das pontas do segmento de ADN para ser amplificado. Uma elevada quantidade das quatro bases azotadas são fundamentais, assim como ADN polimerase resistente ao calor. Os *primers* são produzidos por síntese química e a polimerase é obtida através de bactérias termoestáveis. Em primeiro lugar, o *starter* é aquecido a 90°C para separar a dupla hélice de ADN em cadeias simples. A mistura é, depois, arrefecida a 37-65 °C permitindo a hibridização dos *primers*. Começando a partir dos *primers* são sintetizadas cadeias de ADN complementar e ambas as direções, pela polimerase. Este ciclo é, então repetido 20 a 30 vezes, obtendo-se aproximadamente 10<sup>6</sup> cópias do original<sup>54, 52, 53</sup>.

Deve ter-se em atenção o facto de que a reação da cadeia de polimerase poder ser inibida por componentes presentes no alimento. Este problema pode ser reduzido por separação de células presentes no alimento utilizando procedimentos como separação imunomagnética ou enriquecimento da cultura, permitindo assim a diluição da amostra e conseqüente diluição dos componentes inibitórios. Um enriquecimento antes do PCR permite ainda ultrapassar a objeção apresentada pelo método, visto que o PCR deteta fragmentos de ADN que não são necessariamente provenientes de células viáveis<sup>53</sup>.

Comparativamente com métodos microbiológicos clássicos, este método não apresenta o problema relacionado com o não crescimento de microrganismos em meios de cultura seletivos, nem com o aparecimento de falsos negativos devido a interpretação de resultados dependentes da coloração apresentada pelas colónias<sup>55</sup>.

Vários autores estudaram a utilização do PCR para deteção de microrganismos. O'Grady et al. (2008) usaram este método como forma inovadora de deteção de *Listeria monocytogenes* com grande especificidade em alimentos<sup>56, 57</sup>. Um dos métodos mais utilizados recentemente é o *real time* PCR. É bastante usado na deteção de *L. monocytogenes* e pode ser aplicado a outros patogénicos ou vírus<sup>57</sup>.

A ELISA está relacionada com a ligação anticorpo-antigénio que é detetada por aparecimento de uma cor devido ao substrato cromogénico adicionado. É um método muito utilizado para a determinação de *Salmonella* ou de *Listeria*, quando existe em quantidades mínimas de  $10^5 - 10^6$  organismos<sup>53</sup>. É um método bastante utilizado hoje em dia para a imunodeteção de microrganismos patogénicos. Com a aplicação deste método, a maioria dos patogénicos apresenta um limite de deteção entre  $10^3$  e  $10^5$  UFC/mL<sup>55</sup>. Para se conseguir este nível de deteção é necessário enriquecimento dos patogénicos durante 16 a 24 horas antes da concentração desses mesmos patogénicos. Existem dois formatos de ELISA; no formato direto, ou sanduiche dupla, a amostra é revestida dentro de uma placa de microtitulação. Este prato é então boqueado e lavado. Em seguida, adiciona-se um anticorpo primário específico para o patogénico. Depois do tempo de incubação, o prato é lavado para remover os anticorpos que não ficaram ligados. Adiciona-se seguidamente um anticorpo secundário conjugado com uma enzima (como por exemplo a fosfatase alcalina ou a peroxidase), que vai converter um substrato incolor num produto visível. Este anticorpo secundário é específico para o anticorpo primário de forma a fazer com que, se este último se liga a algum antigénio, o anticorpo secundário ligue-se ao anticorpo primário. No final, o prato é lavado novamente para remover anticorpos secundários em excesso e é adicionado um substrato que altera de cor na presença da enzima. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de microrganismos patogénicos presentes na amostra original<sup>55, 51</sup>. Se o antigénio solúvel específico não se encontrar presente, a sanduiche de captura anticorpo primário – antigénio – anticorpo secundário não é formada e o anticorpo secundário não fica disponível para produzir o composto colorido<sup>51</sup>.

No outro formato de teste, o prato pode ser revestido com um anticorpo específico para o patogénico. Isto vai permitir que o patogénico da amostra fique concentrado no prato, permitindo assim um sinal mais intenso<sup>55</sup>.

#### **1.7.1.1. Métodos clássicos de identificação de *Bacillus cereus* com meio seletivo**

Em 1967 Mossel et al. introduziram o primeiro meio seletivo, o MYP (mannitol-egg-yolk-polymyxin agar). O seu fundamento baseia-se na hidrólise da lectina (reação da gema de ovo) e na reação negativa do manitol permitindo

distinguir *B. cereus* de outras espécies de *Bacillus*<sup>58</sup>. Os autores referiram ainda resultados satisfatórios de seletividade na polimixina B<sup>59</sup>. O manitol permite diferenciar microrganismos contaminantes que o fermentam, alterando o fenol de vermelho para amarelo. A hidrólise da lectina pode ser confirmada pelo aparecimento de um precipitado branco que circunda as colónias. A triptona e o extrato de carne presentes no meio favorecem o crescimento de *Bacillus cereus*. 10mg de polimixina por mililitro vão inibir a microflora competitiva<sup>59, 58, 52</sup>. O meio MYP é oficialmente utilizado por vários países para inoculação em placa<sup>59</sup>.

O KG agar foi desenvolvido por Kim e Goepfert, em 1971. É um meio de sensibilidade e seletividade similar ao MYP que contém hidratos de carbono e baixa quantidade de peptona para promover a formação de esporos em 24 horas de incubação a 37°C. A composição do meio KG permite confirmação direta de organismos produtores de lectinase, através da observação microscópica das diferenças entre *B. cereus* e *B. thuringiensis*<sup>60</sup>.

Holbrook e Anderson desenvolveram um meio constituído por piruvato de polimixina, gema de ovo, manitol e azul-de-bromotimol, o PEMBA (polymyxin-pyruvate-egg yolk-mannitol-bromothymol blue agar), no início dos anos 1980. Também este meio é baseado no manitol-negativo e lectinase positiva. Contém piruvato na sua composição para reduzir a tendência dos *B. cereus* formarem colónias rizoides, melhorando assim a reação da gema de ovo e aumentando a capacidade de esporulação. Por observação ao microscópio é possível distinguir as colónias de *B. cereus* de outras espécies manitol-negativas, pois as células de *B. cereus* apresentam grânulos lipídicos e esporos no citoplasma<sup>59</sup>.

Mais tarde o PEMBA foi modificado, dando origem ao PEMPA (polymyxin-pyruvate-egg yolk-mannitol-bromocresol purple agar), um meio com polimixina, piruvato, gema de ovo, manitol e púrpura bromocressol<sup>59</sup>.

Os substratos cromogénicos que utilizam atividades enzimáticas específicas estão a ser cada vez mais utilizados para a deteção e identificação rápida de microrganismos. A sua incorporação em meios seletivos facilita a identificação das colónias, aumenta a precisão do teste e reduz a necessidade de confirmação. Para a cultura de *B. cereus* e *B. thuringiensis* a enzima utilizada é a fosfolipase específica fosfatidilinositol. Comparativamente com o meio MYP este apresenta maior

capacidade de inibição de bactérias Gram-positivas que não sejam *B. cereus* e *B. thuringiensis* que podem interferir na enumeração<sup>59,53</sup>.

Os testes de confirmação baseiam-se na mobilidade, formação de toxina cristalina, crescimento de rizoides e atividade da hemolisina<sup>59</sup>. Existem diversos métodos rápidos de identificação que podem ser utilizados, dos quais se destacam: o API® (sistema de microtubos prontos a usar que contêm meio desidratado para testes bioquímicos), o Miro-Log™ que utiliza uma fonte de carbono, o *BBL Crystal™ Gram-positive Identification System*, a análise da composição em ácidos gordos por cromatografia gasosa, eletroforese de gel de poliacrilamida, espectroscopia de massa e infra-vermelhos e ribopipetagem (baseada nas diferenças de rRNA)<sup>59</sup>.

#### **1.7.1.2. Métodos de identificação de *Staphylococcus coagulase* positiva com meio seletivo**

O meio de cultura Baird-Parker (B-P) com fibrinogénio de plasma de coelho foi desenvolvido no início dos anos 1960 considerando a produção de coagulase livre como a principal característica de reconhecimento de *Staphylococcus*, em particular *Staphylococcus aureus*<sup>61</sup>. As formulações iniciais da incorporação de plasma no meio de cultura sólido revelaram inconsistência de resultados obtidos pela coagulase em testes de tubos e a formação de um halo de fibrina característico a circundar as colónias. Estas diferenças de resultados devem-se ao facto de certas estirpes possuírem uma coagulase que também ativa o sistema plasminogénio-plasmina resultando em fibrinólise e no desaparecimento do halo de fibrina. Para evitar este processo foi aconselhada a adição de inibidor de tripsina de soja<sup>52, 53</sup>.

Em 1976 Devoyod et al., estudaram a incorporação de plasma suíno no meio de B-P com o objetivo de favorecer a deteção de coagulase produzida por *Staphylococcus aureus*<sup>62</sup>. Mais tarde Hauschild et al. melhoraram a performance do meio de Devoyod incluindo fibrinogénio bovino e um inibidor de tripsina, diminuindo a quantidade de plasma<sup>63</sup>. Em 1983 Beckers et al. modificaram o meio de Hauschild et al., substituindo o meio de plasma suíno por plasma de coelho normalmente utilizado no teste de coagulase por tubo<sup>64</sup>. Também inocularam o meio por cultura à superfície (*spread plate method*), em vez de usarem inoculação

em dupla camada (*pour plate method*) como Devoyod et al. Finalmente, a formulação foi melhorada por Sawhney depois de completar estudos sobre a toxicidade do telurito de potássio do meio de plasma de coelho no *Staphylococcus aureus*<sup>65</sup>.

Os meios baseiam-se no princípio de que o crescimento de *Staphylococcus* é favorecido pelo piruvato de sódio e glicina e que o cloreto de lítio e o telurito de potássio em conjunto com a alta concentração de glicina permitem inibir a microflora indesejável. A escolha do plasma de coelho está relacionada com a sua excelente especificidade relativamente à coagulase de *Staphylococcus* e à sua grande aptidão para produzir formação de coágulos por transformação da protrombina em estafilotrombina.

O plasma de coelho é reforçado com fibrinogénio de coelho. A estafilotrombina atua cortando fibrinopeptídios de fibrinogénio A e B e assim dando início ao processo de polimerização resultando no aparecimento de halos de fibrina a circundar as colónias. O inibidor de tripsina de soja vai prevenir a fibrinólise. A coloração negra das colónias de *Staphylococcus* deve-se à redução do telurito de potássio a telureto. A presença de telureto também favorece a inibição de microflora contaminante Gram-positiva<sup>66</sup>.

### **1.7.1.3. Métodos de identificação de *Enterococcus* com meio seletivo**

Slanezt et al., em 1957 desenvolveram um meio para enumeração de *Enterococcus* utilizando a técnica de filtração por membrana. Mais tarde, Slanez e Bartley modificaram o meio adicionando cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) e descobriram que se podiam obter colónias maiores aplicando filtros de membranas diretamente na superfície do agar em vez de um *pad* (almofada absorvente) saturado com meio líquido<sup>67, 68</sup>. Em 1964 Burkwall e Hartman usaram polisorbato 80 (0,5mL/L) e carbonato de sódio (2mL de uma solução aquosa a 10% /Litro) a fim de aumentar a sensibilidade e o tamanho das colónias<sup>69</sup>. O meio pode ser utilizado na deteção de *Streptococcus faecalis* e grupos de *Enterococcus* usando a técnica de filtração por membrana. O hidrolisado de caseína e o digestor papaico de preparado de soja, o extrato de levedura e a dextrose atuam como fonte de carbono, azoto e outros nutrientes essenciais de crescimento. Azida sódica inibe o crescimento da flora Gram-negativa. O TTC serve com indicador rápido de



crescimento bacteriano. É reduzido para formazano insolúvel dentro das células bacterianas originando a cor vermelha apresentada pelas colónias<sup>69,53</sup>.

#### **1.7.1.4. Métodos de identificação de *Lactobacillus* com meio seletivo**

O meio normalmente usado para o crescimento e enumeração de culturas de *lactobacillus* em placa é a gelose MRS (De Man, Rogosa and Sharp agar). Estes autores desenvolveram, em 1960 um meio específico para a cultura de *lactobacillus* em laticínios sem adicionar sumo de tomate, um ingrediente de composição variadíssima<sup>70</sup>.

As diferentes peptonas, a glucose, o magnésio e os sais de manganês fornecem os elementos nutritivos essenciais para o crescimento de *lactobacillus* enquanto o Tween 80 (polisorbato 80), composto por uma mistura de ésteres oleicos funcionam como uma fonte de ácidos gordos essenciais para o crescimento destas bactérias. O fosfato de dipotássio estabiliza o pH durante o crescimento bacteriano. O citrato de amónio e o citrato de sódio inibem o desenvolvimento da maioria dos contaminantes incluindo *Streptococcus* e bolores<sup>70</sup>.

#### **1.7.1.5. Método de identificação de bolores e leveduras por contagem de placas**

No isolamento de bolores e leveduras o meio mais comum é o Sabouraud Chloramphenicol Agar. A fonte de azoto que permite o crescimento dos bolores e leveduras no meio é obtido por digestão péptica, a glucose funciona como fonte de energia e o Chloramphenicol é um antibiótico de espectro alargado e termo-estável que inibe o desenvolvimento de microflora microbiana.

#### **1.7.1.6. Métodos de identificação de *Clostridium* com meio seletivo**

Existem diversas técnicas de isolamento e enumeração de clostrídios. Para amostras de alimentos com um baixo número de colónias (até 100 UFC/g) pode ser utilizado o método do número mais provável (NMP) para a enumeração. Para tal desenvolveu-se o meio IMM (iron milk medium) que, quando incubado a 46°C, apresenta fermentação visível na presença de *C. perfringens*<sup>71</sup>.

A enumeração de microrganismos anaeróbicos sulfito-redutores a 46°C também pode ser realizada utilizando gelose TSN (trypton sulfite neomycin). O meio de cultura foi sugerido por Mossel et al., em 1959 e, desenvolvido por Marschall et al. em 1965 para o isolamento seletivo e enumeração de *Clostridium perfringens* de amostras de alimentos de origem animal<sup>72,73</sup>. A presença simultânea de neomicina e polimixina inibe o crescimento de enterobactérias enquanto a neomicina, por si só, consegue inibir a maioria das estirpes de *Clostridium bifermentans*. Ao ser incubado a 46°C o meio considera-se específico para *Clostridium perfringens*. Esta espécie vai reduzir o sulfito a sulfato que na presença de citrato férrico leva ao aparecimento de um precipitado férrico à volta das colónias<sup>74,53</sup>.

#### **1.7.1.7. Métodos de identificação de bactérias coliformes e *E. coli* com meio seletivo**

As técnicas seletivas de *E. coli* baseiam-se na sua tolerância ao ácido biliar como consequência do seu habitat natural, o intestino. O marcador de anilina e a capacidade de desenvolvimento a temperaturas perto de 44°C também são usados como agentes seletivos. O primeiro meio seletivo e diferencial foi desenvolvido por MacConkey em 1905<sup>75</sup>. Ocorreram diversas modificações depois disso, mas as características principais foram inalteradas. Os sais biliares e o cristal de violeta atuam como inibidores de bactérias Gram-positivas e de algumas Gram-negativas indesejáveis. A lactose é incluída como hidrato de carbono fermentável e também é incluído um indicador de pH, normalmente o vermelho neutro. Este meio não é muito seletivo e permite o desenvolvimento de outros microrganismos, tais como *Enterococcus* e *Staphylococcus*<sup>52, 76</sup>.

A gelose de eosina e azul-de-metileno (EMB) é um meio seletivo que também é usado em países como a América do Norte. A anilina, a eosina e o azul-de-metileno para além de serem os agentes seletivos funcionam como indicadores de fermentação a lactose por formação de um precipitado, a pH baixo<sup>76</sup>.

Para a deteção e enumeração de bactérias coliformes o meio seletivo mais usado é o VRBL (violet red bile agar with lactose). Muitos autores estudaram este meio. Em 1932 MacCraday estudou-o para o Comité de Métodos Standard De Análise de Leite da Associação Americana de Saúde Pública. Também Bartram e Black estudaram o meio para isolarem bactérias coliformes de leite cru e

pasteurizado. Ainda Miller e Prickett realizaram um trabalho em que utilizaram o meio para incubação de amostras de leite contaminado. Todos estes autores consideraram o meio satisfatório para resultados obtidos 24 horas após incubação<sup>76</sup>.

A presença simultânea de violeta-de-cristal e sais biliares no meio inibe as bactérias Gram-negativas contaminantes. A fermentação láctea vai resultar na acidificação do meio visível através da coloração vermelha do indicador de pH – vermelho neutro – e também através da precipitação de ácidos biliares à volta as colónias<sup>76</sup>.

O petrifilm<sup>TM</sup> de *E.coli* baseia-se no facto referido de que esta consegue crescer no meio VRBL e que a maioria (aproximadamente 97%) produz  $\beta$ -glucuronidase que reage com um indicador colorido presente na placa de Petrifilm<sup>TM</sup> de *E. coli* apresentando colónias azuis a vermelho-azulado. O gás produzido pela fermentação da lactose fica aprisionado no filme<sup>77</sup>.

Outra técnica também utilizada na enumeração e identificação de coliformes, coliformes fecais e *E.coli* é o NMP. Existem dois métodos diferentes: num, a amostra é incubada em 3 tubos com caldo de (sulfato de laurilo) e tubos de Durham invertidos no interior, durante 24 horas a 37°C. Uma *loopful* de cada tubo com produção de gás é então transferida para um tubo com caldo verde brilhante BGLB (brilliant green, lactose bile) e um tubo de Durham invertido e, vai a incubar durante 24 horas a 37°C. A produção de gás indica que houve fermentação láctea por bactérias coliformes. Assim, deve-se considerar cada tubo com formação de gás como resultado positivo para coliformes na amostra. Para a quantificação de coliformes fecais, é extraído um *loopful* de cada tubo de LST com produção de gás e as culturas são transferidas para um tubo com caldo de *E. coli* e um tubo de Durham invertido que em seguida é incubado a 45°C durante 24 horas. A produção de gás indica presença de coliformes fecais. A transferência destas culturas para placas com gelose EMB que vão a incubar durante 24 a 48 horas a 37°C permite identificar a presença de *E. coli*<sup>76</sup>.

A outra técnica que também utiliza NMP é realizada através de inoculação as amostras em 3 tubos com caldo de MacConkey e um tubo de Durham invertido no interior. Depois, os tubos são incubados durante 24 a 48 horas a 37°C. Da mesma forma que na técnica anterior, as bactérias coliformes são identificadas por produção de gás. Para identificação de coliformes fecais, transferiu-se uma *loopful* de cada tubo com caldo de MacConkey que apresentava produção de gás às

24h de incubação, para um tubo com BGLB e um tubo de Durham invertido no interior e para um segundo tubo com água peptonada. Estes tubos são incubados a 45°C durante 24 horas. Os tubos de BGLB que apresentem formação de gás e produção de indol são considerados positivos para coliformes fecais. Estas culturas podem depois ser inoculadas em gelose EMB para serem detetadas as culturas de *E.coli*<sup>76</sup>.

Podem ser utilizados vários meios para isolamento de *E.coli*. O EMB contém iosina Y e azul-de-metileno que permite inibir bactérias Gram-positivas e lactose para poder diferenciar as colónias fermentadoras de lactose. A gelose de MacConkey contém violeta de cristal e sais biliare para inibir as bactérias Gram-positivas. Nos últimos anos tem vindo a aumentar o interesse por substratos de  $\beta$ -glucuronidase na deteção de *E.coli* e muitos autores têm sugerido sua adição a um meio *standard* para melhorar a diferenciação entre *E.coli* e outras espécies bacterianas. No entanto, têm surgido alguns problemas visto que o teste não é 100% específico, existem algumas estirpes de *E.coli* que não produzem a  $\beta$ -glucuronidase e algumas estirpes de *salmonella* e de *Shigella* produzem a enzima<sup>76,53</sup>.

#### **1.7.1.8. Métodos de enriquecimento e identificação de *Salmonella* com caldos de enriquecimento e seleção**

Os métodos de identificação de *Salmonella* em alimentos têm recebido mais atenção do que qualquer outro patogénico. O uso de técnicas de cultura tradicionais num procedimento de 5 fases é a mais usual na maioria dos países<sup>78</sup>. A fase de pré-enriquecimento em meio não seletivo aumenta a capacidade de recuperação de *Salmonella*, permitindo a reparação das células que possam ter sofrido danos durante o processamento do alimento, (tal como refrigeração, congelação ou secagem). A fase de enriquecimento seletivo está relacionado com o aumento da proporção de células de *Salmonella* presentes na microflora total, permitindo a sua proliferação restringindo o crescimento de outros microrganismos presentes. Foram desenvolvidos vários meios com esta finalidade, constituídos por agentes seletivos como a bÍlis, verde brilhante, verde malaquite, tetrionato e selenito. Os mais utilizados são o caldo de selenito-cistina que contém cistina para estimular o crescimento da *Salmonella*; o caldo Muller-Kauffman que contém

tetrionato, verde brilhante e bÍlis; e o caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), que contém verde malaquite e cloreto de magnésio<sup>78</sup>.

Por variarem na seletividade, são usados dois caldos em paralelo, normalmente selenito-cistina e outro do conjunto. Depois dos caldos de enriquecimento as culturas são inoculadas num meio sólido diferencial. Mais uma vez, é normal usar dois meios em paralelo. Os agentes seletivos usados são sais biliares ou desoxicolato e/ou verde brilhante e o resultado do diagnóstico é normalmente fornecido pela incapacidade da maioria das estirpes de *Salmonella* fermentarem a lactose e/ou produzirem hidrogeno-sulfureto. As colónias de *Salmonella* podem ser depois confirmadas por testes bioquímicos e serológicos por aglutinação com anti-soro-O (polivalente). É um protocolo complexo e demora 4 dias para um resultado negativo, por isso desenvolveram-se outras técnicas menos demoradas. Duas dessas técnicas são baseadas na mobilidade da *Salmonella*, o que significa que a deteção falha para *Salmonella* não móvel (incidência de 0,1%)<sup>78,52</sup>.

Outras técnicas que também apresentaram bons resultados foram as técnicas de impedimento de condutividade utilizando o meio de Easter e Gibson que compreendia um caldo modificado de selenito-cistina que continha dulcitol e óxido de trimetilamina (TMAO). A capacidade da *Salmonella* fermentar o dulcitol e reduzir o TMAO para trimetilamina vai aumentar a condutividade do meio, fornecendo assim a base para deteção. O tempo de deteção é reduzido se a amostra for pré-enriquecida num meio com dulcitol e TMAO para induzir as enzimas relevantes. Entretanto foram efetuadas algumas alterações ao meio e ao protocolo, tais como, incorporação de um bacteriófago específico de *Salmonella* numa amostra paralela a fim de demonstrar que as diferenças nas propriedades elétricas são em resposta à *Salmonella*; substituição do dulcitol por manitol ou desoxirribose a fim de detetar *Salmonella* negativa de dulcitol; e o uso de meios de deteção baseados na atividade da descarboxilase da lisina<sup>78</sup>.

Outras técnicas como a ELISA (referida anteriormente) e kits de teste genéticos para deteção de *Salmonella* são também utilizados, no entanto, a amostra deve ter uma concentração de *Salmonella* suficiente para um limite eficaz.

A separação imunomagnética é uma técnica que permite evitar (ou reduzir) o enriquecimento das amostras. A presença de *Salmonella* pode ser confirmada usando meio de cultura tradicional ou com técnicas rápidas de deteção, como a ELISA, referida anteriormente<sup>78</sup>.

### 1.7.1.9. Métodos de enriquecimento e identificação de *Listeria* com caldo de enriquecimento e seleção

Tal como para a identificação de *Salmonella*, a identificação de *Listeria* também é realizada depois de um processo de enriquecimento e seleção das culturas.

A técnica tradicional de enriquecimento isolamento de *Listeria monocytogenes* é realizada encubação das amostras a 4°C durante 12 semanas em meio não seletivo. Este método foi alterado por outro mais rápido que utiliza meios de enriquecimento seletivo baseados em cocktails de antibióticos [proteosa-peptona (0,5%), fitona-peptona (0,5%) e cloreto de sódio (0,5%)] que atuam como agentes seletivos e de incubação, a temperaturas ideais de desenvolvimento da *Listeria*. Posuem ainda dextrose (0,1%), extrato de levedura (0,1%), piruvato sódico (0,1%), e fosfato dissódico (0,25%)<sup>79</sup>.

Dos agares seletivos, o mais comum é a gelose de Oxford. Foi preparado por Curtis et al. em 1988 para isolar *L. monocytogenes* de amostras clínicas com uma considerada flora microbiana. Após 24 horas de incubação, os autores verificaram que já havia aparecimento de colónias e os microrganismos associados estavam inibidos. A identificação das colónias formadas era realizada por iluminação das placas ao microscópio (*Henry's illumination*) e consideravam-se as colónias azul-acinzentadas a azul-esverdeadas. Mais recentemente, para evitar esta técnica, os meios têm incorporado esculina e citrato de amónio férrico para que as colónias de *Listeria* apareçam castanhas escuras ou pretas devido à sua capacidade de hidrolisar a esculina<sup>79</sup>.

Estes estudos foram baseados no trabalho de Rodriguez (1984), que foi o primeiro a estudar a esculina e os sais de ferro na visualização de *L. monocytogenes* por esculinase positiva. Curtis et al. mostrou ainda que a microflora secundária era inibida por cloreto de lítio, acriflavina, ciclohexamida, colistina, cefotetam e fosfomicina<sup>80</sup>. A polipeptona favorece o crescimento da *Listeria* enquanto o extrato de levedura funciona como fonte de vitaminas do complexo B. O amido vai ser a fonte de energia usada no crescimento microbiano e o cloreto de sódio permite manter o equilíbrio osmótico. Assim, as colónias de *Listeria* hidrolisam a esculina em glucose e esculetina. Este último forma um complexo negro com iões férrico, fornecidos pelo citrato férrico<sup>79,53</sup>.

A confirmação por testes bioquímicos pode ser realizada de uma forma mais simples, utilizando tiras de teste prontas a usar e sistemas de identificação automáticos tais como o Vitek® de Gram-positivos. Este sistema é capaz de identificar corretamente 229 de 236 isolados de *Listeria*-positiva e 95% destes são confirmados num espaço de 6 a 8 horas. Outros *kits* de identificação de *L. monocytogenes* baseiam-se em reações bioquímicas fenotípicas. Entre outros, existem os seguintes: teste de acrilamida em discos de papel, *kits* de API® para *Listeria*, Micro-ID® *Listeria* e microarrais fenotípicos. Estes são testes mais rápidos e mais fiáveis do que os usados na microbiologia clássica. Para além dos referidos ainda são possíveis de utilizar o ELISA (referido anteriormente)<sup>79</sup>.

### **1.7.2. Métodos de análise das características físico-químicas de amostras de ovoprodutos, água de consumo ou zaragatoas**

A maioria das análises físico-químicas é realizada com recurso a equipamentos muito frequentes em laboratórios de análise alimentares. Assim, para determinação de pH é usado um potenciómetro de medição contínua; o ° Brix (grau Brix) é determinado por recurso a um refratómetro de bancada; para o extrato seco utiliza-se uma balança de halogénio; na determinação da condutividade recorre-se de um condutivímetro; para a viscosidade utiliza-se um viscosímetro e para determinar a concentração de sal, um titulador automático. Para comprovação rápida de limpezas é utilizado um aparelho de determinação da quantidade de ATP presente na água ou na amostra. Outras determinações físico-químicas são efetuadas com recurso a kits de análise, como por exemplo a determinação do cloro e dureza da água, ou por titulação com bureta, como o caso da determinação da concentração em ácido e soda ou a determinação da percentagem de ácido cítrico ou acético. A determinação da cor da gema efetua-se com recurso ao “Abanico de Roche” enquanto a frescura é feita por inspeção visual do ovo.

#### **1.7.2.1. Método de determinação do pH**

O pH pode ser definido como o logaritmo do recíproco da concentração de iões hidrogénio, ou então, como o logaritmo negativo da concentração molar dos iões de hidrogénio<sup>47</sup>.

O medidor de pH é um potenciômetro que consegue medir voltagem a uma velocidade de corrente infinitesimal. O potenciômetro utiliza um método eletroquímico de voltimetria a corrente zero que envolve o uso de uma célula eletrolítica composta por dois elétrodos mergulhados numa solução de teste. Desenvolve-se uma voltagem relacionada com a concentração iônica da solução<sup>47</sup>.

### **1.7.2.2. Método de determinação do cloro e dureza da água**

A dureza da água consiste no seu conteúdo em íons metálicos alcalinoterrosos, especialmente cálcio e magnésio. Pode ser classificada como temporária ou permanente. Estes dois tipos podem ter origem na dureza total, medida em graus hidrométricos ou de dureza. Águas muito duras podem levar à deposição de cálcio e magnésio em caldeiras de vapor e formar incrustações<sup>81</sup>.

O cloro é adicionado normalmente para tratamento de águas que vão abastecer a rede pública com a finalidade de destruir os microrganismos patogênicos que possam existir nessa água.

A determinação da dureza e cloro da água pode ser realizada de forma rápida e fácil através de *kits* de análise rápidos por comparação visual de cor. São métodos de baixo custo e muito fáceis de aplicar em laboratório.

### **1.7.2.3. Método de determinação de ATP para verificação de limpezas por bioluminescência**

Os métodos baseados na bioluminescência são rápidos e eficazes na verificação da higienização de uma superfície ou contaminação microbiana da água.<sup>53</sup> O método mais utilizado é a medição da adenosina trifosfato – ATP<sup>51</sup>.

O ATP está presente em todas as células vivas e é o agente universal para a transferência de energia de processos catabólicos para anabólicos. Alguns organismos vivos evoluíram um mecanismo de produção de luz por atividade enzimática de luciferasas sob um substrato designado por luciferina. Estas reações requerem a presença de ATP e íons magnésio produzindo um fóton à custa da hidrólise de uma molécula de ATP. Uma molécula de ATP facilita a formação de um complexo substrato-enzima que é oxidado por oxigênio molecular a um estado elétrico excitado. O estado excitado da molécula volve a um estado de energia mais



baixo com a libertação de um fotão e dissocia-se para libertar a enzima luciferase novamente<sup>53</sup>.

Existem agora equipamentos (*luminometers*) com elevada sensibilidade, capazes de detetar níveis baixos de emissão de luz, num espaço muito curto de tempo. Estes instrumentos sensíveis que usam tubos fotomultiplicadores podem detetar  $10^2$  a  $10^3$  fg (fentograma:  $10^{-15}$ g) que corresponde a  $10^2$  a  $10^3$  células bacterianas<sup>51, 53</sup>.

A necessidade de uma preparação de amostra complexa faz com que este método não seja usado para contaminação de alimentos, mas sim, cada vez mais utilizado para monitorizar a higienização de superfícies. Um esfregaço colhido diretamente do equipamento que se pretende analisar e colocado no aparelho indica imediatamente o nível de contaminação desse equipamento, sem necessidade de tratamento da amostra recolhida<sup>53</sup>.

#### **1.7.2.4. Método de determinação do ° Brix de amostras**

Para determinar o grau Brix, ou seja, a quantidade de compostos solúveis numa solução utiliza-se, frequentemente um refratómetro de bancada. Este é um aparelho rápido e preciso que permite determinar a quantidade de sólidos solúveis presentes numa solução. Deve-se ter algum cuidado na manutenção (limpeza da superfície de leitura e proteger da luz) para não danificar o leitor ótico<sup>47</sup>.

#### **1.7.2.5. Método de determinação do extrato seco de amostras**

O extrato seco pode ser determinado por secagem total da amostra com recurso a uma balança de halogénio. Este é um instrumento de análise que envolve a penetração do calor na amostra para conseguir uma secagem num espaço de tempo muito mais curto do que aquele que seria necessário se fosse utilizada uma estufa de secagem. Deve-se ter alguma precaução para não queimar a amostra durante o processo<sup>47</sup>.

#### **1.7.2.6. Método de determinação da condutividade da água**

A condutividade é a medida da capacidade que uma solução aquosa tem para transportar corrente elétrica. Existem vários fatores que alteram a capacidade

de transmissão elétrica de uma determinada solução aquosa, sendo estes a concentração ou número de íons, a mobilidade dos íons, o estado de oxidação e a temperatura da água.

É expressa em S/m (Siemens por metro), no Sistema Internacional e a medição é efetuada com um eletrodo de condutividade. É uma medição que está relacionada com a força iônica e, por isso, não permite identificar os íons presentes especificamente.

A sua determinação pode ter várias aplicações: determinar a quantidade de sólidos dissolvidos, verificar alterações em água natural ou de efluentes de forma rápida, estimar o tamanho da amostra necessária para outras análises químicas e determinar a quantidade de reagentes químicos ou tratamentos químicos que são necessários aplicar.

A presença de um elevado número de sólidos dissolvidos pode provocar corrosão ou incrustação de superfícies metálicas, provocando problemas nos de equipamentos<sup>82</sup>.

Para determinar a condutividade de soluções utilizam-se condutivímetros que são aparelhos rápidos e eficazes que apenas requerem calibração periódica com tampões de calibração recomendados de acordo com as temperaturas mais frequentes de utilização.

#### **1.7.2.7. Método de determinação da viscosidade de amostras**

A viscosidade pode ser definida como a resistência de um fluido ao escoamento, atendendo ao seu gradiente de velocidade. Está relacionada com a extensão com que o fluido apresenta resistência à tendência do escoamento.<sup>83</sup> Para fluidos Newtonianos a viscosidade é constante e é designada por coeficiente de viscosidade ou viscosidade Newtoniana ( $\mu$ ). No entanto, para a maioria dos líquidos o termo viscosidade não é constante, mas sim variável consoante a “*shear rate*”. Neste caso, o fluido é considerado não-Newtoniano<sup>47</sup>.

A viscosidade aparente ( $\eta$ ) é definida como a viscosidade dependente do “*shear rate*” (velocidade de corte) e consiste na razão entre “*shear stress*” (tensão de corte) e “*share rate*”, como se pode ver pela equação:

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}}, [\text{Pa} \cdot \text{s}] \quad \text{para a qual } \eta \text{ corresponde à viscosidade}$$

aparente,  $\sigma$  corresponde a “*shear stress*” e  $\dot{\gamma}$  a “*share rate*”. A viscosidade aparente depende de variáveis tais como: estrutura físico-química da amostra, temperatura, pressão, tempo e “*share rate*”.<sup>27</sup> De todos, o fator mais importante é a temperatura. Sabe-se que, normalmente, a viscosidade diminui com o aumento da temperatura.<sup>47</sup>

Para a determinação da viscosidade de ovoprodutos líquidos utiliza-se um viscosímetro rotacional. Este é constituído por uma sonda de teste de forma cilíndrica que vai entrar em contacto com a amostra e, através de um mecanismo de rotação, determinar a viscosidade do fluido.

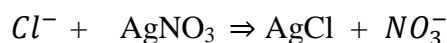
Os viscosímetros rotacionais podem trabalhar de dois modos: oscilatório ou, neste caso, “*steady shear*” (corte constante). Os “*steady shear*” são utilizados quando a condição em que a velocidade da força de corte de um fluido, estando dentro dos limites, se mantém constante em qualquer posição. Além disso, o gradiente de velocidade é constante em todo o fluido<sup>28,47</sup>.

A “*torque*” é uma ação que vai resultar na rotação de um eixo e é produto da força e da distância perpendicular ( $r$ ) designada por momento do braço do eixo de rotação. Essencialmente, a sonda usada vai influenciar o momento do braço. Para sondas maiores o momento resultante também é maior, aumentando assim a “*torque*” do braço. Mesmo que a força aplicada seja a mesma, quanto maior for o comprimento da sonda, maior a “*torque*” providenciada<sup>47</sup>.

#### **1.7.2.8. Método de determinação da concentração de sal (NaCl)**

Para determinar a quantidade de sal presente numa amostra efetua-se uma titulação potenciométrica com um titulador automático. É um método que apresenta vantagens quando comparado com a titulação manual, pois identifica o ponto de viragem com maior precisão<sup>47</sup>. Também permite a utilização do titulante  $\text{AgNO}_3$  em baixas concentrações o que melhora bastante o limite de deteção da análise de cloreto. O ponto de equivalência da análise é obtido diretamente da curva de titulação de potencial do elétrodo versus volume adicionado de titulante.

A equação da reação é:



### 1.7.2.9. Método de determinação da coloração da gema

Tanto para ovo cozido como para ovo líquido, a coloração da gema é uma característica importante para a aceitação do produto. A escala mais utilizada internacionalmente para quantificar a intensidade da cor da gema é a “*Roche Yolk Colour Fan*” (abanico de Roche). Consiste num leque de cores possíveis de serem reproduzíveis na própria gema e que veio responder à necessidade de uma medida quantificável para a cor (Figura 6).



Figura 6 - Roche Yolk Colour Fan <sup>22</sup>

A escala é apresentada numericamente de 1 a 15. Cada número corresponde a uma cor dentro da gama de cores estabelecida<sup>84</sup>. Pode ser aplicada tanto para classificação de ovo em casca como ovo ou gema líquida.

### 1.7.2.10. Método de determinação da frescura do ovo

Para poder determinar a frescura de um ovo não basta apenas verificar a data de postura e considerar aqueles com 6 a 9 dias de postura. Por vezes a data apresentada pelo fornecedor não corresponde inteiramente à realidade. Assim sendo, devem-se avaliar as características do ovo de forma a poder considerá-lo fresco ou não. Quando se observa um ovo aberto numa superfície plana, a clara deve-se encontrar viscosa enquanto a gema deve estar firme e numa posição central relativamente à clara. É uma operação difícil pois depende da objetividade e sensibilidade do analista.

### 1.7.3. Métodos de análise da funcionalidade de ovoprodutos

A funcionalidade dos ovos na indústria alimentar é um fator de grande importância e a ter sempre em conta durante a produção de ovoprodutos.

### 1.7.3.1. Métodos de determinação da capacidade espumante da clara

Os testes realizados para determinação da capacidade espumante variam significativamente de um autor para outro devido principalmente à dificuldade de análise dos parâmetros e à subjetividade dos resultados.

Em 1990, Phillips et al.<sup>85</sup> estudaram um método de análise de espumas de clara que envolvia o uso de uma batedeira modificada com um orifício de escoamento a fim de determinar a estabilidade da espuma.<sup>85</sup> Este método foi utilizado durante muitos anos, mas foi sucessivamente melhorado por vários autores.

Kuropatwa<sup>30</sup> utilizou uma solução proteica de clara de ovo para a qual determinou a capacidade espumante, a firmeza e estabilidade da espuma. O *overrun* (capacidade que a espuma apresenta de prender o ar no seu interior) foi determinado pela diferença de peso da espuma e do mesmo volume de solução proteica que lhe deu origem. Imediatamente depois de bater a clara a espuma foi transferida para um copo de medição sem qualquer bolsa de ar no seu interior e o topo do copo foi alisado permitindo uma consistência entre as medições realizadas<sup>30</sup>. A firmeza foi determinada com um analisador de textura e a estabilidade foi medida por monitorização do escoamento de fluido da espuma. Imediatamente depois do fim da batidura, a espuma foi pesada e deixada à temperatura ambiente durante 30 minutos, período depois do qual foi pesado novamente, sem o fluido<sup>30</sup>.

Talansier<sup>86</sup> utilizou um método semelhante de análise, alterou, apenas, o tempo de medição do fluido de escoamento para 180 minutos.<sup>86</sup> Davis<sup>31</sup> para determinar o *overrun* de clara reidratada batida fez 3 ensaios para cada amostra<sup>31</sup>. Van der Plancken<sup>16</sup> utilizou um cilindro que depois de colocar a amostra de espuma cerrou e agitou vigorosamente duas vezes para remover os espaços existentes na espuma<sup>16</sup>.

Todos os autores referiram a importância de recolher a espuma no final da batidura, o mais rapidamente possível.

### 1.7.3.2. Método de determinação da capacidade de coagulação da clara (textura)

As propriedades reológicas dos alimentos sólidos são medidas usando a compressão, extensão ou torção do material e podem ser acompanhadas de duas formas de análise que são testes de tensão pequena ou grande. Para os testes de tensão pequena, o objetivo é aplicar a quantidade mínima de tensão ou de *stress* requerido para medir o comportamento reológico ao mesmo tempo que se tenta prevenir ou, pelo menos minimizar, danos na amostra. Os testes de tensão grande (ou testes de fratura) têm um objetivo contrário, as amostras são deformadas fazendo com que a matriz do alimento seja significativamente tensa, danificada ou até fraturada. Os testes de tensão pequena são usados para estudar as propriedades de uma família de alimentos enquanto os testes de tensão grande dão uma indicação da textura sensorial de um produto.

Para realizar testes de compressão devem-se ter em atenção as condições da amostra em termos de homogeneidade e isotropia. No caso da gema de ovo cozida, deve-se assumir que o material é incompressível, ou seja, quando sujeito a compressão altera de forma mas não de volume<sup>47</sup>.

Durante a compressão, a área de secção transversal ( $A_i$ ) aumenta à medida que o comprimento diminui. Assim, adiciona-se um termo de correção ao cálculo do *stress* aplicado – a variação inicial e final do comprimento do cilindro ( $L/L_i$ ):

$$\sigma = \frac{F}{A_i} \times \left(\frac{L}{L_i}\right) \quad , \text{ em que } \sigma \text{ é o stress em Pa e } F \text{ é a força em Newtons .}$$

Quando o material comprimido é um sólido elástico puro a taxa de compressão não tem importância, no entanto, se o material for viscoelástico os valores de *stress*, tensão e o módulo elástico podem variar conforme a velocidade de compressão<sup>47</sup>.

Os testes de compressão da amostra podem ser realizados entre dois pratos planos ou com uma *probe* cilíndrica de diâmetro conhecido que vai comprimir a amostra. Existem vários tipos de teste de análise que permitem determinar diferentes parâmetros. Em termos de análises sensoriais, a amostra pode ser comprimida até ao seu nível de fratura ou abaixo desse nível enquanto que para determinar um perfil de textura pode-se realizar o teste TPA (*texture profile analysis*) que utiliza uma técnica de compressão em dois ciclos que permite determinar dureza, coesão e elasticidade de uma amostra. Reproduz a ação de duas

dentadas com um certo tempo de recuperação do material e está relacionado com a precessão da textura de um alimento quando se mastiga<sup>47</sup>.

## 2. Materiais e métodos

Neste capítulo serão abordados os materiais e os equipamentos que foram utilizados no laboratório para execução das análises de microbiologia, físico-químicas e funcionais. Também os métodos e técnicas utilizadas serão descritos.

### 2.1. Material e métodos para análises de microbiologia

#### Material

- Material estéril e descartável:
  - ansas de *Henle* de 1  $\mu$ L;
  - placas de *petri*;
  - pipetas graduadas de 1 e 10mL;
  - espalhadores em L;
  - bolsas de *stomacher*;
  - zaragatoas e esponjas de recolha azuis.
- Material de vidro reutilizável:
  - frascos *shot* de 100 e de 250mL;
  - tubos de ensaio com tampa.
- Outro material usual de laboratório:
  - bico de *Bünsen*
  - bisturi;
  - tesouras;
  - pinças;
  - espátulas metálicas
  - copos de diluição em plástico (PVC) de 5L e provetas de 500mL;
  - câmara de anaerobiose;
  - papel absorvente;
  - etanol 70%;
  - água destilada.

#### Equipamentos

- 2 autoclaves *Selecta*® *Presoclave II*;
- 1 estufa *Selecta*® *Prebatem* para secagem e esterilização;
- 3 estufas *Selecta*® *Prebatem* para incubação;
- balança *Kern PLS*;
- *stomacher*;
- vórtex *Labnet*®;
- 2 frigoríficos;
- placa de aquecimento;



- banho-maria com regulador de temperatura.

Meios de cultura (Os meios de cultura utilizados foram adquiridos à Biokar diagnostics®)

- Para *Listeria*:
  - caldo de enriquecimento de *Listeria*;
  - meio líquido seletivo Fraser Broth;
  - meio de cultura Oxford.
- Para salmonela:
  - água peptonada tamponada;
  - meio líquido seletivo Selenito-Cistina;
  - meio de cultura SM2 (SMID Biomerieux).
- Para inoculação por espalhamento à superfície:
  - 3M™ Petrifilm Count Plates de *E. coli*, de aeróbios totais e enterobactérias;
  - gelose de Sabouraud Chlorophenicol para bolores e leveduras;
  - gelose de *Baccillus cereus* (acc. To Mossel) para *Bacillus cereus*;
  - gelose de Baird-Parker (B-P) para *Staphylococcus aureus*;
  - gelose de *m-Enterococcus* para *Enterococcus*.
- Para inoculação por incorporação:
  - VRBL (violet red bile agar) para coliformes totais;
  - TSN (tryptone sulfite neomycin) para *Clostridium*;
  - MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) para *Lactobacillus*.

### 2.1.1. Esterilização de material e meios de cultura

Os meios de cultura são esterilizados a 121°C durante 15 minutos na autoclave de esterilização meios, antes de serem eliminados. Também material descartável, depois de ser utilizado, foi todo esterilizado na autoclave de esterilização de resíduos. A temperatura e tempos utilizados são de 121°C durante 15 minutos. O processo de esterilização é verificado com cinta adesiva de comprovação de esterilização que apresenta mudança de coloração de amarelo claro para preto quando a esterilização é eficaz.

O material de vidro reutilizável, depois de lavado era secado na estufa de esterilização a 80°C durante 3 horas e esterilizado a 180°C durante 4 horas.

### **2.1.2. Refrigeração e incubação de amostras e meios de cultura**

Os dois frigoríficos disponíveis na sala de análises de microbiologia com temperaturas entre os 0 e os 5°C são utilizados na refrigeração de meios de cultura preparados e para guardar amostras enquanto não são analisadas. As embalagens de *petrifilm* são guardadas em refrigeração enquanto não são abertas. Depois de abertas, as embalagens são guardadas à temperatura ambiente, fechadas com fita-cola e são usadas no máximo até um mês depois de serem abertas. Deve-se ter sempre o cuidado de verificar a data de validade dos *petrifilm*, impressa na embalagem.

Os meios com a finalidade de serem utilizados para inocular a amostra por incorporação ficaram na estufa de 45°C, até serem utilizados, num prazo máximo de 8 horas.

Os meios utilizados para inoculação por espalhamento da amostra na superfície são guardados no frigorífico. Podem-se guardar já plaqueados ou nos frascos estéreis onde foram preparados para assim, poderem ser plaqueados quando forem necessários. Os meios de cultura líquidos utilizados para enriquecimento (usados na deteção de *Salmonella* e *Listeria*) são guardados juntamente com estes últimos, em refrigeração e foram todos utilizados 2 a 3 semanas depois da sua preparação.

Todos os frascos e placas que se encontram dentro do frigorífico possuem data de preparação e identificação.

### **2.1.3. Recolha, preparação e caracterização das amostras para análise**

As amostras recolhidas para análise microbiológica foram as seguintes: *ovoprodutos líquidos, ovo cozido, salsicha de clara, clara de ovo em pó, água de cozedura, água de arrefecimento, água de CIP, água de esterilização, zaragatoas, esponjas de recolha de amostras e placas de análise ambiental.*

Para os ovoprodutos líquidos que são embalados asseticamente a amostra é recolhida também de forma assética, automaticamente pela máquina de embalamento (*StarAsept® 1307 AB*). As bolsas de amostras utilizadas são de 7L de capacidade. Para produtos líquidos embalados em Bag-In-Box também a amostra é

recolhida de forma automática pela embaladora (*Van Meurs*®). Para estes produtos, a amostra é recolhida em bolsas de 3L. No caso de ovoprodutos líquidos embalados em contentores as amostras são recolhidas diretamente dos contentores em copos de análises estéreis de 100mL, depois da correta desinfeção das mãos do operador e do bocal do contentor onde é efetuada a recolha. O número de amostras recolhidas por cada lote de produto depende da quantidade produzida por lote e das análises necessárias ao produto. As embalagens e copos de amostras são todos guardados na câmara de refrigeração de produto final (0 a 5°C), no espaço destinado apenas às amostras para o laboratório. Todas as amostras são identificadas com a designação do produto, número de lote, número da amostra, número da palete ou de contentor e hora de recolha da amostra.

São recolhidos 6 a 8 ovos cozidos de cada linha de produção (linha 1 ou 2) e de cada seleção (1ª seleção ou 2ª seleção) em baldes com salmoura, também utilizada durante essa mesma produção e, são cerrados com tampa. As salsichas para amostragem são feitas aquando da produção de salsicha. O operador que está na produção faz a salsicha para amostra com metade do tamanho de uma salsicha normal (1,5m aproximadamente). O número de amostras (baldes ou salsichas) depende da produção e das linhas em uso. Os baldes são identificados com lote, linha de produção e seleção enquanto as salsichas são identificadas com o lote. Os baldes com as amostras assim como as salsichas ficam guardados na câmara de produtos finais (0 a 5°C), no espaço destinado às amostras para o laboratório.

As amostras de clara em pó são recolhidas das caixas de produto final, depois do produto já se encontrar à temperatura ambiente. É utilizado um copo de análise estéril para encher uma bolsa de amostras, também estéril com cerca de 200g de produto. As amostras são identificadas com o número do lote e guardadas à temperatura ambiente, em local destinado às amostras de laboratório, na zona de produção de clara em pó.

As recolhas de amostras para verificação de limpezas de superfícies, equipamentos ou mão de manipuladores são efetuadas com zaragatoas estéreis embebidas em solução de Ringer ou esponjas de recolha que são esfregadas em 10 ou 100 cm<sup>2</sup> do que se pretende analisar, dependendo também do tamanho da amostra. As recolhas são realizadas por um operador depois da correta desinfeção das mãos com álcool etílico imediatamente antes da recolha. Os tubos de ensaio onde são submersas as zaragatoas imediatamente após a recolha e as bolsas onde se

colocam as esponjas logo a seguir à recolha são identificados com número de amostra e superfície ou local de recolha. Para as recolhas de água de cozedura, água de arrefecimento, água de CIP, água de esterilização e solução de salmoura que são analisadas microbiologicamente utilizam-se recipientes de análise estéreis de 100mL com tampa, depois da correta desinfecção das mãos do operador que evita tocar no interior do recipiente aquando da recolha.

Para este tipo de amostras, são anotadas a data e a hora de recolha, a zona da produção onde foi recolhida, a última higienização realizada ao equipamento/superfície a analisar, o aspeto visual e olfativo da amostra e outras características específicas da amostra (por exemplo descrição do local exato de recolha ou nome do operador ao qual se efetuou a zaragatoa às mãos). As amostras são então guardadas em refrigeração (0 a 5°C) no laboratório até serem analisadas num espaço de tempo máximo de 3 horas. A instrução de trabalho encontra-se no anexo 4.

Para a análise ambiental utilizam-se placas de *petri* estéreis já plaqueadas com os meios de cultura solidificados. Estas são levadas para locais específicos onde são abertas e aí permanecem 20 a 30 minutos. Aponta-se a hora de início e de fim, o local de recolha da amostra e a data da recolha.

As amostras recolhidas de ovoprodutos líquidos podem ser pipetadas diretamente para os meios ou então diluídas em solução de Ringer. As diluições são realizadas em meio assético, em tubos de ensaio com 9mL de solução de Ringer para onde se pipeta 1mL de amostra. As amostras são diluídas o número de vezes que for considerado necessário para que os resultados sejam viáveis. Isto vai depender do tipo produto, e do conhecimento prévio que possa haver do número de colónias prováveis nesse produto. Para ovoprodutos sólidos ou em pó são pesados 15g de amostra aseticamente, colocados numa bolsa de *stomacher*, cobertos com 25mL de solução de Ringer e triturados no *stomacher*, antes de serem utilizadas.

#### **2.1.4. Método de isolamento e identificação de *Listeria* com caldos de enriquecimento seletivos**

O procedimento utilizado para isolamento e deteção de *Listeria* pode ser dividido em três partes: pré-enriquecimento em meio líquido não seletivo, enriquecimento em meio líquido seletivo e isolamento diferencial em meio sólido

seletivo. A primeira parte consistiu em pesar assepticamente 25g de amostra, para uma bolsa de *stomacher* e, em seguida cobrir com 225mL de caldo de enriquecimento de *Listeria*, macerar no *stomacher*, fechar a bolsa e incubar na estufa de 30°C durante 24 horas. Este procedimento é aplicado para ovoprodutos sólidos, como são o ovo cozido ou a salsicha. Para amostras de ovoprodutos líquidos, pipetaram-se 25mL da amostra diretamente para o frasco que continha 225ml de caldo de enriquecimento de *Listeria*.

Depois de terminado o tempo de incubação, procede-se ao enriquecimento da amostra. Pipetaram-se 10mL desse mesmo meio que contém a amostra para o frasco que contém 100mL de meio líquido seletivo, *Fraser Broth*. Seguidamente, o frasco depois de cerrado com a tampa, foi a incubar durante 24 horas na estufa de 37°C.

Por fim, inoculou-se a amostra numa placa de *petri* contendo o meio cultura sólido *Oxford*, cuidadosamente para não ferir o meio de cultura. A placa foi então incubada em posição invertida na estufa de 37°C durante 48 horas. Após 24 horas de incubação as colónias de *Listeria*, quando existentes, mostram-se de cor verde-azeitona rodeadas por um halo preto. Depois de 48 horas as colónias escurecem ficando negras no centro e rodeadas por zonas negras. O resultado é, então, apontado como sendo positivo ou negativo para *Listeria*.

A instrução de trabalho encontra-se no anexo 5.

#### **2.1.5. Método de isolamento e identificação de *Salmonella* com caldos de enriquecimento seletivos**

O procedimento para deteção de *Salmonella* pode ser dividido em três partes: pré-enriquecimento em meio líquido não seletivo, enriquecimento em meio líquido seletivo e isolamento diferencial em meio sólido seletivo. A primeira parte consistiu em pesar assepticamente 25g de amostra para uma bolsa de *stomacher* e, em seguida cobrir com 225mL de água peptonada tamponada, macerar no *stomacher*, fechar a bolsa e incubar na estufa de 37°C durante 16 horas. Este procedimento é aplicado para ovoprodutos sólidos, como são o ovo cozido e a salsicha e também para clara de ovo em pó. Para amostras de ovoprodutos líquidos, pipetou-se 25mL de amostra diretamente para o frasco que continha 225mL de água peptonada tamponada.

Depois de terminado o tempo de incubação, procede-se ao enriquecimento da amostra. Pipetaram-se 10mL desse mesmo meio que contém a amostra para o frasco que contém 100mL de meio líquido seletivo, *Selenito-Cistina*. A seguir o frasco foi fechado com a tampa e foi a incubar durante 8 horas na estufa de 45°C.

Por fim, inoculou-se a amostra numa placa de *petri* contendo o meio cultura sólido *SM2 (SMID, Biomerieux)* cuidadosamente para não ferir o meio de cultura. A placa foi então incubada em posição invertida na estufa de 37°C durante 24 horas. As colónias características de *Salmonella* apresentam uma cor rosa pálida a roxo. O resultado é, então, apontado como sendo positivo ou negativo para *Salmonella*.

A instrução de trabalho encontra-se no anexo 6.

#### **2.1.6. Método de identificação de *E. coli*, aeróbios totais e enterobactérias com 3M™ Petrifilm™ Count Plates**

Os três tipos diferentes de *petrifilm* têm procedimentos de utilização semelhantes, variando apenas a temperatura e o tempo de incubação. Colocaram-se os *petrifilm* numa superfície plana e sob ambiente esterilizado pelo bico de *Bünsen*. Para cada *petrifilm* levantou-se a película protetora e com uma pipeta descartável pipetou-se 1mL de amostra para o centro do *petrifilm*. Tapou-se com a película de forma cuidadosa e sem deixar cair, a fim de evitar o aparecimento de bolhas e pressionou-se com o espalhador para estender a amostra na área colorida do *petrifilm*. Foram então incubados com a face para cima, numa pilha de máximo 20 *petrifilm*. Os *petrifilm* de deteção de *E. coli* foram incubados na estufa de 45°C durante 24 horas, enquanto os de aeróbios totais foram incubados na estufa de 30°C durante 48 a 72 horas e os de enterobactérias na estufa de 37 °C durante 24h.

Concluído o tempo de incubação os *petrifilm* foram lidos com o auxílio de um contador de colónias. As colónias de *E.coli*, quando presentes mostram uma coloração azul escura, com ou sem formação de gás. No *petrifilm* de aeróbios totais consideraram-se todas as colónias de cor vermelha, independentemente do tamanho apresentado. As colónias de enterobactérias de cor vermelha podem aparecer rodeadas por um halo amarelo (bactérias produtoras de ácido) ou com bolhas de gás formado à sua volta. A instrução de trabalho encontra-se no anexo 7.

Os resultados dos *petrifilm* são apresentados sob a forma de UFC/mL.

### **2.1.7. Método de isolamento e deteção de bolores, leveduras, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* por espalhamento**

Este procedimento de inoculação é semelhante para os vários tipos de microrganismos, variando apenas o meio de cultura, o tempo e a temperatura de incubação. Colocaram-se as placas de *petri* com o meio de cultura solidificado em ambiente esterilizado por bico de *Bünsen*. Pipetou-se 0,1mL de amostra para a placa de *petri* e espalhou-se a amostra na superfície do meio de cultura, com cuidado para não ferir o meio nem afastar a placa da área estéril. Deixou-se secar a amostra antes de incubar as placas em posição invertida.

Para a deteção de bolores e leveduras o meio utilizado foi gelose de *Sabouraud Chloramphenicol* e as placas com a amostra foram incubadas a 30° durante 3 a 5 dias. As colónias de leveduras têm cor clara e aspeto redondo brilhante enquanto os bolores apresentam um aspeto filamentosos e não uniforme.

O meio de cultura utilizado para deteção de *Bacillus cereus* é a gelose de *Bacillus cereus* (acc. to Mossel). As placas foram incubadas durante 24 horas na estufa de 30°C e as colónias, quando formadas, apresentavam coloração rosa quase sempre rodeadas por um halo que indica a produção de lectinase. A instrução de trabalho encontra-se no anexo 8.

Na deteção de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva foi utilizado o meio de cultura gelose de *Baird – Parker* que se incubou com a amostra durante 24 a 48 horas na estufa de 37°C. As colónias de *Staphylococcus aureus* apresentam uma cor cinzenta ou negra rodeada por um halo opaco de fibrina perfeitamente desenhado e facilmente visível.

O meio gelose de *M-Enterococcus* é utilizado na deteção de *Enterococcus*. A incubação das placas realizou-se na estufa de 37°C por um período de 24 a 48 horas e as colónias formadas apresentam cor vermelha clara ou escura.

Os resultados obtidos da leitura das placas são registados sob a forma de UFC/mL.

### **2.1.8. Método de isolamento e identificação de coliformes totais, *Clostridium*, e lactobacilos por incorporação**

Este procedimento é semelhante para os vários tipos de microrganismos, variando apenas o meio de cultura, o tempo e a temperatura de incubação. As

placas de *petri* descartáveis esterilizadas foram colocadas em cima da bancada, junto ao bico de *Bünsen* de forma a conseguir um ambiente estéril para as placas. Pipetou-se 1mL de amostra para uma placa, com cuidado para não afastar a tampa da placa ou sair da zona esterilizada pelo bico de *Bünsen*. Colocou-se a primeira camada do meio de cultura que se encontrava na estufa de 45°C para não solidificar, com movimentos rotativos para espalhar a amostra uniformemente na placa, cuidadosamente, sem levantar a placa da mesa de trabalho e evitando que o meio contacte com a tampa da placa. Depois de solidificada a primeira camada, adicionou-se uma segunda camada que se deixou solidificar antes de incubar em posição invertida.

Para deteção e enumeração de coliformes totais foi utilizado o meio seletivo *violet red bile agar* (VRBL) que, depois de plaqueado como foi descrito, levou-se a incubar durante 24 horas na estufa de 30°C. As bactérias coliformes formam colónias violetas com diâmetro igual ou superior a 0,5 mm.

O meio utilizado para determinação de *Clostridium* é o meio de gelose de TSN (*tryptone sulfite neomycin*). Este meio deve ser incubado a 45°C durante 24h, em ambiente de anaerobiose, e por isso, colocaram-se as placas numa câmara de anaerobiose que depois se colocou na estufa. A leitura de resultados foi feita imediatamente depois de retirar as placas da câmara pois as colónias podem ficar oxidadas com o tempo. As colónias formadas apresentam um halo negro. A instrução de trabalho encontra-se no anexo 9.

Para enumeração de colónias de *Lactobacillus* foi utilizada gelose MRS (*De Man, Rogosa and Sharpe*). Também este meio teve de ser incubado em câmara de anaerobiose, mas neste caso, na estufa de 37°C durante um período de 48 horas. As colónias apresentadas são de cor branca com a forma de grão de arroz.

## 2.2. Material e métodos para análises físico-químicas

### Material

- Geral de laboratório para análises físico-químicas:
  - copos de medição em PVC de 1L;
  - copos de vidro de 100mL;
  - frascos de 100mL com tampa vermelha;
  - espátulas de inox;
  - magnetos para agitação;
  - conta gotas;



- pipetas de vidro;
- balança analítica *Kern 572* (0,001 g);
- zaragatoas *3M™ Clean Trace™* para água e para superfícies.

#### Equipamentos (Figura 7)

- refratômetros *Atago® pocket PAL-α* (0 – 85%) e *Atago® palett Pr-201α* (0 – 60 %);
- medidor de pH e temperatura *HI 2221* - *Hanna® Instruments*;
- analisadores de humidade *Sartorius® - MA 35* e *HR 73-Mettler® Toledo*;
- viscosímetros *Brookfield® DV-I* e *Brookfield® DV-II+Pro*;
- condutivímetro *Serie® InLab 738*;
- luminômetro *3M™ Clean Trace™*;
- titulador automático *848 Titrino Plus* – *Metrohm®*

#### Reagentes

- ácido nítrico [HNO<sub>3</sub>] (2N)
- nitrato de prata [AgNO<sub>3</sub>](1M)
- kit de análises de cloro e dureza da água da *Aquamerck®*



**Figura 7 - Equipamentos utilizados: (a) refratômetro *Atago® pocket PAL-α* (0 – 85%); (b) refratômetro *Atago® palett Pr-201α* (0 – 60 %); (c) medidor de pH e temperatura *HI 2221* - *Hanna® Instruments*; (d) analisador de humidade *Sartorius® - MA 35*; (e) analisador de humidade *HR 73- Mettler® Toledo*; (f) viscosímetro *Brookfield® DV-II+Pro*; (g) condutivímetro *Serie® InLab 738*; (h) luminômetro *3M™ Clean Trace™*; (i) titulador automático *848 Titrino Plus* – *Metrohm®***

### **2.2.1. Recolha, preparação e caracterização das amostras**

As análises físico-químicas de *ovoprodutos líquidos* foram realizadas após as análises microbiológicas. As amostras que não necessitavam de análises de microbiologia prévias foram guardadas no frigorífico a temperaturas de refrigeração de 0 a 5°C. A recolha de ovoprodutos líquidos para análise físico-química diretamente das linhas de produção efetuou-se em copos de medição de 1L. Garantiu-se que o produto recolhido estava homogeneizado proporcionando assim amostras representativas e fiáveis. As amostras foram identificadas com a designação, o local e a hora de recolha.

A determinação de extrato seco de amostras de *clara em pó* foi realizada com especial cuidado para evitar que a amostra adquira humidade, secando sempre a espátula utilizada e colocando a bolsa com a amostra em local seco.

As amostras de *água* e de *salmoura* depois da análise microbiológica foram mantidas em refrigeração (0 a 5°C) até serem analisadas quanto aos seus parâmetros físico-químicos. Quando a finalidade das amostras era apenas para análises físico-químicas a recolha era feita em frascos de 100mL limpos e secos que foram cerrados com a tampa e identificados com nome da amostra, data e hora de recolha. Os frascos ficaram no frigorífico (em refrigeração de 0 a 5°C) até à análise, que ocorreu num prazo máximo de 2h após a colheita.

As amostras das *águas provenientes da ETAR* foram recolhidas em recipientes próprios para o efeito e de uso exclusivo para águas residuais, rotulados e identificados de forma a serem separados do restante material.

### **2.2.2. Métodos de determinação do °Brix e do pH**

Para determinar o grau Brix colocou-se uma pequena quantidade de amostra no óculo de leitura de um dos refratómetros existentes: *Atago® pocket* e *Atago® palett*. e registou-se o valor mostrado no aparelho. No fim, o óculo de leitura foi limpo com água destilada e seco com papel absorvente.

O pH foi lido diretamente do medidor de pH e temperatura, depois de submergir o eléctrodo na amostra e agitar suavemente. Esperou-se que o valor estabiliza-se antes de se registar a leitura. A calibração do medidor foi realizada em

2 pontos com uma frequência de 24 horas. No anexo 10 encontra-se a instrução de trabalho.

### **2.2.3. Método de determinação do extrato seco com balança de halogénio**

O extrato seco foi determinado com recurso às balanças de halogénio disponíveis na sala de físico-químicos. Para analisar uma amostra na *Sartorius® - MA 35* abriu-se a cobertura e colocou-se um prato de alumínio com um filtro no centro da balança. Depois de se ter tarado esse valor retirou-se o filtro e colocaram-se 0,500 a 0,700 gramas da amostra no centro do prato de alumínio com o auxílio de uma espátula. O filtro foi colocado depois, por cima da amostra. Pressionou-se o botão para dar início à análise e esperou-se cerca de 7 minutos pelo resultado que apareceu no ecrã. Com o analisador de humidade *HR 73- Metter® Toledo* o procedimento utilizado foi o mesmo. As temperaturas atingidas durante a secagem foram definidas anteriormente pelo fabricante. O tempo de análise pode depender da quantidade e tipo de produto. Os resultados obtidos foram em forma de percentagem de matéria seca de produto analisado. No anexo 11 encontra-se a instrução de trabalho.

### **2.2.4. Método de determinação da viscosidade**

Para medição da viscosidade de ovoprodutos líquidos estão disponíveis dois viscosímetros rotacionais. A quantidade de amostra utilizada foi de 500 a 600mL. A sonda e velocidade em RPM (rotações por minuto) de teste dependeram do tipo de produto analisado. A Tabela 4 apresenta as sondas e temperaturas utilizadas para cada produto analisado. O procedimento é semelhante para os dois viscosímetros, com a diferença de que o viscosímetro *DV-II+Pro* possui uma sonda de temperatura que não existe no *DV-I*. Antes de iniciar o ensaio o aparelho efetua “*autorun*”. A sonda de análise selecionada foi aplicada, escolheu-se a velocidade e mergulhou-se a sonda de medição de temperatura no copo com a amostra. Quando se inicia o ensaio, o ecrã mostra a velocidade selecionada (em RPM), a “*torque*” em percentagem, o valor medido de temperatura e a viscosidade em Paxs. Os resultados são apontados quando aparecem estabilizados no ecrã. No anexo 12 encontra-se a instrução de trabalho.

**Tabela 4 - Sondas e velocidades utilizadas na determinação da viscosidade**

Sonda	Velocidade (RPM)	Produto
S 61	200	Clara
S 62	100	Ovo inteiro Ovo com sal
S 63	60	Gema Gema com sal (baixo extrato)
S 64	30	Gema com sal (baixo extrato)

#### **2.2.5. Método de determinação da condutividade com condutivímetro de bancada**

Para determinar a condutividade da água recolhida foi apenas necessário mergulhar a sonda do condutivímetro na amostra recolhida e esperar que o valor apresentado no ecrã estabilizasse. No final da leitura, a sonda foi limpa com água destilada e seca com papel absorvente. Os resultados apontados encontravam-se em mS/cm ou  $\mu$ S/cm. O condutivímetro deve ser calibrado todos os anos com os padrões de calibração recomendados.

No anexo 13 encontra-se a instrução de trabalho.

#### **2.2.6. Método de determinação da quantidade de ATP com o *Luminometer***

A verificação da limpeza de uma superfície por análise com zaragatoas de *Clean Trace* é fácil, rápido e eficaz. Para uma amostra de água a zaragatoa foi retirada da cápsula e mergulhada durante alguns segundos na amostra. Em seguida a zaragatoa foi colocada novamente na capsula e agitada vigorosamente durante alguns segundos. Colocou-se a cápsula no leitor e leu-se o valor apresentado no ecrã. Para zaragatoas de superfície o procedimento é semelhante, a diferença está em que, a zaragatoa em vez de ser submersa na amostra é esfregada na superfície que se pretende testar. O resultado é apresentado em RLU (*relative light units*).

No anexo 14 encontra-se a instrução de trabalho.

#### **2.2.7. Método de determinação da percentagem de NaCl**

A percentagem de sal de amostras de ovo líquido com sal foi determinada utilizando o titulador automático. Foram pesados 0,500 a 0,600 mg de

amostra. Em seguida adicionaram-se 60mL de água destilada e 5 gotas de HNO<sub>3</sub> à amostra. Verificou-se se a garrafa de titulante, nitrato de prata ainda possuía reagente suficiente para proceder ao ensaio. Colocou-se um magneto dentro do copo com a amostra e colocou-se no agitador magnético. Inseriu-se o valor exato da massa da amostra no titulador e colocou-se o elétrico de pH e o doseador no local correto para dar início à titulação. Por último pressionou-se o botão para dar início à titulação. Quando o aparelho termina a titulação é indicado no ecrã a curva de titulação, o volume de AgNO<sub>3</sub> gasto e a percentagem de sal presente na amostra analisada.

No anexo 15 encontra-se a instrução de trabalho.

#### **2.2.8. Método de determinação de cloro e dureza da água com kit rápido de análises**

O cloro total foi determinado com recurso a um kit de análise da *Aquamerck*. O teste consistiu em juntar sete gotas do primeiro reagente e uma do segundo reagente no tubo de observação que vem com o kit. Depois de agitar bem juntou-se 10mL da amostra de água a analisar. Comparou-se a cor obtida com a escala de cores apresentadas no tubo e registou-se o valor do cloro total da amostra.

A determinação da dureza foi efetuada com recurso a um teste de análise da *Aquamerck* para medição da dureza total. Adicionaram-se 3 gotas do primeiro reagente a 5 mL de amostra, numa. Observou-se o aparecimento de uma coloração vermelha na solução com a amostra. Adicionou-se o segundo reagente até a solução mudar de vermelho para verde. A quantidade de reagente gasto é lido na pipeta e o resultado apresentado em mg/L de CaCO<sub>3</sub>.

### **2.3. Material e métodos para análises de funcionalidade**

#### Material

- copos de medição de 1L;
- recipiente de 100mL transparente;
- espátulas de inox;
- magnetos para agitador;
- copos plásticos de 100mL com tampa vermelha;
- tesouras;
- provetas de 150mL;
- funis;

- gaze;
- tabuleiros brancos;
- exsiccador.

#### Equipamentos

- balança *Kern PLS*;
- balança *Kern 572 (0,001 g)*;
- agitador magnético;
- banho-maria;
- batedeira industrial *Sinmag mixer SM-200C* (Capacidade 20 L);
- texturómetro *Brookfield CT3texture analyzer*.

### **2.3.1. Recolha, preparação e caracterização das amostras**

As análises de funcionalidade foram efetuadas a *clara de ovo líquida não pasteurizada*, *clara de ovo pasteurizada*, *clara de ovo em pó não pasteurizada* e *clara de ovo em pó pasteurizada*.

As amostras de *clara de ovo líquida não pasteurizada* foram recolhidas em copos de medição de 1L de capacidade, diretamente dos tanques de produto cru, depois de garantir que a amostra recolhida era homogénea e representativa do lote a analisar. A *clara de ovo líquida pasteurizada* foi recolhida, com a ajuda de copos de medição de 1L, das bolsas de amostra, depois das análises de microbiologia e físico-químicas serem realizadas. A *clara de ovo em pó* foi reidratada antes de se procederem às análises funcionais.

Para todas as amostras (líquidas e em pó) foram efetuadas as análises físico-químicas possíveis antes de serem realizadas as análises de funcionalidade, entre as quais, °Brix, pH, viscosidade e extrato seco.

O processo utilizado para reidratar as amostras em pó encontra-se descrito em seguida. Depois da reidratação as amostras destinadas à análise da capacidade espumante foram submetidas a refrigeração (0 a 5°C) e as análises realizadas sempre a temperaturas inferiores a 11°C.

### **2.3.2. Método de reidratação da clara em pó**

Pesaram-se 180g de água e adicionaram-se 20g de clara em pó. Colocou-se uma barra de agitação magnética dentro do copo com a água e a clara em pó que depois foi colocado em cima do agitador magnético durante aproximadamente 20

min até total dissolução. Em seguida removeu-se a barra de agitação magnética e deixou-se em repouso no exsiccador durante 30 min. A espuma deve ser removida antes de utilizar a clara para determinações físico-químicas e de funcionalidade.

No anexo 16 encontra-se a instrução de trabalho.

### **2.3.3. Preparação de amostras para determinação da força de gel**

Para a determinação da força de gel da clara em pó começou-se por reidratar a clara como indicado no ponto 2.3.2. A amostra foi depois transferida para 3 copos plásticos de tampa vermelha devidamente identificados com o lote e fechados com a tampa. Os copos foram, seguidamente, colocados em banho-maria a 90°C durante 30 minutos. Depois de cozidos, os copos foram retirados do banho-maria e colocados em tabuleiros com gelo e água para arrefecerem até 25°C. Os copos com a amostra foram, depois, abertos e a clara foi retirada passando uma espátula junto às paredes interiores do copo, tentando evitar danificar a amostra. Os 3 cilindros de clara cozida obtidos foram depois cortados para ficarem com 3 cm de altura, tendo o cuidado de se obter uma superfície plana para executar o teste.

As amostras de clara líquida foram tratadas de forma idêntica à clara em pó, à exceção da reidratação da amostra que não é aplicada a este produto. A clara líquida deve ser transferida com cuidado para os copos, de forma a evitar a formação de espuma.

No caso das salsichas de clara, foram tratadas de forma mais simples pois não necessitam de cozimento prévio em banho-maria. Removeram-se as películas envolventes (tripas) com uma tesoura antes de serem cortados cilindros com 3cm de altura.

### **2.3.4. Método de determinação da capacidade espumante**

Para a determinação da capacidade espumante foi utilizada a batedeira industrial que se pode ver na Figura 8. Depois de determinar o peso de 100 mL de amostra colocaram-se 600 mL na batedeira que se acendeu na primeira velocidade (mínima) durante 1 minuto. Em seguida a amostra foi batida na segunda velocidade (média) por mais outro minuto e depois durante 3,5 minutos na terceira velocidade (máxima). A espuma obtida foi então retirada e transferida para um recipiente transparente e preenchido com a espuma, para que não tenha espaços vazios e,

aplanado na superfície. Esta espuma foi, em seguida, pesada e transferida para um funil com gaze que se colocou em cima de uma proveta. Determinou-se, com a balança *Kern 572* o peso do fluido que escorreu da espuma durante 1h, fazendo pesagens de dez em dez minutos. O processo de recolha, pesagem e transferência da espuma foi efetuado o mais rapidamente possível, depois de terminada a batadura. No anexo 18 encontra-se a instrução de trabalho.



**Figura 8 - Batedeira industrial Sinmag Mixer SM-200C (Cap. 20L)**

### **2.3.5. Determinação da força de gel**

A força de gel das amostras foi determinada depois da preparação das amostras como indicado em 2.3.3. As amostras foram, em seguida, arrefecidas e testadas à temperatura ambiente no texturómetro (Figura 9). Foram cortados 3 cilindros de cada amostra, com uma superfície plana, e colocados no texturómetro que fez uma medição, no centro de cada cilindro, com os seguintes parâmetros de análise: teste normal, trigger 3,9g, deformation 4,2 mm e speed 1,5mm/s. Foi considerada a média de resultados (peak load em gramas) dos 3 ensaios realizados.

A instrução de trabalho encontra-se no anexo 18.



**Figura 9 -Texturómetro Brookfield CT3 Texture analyzer**



### 3. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos das análises físico-químicas, de microbiologia e de funcionalidade da clara.

#### 3.1. Análises físico-químicas

De forma a ajudar na interpretação dos resultados obtidos nas análises físico-químicas foram construídas cartas de controlo considerando os limites superiores (LSC) e inferiores (LIC) calculando a média  $\pm 2$  vezes o desvio-padrão, isto é, considerando o intervalo  $]\bar{x} - 2\sigma ; \bar{x} + 2\sigma [$ , 95,46% dos resultados estão nesse intervalo.

##### 3.1.1. Determinação do extrato seco de ovoprodutos líquidos

Foram analisados dois tipos de amostras no *Analizador de Humedad Sartorius - MA 30*. A primeira de *ovo líquido não pasteurizado* para a qual se realizaram 18 ensaios ao mesmo lote (Figura 10). A segunda de *clara líquida não pasteurizada* para a qual se efetuaram 16 ensaios ao mesmo lote. A massa de amostra pesada para cada ensaio encontra-se em valores entre os 0,500g e os 0,900g.



Figura 10 - Gráfico correspondente aos ensaios de determinação de % de extrato seco em ovo líquido não pasteurizado

A média  $\pm$  desvio padrão de resultados encontrada para o extrato seco de amostras de ovo líquido não pasteurizado foi de  $24,11 \pm 0,51$  % (Figura10). O valor obtido no ensaio N3 situam-se abaixo do LIC e o valor encontrado no ensaio N21 situam-se acima do LSC. Isto pode ser devido a uma incorreta homogeneização da amostra antes da análise, o que resultaria, no caso do ensaio N3 num excesso de gema e no caso do ensaio N21 num excesso de clara. Os restantes valores encontram-se dentro dos limites de controlo.

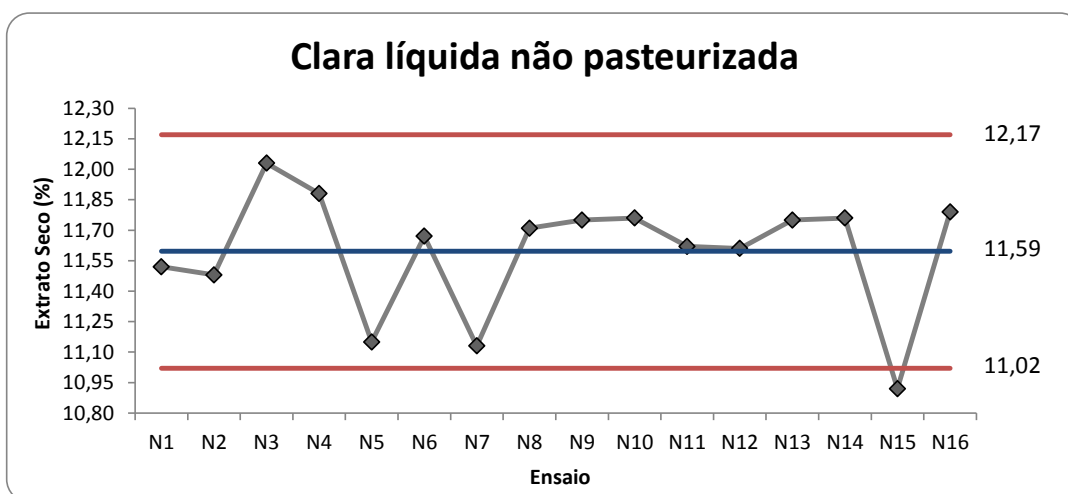
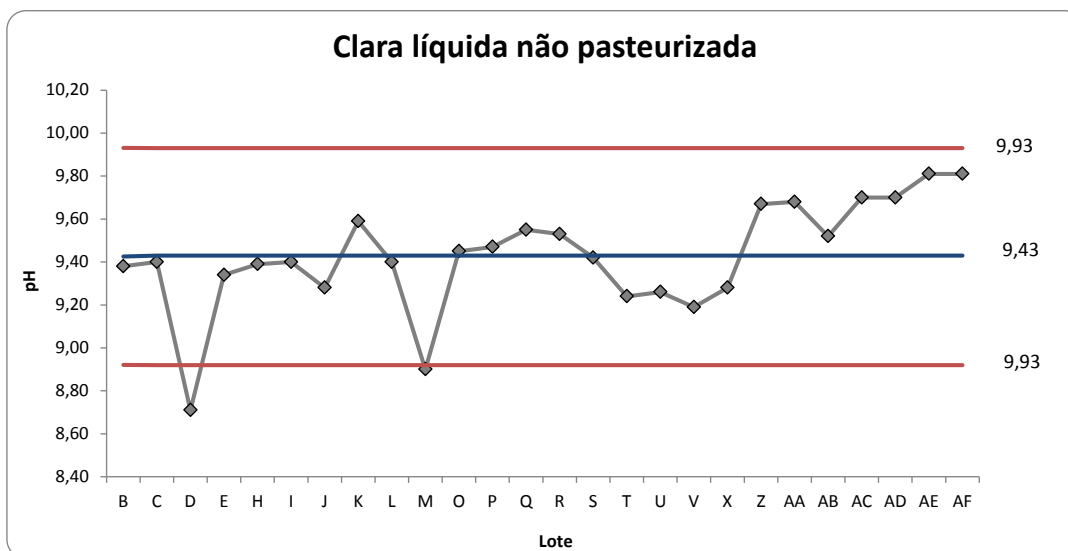


Figura 11 - Gráfico correspondente aos ensaios de determinação de % de extrato seco em clara líquida não pasteurizada

O valor da média  $\pm$  desvio padrão de extrato seco encontrado para a clara líquida antes da pasteurização foi de  $11,596 \pm 0,287$  % (Figura 11). O valor encontrado no ensaio 15 encontra-se abaixo do LIC. Este desvio dos resultados pode dever-se à homogeneização da amostra antes da análise. Se a amostra possuir maior proporção de água do que o real, o valor de percentagem de extrato seco diminui.

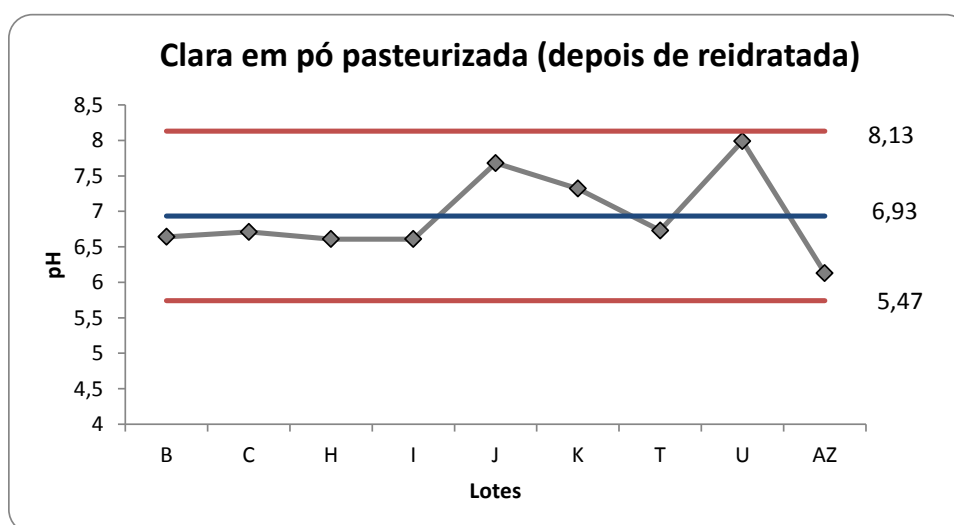
### 3.1.2. Determinação do pH de clara líquida não pasteurizada e clara em pó reidratada

Foi determinado o pH de três diferentes produtos: *clara líquida não pasteurizada*, *clara em pó pasteurizada reidratada* e *clara em pó não pasteurizada reidratada* com a finalidade de comparar os valores obtidos. As análises foram efetuadas no medidor de pH da *Hanna® Instruments*.



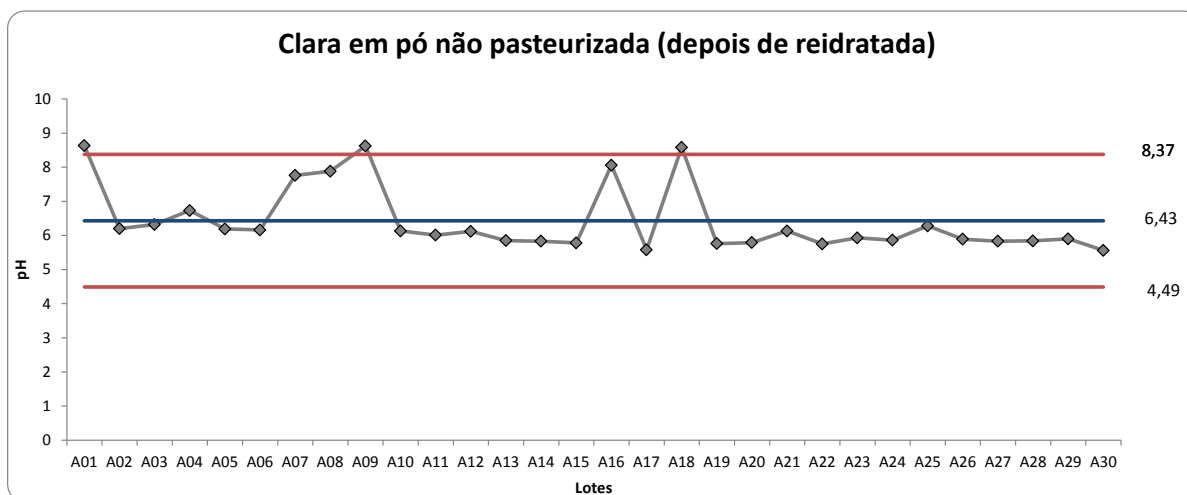
**Figura 12 - Gráfico de valores de pH obtidos para os diferentes lotes de clara líquida não pasteurizada**

A maioria dos valores de pH determinados para os vários lotes de clara líquida não pasteurizada (Figura 12) encontram-se dentro dos limites de controlo e apresentam uma média  $\pm$  desvio padrão de  $9,43 \pm 0,68$ . Os valores dos lotes D e M podem encontrar-se fora dos limites devido a dois fatores, a recolha de amostra de forma incorreta ou por utilização de clara de ovo com data de postura demasiado recentes (ovos muito frescos). A forma de recolha de amostra pode influenciar, pois a parte aquosa pode diminuir o resultado real para valores abaixo do limite de controlo. A clara de ovo quando produzida com ovos mais frescos vai apresentar valores de pH mais baixos.



**Figura 13 - Gráfico de valores de pH obtidos para os diferentes lotes de clara em pó pasteurizada reidratada**

A clara em pó pasteurizada depois de reidratada apresenta valores médios de pH média  $\pm$  desvio padrão de  $6,93 \pm 0,66$  (Figura 13). Os resultados obtidos para os lotes analisados encontram-se dentro dos limites de controlo.



**Figura 14 - Gráfico de valores de pH obtidos para diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada reidratada**

Os lotes de clara em pó não pasteurizada analisados apresentam um pH, próximo da média  $\pm$  desvio padrão ( $6,43 \pm 0,97$ ) (Figura 14). Para os lotes A01, A09 e A18 o pH obtido encontra-se acima do LSC, que pode dever-se de erros durante a reidratação das amostras. Quando a reidratação é realizada com mais quantidade de água, o pH pode aumentar. Para estas amostras a reidratação deve ser repetida de forma a ser possível excluir que o erro obtido no valor de pH não é da hidratação mas sim inerente ao produto.

O pH da clara em pó antes e depois da pasteurização encontra-se na casa dos 6,50 a 6,90, o que demonstra que durante o processo de pasteurização não ocorrem situações que alterem o pH das amostras.

Comparando os resultados obtidos nos lotes de clara em pó com os lotes de líquida pode-se observar que esta última apresenta um pH superior aos apresentados pela clara em pó. Isto pode dever-se ao processamento da clara na transformação em pó, durante a qual esta é sujeita a ajustes de pH para valores inferiores a 8.

Todos os resultados obtidos estão dentro das especificações de produto e, portanto apresentam-se satisfatórios em termos de qualidade.

### 3.1.3. Determinação do °Brix de clara e clara em pó pasteurizada reidratada

Determinaram-se os °Brix de vários lotes de *clara em pó pasteurizada e clara em pó não pasteurizada* com a finalidade de comparar os resultados obtidos.

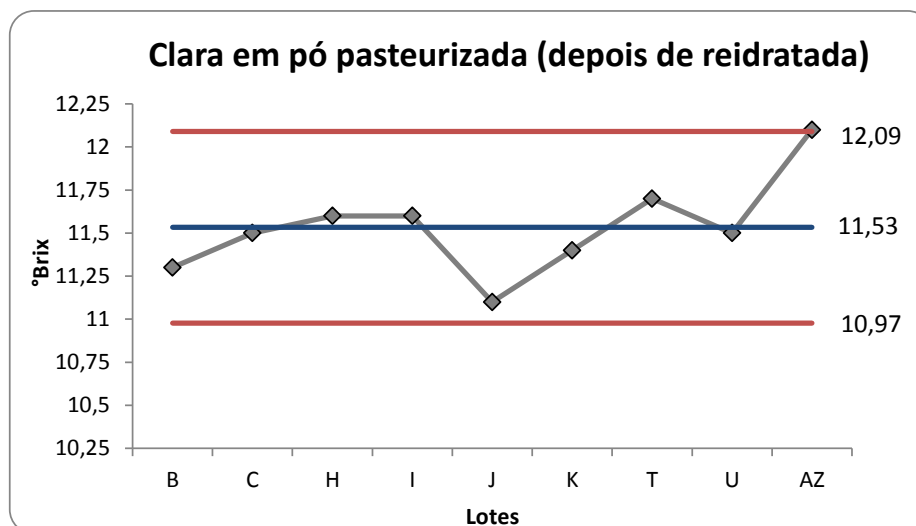


Figura 15 - Gráfico dos valores de °Brix obtidos nos vários lotes de clara em pó pasteurizada reidratada

Os valores de °Brix determinados para vários lotes de clara em pó pasteurizada reidratada apresentam uma média  $\pm$  desvio padrão de  $11,53 \pm 0,28$  °Brix (Figura 15). Todos os lotes analisados apresentam resultados dentro dos limites de controle. O lote AZ que apresenta um Brix de  $12,1^\circ$ , ou seja, encontra-se no limite superior de controle.

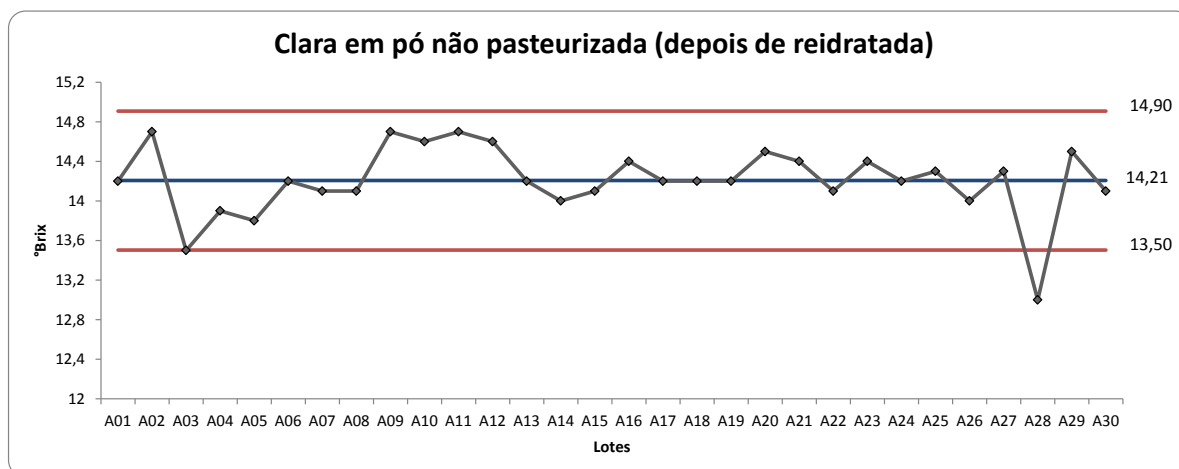


Figura 16 - Gráfico de valores de °Brix obtidos nos diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada reidratada

O valor de °Brix obtido nos lotes analisados apresentam uma média±desvio padrão de 14,20 ±0,36 °Brix (Figura 16). O lote A28 apresenta um valor de 13°Brix e encontra-se abaixo do limite inferior. Este resultado pode estar relacionado com processo de reidratação. Uma quantidade mais elevada de água pode significar numa diminuição do °Brix da amostra. Também a dissolução do pó pode estar relacionado. Uma menor solubilidade pode resultar na diminuição do °Brix final da amostra. Assim, amostra deve ser reidratada novamente de forma a ser possível excluir este erro e confirmar, assim se o resultado é inerente ao produto.

A clara em pó pasteurizada depois de reidratada apresenta, em média, valores inferiores de °Brix, quando comparado com a clara líquida pasteurizada (valores entre 14 e 16 °Brix). Isto pode dever-se ao processo de reidratação da clara. Ou seja, depois de reconstituída, a percentagem de sólidos totais que se consegue obter com a dissolução é inferior àquela que se encontra em clara de ovo naturalmente líquida.

Todos os resultados obtidos estão dentro das especificações de produto e, portanto apresentam-se satisfatórios em termos de qualidade.

### 3.1.4. Determinação do extrato seco de clara em pó pasteurizada e não pasteurizada

Foram analisados vários lotes de dois produtos distintos: *clara em pó pasteurizada* e *clara em pó não pasteurizada*. O extrato seco foi determinado com recurso à balança de halogénio *Sartorius*.

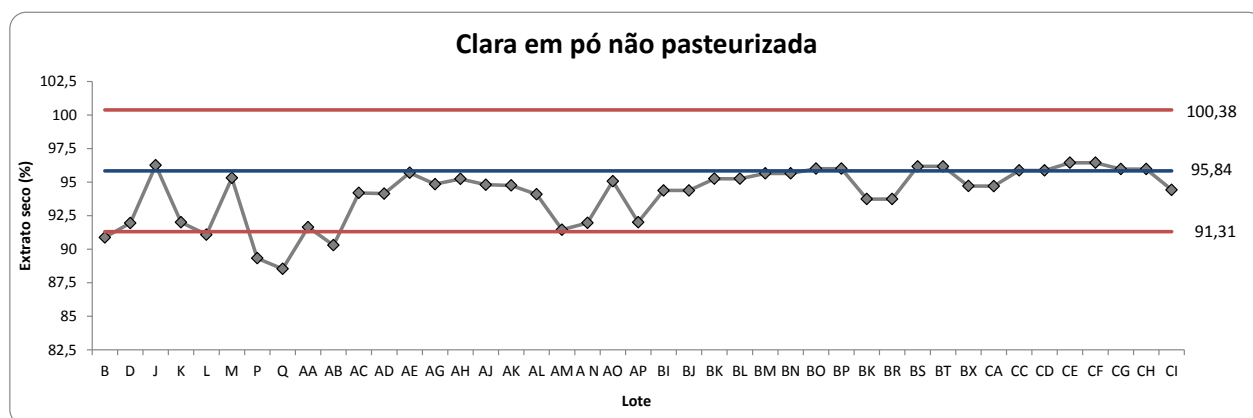
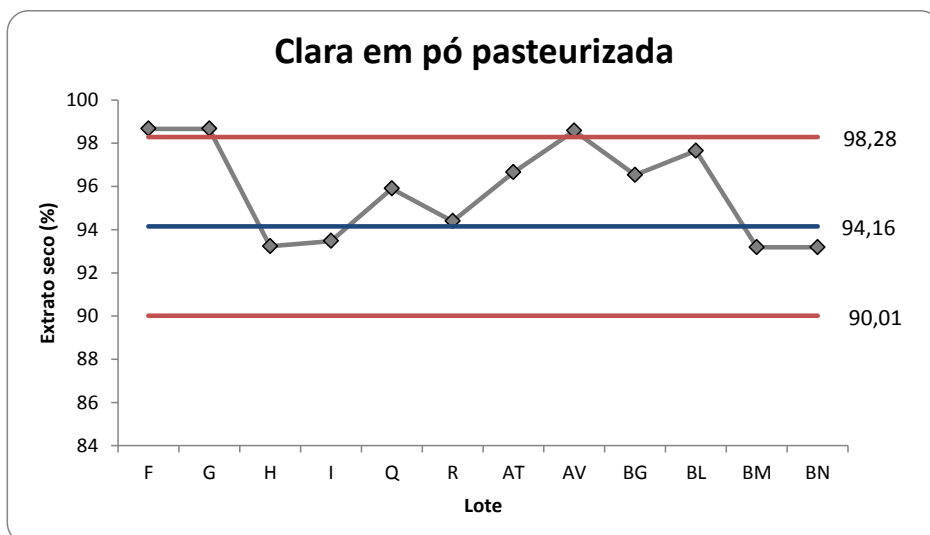


Figura 17 - Gráfico de valores de % de extrato seco obtidos nos vários lotes de clara em pó não pasteurizada



**Figura 18 - Gráfico de valores de % de extrato seco obtidos nos diferentes lotes de clara em pó pasteurizada**

Os resultados de extrato seco obtidos, em média, para a clara em pó, antes e depois de pasteurizar (Figura 17 e 18) são bastante próximas entre si, com  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$  de  $94,14 \pm 2,07 \%$  para a clara não pasteurizada e  $95,84 \pm 2,27 \%$  para a clara pasteurizada. Os valores de extrato seco que se encontraram abaixo do limite de controlo, na clara em pó não pasteurizada (lotes B, L, M, P, Q, AB) podem ter ocorrido durante a manipulação da amostra antes do ensaio. Como se trata de um produto com grande capacidade de absorver água, o resultado do extrato seco pode ser influenciado se ocorrer absorção de humidade e assim diminuir o valor da percentagem de matéria seca.

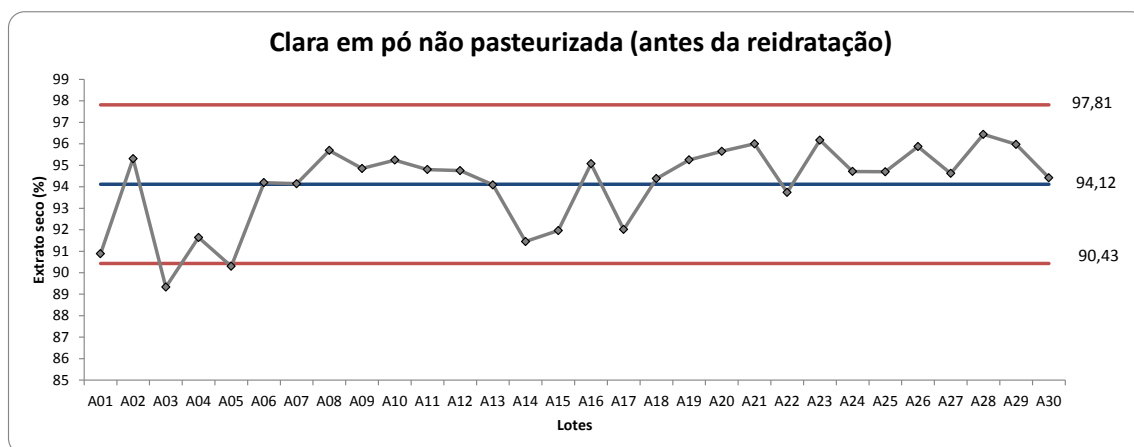
Os lotes F, G e AV de clara em pó pasteurizada, apresentam percentagens de extrato seco superiores ao LSC. Estes lotes apresentam uma percentagem de humidade inferior aos restantes devido a alterações que possam ter ocorrido no processo de secagem da clara.

Pode-se então verificar que o processo de pasteurização em *Hot Room* não influencia o resultado final de extrato seco.

### **3.1.5. Determinação do extrato seco da clara em pó não pasteurizada antes e depois de reidratação**

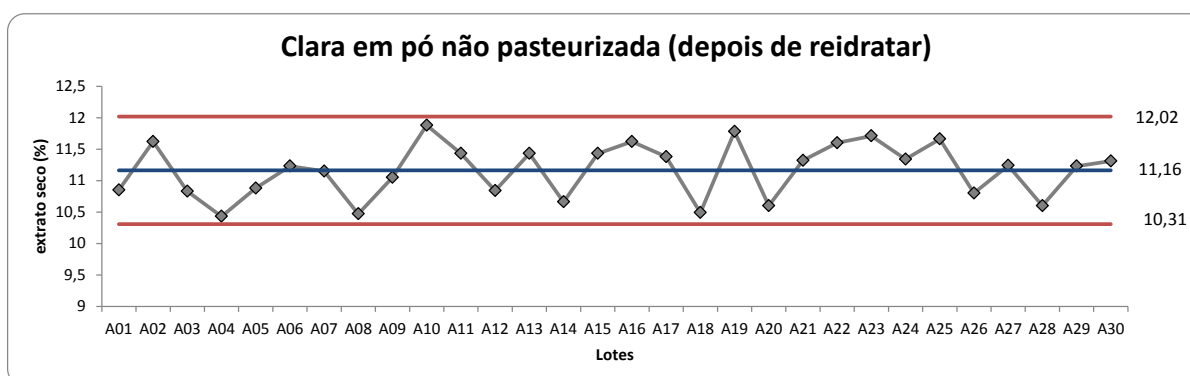
Para trinta lotes de *clara em pó não pasteurizada* foram determinadas as percentagens de extrato seco das amostras antes e depois da reidratação. A

determinação da percentagem de extrato seco foi realizada na balança de halogénio *Sartorius*.



**Figura 19 - Gráfico de valores de % de extrato seco obtidos nos diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada antes de reidratar**

Os lotes de clara em pó não pasteurizada analisados (Figura 19) encontram-se dentro dos limites de controlo, excetuando o lote A03 que se encontra abaixo do LIC. A média de valores encontra-se nos  $94,12 \pm 1,88$  de percentagem de extrato seco. O valor encontrado fora dos limites (lote A03) pode ter sido influenciado por absorção de humidade do meio antes da realização da análise.



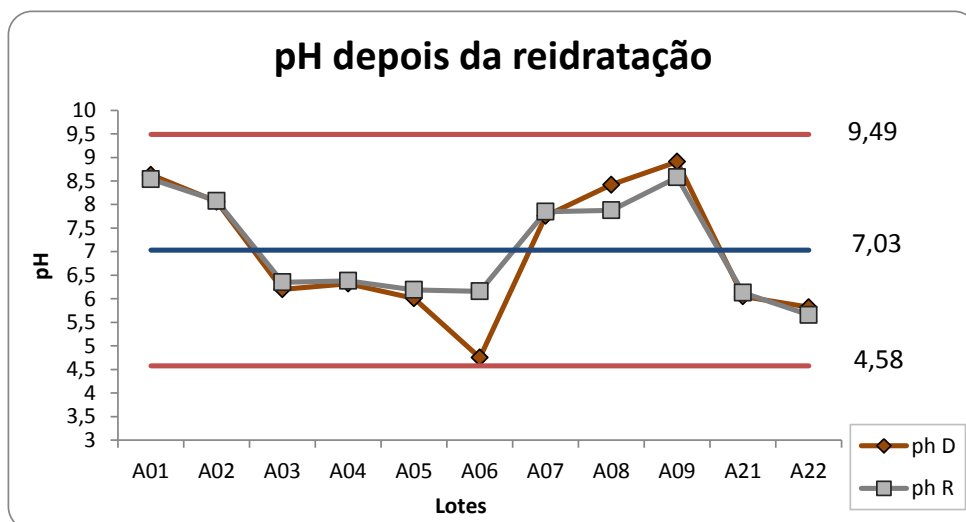
**Figura 20 - Gráfico de valores obtidos de % de extrato seco de diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada depois de reidratar.**

A média  $\pm$  desvio padrão dos resultados de percentagem de extrato seco de clara em pó não pasteurizada depois da reidratação (Figura 20) é de  $11,23 \pm 0,42$  %. Os resultados obtidos para os lotes analisados encontram-se dentro dos limites de controlo.



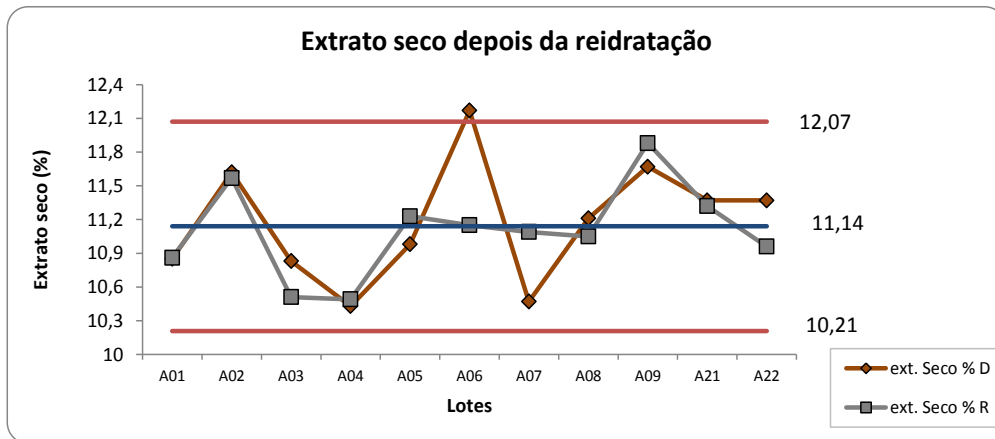
### 3.1.6. Determinação de pH, extrato seco e °Brix depois da reidratação de clara em pó com água destilada (D) e com água de rede (R)

Reconstituíram-se 20 lotes de *clara em pó não pasteurizada* de duas formas diferentes: com água destilada e com água da rede com o objetivo de verificar quais as diferenças de pH, extrato seco e °Brix.



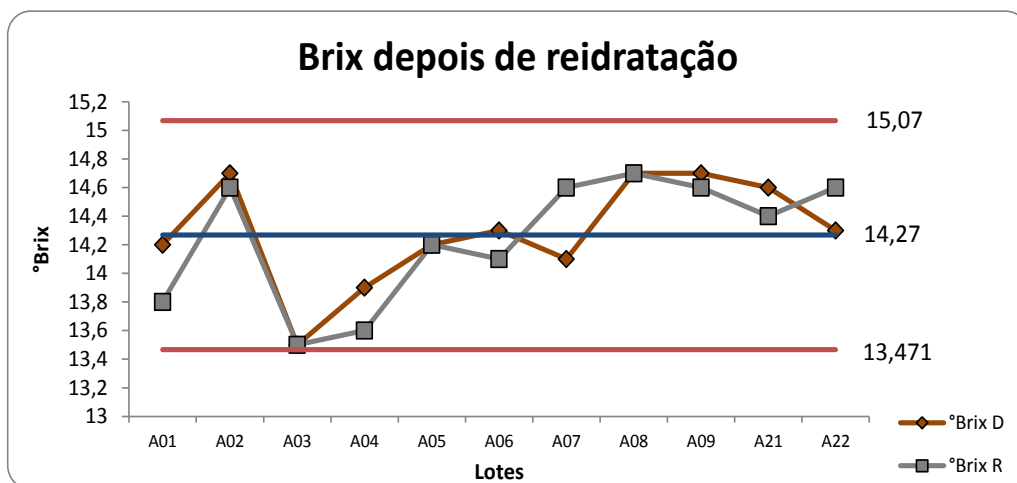
**Figura 21 - Gráfico de valores de pH obtidos nos diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada; pH D corresponde a reidratação com água destilada e pH R corresponde a reidratação com água da rede.**

Os valores encontrados para o pH depois da reidratação da clara com água destilada e água da rede (Figura 21) são muito semelhantes, verificando-se apenas uma diferença maior para o lote A06. A média  $\pm$  desvio padrão de pH encontrado foi de  $7,03 \pm 1,23$ .



**Figura 22 - Gráfico de valores de % de extrato seco obtidos nos diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada depois de reidratada; ext.seco % D corresponde a reidratação com água destilada e est.seco % R corresponde a reidratação com água de rede**

A média  $\pm$  desvio padrão de resultados encontrados para a percentagem de extrato seco dos lotes analisados foi de  $11,12 \pm 0,46$  % (Figura 22). Para o lote A06 o valor da percentagem de extrato seco foi o que apresentou maior diferença entre os dois métodos de reidratação.



Legenda das retas: — LSC; — média; — LIC

**Figura 23 - Gráfico de valores de °Brix obtidos nos diferentes lotes depois da reidratação; °Brix D corresponde a reidratação com água destilada e °Brix R corresponde a reidratação com água de rede**

A média  $\pm$  desvio padrão de resultados de °Brix apresentados é de  $14,30 \pm 0,39$  °Brix (Figura 23). Os resultados obtidos para a amostra A07 foram os que se apresentaram mais distintos entre si.

No geral não se observaram diferenças significativas de pH, °Brix e extrato seco entre as amostras reidratadas com água destilada e com água da rede

pública. O lote A06 foi o que apresentou maior diferença, tanto em termos de pH como de extrato seco. Isto pode ter ocorrido devido a erros ocorridos durante o processo de reidratação da amostra. Uma dissolução insuficiente pode levar à diminuição do teor de sólidos totais e assim diminuir o °Brix obtido. Se a reidratação for realizada com maior quantidade de água isto pode provocar um aumento no pH da amostra. Este lote deveria ser novamente reidratado e a análise repetida.

### 3.2. Análises de microbiologia

#### 3.2.1. Análises realizadas a diferentes ovoprodutos

Foram realizadas análises microbiológicas a diferentes tipos de ovoprodutos no final do seu processo de fabrico. Os resultados obtidos encontram-se expressos na tabela seguinte.

**Tabela 5 – Resultados das análises microbiológicas realizadas a clara líquida, gema com 11% de sal, gema com 8% de sal, ovo inteiro, ovo inteiro HS, clara em pó, ovo cozido e salsicha.**

Produtos analisados	Parâmetros Microbiológicos																				Result. OK	Result. KO	Comentários
	Enterob (/ml) <1	Enterob (/ml) >1	Fungos e Lev. <1 (/ml)	Fungos e Lev. >1 (/ml)	E. coli <1 (/ml)	E. coli >1 (/ml)	Staph. Aureus <10 (/ml)	Staph. Aureus >10 (/ml)	Clostr. (/ml) <10	Clostr. (/ml) >10	Aerob. T (/mL) <1	Aerob. T (/mL) >1	Bacillus cereus <10 (/ml)	Bacillus cereus >10 (/ml)	Colif. (/ml) <10	Colif. (/ml) >10	Salm negativo/(2 5 mL ou mg)	Salm positivo/(2 5 mL ou mg)	Listeria negativo/(2 5 mL ou mg)	Listeria positivo (/25 mL ou mg)			
Clara Líquida	7	23	30	0	30	0	30	0	30	0	18	12	30	0	30	0	30	0	30	0	30	0	
Gema 11% S	22	9	31	0	31	0	31	0	31	0	17	14	31	0	27	0	31	0	27	0	31	0	
Gema 8% S	21	8	29	0	29	0	29	0	29	0	17	12	29	0	27	2	29	0	29	0	29	0	
Ovo inteiro	4	10	14	0	14	0	14	0	14	0	6	8	14	0	14	0	14	0	14	0	14	0	
Ovo inteiro HS	10	6	16	0	16	0	16	0	13	3	5	11	16	0	15	1	16	0	16	0	16	0	
Clara pó	24	3	27	0	NE	NE	27	0	NE	NE	23	4	27	0	NE	NE	27	0	NE	NE	27	0	NE -não efetuado
Ovo cozido	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	10	2	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	
Salsicha	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	14	1	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	



Na Tabela 5 estão representados os resultados das análises de microbiologia efetuadas a alguns lotes de produtos acabados. Para um total de 30 amostras de lotes diferentes de clara líquida pasteurizada, os resultados obtidos em relação à presença de fungos, leveduras, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, clostrídios, *B. cereus* e coliformes, encontram-se dentro dos limites aceitáveis (inferiores a 1 UFC / mL). Do mesmo modo, os resultados obtidos de *Salmonella* e *Listeria* encontram-se dentro dos limites estabelecidos internamente (ausência em 25g de amostra). Apesar de serem encontradas enterobactérias e microrganismos aeróbios totais em algumas amostras de clara pasteurizada em valores superiores a 1 UCF / mL, estes nunca ultrapassam as 100 UFC/ mL como consta nos Regulamentos (CE) n.º 2073/2005 e 1441/2007. Assim, os resultados microbiológicos obtidos para os lotes de clara analisados foram satisfatórios.

Os resultados obtidos em 31 amostras de lotes diferentes de gema líquida pasteurizada (com 11% sal) apresentam valores aceitáveis de UFC em todos os parâmetros determinados.

Dos parâmetros microbiológicos determinados para a gema líquida pasteurizada com 8% de sal, os resultados obtidos foram todos aceitáveis. Tal como referido para a clara pasteurizada, também nesta gema a quantidade de UFC de enterobactérias e aeróbios totais está dentro dos limites estabelecidos. A presença de mais de 10 UFC de coliformes em 2 dos lotes analisados pode dever-se à falta de cumprimento das regras de recolha de amostras por parte do manipulador (desinfecção das mãos, do bucal e/ou do recipiente de recolha da amostra), o que pode ter levado à contaminação das mesmas. No entanto, os valores encontrados nunca ultrapassaram as 20 UFC, o que significa que não foi em valores superiores ao estipulado internamente para reter o produto (acima de 100 UFC/mL) e considerando-se estes dois lotes com características microbiológicas aceitáveis.

Comparativamente, os lotes analisados de gema líquida com 8% de sal apresentaram melhores resultados microbiológicos do que aqueles de gema líquida com 11% de sal, sendo no entanto, os valores de ambas satisfatórias.

Os 14 lotes de ovo líquido pasteurizado analisado apresentaram valores microbiológicos aceitáveis, assim como os 16 lotes de ovo inteiro pasteurizado HS (*Heat Stable*) que apresentam, no geral, resultados satisfatórios de carga microbiana, ou seja, a quantidade de UFC encontradas para cada microrganismo estudado situa-se dentro dos limites máximos internos e legislados. Os resultados microbiológicos obtidos

a partir de amostras de ovo líquido HS foram, no geral, melhores do que as amostras de ovo não HS. No entanto, todos os lotes apresentaram valores microbiológicos aceitáveis

Na análise microbiológica de clara em pó pasteurizada realizada a 27 lotes não foram efetuadas determinações de *E. coli*, clostrídios, coliformes e *Listeria*. Estes parâmetros dispensam análise devido ao processo de secagem diminuir significativamente a ocorrência destes microrganismos. Os resultados obtidos para a clara em pó são consideravelmente melhores do que aqueles obtidos para a clara líquida pasteurizada.

Tanto os valores microbiológicos obtidos nas análises realizadas a ovo cozido (12 amostras) como a salsicha de clara (15 amostras) foram satisfatórios para todos os parâmetros analisados. A presença de aeróbios totais em alguns lotes pode estar relacionada com o método de análise, ou seja, o tempo que a amostra fica exposta ao ar antes de ser incubada pode ter influência nos resultados obtidos. No entanto, a quantidade de UFC nunca foi acima de 40 UFC / mL (inferior a 100 UFC/mL).

No geral, para os diferentes produtos analisados, a quantidade detetada de fungos, leveduras, clostrídios e *Staphylococcus aureus* foi sempre inferior a 1 UFC / mL. Para todas as amostras de ovoprodutos analisados verificou-se ausência de *Salmonella*, tal como estabelecido nos Regulamentos (CE) n.º 2073/2005 e 1441/2007.

No caso de ocorrência de resultados microbiológicos acima do limite máximo estabelecido por lei em amostras analisadas, o procedimento correto consistiria em reter o produto em câmara, repetir a análise e, no caso de se confirmar a suspeita inicial, acionar-se-ia o procedimento de rastreabilidade e recolha junto dos clientes. Internamente seriam avaliadas as causas e implementadas medidas corretivas adequadas com seguimento das mesmas.

As causas que podem levar ao aparecimento de números de colónias acima dos limites podem ser várias. A contaminação pode ser proveniente da carga inicial da matéria-prima ou pode ocorrer nas linhas de processamento antes ou depois da pasteurização. Pode, também estar relacionada com dificuldades no processo de pasteurização, ou ainda com contaminação proveniente das embalagens, da manipulação inadequada, de desvios nas práticas de higiene ou até mesmo de manutenção dos equipamentos.

### 3.2.2. Folha de registo de produto terminado

Na Figura seguinte apresenta-se um exemplo de um boletim de análises que pode ser aplicado no laboratório.

Tipo de Análisis: \_\_\_\_\_

LOTE	34CC							
FECHA ANÁLISIS	17/02							
FECHA PRODUCCIÓN	17/02							
ENVASE	Bag in Box							
INDICACIÓN ESPECÍFICA	Yema 11% Sal							
Nº MUESTRA	4							
HORA MUESTRA	18h35							
PH	6,6							
TEMP.(°C)	11,3							
°BRIX	50,8							
VISCOSIDAD (PA.S)	2800							
% EX. SECO	50,1							
% SAL	10,9							
ODOR	Normal							
ASPECTO	Normal							
COLOR	Normal							
SALMONELLA/ 25g ou 25 mL	Negativa							
AERÓBIOS TOTALES /mL	6							
E. COLI / mL	<1							
COLIFORMES / mL	<1							
ENTEROBAC. / mL	2							
S. AUREUS / mL	<1							
ENTEROCOCOS /0,1 mL	NE							
B. CEREUS /0,1 mL	<1							
BOLORES / 0,1mL	<1							
LEVEDURAS /0,1 mL	<1							
LISTERIA / 25g ou 25 mL	Negativa							
TEC. LAB..	-----							
OBS.:								

Figura 24 - Boletim de registo de resultados (com exemplo na primeira coluna)



A Figura 24 representa uma ficha de registo de resultados de análise de produtos terminado. No exemplo específico podem ler-se os resultados referentes à análise de uma amostra de um lote de gema de ovo líquida pasteurizada com 11% de sal.

Os resultados obtidos relativamente às análises físico-químicas encontram-se dentro dos limites estabelecidos para o produto que são: pH de 5,8 a 6,7, °Brix de 50,8 a 51, percentagem de extrato seco de 50,0 a 50,5 % e percentagem de sal de 7,7 a 8,3 %. Relativamente às análises de microbiologia todos os parâmetros analisados encontravam-se dentro dos limites estabelecidos. A quantidade determinada de UFC de *E. coli*, Coliformes, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, bolores e leveduras foi inferior a 1 UFC/mL. O aparecimento de 6 e 2 UFC/mL de microrganismos aeróbios totais e de enterobactérias respetivamente demonstra a satisfatória qualidade microbiológica e higiénica do produto.

### 3.2.3. Verificação de limpezas

Foram recolhidas amostras com zaragatoas e esponjas de recolha para verificação da eficácia das limpezas da produção. Os locais de incidência foram de tipo 1, tipo 2 e tipo 3. Os locais de tipo 1 são aqueles que de alguma forma entram em contacto prolongado com o produto, como são a cinta de inspeção de ovo cozido, a água de arrefecimento e cozimento do ovo cozido, a salmoura, as mãos dos manipuladores da cinta de inspeção, entre outras. As amostras recolhidas de tipo 2 foram aquelas realizadas a superfícies em contacto com o produto, mas durante menos tempo, com são as roldanas de transporte de ovo cozido e as conchas de separação e os filtros de ovo/clara. Os locais de tipo 3 são aqueles que não entram em contacto direto com o produto, como são, por exemplo as portas e paredes das câmaras ou as roldanas de transporte de ovo encascado. As análises de tipo 1 foram realizadas uma vez por semana, as de tipo 2 quinzenalmente e as de tipo 3 a cada 3 semanas.

Através da análise de resultados obtidos (Tabela 6) observa-se que estes se encontram dentro dos limites microbiológicos para a todas as amostras recolhidas. Foram obtidas 20 UFC de *Enterococcus* na amostra água de arrefecimento de ovos cozidos (dia 30/11/2011). Este valor encontra-se abaixo do valor máximo estabelecido por lei. Também o valor da condutividade se encontra dentro dos parâmetros estabelecidos.

Tabela 6 - Resultados das análises de verificação de limpeza nos vários setores de produção

Identificación Muestra							Análisis						Verificación Resultados		
Fecha Recogida de muestra	Sector	Local/Muestra	Metodo de Recogida	Tipo Análisis	Fecha Análisis	Técnico	Físico - Químicos		Microbiológicos				Conformidad Resultados	Acciones Correctivas	Observaciones
							pH	Temp.	Ent. (/ml)	M y L (/ml)	Salm	Listeria			
04-11-2011	Cocido	Água cocción (L1)	Frasco estéril	1	04-11-2011	xxxx	7,81	20	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Água enfriamiento (T3)	Frasco estéril		04-11-2011	xxxx	7,72	15,1	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Filme protección cubos	Torunda		04-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Salmuera	Frasco estéril		04-11-2011	xxxx	1,75	10	<1	NA	NA	NA	OK	.	
	Líquido	Cascadora - conchas separación clara y yema	Torunda	2	04-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Tapete transporte cascaras	Torunda		04-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Filtro Yema	Frasco estéril		04-11-2011	xxxx	7,89	10,1	<1	NA	Neg./25ml		OK	.	
		Filtro Clara	Frasco estéril		04-11-2011	xxxx	8,01	15,2	<1	NA	Neg./25 ml		OK	.	
07-11-2011	Líquido	Roletes Cascadora 1	Torunda	3	07-11-2011	xxxx	NA	NA	NA	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Tapete Cascadora 2	Torunda		07-11-2011	xxxx	NA	NA	NA	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Utiles limpieza	Torunda		07-11-2011	xxxx	NA	NA	NA	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Doseador detergente	Torunda		07-11-2011	xxxx	NA	NA	NA	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
11-11-2011	Líquido	Limpieza contenedor	Frasco estéril	1	11-11-2011	xxxx	7,85	15,4	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Cámara de Flujo Van Meurs	Torunda		11-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Limpieza toma muestra	Frasco estéril		11-11-2011	xxxx	7,91	14,1	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Boca manguera 2 (llenado contenedores)	Torunda		11-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
15-11-2011	Cocido	Rodillos Cocedora 1	Torunda	2	15-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Tapete transporte cubos	Torunda		15-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Flejadora	Torunda		15-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Utile de limpieza - pala	Torunda		15-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
	Líquido	Rodillos contadora	Torunda	1	15-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Cinta Inspección	Torunda		15-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Tala Inox	Torunda		15-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Contadora	Torunda		15-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
21-11-2011	Líquido	Boca manguera 1 (llenado contenedores)	Torunda	1	21-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Grifo Toma-muestra	Torunda		21-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Limpieza línea llenado 3	Frasco estéril		21-11-2011	xxxx	7,79	10,1	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Boca manguera 2 (llenado contenedores)	Torunda		21-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
30-11-2011	Cocido	Agua enfriamiento (T1)	Frasco estéril	1	30-11-2011	xxxx	9,09	13,9	20	NA	NA	NA	OK	.	Cond. 298uS (16,8°C)
		Cinta Inspección	Torunda		30-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Barra Blanca	Torunda		30-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Filme protección cubos	Torunda		30-11-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	NA	NA	OK	.	
01-12-2011	Líquido	Filtro Yema	Frasco estéril	2	01-12-2011	xxxx	7,8	20,2	<1	NA	Neg./100 cm2		OK	.	Cond. 138,7uS (20,5°C)
		Filtro Clara	Frasco estéril		01-12-2011	xxxx	8,07	19,3	<1	NA	Neg./100 cm2		OK	.	Cond. 172,6uS (21,2°C)
		Tapete Cascadora 1	Torunda		01-12-2011	xxxx	NA	NA	2	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Conchas Separación Yema /Clara - Casc. 2	Torunda		01-12-2011	xxxx	NA	NA	<1	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
07-12-2011	Cocido	Agua cocedora (L1)	Frasco estéril	1	07-12-2011	xxxx	7,88	10,2	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Agua enfriamiento (T1)	Frasco estéril		07-12-2011	xxxx	7,96	21,3	<1	NA	NA	NA	OK	.	
	Líquido	Agua limpieza llenado contenedores (L3)	Frasco estéril	1	07-12-2011	xxxx	8,1	10,5	<1	NA	NA	NA	OK	.	
		Toma muestra	Torunda		07-12-2011	xxxx	NA	NA	10	NA	NA	NA	OK	.	
	Planta	Cuerda Puerta Acceso CIP (Sector Cocido)	Torunda	3	07-12-2011	xxxx	NA	NA	NA	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Lamas amarillas (Acceso producción)	Torunda		07-12-2011	xxxx	NA	NA	NA	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Cámara 3	Torunda		07-12-2011	xxxx	NA	NA	NA	NA	Neg./100 cm2		OK	.	
		Cámara 8	Torunda		07-12-2011	xxxx	NA	NA	NA	NA	Neg./100 cm2		OK	.	



### 3.3. Análises de funcionalidade da clara

Foram realizados batidos de vários lotes de *clara de ovo líquida* (pasteurizada e não pasteurizada), *não filtrada* e *em pó* (pasteurizada e não pasteurizada). A clara em pó foi reidratada conforme descrito no ponto 2.3.2. O método de determinação da densidade, capacidade espumante e estabilidade encontra-se descrito em 2.3.4.

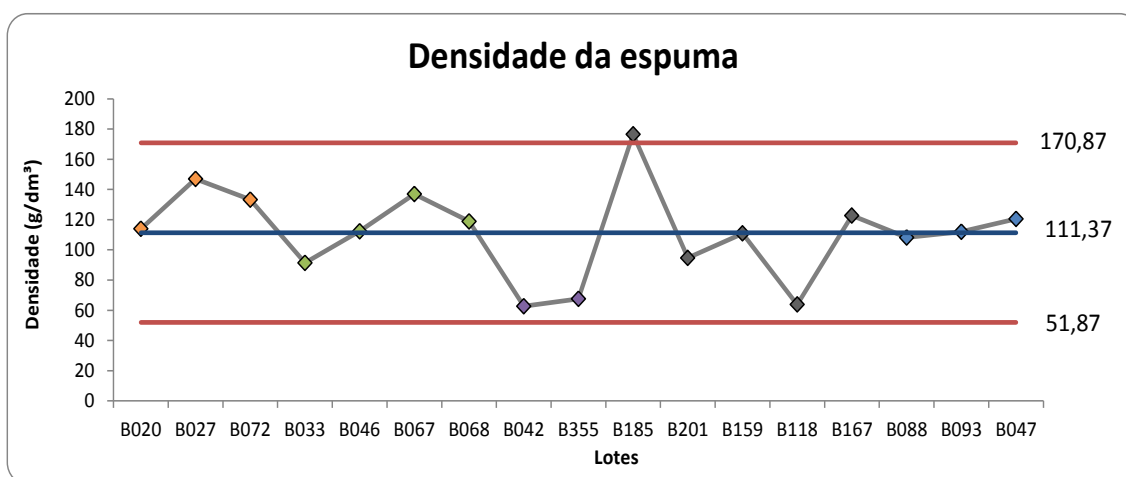
Para determinação da força de gel foram analisados vários lotes de *clara líquida* (pasteurizada e não pasteurizada) e *clara em pó* (pasteurizada e não pasteurizada) que foram preparados conforme descrito no ponto 2.3.4. Foram também analisados vários lotes de *salsicha de clara*.

Os resultados de densidade e de capacidade espumante obtidos foram tratados com cartas de controlo. Para os limites máximos e mínimos de controlo foi considerada a média  $\pm 2$  desvio-padrão com um intervalo de confiança de 95,46%.

#### 3.3.1. Densidade da espuma

Para determinar a densidade da espuma ( $\rho_{\text{espuma}}$ ), foram pesados 100mL de espuma, num recipiente medidor de 100mL de capacidade. O valor de densidade relativa obtido é dado pela expressão:

$$\rho_{\text{espuma}} = \frac{\text{massa espuma}}{\text{volume espuma}} \text{ [g/dm}^3\text{]}$$



Legenda: ◆ - líquida pasteurizada; ◆ - líquida não pasteurizada; ◆ - em pó pasteurizada; ◆ - em pó não pasteurizada; ◆ - líquida não filtrada

Figura 25- Gráfico correspondente aos valores de densidade determinados para os diferentes lotes de clara

No gráfico da Figura 25 estão representados os resultados obtidos de densidade da espuma dos vários lotes de produtos analisados. A média  $\pm$  desvio padrão da densidade da espuma é de  $111,37 \pm 29,75 \text{ g/dm}^3$ . Os resultados obtidos encontram-se dentro dos limites de controlo com exceção do lote B185 de clara em pó não pasteurizada que se apresenta acima do LSC. Para além de se ter em conta as variabilidades que possam ocorrer na matéria-prima que deu origem aos lotes indicados, também é de referir que o processo de bater as claras pode influir no resultado final de formação de espuma.

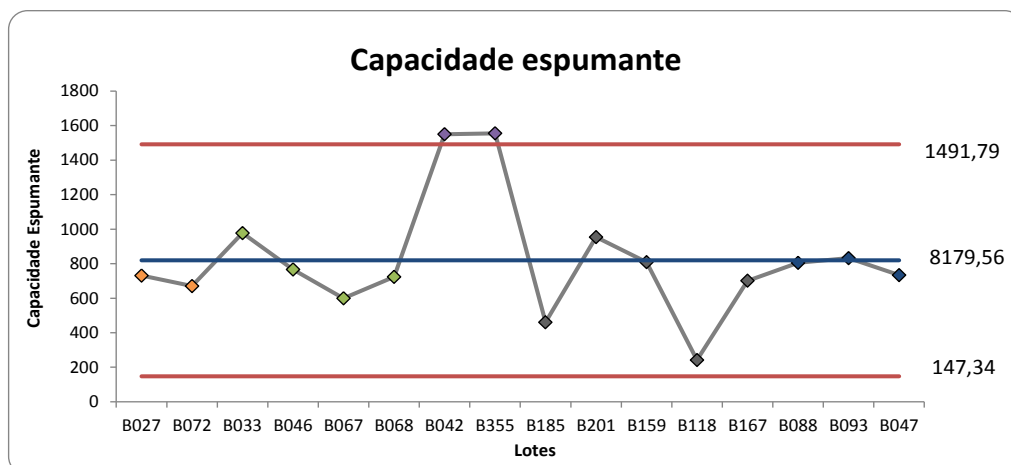
São os dois lotes de clara em pó pasteurizada (B042 e B335) que apresentam os valores de densidade mais baixos de todos os lotes analisados

Comparativamente, os lotes de clara líquida filtrada não apresentaram muita diferença de densidades dos lotes de clara líquida não filtrados. Os valores de densidade dos lotes de clara em pó (pasteurizada e não pasteurizada) aproximam-se bastante dos valores apresentados pela clara líquida, sendo que, deveriam existir mais resultados para que fosse possível uma melhor análise de resultados.

### **3.3.2. Capacidade espumante**

Para determinar a capacidade espumante foram pesados 100mL de cada lote de clara analisada, assim como 100mL de espuma obtida do lote correspondente. O cálculo foi efetuado segundo a seguinte equação:

$$\text{Capacidade Espumante} = \frac{m(\text{clara}) - m(\text{espuma})}{m(\text{espuma})} \times 100$$



Legenda: ◆ - líquida pasteurizada; ◆ - líquida não pasteurizada; ◆ - em pó pasteurizada; ◆ - em pó não pasteurizada; ◆ - líquida não filtrada

**Figura 26 - Gráfico de valores de capacidade espumante determinados para os diferentes lotes de clara**

Os lotes analisados encontram-se dentro dos limites de controlo considerados, para os quais a média  $\pm$  desvio padrão é de  $819,56 \pm 336,11$  (Figura 26). Os lotes de clara em pó pasteurizada analisados (lotes B042 e B355) são os que apresentam valores mais elevados para a capacidade espumante, encontrando-se acima do LSC. O lote B118 (de clara em pó não pasteurizada) é o que apresenta menor capacidade espumante.

Não se observam diferenças significativas nos resultados obtidos entre a clara líquida filtrada e não filtrada.

São necessárias mais análises de capacidade espumante dos vários ovoprodutos de forma a se poder comparar melhor os resultados entre si.

### 3.3.3. Estabilidade da espuma

A estabilidade da espuma foi determinada pesando o líquido vertido de 100mL de espuma, de 10 em 10 minutos, no total de 1 hora. Os valores obtidos foram apresentados em forma de gráfico com quantidade de líquido perdido (em g) em função do tempo decorrido (em minutos).

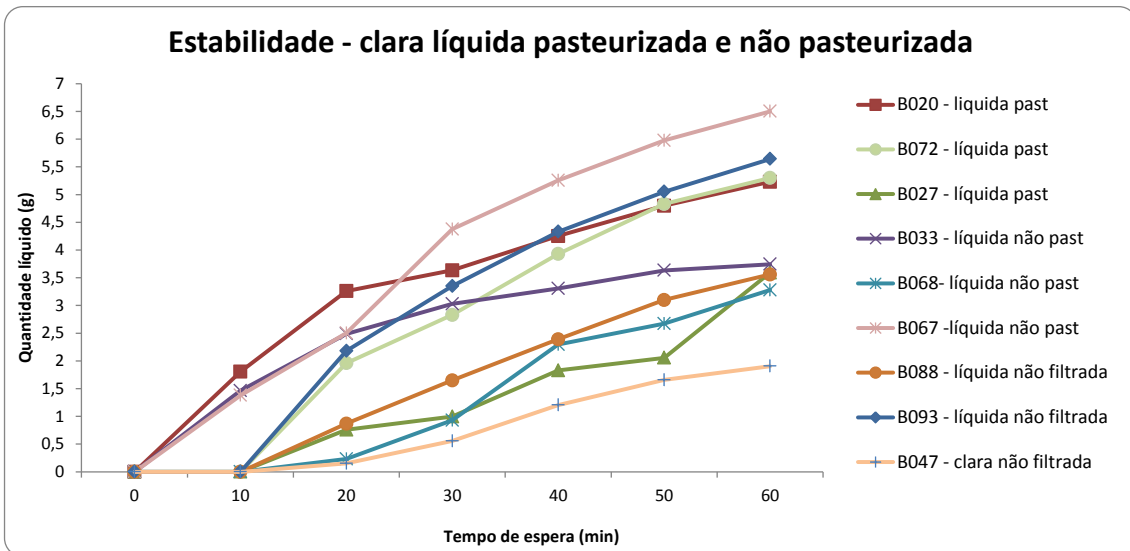


Figura 27 - Gráfico da estabilidade da clara nos diferentes lotes analisados

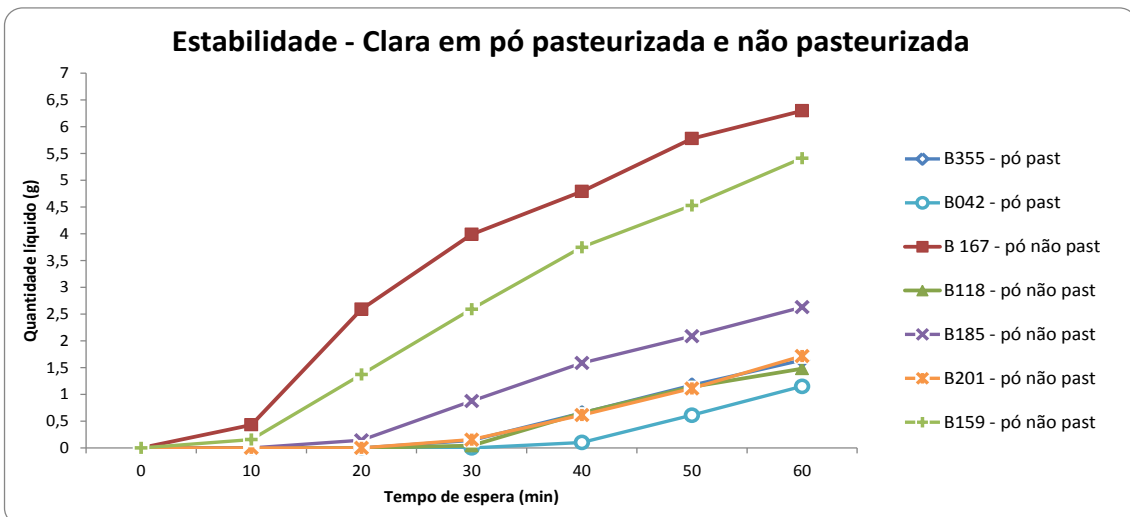


Figura 28 - Gráfico de estabilidade da clara nos diferentes lotes analisados

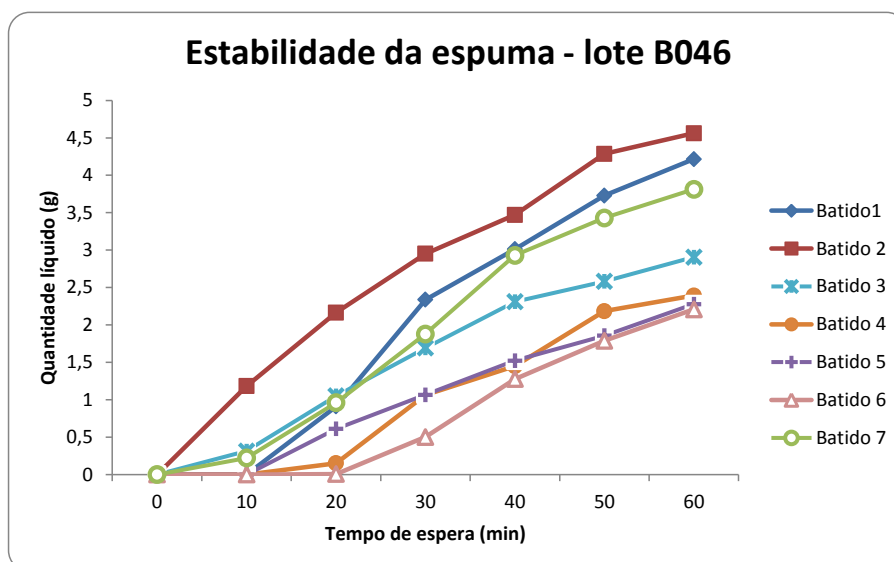
Os valores obtidos para a *estabilidade da clara líquida* assim como da *clara em pó* dos lotes analisados são bastante distintos como se pode observar pelos gráficos representados nas Figuras 27 e 28. Ao fim de 30 minutos a quantidade de líquido perdido no caso de lotes de clara líquida, foi de 0,5g a 1,7g para os lotes B047, B027, B068 e B088 e, para os restantes lotes foi entre 2,5 e 4,5. Ao final de uma hora a quantidade de líquido vertido dos lotes B047 e B067, varia entre os 1,906g e os 6,501g, respetivamente.

Os lotes de clara em pó analisados apresentaram quantidades de líquido perdido, ao fim de 10 minutos inferiores a 0,5g. Ao fim de 30 minutos cinco dos sete lotes analisados apresentam menos de 1g de líquido perdido. Ao fim de 60 minutos, os mesmos cinco lotes apresentam quantidades de líquido entre 1g e 3g.

A menor quantidade de líquido perdido ocorreu para o lote B355 correspondente à clara em pó pasteurizada.

Como já foi referido anteriormente, é importante que a espuma seja recolhida e pesada o mais depressa possível, para que depois o teste de estabilidade seja iniciado o mais rapidamente possível, não decorrendo muito tempo desde a formação da espuma e o início do teste de estabilidade. Assim, a variabilidade de resultados encontrada pode dever-se a este facto.

O lote B046 (*clara líquida pasteurizada*) foi utilizado para realizar 7 batidos. Todos os batidos foram realizados segundo o mesmo método, assim como o procedimento para determinar a estabilidade da espuma. Os batidos foram numerados de 1 a 7 e os resultados da estabilidade apresentam-se na imagem seguinte:



**Figura 29 - Gráfico representativo da estabilidade da espuma do lote B046 nos sete batidos efetuados**

Os resultados de estabilidade obtidos para os sete batidos são significativamente diferentes (Figura 29). Excetuando o segundo batido, os restantes apresentam quantidades de líquido vertido, aos 10 minutos, inferiores a 0,5 g. Ao final de meia hora a quantidade de líquido vertido já é bastante diferente para todos os batidos: para os batidos 4, 5 e 6 a quantidade é igual ou inferior a 1g e para os restantes batidos varia entre 1,5g e 3g. No final dos 60 minutos os batidos 3, 4, 5 e 6 apresentavam



valores inferiores a 3g enquanto os batidos 7, 1 e 2 apresentam valores de 3,81g, 4,21g e 4,56, respetivamente.

De um modo geral, verifica-se que a perda de líquido é menor nos primeiros 20 minutos e depois aumenta entre os 20 e os 40 min. Nos últimos 20 minutos de teste a quantidade de líquido perdida apresenta uma tendência para diminuir.

A dificuldade de medição, da recolha de espuma e do seu manuseamento podem ter influência no resultado de estabilidade do montado de espuma.

Segundo algumas referências bibliográficas a estabilidade da espuma deve ser medida o mais rapidamente possível depois de se efetuar o batido. Este facto foi analisado, durante os ensaios de estabilidade para os quais se efetuaram três repetições da medição da estabilidade com intervalos entre si de aproximadamente 7 minutos. Ou seja, foi dado início ao 2º ensaio aproximadamente 7 minutos depois do 1º ensaio e o 3º iniciou-se sete minutos depois do 2º ensaio.

Na Figura 30 podem-se observar três gráficos de estabilidade obtidos para os lotes B088, B072, e B046.

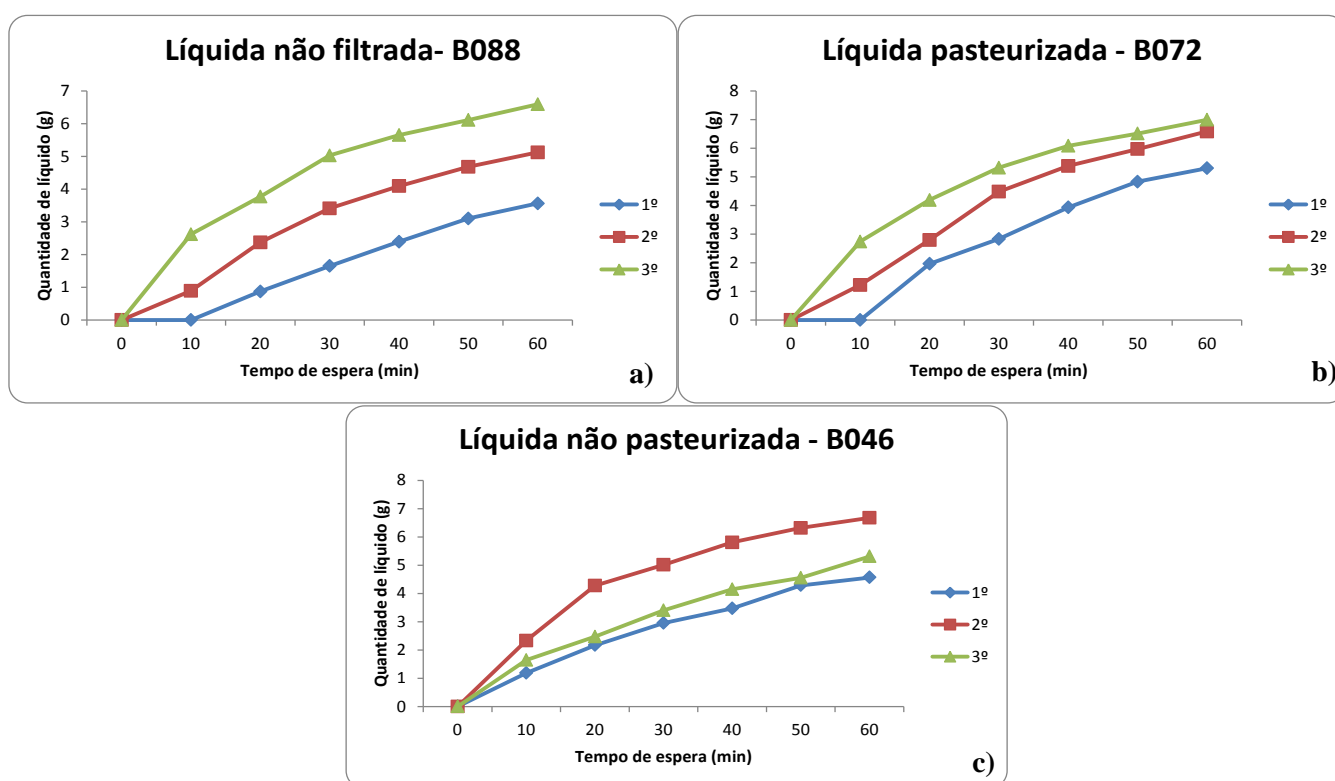


Figura 30 – a) Estabilidade da clara de lote B088 nos 3 ensaios; b) Estabilidade da clara de lote B072 nos 3 ensaios; c) Estabilidade da clara de lote B046 nos 3 ensaios

Os lotes de clara líquida B046, B088 e B072, apresentam resultados de estabilidade da espuma bastante semelhantes. A quantidade máxima de líquido vertido aos 60 minutos de ensaio é de 6,99g (3º ensaio do lote B072). Comparando os resultados ao fim de 30 minutos de espera pode-se observar que os valores apresentados rondam os 3g (1º ensaios) e os 5g (3º ensaios).

As diferenças de quantidade de líquido perdido entre ensaios é significativamente maior para o lote de clara líquida não filtrada. No final dos 60 minutos, a quantidade de líquido perdida no 1º ensaio é de 3,56g, no 2º ensaio é de 5,12g e no 3º ensaio de 6,59. A diferença do 1º para o 2º ensaio é de 1,56g, do 2º para o 3º ensaio é de 1,47g e do 1º para o 2º ensaio é de 3,03g.

A Figura 31 representa o gráfico de estabilidade de três lotes de clara em pó pasteurizada e não pasteurizada.

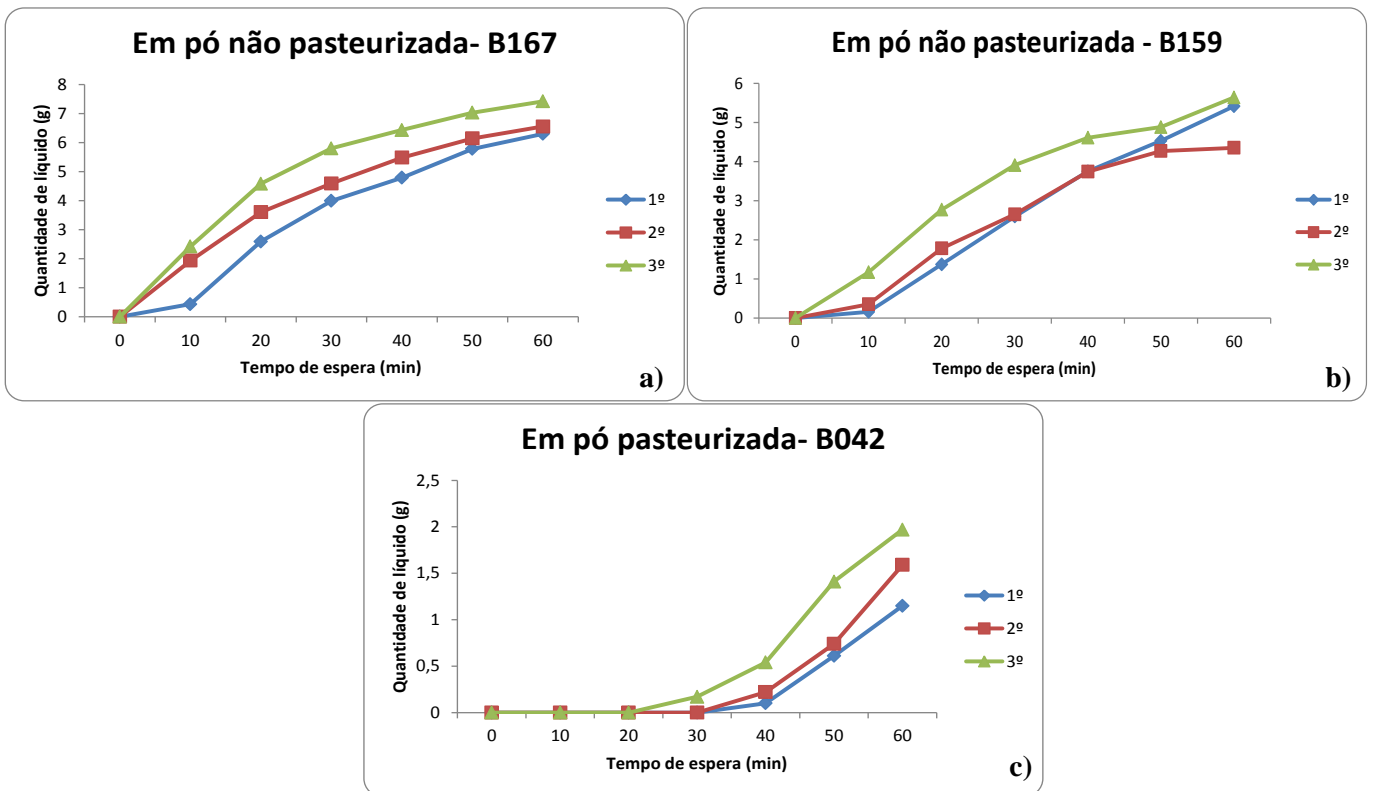


Figura 31 - a) Estabilidade da clara de lote B167 nos 3 ensaios; b) Estabilidade da clara de lote B159 nos 3 ensaios; c) Estabilidade da clara de lote B042 nos 3 ensaios.

Os resultados obtidos da estabilidade da espuma de clara em pó pasteurizada e não pasteurizada dos lotes analisados são significativamente distintos, como se pode observar pela imagem.

Durante os primeiros 31 minutos, a quantidade de líquido perdido no batido de clara em pó pasteurizada (B042) é inferior a 0,5g enquanto nos batidos de clara em pó pasteurizada com lotes B159 e B167, após o mesmo tempo decorrido a quantidade é de 3,91g e 5,80g respectivamente. Verifica-se, também, que a quantidade de líquido perdido no lote B159 e B167, de clara em pó não pasteurizada, ao fim de 60 minutos, é de 5,64g e de 7,42g, respectivamente. O lote B042 (clara em pó pasteurizada) perdeu 2g de líquido no final do 3º ensaio.

Comparando os três ensaios entre si, conseguem-se observar as diferenças de valores encontrados entre o 1º e o 3º ensaio. Por exemplo, para o lote B167, ao fim de 20 minutos a quantidade de líquido perdido no 1º ensaio é de 2,59g, no 2º ensaio de 3,60g e no 3º ensaio de 4,58g. A diferença do 1º para o 2º ensaio é de 1,01g, do 2º para o 3º é de 0,98 e do 1º para o 3º de 1,99g.

Os lotes analisados de clara líquida, comparativamente com os lotes de clara em pó não pasteurizada, apresentam resultados de estabilidade da espuma próximos entre si. A quantidade média de líquido perdido após 30 minutos é de 3,07g e após 60 minutos é de 4,85g nos lotes de clara líquida analisados, enquanto a quantidade média de líquido perdido nos lotes de clara em pó não pasteurizada é de 2,46g após 30 minutos e de 4,22g após 60 minutos. Já a clara em pó pasteurizada analisada apresenta valores médios de líquido vazado claramente diferentes. Após 30 minutos o valor médio é de 0,06g e depois de 60 minutos é de 1,59g. Ou seja, a quantidade média de líquido perdido pela espuma da clara em pó pasteurizada é muito inferior àquela apresentada pela clara líquida e pela clara em pó não pasteurizada, ou seja, a espuma produzida com clara em pó pasteurizada tem maior estabilidade quando comparada com a produzida com clara líquida.

### 3.3.4. Comparação de resultados

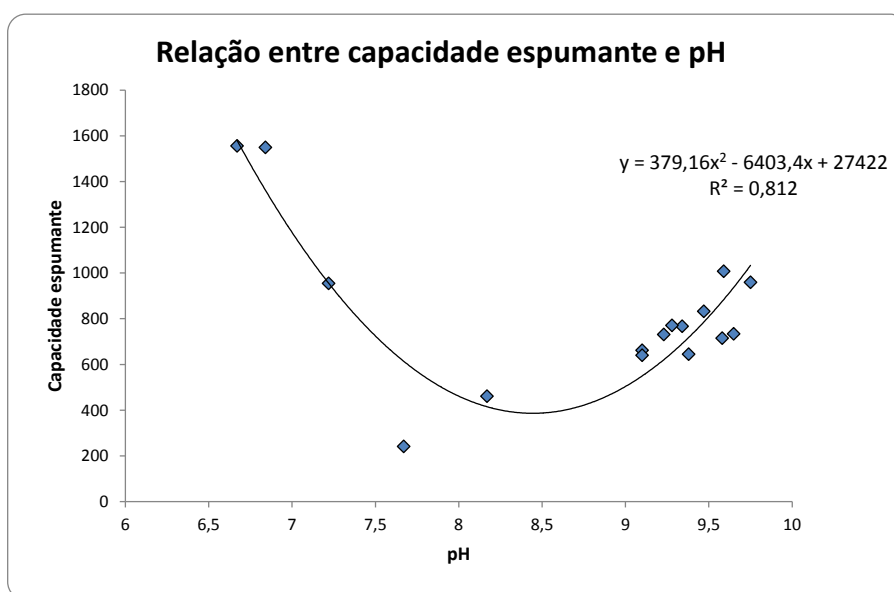


Figura 32 – Gráfico que relaciona a capacidade espumante com o pH

Segundo Bovskova a capacidade espumante da clara de ovo pasteurizada e não pasteurizada é melhor para pH inferior a 4,5 e pH neutro. Refere ainda que a capacidade espumante é menor a pH 5 e pH entre 7,5 e 8,5<sup>35</sup>. Nakamura e Sato (1964), que mostraram que a capacidade espumante era maior para valores de pH de 8,6<sup>87</sup>.

Os resultados encontrados com este trabalho (Figura 32) confirmam os dois estudos a capacidade espumante é melhor a pH inferior a 7,22 e mínima nas amostras com pH 7,67 e 8,17. A capacidade espumante volta a aumentar para pH maior que 9.

Kuropatwa referiu que a clara demonstra melhores capacidades espumantes a pH básico e neutro e menor capacidade espumante a pH 5. Refere ainda que o pH 7 é o ideal para a capacidade espumante, em vez de pH 5 ou 9, o que também vai de encontro aos nossos resultados<sup>30</sup>.

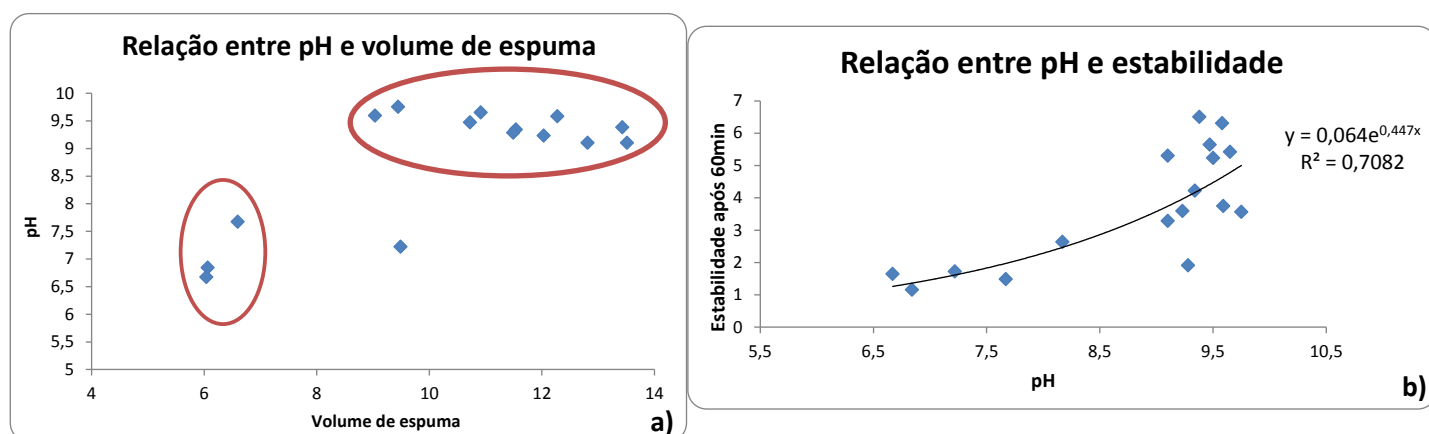
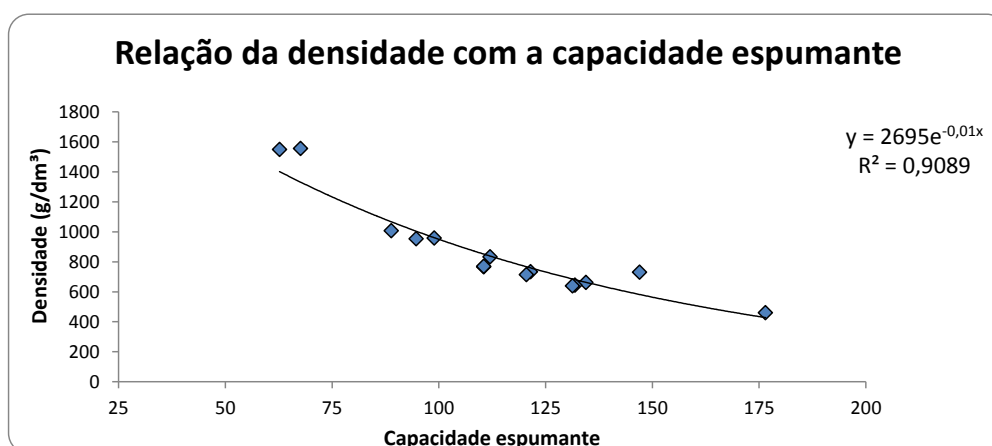


Figura 33 - a) Relação entre pH e volume de espuma; b) Relação entre estabilidade (quantidade de líquido perdido) e pH

Van der Placker, et al. referem que o volume da espuma aumenta a pH 8,8, mas que os valores de estabilidade e densidade eram melhores a pH 7,6<sup>16</sup>.

Os resultados aqui apresentados (Figura 33) estão de acordo com este autor. Em relação ao volume, os lotes de clara com pH inferior a 8 apresentam volumes mais baixos do que os lotes de pH mais altos. Verifica-se, igualmente, que a estabilidade é maior a pH entre 6,5 e 8,5. O gráfico densidade de espuma em função do pH está em concordância com o gráfico do volume vs. pH.

Atendendo a que as amostras têm diversos tratamento e têm muitas variáveis, as correlações encontradas estão razoavelmente de acordo com a literatura. Se mais amostras de cada tipo forem analisadas existirá um número suficiente para que uma análise como a anterior possa ser feita por cada tipo de produto.



**Figura 34 – Gráfico que relaciona a densidade da espuma com a capacidade espumante**

Como se pode observar no gráfico da Figura 34, os resultados obtidos indicam que a densidade e a capacidade espumante estão relacionadas entre si. Assim, as espumas com densidade menor que 75g/dm<sup>3</sup> apresentam maior capacidade espumante do que aquelas com densidade inferior a 75g/dm<sup>3</sup>. Isto pode refletir uma maior quantidade de água presente nas amostras com menor densidade.

### 3.3.5. Força de gel

Foi determinada a força de gel de diferentes tipos de ovoprodutos. Para calcular a força de gel, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Força de gel (g.cm}^{-2}\text{)} = [ \bar{x} (\text{Peak Load})(g) ] \times 7,96$$

### 3.3.5.1. Determinação da força de gel em clara líquida pasteurizada e não pasteurizada

Foi determinada a força de gel de *clara líquida não pasteurizada* de dois lotes diferentes, T068 e T072 (Figura 35). Para tal realizaram-se 15 ensaios a cada lote. Cada ensaio corresponde a uma análise feita a um cilindro de amostra.

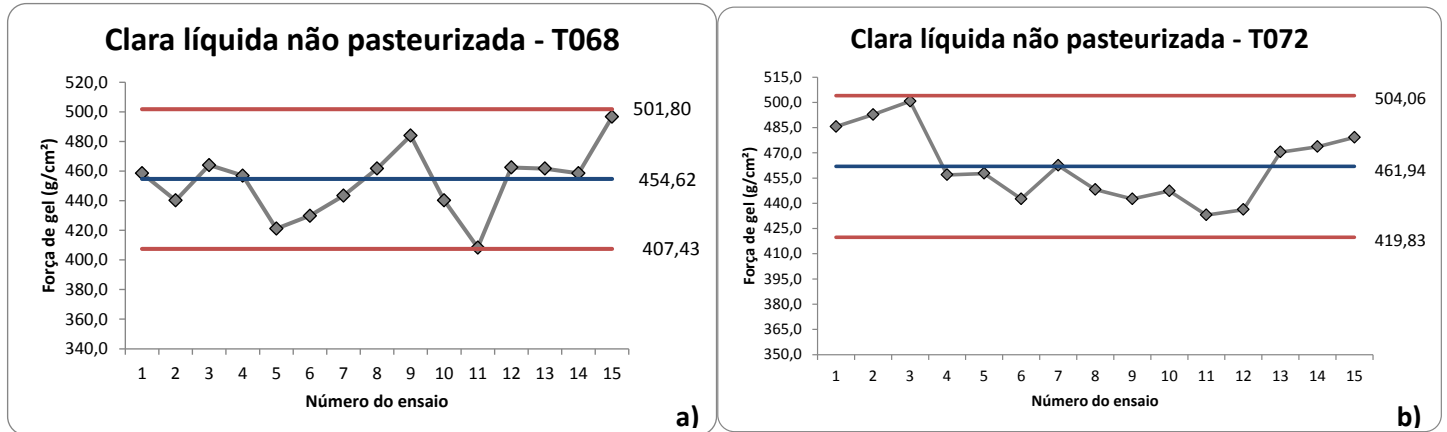


Figura 35 -a) Força de gel obtida nos ensaios da clara de lote T068 ; b) Força de gel obtida nos ensaios da clara de lote T072

Para o lote T068, foi encontrada uma força de gel com média  $\pm$  desvio padrão de  $454,62 \pm 23,59$  g/cm<sup>2</sup> enquanto para o lote T072 a média foi de  $461,95 \pm 21,05$  g/cm<sup>2</sup>. A dispersão de resultados encontrada pode ser causada pela dificuldade do método em obter amostras cilíndricas uniformes na área de teste.

Foi determinada a força de gel de *clara líquida pasteurizada* de dois lotes diferentes, T075 e T072 (Figura 36). Para tal realizaram-se 15 ensaios a cada lote. Cada ensaio corresponde a uma análise feita a um cilindro de amostra.

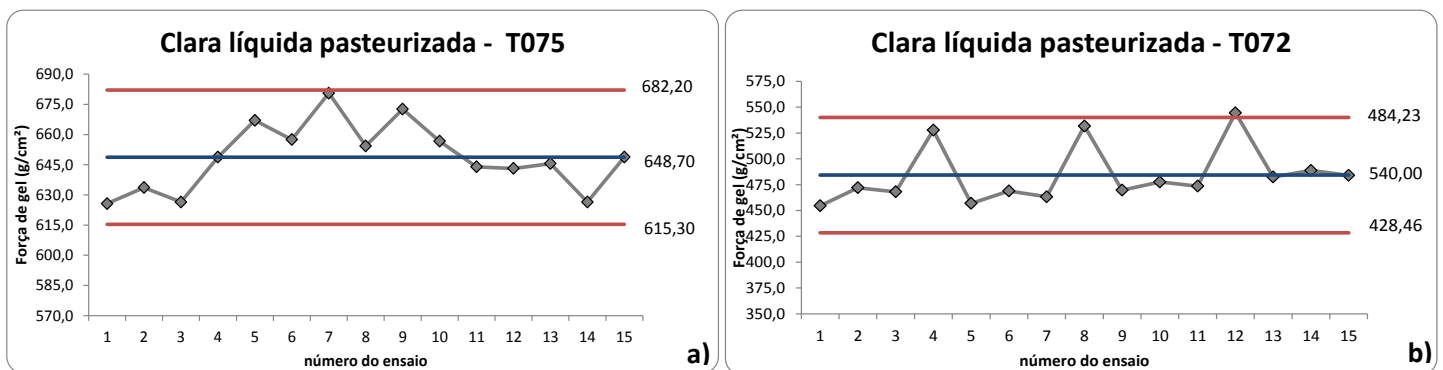


Figura 36 - a) Força de gel obtida nos ensaios da clara de lote T075; b) Força de gel obtida nos ensaios da clara de lote T072

Para o lote T075, foi encontrada uma força de gel com média  $\pm$  desvio padrão de  $648,74 \pm 16,71 \text{ g/cm}^2$  enquanto para o lote T072 a média foi de  $484,23 \pm 27,89 \text{ g/cm}^2$ . Também para este caso, a dispersão de resultados encontrada pode ser causada pela dificuldade do método em obter amostras cilíndricas uniformes na área de teste.

Comparando os resultados obtidos antes e depois da pasteurização do lote T042, observa-se um ligeiro aumento na média da força de gel depois da pasteurização.

### 3.3.5.2. Determinação da força de gel da clara em pó pasteurizada e não pasteurizada

Para determinar a força de gel da *clara em pó não pasteurizada* foram analisados 11 lotes, e para a *clara em pó pasteurizada* foram analisados 16 lotes. Os gráficos apresentam-se na Figura 37.

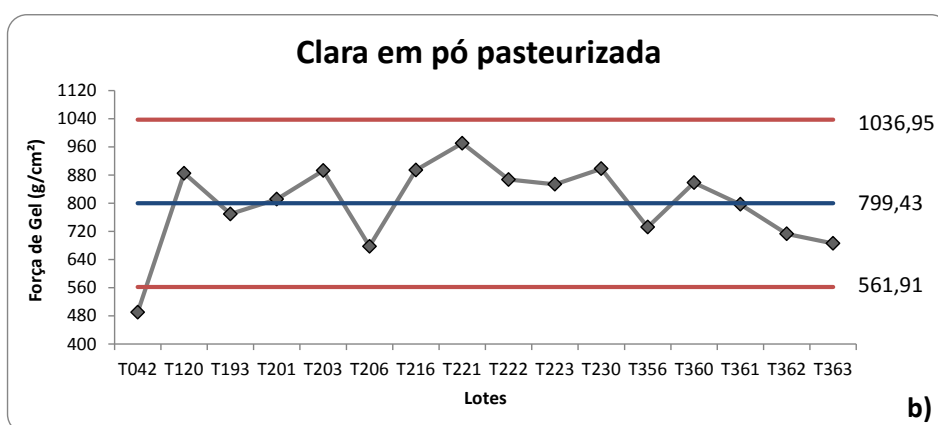


Figura 37 – a) força de gel obtida nos diferentes lotes de clara em pó não pasteurizada; b) força de gel obtida nos diferentes lotes de clara em pó pasteurizada

A média determinada da força de gel da clara em pó não pasteurizada e pasteurizada foi de  $337,48 \pm 74,50 \text{ g/cm}^2$  e  $799,43 \pm 118,76 \text{ g/cm}^2$ , respetivamente. Pode-se verificar, que, para os lotes analisados, a clara em pó pasteurizada apresenta maior força de gel do que a clara em pó não pasteurizada.

A uniformidade de produto obtida nas amostras analisadas de clara em pó pasteurizada era claramente maior do que a de clara em pó não pasteurizada. Isto pode-se refletir na maior dispersão de resultados obtidos na clara em pó não pasteurizada.

A força de gel média determinada para os lotes de clara em pó não pasteurizada é de cerca de  $300 \text{ g/cm}^2$  enquanto o valor determinado para a clara em pó pasteurizada é aproximadamente 2,5 vezes maior. Comparando com os valores obtidos na clara em pó com a clara líquida pode-se verificar que a clara líquida apresenta maior força de gel do que a clara em pó não pasteurizada. No entanto, a clara em pó pasteurizada apresenta uma força de gel superior à da clara líquida (pasteurizada e não pasteurizada) e clara em pó não pasteurizada.

### 3.3.5.3. Determinação da força de gel das salsichas de clara.

Para determinação da força de gel das *salsichas de clara* estas foram cortadas de forma a obterem-se cilindros com 3cm de altura. Analisaram-se 12 lotes diferentes e os resultados apresentam-se em forma de gráfico na Figura 38.

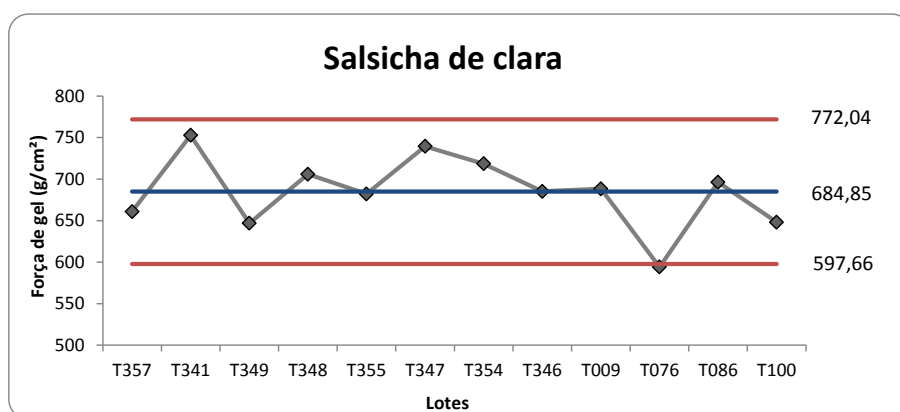


Figura 38 - Gráfico dos valores de força de gel obtidos nos diferentes lotes de salsichas de clara



A média de resultados da força de gel determinada para os lotes analisados foi de  $684,85 \pm 43,60$  g/cm<sup>2</sup>. Este resultado aproxima-se do encontrado na clara em pó pasteurizada ( $799,43$  g/cm<sup>2</sup>).

Assim, foram verificadas maiores forças de gel na salsicha de clara e na clara em pó pasteurizada.

### 3.4. Composição e organização do laboratório de análises

O laboratório, no fim do período de estágio, encontra-se preparado não apenas para realizar análises a ovoprodutos como também para análises ao longo do processo de fabrico, análises de verificação de higienizações e ainda, análises às águas de efluentes.

Encontra-se dividido em 5 salas diferentes. A primeira sala ficou destinada ao apoio informático, ou seja, registos de resultados de análises, boletins de análise dos produtos, relatórios, entre outros. A sala de receção de amostras encontra-se antes da sala de análises físico-químicas. Separada, encontra-se a zona de microbiologia que se está dividida em sala de análises, sala de preparação de meios e sala de lavagem de material.

A sala de análises físico-químicas foi equipada com vários aparelhos fundamentais para a análise de ovoprodutos, como medidores de pH, refratómetros de bancada, balanças de halogénio, viscosímetro, texturómetro, titulador automático e balanças de precisão, que fazem parte da lista de equipamentos necessários diariamente no laboratório. Os reagentes necessários foram todos guardados em armário com acesso restrito e todas as fichas técnicas de segurança dos produtos, assim como os manuais dos equipamentos foram devidamente guardados e datados de forma a poderem ser facilmente consultados.

As análises de microbiologia foram realizadas na sala destinada para tal, onde foram colocadas as estufas para incubação de placas assim como todo o material básico de análise microbiológica. Foi estabelecida uma limpeza e desinfeção periódica de forma a prevenir eventuais contaminações de amostras, evitando assim falsos resultados.

A esterilização do material de vidro assim como a preparação e esterilização dos meios de cultura é realizada na sala de preparação de meios equipada com estufa de

esterilização, autoclave e extrator de fumos. Os meios de cultura utilizados, foram fechados num armário e o seu acesso condicionado.

Na sala de lavagem de material, para além da lavagem de material de vidro e da esterilização de material descartável, também se realizam provas de montado de clara de ovo com recurso à bateadeira industrial aí colocada.

As amostras recebidas no laboratório foram encaminhadas para a sala na qual iriam ser analisadas, tendo em conta que sempre que forem necessárias análises de microbiologia, estas devem ser efetuadas antes das análises físico-químicas.

## 4. Conclusões

No decorrer do período de estágio foi possível organizar e estruturar o laboratório:

- criando e implementando instruções de trabalho, folhas de registo de resultados e arquivos de fichas de segurança de reagentes;
- testando os vários equipamentos e implementando os métodos de análise necessários para os vários parâmetros de análise físico-químicos microbiológicos e funcionais dos produtos de ovo produzidos na empresa;
- analisando os produtos durante a produção e os produtos terminados;
- monitorizando a higiene e eficácia da limpeza nos diferentes locais/equipamentos e zonas de produção.

A média  $\pm$  desvio padrão de resultados encontrada para o extrato seco de amostras de ovo líquido não pasteurizado foi de  $24,11 \pm 0,51$  % e para a clara líquida antes da pasteurização foi de  $11,596 \pm 0,287$  %. A média  $\pm$  desvio padrão pH de clara líquida não pasteurizada é de  $9,43 \pm 0,68$ , enquanto a clara em pó depois de reidratada apresenta valores médios de pH de  $6,93 \pm 0,66$  e a clara em pó não pasteurizada  $6,43 \pm 0,97$ . Os valores de °Brix determinados para vários lotes de clara em pó pasteurizada reidratada apresentam uma média  $\pm$  desvio padrão de  $11,53 \pm 0,28$  °Brix e no caso da clara líquida  $14,20 \pm 0,36$  °Brix. O valor da percentagem de extrato seco determinada para clara não pasteurizada é de  $94,14 \pm 2,07$  % de média  $\pm$  desvio padrão e de  $95,84 \pm 2,27$  % na clara pasteurizada.

No geral não se observaram diferenças significativas de pH, °Brix e extrato seco entre as amostras reidratadas com água destilada e com água da rede pública. O lote A06 foi o que apresentou maior diferença, tanto em termos de pH como de extrato seco.

Para os diferentes produtos analisados microbiologicamente, a quantidade detetada de fungos, leveduras, clostrídios e *Staphylococcus aureus* foi sempre inferior a 1 UFC / mL. Para todas as amostras de ovoprodutos analisados verificou-se ausência de microrganismos patogénicos.

A capacidade espumante é melhor a pH inferior a 7,22 e mínima a pH 7,67 e 8,17. Volta a aumentar para pH maior que 9. Em relação ao volume de espuma, os lotes

de clara com pH inferior a 8 apresentam volumes mais baixos do que os lotes de pH mais altos. Verifica-se, igualmente, que a estabilidade é maior a pH entre 6,5 e 8,5.

A média determinada da força de gel da clara em pó não pasteurizada e pasteurizada foi de  $337,48 \pm 74,50$  g/cm<sup>2</sup> e  $799,43 \pm 118,76$  g/cm<sup>2</sup>. A média de resultados da força de gel dos lotes de salsicha analisados foi de  $684,85 \pm 43,60$  g/cm<sup>2</sup>. Este resultado aproxima-se do encontrado na clara em pó pasteurizada ( $799,43$  g/cm<sup>2</sup>). Assim, foram verificadas maiores forças de gel na salsicha de clara e na clara em pó pasteurizada.

No total foram criadas 39 Instruções de Trabalho, analisados 174 lotes para verificação das características microbiológicas, recolhidas 44 amostras para verificação das limpezas, e analisados 213 lotes em termos de °Brix, pH, percentagem de extrato seco, capacidade espumante, densidade, estabilidade e força de gel.

Para que fosse possível comparar de forma mais aprofundada as relações entre os parâmetros estudados seria necessário realizar análises a um maior número de lotes e efetuar também um maior número de ensaios por cada análise. Também seriam necessárias mais análises para verificar as características que distinguem cada produto.

No entanto as análises e os ensaios efetuados permitem uma observação do comportamento dos produtos, assim como dos equipamentos utilizados, tal como se pretendia para este trabalho.

É de salientar a importância de um estudo das características dos produtos tanto a nível microbiológico, como físico-químico e funcional, de forma a ser possível validar os parâmetros de qualidade importantes para o sistema HACCP.

Em conclusão este estágio permitiu o conhecimento da forma de funcionamento da fábrica Ovofoods, das matérias-primas e da sua transformação em produtos. Por outro lado foi muito enriquecedor ter a possibilidade de participar na estruturação do laboratório de controlo de qualidade, pois possibilitou o conhecimento aprofundado dos equipamentos e das metodologias que permitem a caracterização integral das matérias-primas e dos produtos, assim como do acompanhamento do processo produtivo. Os ovoprodutos devem ser sujeitos a rigorosos controlos de qualidade, não só por serem produtos microbiologicamente suscetíveis de alteração, como também por serem produtos que apresentam características funcionais como ingrediente com capacidade de formação de espuma, emulsionante e coagulante, as quais podem sofrer alterações durante o processamento.

## 5. Referências Bibliográficas

1. Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P., Food chemistry. In *Food Chemistry*, 4th revised and extended ed.; Springer, Ed. Springer: Berlin; Heidelberg, 2009; pp 546 - 562.
2. McNamara, D. J.; Thesmar, H. S., EGGS. In *Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition)*, Editor-in-Chief: Benjamin, C., Ed. Elsevier: Oxford, 2005; pp 86-92.
3. C.G, B., EGGS - Use in the Food Industry. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Editor-in-Chief: Benjamin, C., Ed. Academic Press: Oxford, 2003; pp 2000-2004.
4. Kovacs, M.; Mine, Y. , Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **2005**, 53, 8421-8431.
5. Huevo, I. d. E. d., Seguridad Alimentaria en Huevos y Ovoproductos. 2ª ed.; Huevo, I. d. E. d., Ed. Madrid, 2006. (acessado em maio de 2011).
6. W.J, S., Eggs - Structure and Composition. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Editor-in-Chief: Benjamin, C., Ed. Academic Press: Oxford, 2003; pp 2005-2009.
7. Macrae, R. R., R.K. and Sadler, M.J. , Eggs: Structure and Composition,. *Food Technology and Nutrition* **1993**.
8. Agriculture, U. S. D. o., USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Agricultural Research Service: 2010.
9. Gallego, A. S. G., R. M. ; Cosialls, F. T. et al., *Lecciones sobre el Huevo*. 1a ed.; Instituto de Estudios del Huevo: Madrid, 2002.
10. Ramachandran, R.; Malhotra, D.; Anishaparvin, A.; Anandharamakrishnan, C., Computational fluid dynamics simulation studies on pasteurization of egg in stationary and rotation modes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2011**, 12 (1), 38-44.
11. Rossi, M.; Casiraghi, E.; Primavesi, L.; Pompei, C.; Hidalgo, A., Functional properties of pasteurised liquid whole egg products as affected by the hygienic quality of the raw eggs. *Lwt-Food Science and Technology* **2010**, 43 (3), 436-441.
12. 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* **1997**, 36 (2-3), 111-125.

13. Delves-Broughton, J.; Board, R. G., EGGS - Microbiology of Egg Products. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Editor-in-Chief: Richard, K. R., Ed. Elsevier: Oxford, 1999; pp 569-573.
14. ICMSF, Huevos y Ovoproductos. In *Microorganismos de los Alimentos (6) - Ecología Microbiana de los Productos Alimenticios*, Acríbia, Ed. 2001; pp 451 - 488.
15. Lechevalier, V.; Jeantet, R.; Arhahass, A.; Legrand, J.; Nau, F., Egg white drying: Influence of industrial processing steps on protein structure and functionalities. *Journal of Food Engineering* **2007**, 83 (3), 404-413.
16. Van der Plancken, I.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. E., Foaming properties of egg white proteins affected by heat or high pressure treatment. *Journal of Food Engineering* **2007**, 78 (4), 1410-1426.
17. Brennan, J. G., Drying - Spray Drying. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Editor-in-Chief: Benjamin, C., Ed. Academic Press: Oxford, 2003; pp 1929-1938.
18. Sisak, C.; Csanadi, Z.; Ronay, E.; Szajani, B., Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase. *Enzyme and Microbial Technology* **2006**, 39 (5), 1002-1007.
19. Sanovo <http://www.sanovogroup.com/> (acessado em 2012).
20. Humphrey, T. J.; Richardson, N. P.; Statton, K. M.; Rowbury, R. J., Effects of temperature shift on acid and heat tolerance in Salmonella enteritidis phage type 4. *Applications of Environmental Microbiology* **1993**, 59 (9), 3120-2.
21. Erickson, J. P., Behavior of Yersinia enterocolitica in commercially pasteurized liquid eggs held at 2, 6.7, and 12.8 degrees *Contributions to Microbiology and Immunology* **1995**, 13, 83-5.
22. Brackett, R. E.; Beuchat, L. R., Methods and media for the isolation and cultivation of Listeria monocytogenes from various foods. *International Journal of Food Microbiology* **1989**, 8 (3), 219-23.
23. Stadelman, W. J., Cotterill, O.J., *Egg science and technology*. fourth ed.; New York, 1995.
24. Ragni, L.; Berardinelli, A.; Cevoli, C.; Sirri, F., Admittance measurements to assess the total solids and fat contents in liquid whole egg products. *Journal of Food Engineering* **2011**, 107 (2), 179-185.
25. Washburn, K. W., Genetic-Variation in the Chemical Composition of the Egg. *Poultry Science* **1979**, 58 (3), 529-535.

26. Davis C., R. R. *High value opportunities from the chicken egg*; Publication No 02/094. Project No DAQ-275A.; Industries Research and Development Corporation: 2002.
27. Severa, L.; Nedomova, S.; Buchar, J., Influence of storing time and temperature on the viscosity of an egg yolk. *Journal of Food Engineering* **2010**, *96* (2), 266-269.
28. Palmer, H. H.; Ijichi, K.; Roff, H., Partial Thermal Reversal of Gelation in Thawed Egg Yolk Products. *Journal of Food Science* **1970**, *35* (4), 403-&.
29. Martin, A. H.; Grolle, K.; Bos, M. A.; Stuart, M. A.; van Vliet, T., Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *254* (1), 175-183.
30. Kuropatwa, M.; Tolkach, A.; Kulozik, U., Impact of pH on the interactions between whey and egg white proteins as assessed by the foamability of their mixtures. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23* (8), 2174-2181.
31. Davis, J. P.; Foegeding, E. A., Comparisons of the foaming and interfacial properties of whey protein isolate and egg white proteins. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2007**, *54* (2), 200-10.
32. Wilde, P. J., Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2000**, *5* (3-4), 176-181.
33. Lostie, M.; Peczalski, R.; Andrieu, J.; Laurent, M., Study of sponge cake batter baking process. Part I: Experimental data. *Journal of Food Engineering* **2002**, *51* (2), 131-137.
34. Celik, I.; Yilmaz, Y.; Isik, F.; Ustun, O., Effect of soapwort extract on physical and sensory properties of sponge cakes and rheological properties of sponge cake batters. *Food Chemistry* **2007**, *101* (3), 907-911.
35. Bovskova, H.; Mikova, K., Factors Influencing Egg White Foam Quality. *Czech Journal of Food Sciences* **2011**, *29* (4), 322-327.
36. Mine, Y., Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology* **1995**, *6* (7), 225-232.
37. Sleight, R., *Egg science and technology* (4th ed): edited by William J. Stadelman and Owen J. Cotterill, Food Products Press, 1995.
5. *Trends in Food Science & Technology* **1996**, *7* (10), 341.
38. Kato, A.; Fujimoto, K.; Matsudomi, N.; Kobayashi, K., Protein Flexibility And Funcional-Properties Of Heat-Denaturated Ovalbumin And Lysozime. *Agricultural and Biological Chemistry* **1986**, *50* (2), 417-420.

39. Donovan, J. W.; Mapes, C. J., Differential Scanning Calorimetric Study Of Conversion Of Ovalbumin To S-Ovalbumin In Eggs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1976**, 27 (2), 197-204.
40. Chang, Y. I.; Chen, T. C., Functional and gel characteristics of liquid whole egg as affected by pH alteration. *Journal of Food Engineering* **2000**, 45 (4), 237-241.
41. Daimer, K.; Kulozik, U., Oil-in-water emulsion properties of egg yolk: Effect of enzymatic modification by phospholipase A(2). *Food Hydrocolloids* **2009**, 23 (5), 1366-1373.
42. Kim, M. R.; Shim, J. Y.; Park, K. H.; Imm, B. Y.; Oh, S.; Imm, J. Y., Optimization of the enzymatic modification of egg yolk by phospholipase A(2) to improve its functionality for mayonnaise production. *Lwt-Food Science and Technology* **2009**, 42 (1), 250-255.
43. Zhao, X. G.; Shi-Jian, D.; Tao, G. J.; Xu, R. R.; Wang, M.; Reuhs, B.; Yang, Y. J., Influence of phospholipase A2 (PLA2)-treated dried egg yolk on wheat dough rheological properties. *Lwt-Food Science and Technology* **2010**, 43 (1), 45-51.
44. Guilmineau, F.; Kulozik, U., Impact of a thermal treatment on the emulsifying properties of egg yolk. Part 1: Effect of the heating time. *Food Hydrocolloids* **2006**, 20 (8), 1105-1113.
45. Guilmineau, F.; Kulozik, U., Impact of a thermal treatment on the emulsifying properties of egg yolk. Part 2: Effect of the environmental conditions. *Food Hydrocolloids* **2006**, 20 (8), 1114-1123.
46. Service, U.-U. K. A., Accreditation for Chemical Laboratories. 1 ed.; Eurachem / WELAC: Teddington -Middlesex, 2000; pp 1-34.
47. Nielsen, S., *Food analysis*. 4th ed.; Springer: New York, 2010.
48. Walton, R. M., Validation of laboratory tests and methods. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **2001**, 10 (2), 59-65.
49. Singh, A.; Korasapati, N. R.; Juneja, V. K.; Subbiah, J.; Froning, G.; Thippareddi, H., Dynamic Predictive Model for the Growth of Salmonella spp. in Liquid Whole Egg. *Journal of Food Science* **2011**, 76 (3), M225-M232.
50. Wilbey, R. A., Pasteurization. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Elsevier Science Ltd: 2003; pp 4381 - 4386.
51. Caballero, B.; Trugo, L. C.; Finglas, P. M., *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2nd ed.; Academic Press: Amsterdam ; New York, 2003.
52. Prescott, L. M., *Microbiology*. 5th ed.; The McGraw-Hill Companies: 2002.



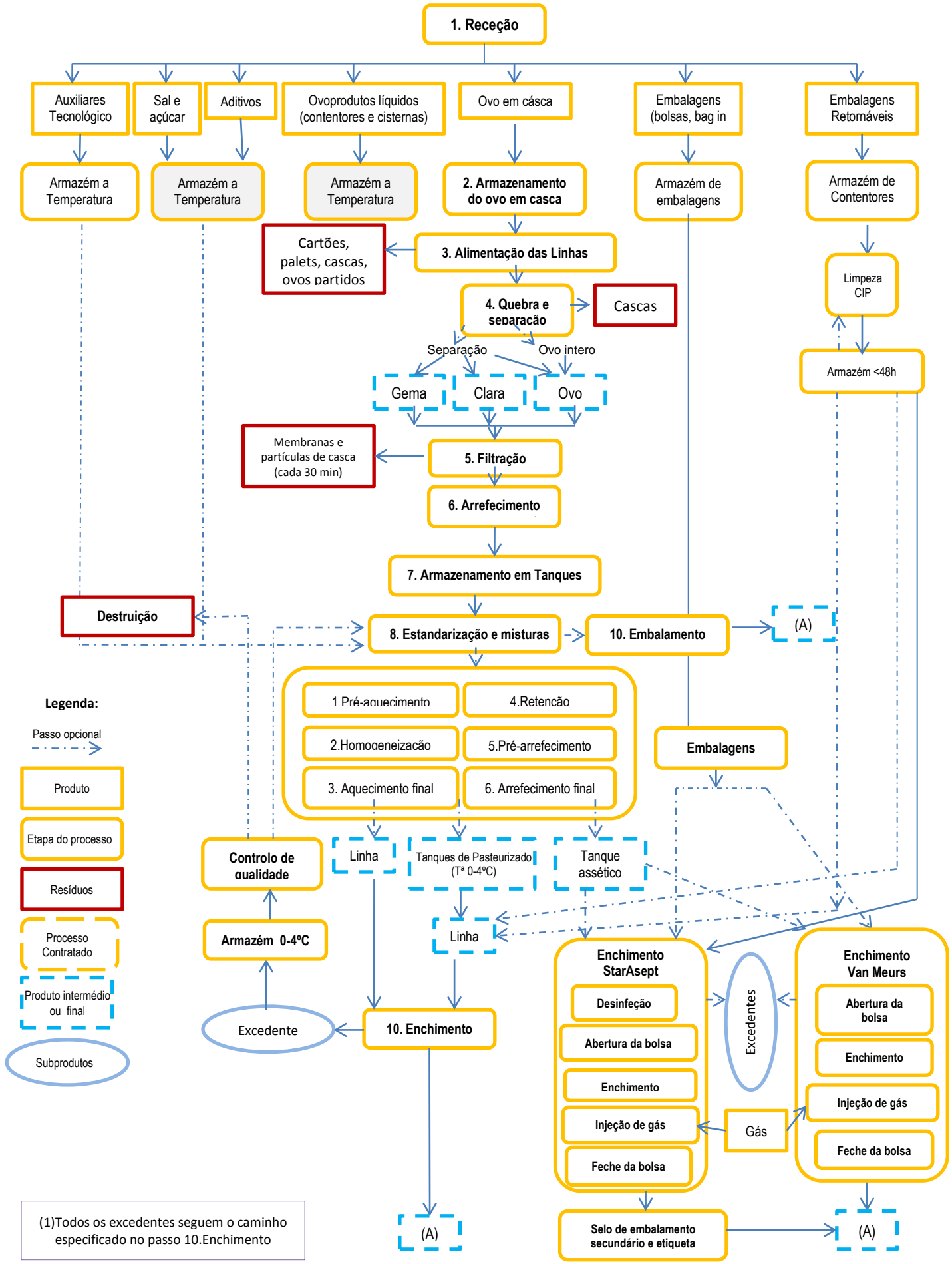
53. Moss, M. R. A. M. O., *Food Microbiology*. 3rd ed.; The Royal Society of Chemistry University of Surrey, Guildford, UK, 2008.
54. Roehm, J. K. K. H., Molecular Genetics - Genetic Engineering - PCR and protein expression. In *Color Atlas of Biochemistry*, Thieme: New York, 2005; pp 262 - 264.
55. J. A. Odumeru; R. L. T. Churchill, H. L., and J. C. Hall, Food Safety. In *Food Biochemistry and Food Processing*, Hui, Y. H., Ed. Blackwell Publishing: Ames, Iowa, 2006; pp 689 - 744.
56. O'Grady, J. O. e. a., Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssr A* gene. *Food Microbiology* **2008.**, *25*, 75.
57. Dimitris G. Arapoglou, A. E. L., and Theodoros H. Varzakas, Enzymes Applied in Food Technology. In *Advances in Food Biochemistry*, Yildiz, F., Ed. CRC Press - Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, 2010; pp 101 - 130.
58. Mossel, D. A.; Koopman, M. J.; Jongerius, E., Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl Microbiol* **1967**, *15* (3), 650-3.
59. Shelef, L. A., Detection. In *Encyclopedia of Food Science (Second Edition)*, Elsevier, Ed. Detroit, MI, USA, 2003; pp 358 - 364.
60. Kim, H. U.; Goepfert, J. M., Enumeration and identification of *Bacillus cereus* in foods. I. 24-hour presumptive test medium. *Appl Microbiol* **1971**, *22* (4), 581-7.
61. Baird-Parker, A. C., A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J Gen Microbiol* **1963**, *30*, 409-27.
62. Devoyod, J. J.; Millet, L.; Mocquot, G., [An agar medium for direct enumeration of *Staphylococcus aureus*: pork plasma medium for *S. aureus* (PPSA)]. *Can J Microbiol* **1976**, *22* (11), 1603-11.
63. Hauschild, A. H.; Park, C. E.; Hilsheimer, R., A modified pork plasma agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. *Can J Microbiol* **1979**, *25* (9), 1052-7.
64. Beckers, H. J.; van Leusden, F. M.; Bindschedler, O.; Guerraz, D., Evaluation of a pour-plate system with a rabbit plasma-bovine fibrinogen agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. *Can J Microbiol* **1984**, *30* (4), 470-4.
65. Sawhney, D., The toxicity of potassium tellurite to *Staphylococcus aureus* in rabbit plasma fibrinogen agar. *J Appl Bacteriol* **1986**, *61* (2), 149-55.
66. Wong, M. B. a. A. L., Detection. In *Encyclopedia of Food Science (second edition)*, Madison, WI, USA, 1993; pp 5551-5556.

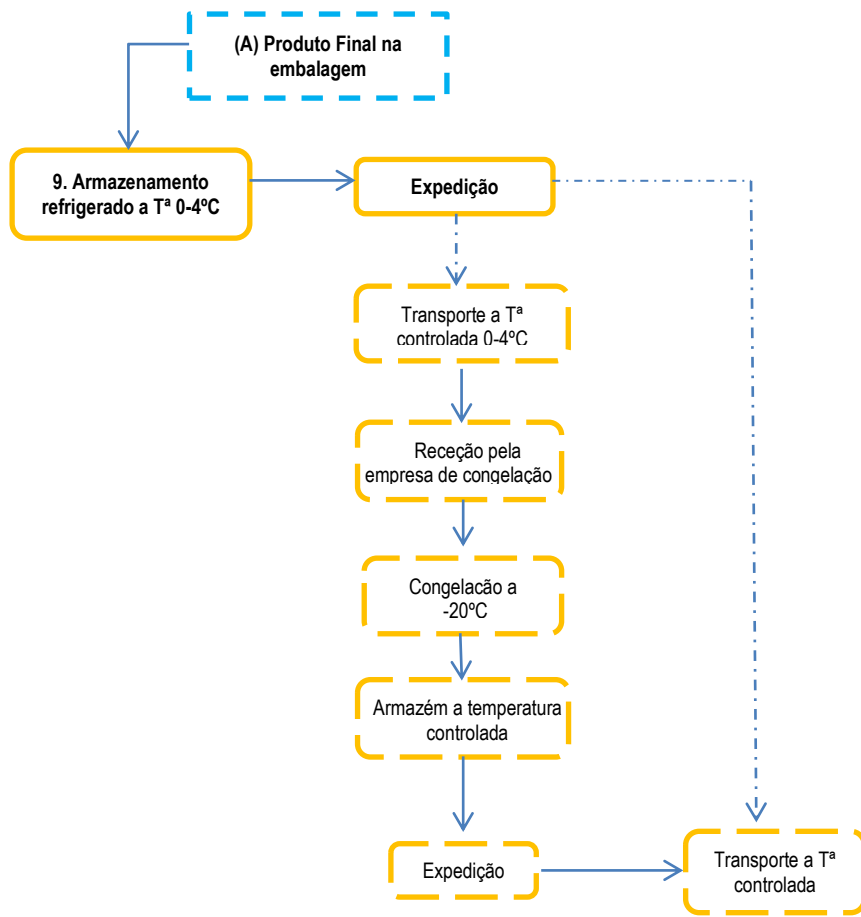
67. Slanetz, L. W.; Bartley, C. H., Evaluation of membrane filters for the determination of numbers of coliform bacteria in water. *Appl Microbiol* **1955**, *3* (1), 46-51.
68. Slanetz, L. W.; Bartley, C. H., Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J Bacteriol* **1957**, *74* (5), 591-5.
69. Burkwall, M. K.; Hartman, P. A., Comparison of Direct Plating Media for the Isolation and Enumeration of Enterococci in Certain Frozen Foods. *Applications of Microbiology* **1964**, *12*, 18-23.
70. De Man, J. C.; Rogosa, M.; Sharpe, M. E., A Medium For The Cultivation Of Lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* **1960**, *23* (1), 130-135.
71. Labbe, R. G., Occurrence of Clostridium perfringens. In *Encyclopedia of Food Sciences*, Elsevier Science Ltd: Amherst, MA, USA, 2003; pp 1398-1403.
72. Mossel, D. A.; von, G. B. G.; de, B. A., A simplified method for the isolation and study of obligate anaerobes. *J Pathol Bacteriol* **1959**, *78*, 290-1.
73. Marshall, R. S.; Steenbergen, J. F.; McClung, L. S., Rapid Technique for the Enumeration of Clostridium Perfringens. *Appl Microbiol* **1965**, *13*, 559-63.
74. Collee, J. G., The nature and properties of the haemagglutinin of Clostridium welchii. *J Pathol Bacteriol* **1961**, *81*, 297-312.
75. Macconkey, A., Lactose-Fermenting Bacteria in Faeces. *J Hyg* **1905**, *5* (3), 333-79.
76. Venkitanarayanan, K. S., Detection. In *Encyclopedia of Food Sciences (second edition)*, Science, E., Ed. Storrs, CT, USA, 2003.
77. Microbiologia, M. P.-D. d., Guía de Interpretación - Placas para Recuento de E.coli y Coliformes. Company, M., Ed. 2002.
78. T Humphrey, P. S., Detection. In *Encyclopedia of Food Sciences (second edition)*, Elsevier Science: Exeter, Devon, UK, 2003; pp 5079-5083.
79. Griffiths, M. W., Detection. In *Encyclopedia of Food Sciences (second edition)*, Science, E., Ed. Guelph, Ontario, Canada, 2003; pp 3573-3582.
80. van Netten, P.; Perales, I.; van de Moosdijk, A.; Curtis, G. D.; Mossel, D. A., Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of L. monocytogenes and other Listeria spp. *Int J Food Microbiol* **1989**, *8* (4), 299-316.
81. Infopedia. Dureza da água. 2003 - 2012. [http://www.infopedia.pt/\\$dureza-da-agua](http://www.infopedia.pt/$dureza-da-agua).

82. Conductivity and Water Quality. [kywater.org/ww/ramp/rmcond.htm](http://kywater.org/ww/ramp/rmcond.htm).
83. Kemps, B. J.; Bamelis, F. R.; Mertens, K.; Decuyper, E. M.; De Baerdemaeker, J. G.; De Ketelaere, B., The assessment of viscosity measurements on the albumen of consumption eggs as an indicator for freshness. *Poult Science* **2010**, 89 (12), 2699-703.
84. The DSM Yolk Colour Fan- the quality standard for the egg industry. [http://www.dsm.com/en\\_US/downloads/dnp/51559\\_poultry.pdf](http://www.dsm.com/en_US/downloads/dnp/51559_poultry.pdf) (accessed 06/11/2011).
85. Phillips, L. G.; German, J. B.; O'Neill, T. E.; Foegeding, E. A.; Harwalkar, V. R.; Kilara, A.; Lewis, B. A.; Mangino, M. E.; Morr, C. V.; Regenstein, J. M.; Smith, D. M.; Kinsella, J. E., Standardized Procedure for Measuring Foaming Properties of Three Proteins, A Collaborative Study. *Journal of Food Science* **1990**, 55 (5), 1441-1444.
86. Talansier, E.; Loisel, C.; Dellavalle, D.; Desrumaux, A.; Lechevalier, V.; Legrand, J., Optimization of dry heat treatment of egg white in relation to foam and interfacial properties. *Lwt-Food Science and Technology* **2009**, 42 (2), 496-503.
87. Nakamura R., S. Y., Studies on the foaming property of the chicken egg white. *Agricultural and Biological Chemistry* **1964**, 28, 530-534.

## **Anexos**

## Anexo 1





**Legenda:**

Passo opcional

Produto

Etapa do processo

Resíduos

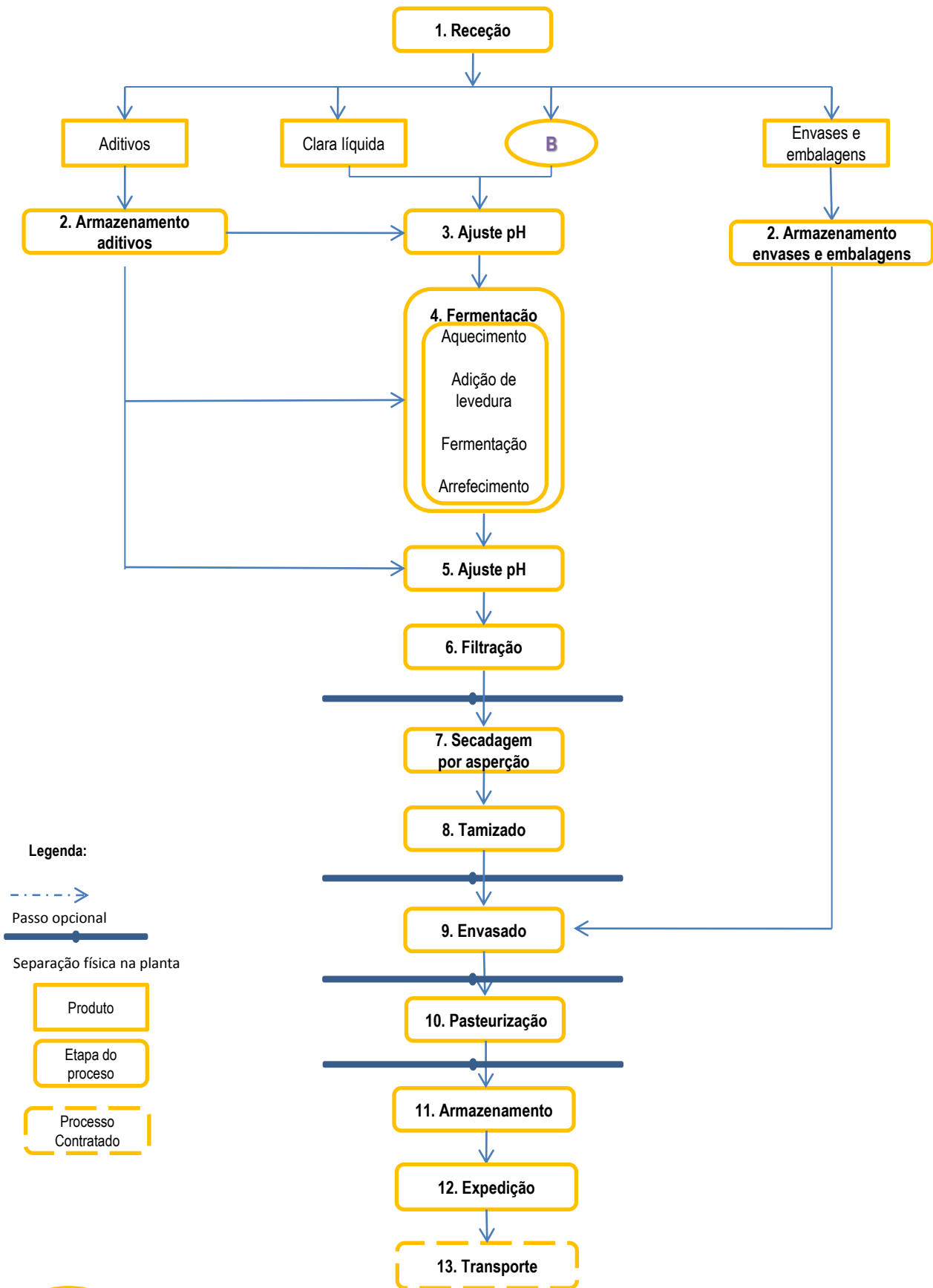
Processo Contratado

Produto intermédio ou final

Subprodutos

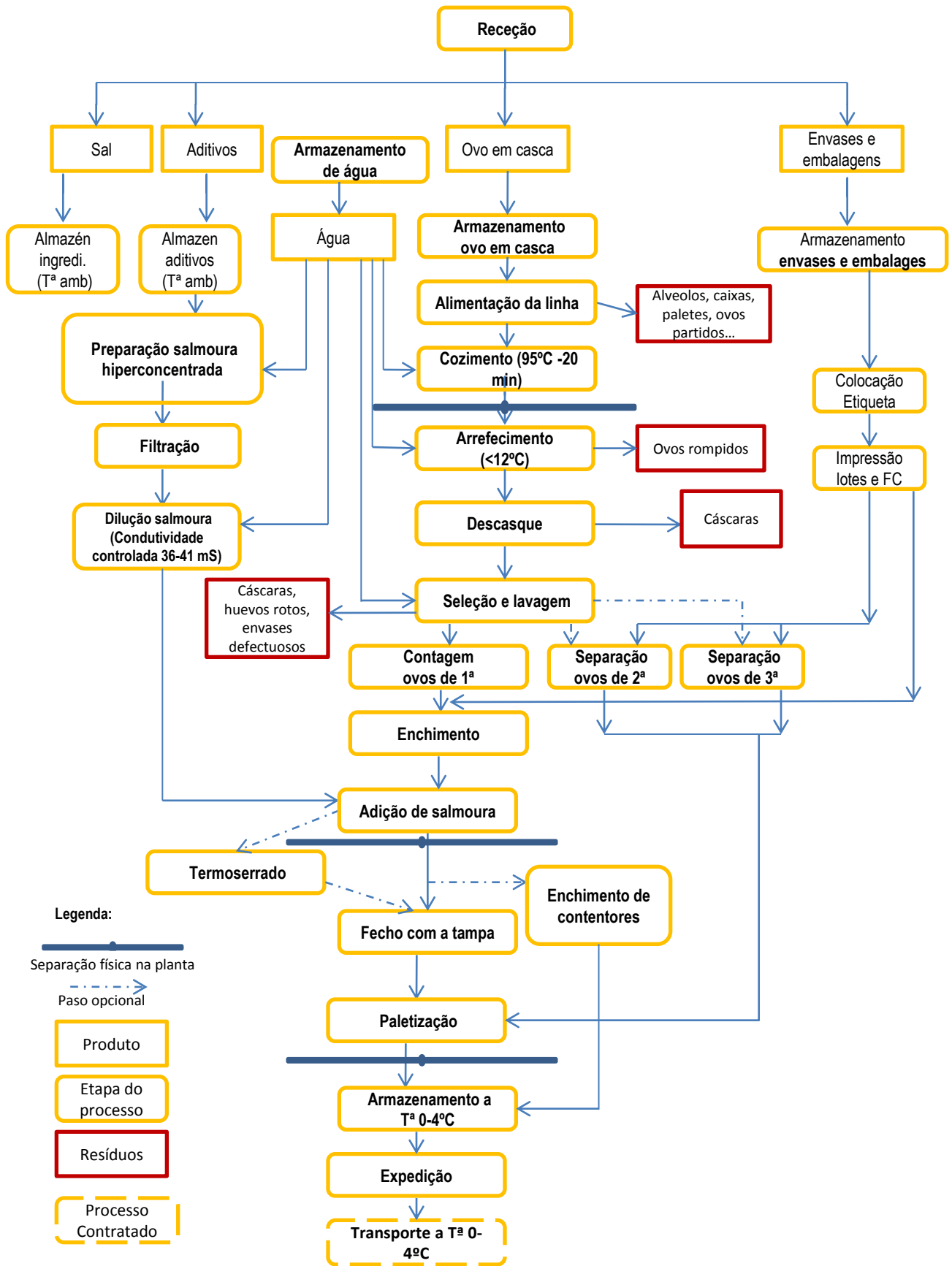
## Anexo 2

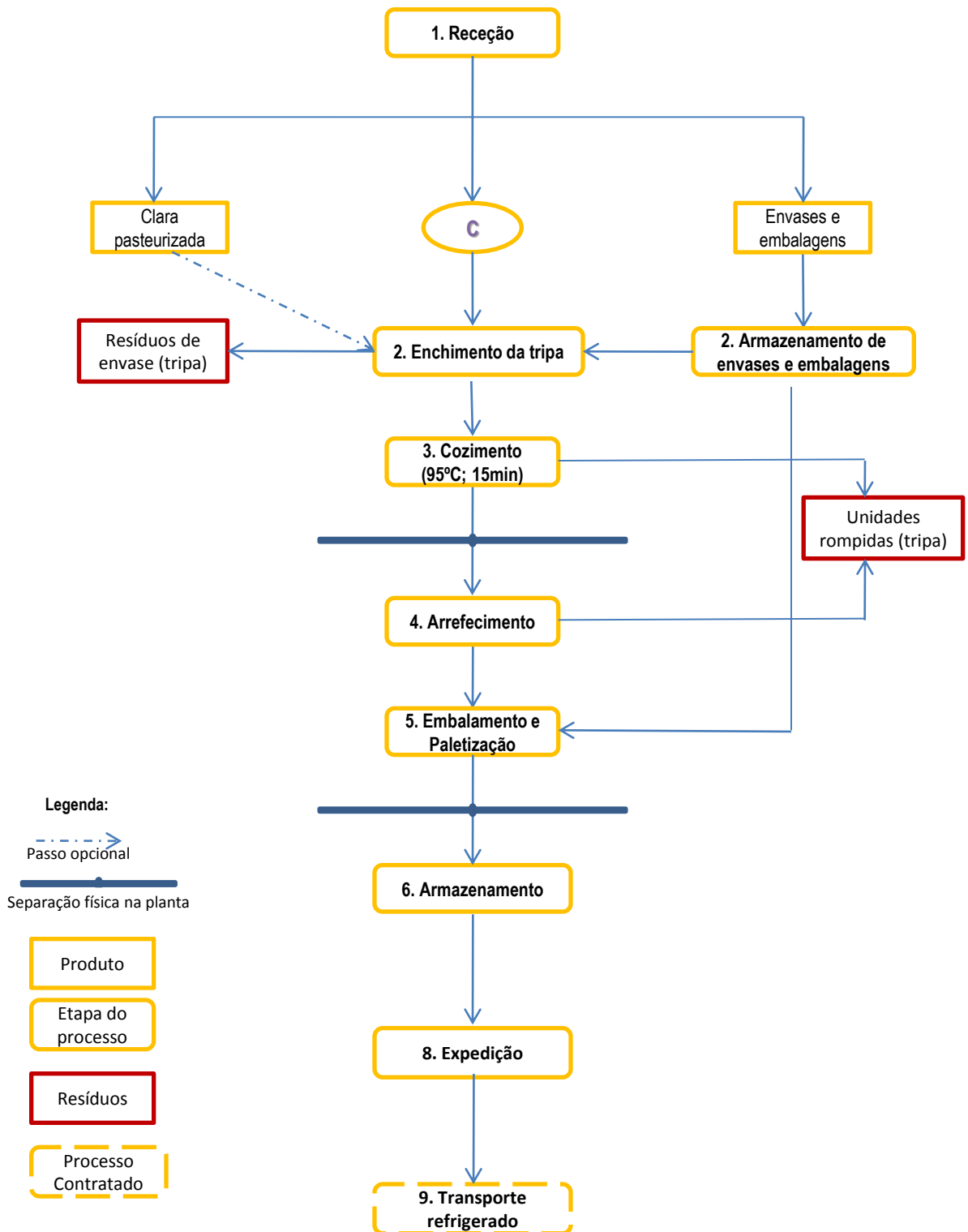




**B** No diagrama de fluxo do ovo líquido, corresponde às fases desde a recepção até à estandarização e misturas (tanques de produto cru).

## Anexo 3





**C**

No diagrama de fluxo do ovo líquido, corresponde às fases desde a recepção até ao enchimento.

## Anexo 4

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Recogida de muestras para análisis microbiológico Torunda y Polywipes

#### 1. Primera Edición

#### 2. Objetivo

Este documento se destina a establecer el método de recogida de muestras para validación/verificación de limpiezas de superficies, equipos e higiene de los manipuladores.

#### 3. Principios

Se pretende con la aplicación de esta instrucción de trabajo verificar que las limpiezas efectuadas en la planta son eficaces y eliminan todo lo que puede contaminar el producto final (residuos sólidos y microorganismos). Existen planos de limpiezas para todas las superficies y equipos que deben de ser cumplidos según la periodicidad definida, teniendo siempre en cuenta las buenas prácticas de higiene.


En el sector alimentar la higiene de los colaboradores es muy importante por lo que se tiene que verificar la eficacia de la limpieza de la indumentaria de trabajo periódicamente.

La recogida de muestras se realizada con Polywipes (esponjas azules estériles) o con torundas, de acuerdo con el local a inspeccionar.

#### 4. Responsabilidad

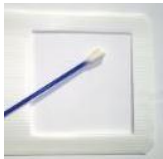
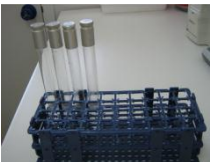
La recogida de muestras es de la responsabilidad del Técnico de Laboratorio o de otro colaborador que tenga recibido formación para desempeñar estas funciones.

#### 5. Método

Flujograma	Descripción del Método	Equipos/Materiales
	<p><b>A. Polywipes</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Identificar y numerar todas las bolsas con local de cogida de muestra y fecha, respectando el plan de análisis definido.</li><li>2. Poner guantes y desinfectar las manos con alcohol para no contaminar las esponjas.</li><li>3. Fregar la esponja en un área equivalente a 100 cm<sup>2</sup> (aprox. 2 esponjas). Garantizar que la esponja pase apenas por el área a analizar.</li><li>4. Poner la esponja en su bolsa ya identificada.</li><li>5. Después de recoger todas las muestras, llevar las bolsas para el laboratorio.</li><li>6. Colocar la esponja con la ayuda de una pinza desinfectada en el medio de cultivo que se va utilizar para el análisis (ex. ATP) o en 100ml de sol. de Ringer.</li><li>7. Realizar el análisis de acuerdo con el plan definido (La muestra se debe de almacenar en la nevera y el análisis se debe realizar como máximo hasta 12 horas después de la recogida de muestra).</li></ol> <p><b>Nota:</b> Para el análisis microbiológico se considera la muestra inicial la esponja en 100 ml de medio (Ej. Sol.Ringer)</p> <p><u>Resultados:</u></p> <ol style="list-style-type: none"><li>8. Los resultados son expresos en UFC / 100 cm<sup>2</sup>.</li><li>9. Anotar el resultado en el registro correspondiente.</li></ol>	<p>Esponjas (Polywipes) Bolsas de esponjas Rotulador Guantes Alcohol Pinza</p>

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Recogida de muestras para análisis microbiológico Torunda y Polywipes

Flujograma	Descripción del Método	Equipos/Materiales
 	<p><b>B. <u>Torunda</u></b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Preparar tubos de ensayo con 10 mL de sol. Ringer.</li><li>2. Identificar los tubos de acuerdo con las zonas a analizar.</li><li>3. Poner guantes y desinfectar las manos con alcohol para no contaminar las torundas.</li><li>4. Colocar la torunda durante 5 seg. en su tubo de ensayo para que se quede húmida.</li><li>5. Fregar la torunda en un área equivalente a 100 cm<sup>2</sup> (utilizar marcador). Garantizar que la torunda pase apenas por el área a analizar.</li><li>6. Colocar la torunda en un tubo de ensayo con 10ml de sol. de Ringer y poner la tapa (solución inicial).</li><li>7. Después de recoger todas las muestras, llevar los tubos para el laboratorio para analizar. Si no se analiza de inmediato, colocar en la nevera (máximo 12 h).</li></ol> <p><b><u>Resultados:</u></b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>8. Los resultados son expresos en UFC / 100 cm<sup>2</sup>.</li><li>9. Anotar el resultado en el registro correspondiente.</li></ol>	<p>Torundas estériles Tubos de ensayo Solución de Ringer Rotulador Guantes Papel absorbente Alcohol</p>

## Anexo 5



# INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

## Aislamiento de Listeria

### 1. Primera Edición

### 2. Objetivo

Este documento se destina a establecer reglas generales para el aislamiento de Listeria.


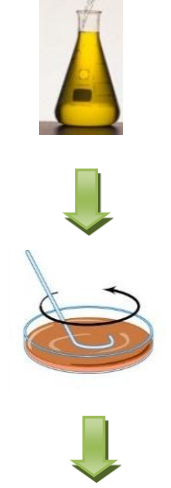
### 3. Principios

*L. monocytogenes* es un bacilo Gram- positivo, de 0,4 a 0,5 micrones de ancho por 0,5 a 1,2 de largo, no ramificado y anaerobio facultativo. Es capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (1 a 45 °C) y en elevadas concentraciones de sal. Es catalasa positiva y no presenta cápsula ni espora. Tiene flagelos gracias a los cuales presenta movilidad a 30 °C o menos, pero es inmóvil a 37 °C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan. El hábitat primario de *L.monocytogenes* es el suelo y los vegetales en descomposición en los que se puede desarrollar.

### 4. Responsabilidad


La aplicación del método descrito en esta instrucción de trabajo es del Técnico de Laboratorio o de otro colaborador que tenga recibido formación para desempeñar estas funciones. Todos los resultados obtenidos fuera de los parámetros pre-establecidos deberán ser comunicados al Jefe del Departamento.

### 5. Método

Flujograma	Descripción del Método	Equipos/Materiales
	<b>A. Preenriquecimiento En Medio Líquido No Selectivo:</b>  1. Pesar, asépticamente, 25 gr. de producto o pipetar 25 ml (en productos líquidos); 2. Mezclar con 225 ml del caldo de enriquecimiento de Listeria; 3. Incubar a 30°C durante 18-24 horas.	Listeria Enrichment broth Placas Petri estériles Pipetas estériles Pipetador Fascos 250 mL Mechero de bunsen Stomacher Bascula Estufa a 30°C
	<b>B. Enriquecimiento en Medio Líquido Selectivo:</b>  4. Preparar previamente el Fraser broth y añadirle 10 ml de suplemento. 5. Pipetar 10 ml del caldo de enriquecimiento a 100 ml de Fraser. 6. Incubar a 35 - 37°C durante 24 - 48 horas.	Fraser Broth + suplemento de Fraser  Pipetador Pipetas estériles Fascos 100ml Estufa a 37°C

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Aislamiento de Listeria

Flujograma	Descripción del Método	Equipos/Materiales
	<p><b>C. Aislamiento Diferencial Sobre Medios Sólidos Selectivos:</b></p> <p>7. Partiendo de los Frasers obtenidos, sembrar las placas de Oxford y dejar absorber sobre la mesa.</p> <p>8. Incubar en posición invertida a 35 - 37°C durante 48 horas.</p> <p>9. Las colonias se pueden observar ya a las 24 horas, aunque se mantenga la incubación durante 48 horas. Son pequeñas, inferiores a 1 mm y con luz incidente oblicua exhiben superficie azulada.</p>	<p>Oxford Agar</p> <p>Asa de siembra desechable</p> <p>Estufa a 37°C</p>
	<p><b>D. Resultados:</b></p> <p>10. El resultado deberá ser ausencia/25 ml o 25 gr. A no ser, se deberá retener el producto y reprocesar.</p> <p>11. Apuntar los resultados obtenidos en el registro interno de análisis del producto final.</p>	<p>Contador de colonias</p>

## Anexo 6

# INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

## Aislamiento de *Salmonella*

### 1. Primera Edición

### 2. Objetivo

Este documento se destina a establecer reglas generales por el aislamiento de *Salmonella*.

### 3. Principios

*Salmonella* es un género de bacterias que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, formado por bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, con flagelos y que no desarrollan cápsula ni esporas. Son bacterias móviles que producen sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). Fermentan glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa.



En el Reglamento CE nº 1441/2007, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en el capítulo 2.3, destinado a Ovoproductos, se establece que estos productos deben de ser ausentes de *Salmonella*.

El método de análisis es por sementera con medio de cultivo selectivo para está de acuerdo con la ISO11133-2:2003 y ISO 6785:2001(IDF 93:2001).

### 4. Responsabilidad


La aplicación del método descrito en esta instrucción de trabajo es del Técnico de Laboratorio o de otro colaborador que tenga recibido formación para desempeñar estas funciones. Todos los resultados obtenidos fuera de los parámetros pre-establecidos deberán ser comunicados al Jefe del Departamento.

### 5. Método

Fluxograma	Descripción del Método	Equipos/Materiales
	<p><b>A. <u>Pre-enriquecimiento En Medio Líquido No Selectivo.</u></b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Pesar, asépticamente, 25 gr. de muestra o pipetar 25 ml (para productos líquidos).</li><li>2. Mezclar con 225 ml de agua de peptona.</li><li>3. Incubar a 37°C durante 16-24 horas.</li></ol>	Agua de Peptona tamponada Placas Petri estériles Pipetador Pipetas estériles Fascos de 250ml Mechero de bunsen Stomacher Bascula Alcohol/Papel/Pinza/ Cuchilo Estufa
	<p><b>B. <u>Enriquecimiento en Medio Líquido Selectivo.</u></b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>4. Agitar bien el cultivo obtenido en el medio líquido de preenriquecimiento;</li><li>5. Añadir 10 ml sobre 100 ml de Caldo Selenito-Cistina.</li><li>6. Incubar a 43°C durante 18-24 horas.</li></ol>	Caldo Selenito-Cistina Pipetador Pipetas estériles. Fascos de 100ml Mechero de bunsen Alcohol Estufa

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Aislamiento de *Salmonella*

Fluxograma	Descripción del Método	Equipos/Materiales
	<p><u>C. Aislamiento Diferencial Sobre Medios Sólidos Selectivos.</u></p> <p>7. Sembrar sobre las placas de SMID preparadas, partiendo de los medios líquidos selectivos de enriquecimiento obtenidos.</p> <p>8. Incubar a 37°C durante 48 horas.</p>	<p>Medio de cultivo: SM2 (SMID Biomerieux)</p> <p>Pipetas estériles.</p> <p>Matraces Erlenmeyer</p> <p>Mechero de bunsen.</p> <p>Alcohol.</p> <p>Asa de siembra.</p> <p>Estufa</p>
	<p><u>D. Resultados</u></p> <p>9. El resultado deberá ser ausencia/25 ml o 25 gr. A no ser, se deberá retener el producto y reprocesar.</p> <p>10. Apuntar los resultados obtenidos en el registro interno de análisis del producto final.</p>	<p>Contador de colonias</p>

## Anexo 7

# INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

## Detección y recuento de Enterobacterias en PETRIFILM

### 1. Primera Edición

### 2. Objetivo

Este documento se destina a establecer reglas generales para la detección y recuento de Enterobacterias en Petrifilm™.

### 3. Principios

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son huéspedes normales del intestino de los mamíferos, por lo tanto, su presencia en el agua y ovoproductos se relaciona con contaminación de origen fecal. La determinación de Enterobacterias nos permite saber si el proceso de pasteurización fue eficaz, una vez que su surgimiento post producción nos indica algún tipo de contaminación fecal no eliminada.

En el Reglamento CE nº 1441/2007, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en el capítulo 2.3, destinado a Ovoproductos, se establece como límites (de 5 muestras analizadas), un resultado:

- Satisfactorio: si todos los valores son inferiores a 10 ufc/ml;
- Aceptable: si apenas 2 muestras se encuentran entre 10 y 100 ufc/ml y las otras 3 inferiores a 10;
- Insatisfactorio: si uno o varias muestras son superiores a 100 ufc/ml o más de 2 muestras están entre 10 y 100 ufc/ml.

Se utiliza el Petrifilm™ para la detección de Enterobacterias según la ISO 24528:2004. Este método de análisis no necesita de preparación de medios, es de incubación rápida y de fácil.

### 4. Responsabilidad

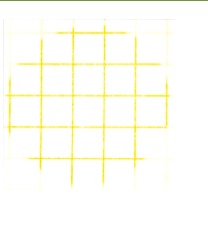
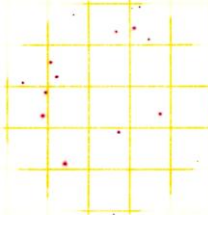
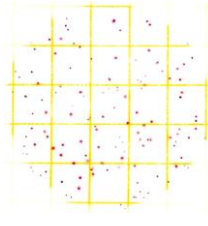
La aplicación del método descrito en esta instrucción de trabajo es del Técnico de Laboratorio o de otro colaborador que tenga recibido formación para desempeñar estas funciones. Todos los resultados obtenidos fuera de los parámetros pre-establecidos deberán ser comunicados al Responsable del Departamento.

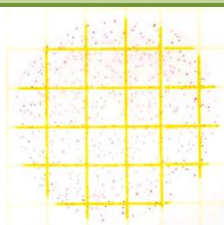
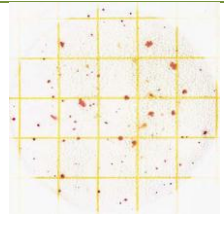
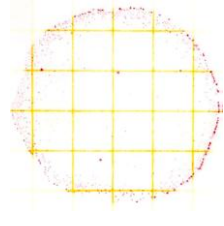
### 5. Método

Flujograma	Descripción del Método	Equipos/Materiales
	1. Prepara una dilución 10 <sup>-1</sup> , de la muestra en Ringer, si necesario.	Pipetas 1 ml desechables Tubos de ensayo Alcohol Mechero de bunsen Papel absorbente
	2. Levantar la tapa del film. 3. Con una pipeta estéril inocular 1 ml de la dilución en el centro del film. 4. Bajar la tapa superior del film con cuidado de que no se formen burbujas. 5. Co el dispersor hacer presión sobre la superficie para extender la muestra; 6. Esperar un minuto para que el gel solidifique.	Petrifilm™ Enterobactereaceae Count Plate Dispersor
	7. Incubar a 37°C durante 18 a 24 horas, con la muestra hacia arriba, en grupos de 20 films o menos.	Estufa
	8. Contar todas las colonias de color rojo con acido e colonias rojas con acido e burbujas de gas; 9. Los resultados son expresos en U.F.C./mL 10. Apuntar los resultados obtenidos en el registro interno de análisis del producto final	Contador de colonias <i>Soporte papel:</i> R 03.02 LAB <i>Soporte informático:</i> R 03.03 LAB


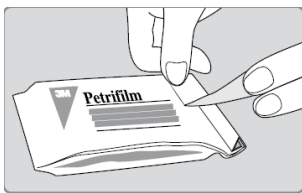

**INSTRUCCIÓN DE TRABAJO**  
**Detección y recuento de Enterobacterias**  
**en PETRIFILM**

**6. Interpretación de Resultados**

Ejemplo	Resultado
	Colonias = <b>0</b> El Petrifilm no tiene crecimiento
	Colonias = <b>13</b> (dilución $10^{-1}$ ) = <b>130</b> Si la muestra se ha diluido antes de inocular, se debe de multiplicar las colonias obtenidas por el factor de dilución.
	Colonias = <b>143</b>

Ejemplo	Resultado
	Colonias = <b>420</b> Cuando los recuentos sobrepasan las 300 colonias, se debe de contar las colonias de un cuadrado ( $1\text{cm}^2$ ) y multiplicar por 20 ( $20\text{ cm}^2$ es el área aproximadamente inoculada).
	Colonias = <b>83</b> Las colonias rojas se distinguen perfectamente de las partículas opacas de alimentos.
	Colonias = <b>Incontable</b> La distribución de las colonias es aleatoria y no es posible tener un resultado aproximado.

**7. Almacenamiento Petrifilm™**

		
<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Mantener en refrigeración las bolsas de Petrifilm no abiertas.</li> <li>◦ Controlar las fechas de caducidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Cerrar las bolsas abiertas, doblando la extremidad y cerrando con cinta adhesiva o con un clip</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ No refrigerar bolsas abiertas.</li> <li>◦ Mantener a <math>&lt;21^{\circ}\text{C}</math>.</li> <li>◦ Utilizar hasta un mes después de abierta la bolsa</li> </ul>



## Anexo 8

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Detección y recuento de *Bacillus cereus* con medio de cultivo

#### 1. Primera edición

#### 2. Objetivo

Este documento se destina a establecer reglas generales por la detección y recuento de *Bacillus cereus* con medio de cultivo.

#### 3. Principios

*Bacillus cereus* es un microorganismo Gram-positivo, con forma de bastón alargado, aerobio facultativo y formador de esporas. La resistencia térmica de las esporas de *B. cereus* en un medio con elevado contenido de agua vuelve a este microorganismo un potencial peligro para el desarrollo de una intoxicación, si las medidas higiénico sanitarias y de elaboración no son las adecuadas.

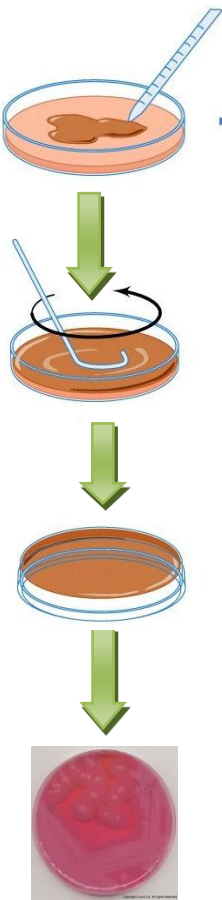
Los parámetros internos definen la cantidad máxima de aceptabilidad para valores inferiores a 10 UFC/mL.

El método de análisis por sementera con medio de cultivo selectivo para *B. cereus* está de acuerdo con la ISO 21871:2006.

#### 4. Responsabilidad

La aplicación del método descrito en esta instrucción de trabajo es del Técnico de Laboratorio o de otro colaborador que tenga recibido formación para desempeñar estas funciones. Todos los resultados obtenidos fuera de los parámetros pre-establecidos deberán ser comunicados al Jefe del Departamento.

#### 5. Método

Flujograma	Métodos	Equipos/ Materiales
	<p><u>Preparación</u></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Fundir el medio de cultivo en baño –maría, y distribuí uniformemente en placas</li><li>2. Dejar solidificar sobre la mesa;</li></ol>	Medio de cultura <i>Bacillus cereus</i> Agar Placas de petri esterilizadas. Mechero de bunsen Alcohol
	<p><u>Inoculación</u></p> <ol style="list-style-type: none"><li>3. Depositar 0,1 mL de la muestra con una pipeta estéril sobre el medio de cultivo.</li><li>4. Sembrar la superficie del medio con un sembrador.</li><li>5. Dejar las placas secar antes de incubar.</li></ol>	Sembradores estériles Pipetas 1 ml desechables Mechero Bunsen Alcohol
	<ol style="list-style-type: none"><li>6. Incubar las placas a 30 °C durante 24 a 48 horas, en posición invertida</li></ol>	Estufa
	<p><u>Recuento</u></p> <ol style="list-style-type: none"><li>7. Contar todas las colonias circulares lisas de color rosa con un halo;</li><li>8. Los resultados son expresos en U.F.C./mL</li><li>9. Apuntar los resultados obtenidos en el registro interno de análisis del producto final</li></ol>	Contador de colonias

## Anexo 9

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Aislamiento e identificación de *Clostridium perfringens* con medio TSN

#### 1. Primera Edición

#### 2. Objetivo

Este documento se destina a establecer reglas generales por el aislamiento e identificación de *Clostridium perfringens*.

#### 3. Principios

El *Clostridium* es un género de bacterias anaerobias, bacilos grampositivas, parásitas y saprófitas algunas de ellas, que esporulan y son móviles, en general por intermedio de flagelos peritricos. No todas las especies son patógenas, algunas forman parte de la flora intestinal normal. Los más importantes son el *Clostridium botulinum* y el *Clostridium perfringens*. O *C. perfringens* es un microorganismo anaeróbico más frecuente en los alimentos.

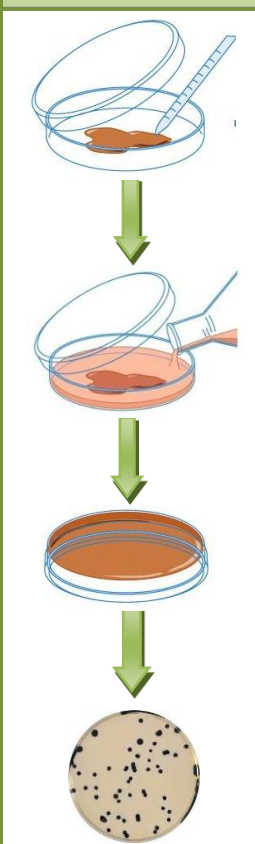
Los parámetros internos definen la cantidad máxima de aceptabilidad para valores inferiores a 10 UFC/mL.

El método de análisis por sembradura con medio de cultivo selectivo para *Clostridium perfringens* está de acuerdo con la ISO11133-2:2003.

#### 4. Responsabilidad

La aplicación del método descrito en esta instrucción de trabajo es del Técnico de Laboratorio o de otro colaborador que tenga recibido formación para desempeñar estas funciones. Todos los resultados obtenidos fuera de los parámetros pre-establecidos deberán ser comunicados al Jefe del Departamento.

#### 5. Método

Flujograma	Descripción del Método	Equipos/Materiales
	<u>Preparación</u> 1. Depositar con una pipeta estéril, 1ml de muestra en una placa de Petri estéril.	Placas de petri esterilizadas Pipetas 1 ml esterilizadas Papel absorbente Mechero de bunsen Alcohol
	<u>Inoculación</u> 2. Añadir el medio de cultivo TSN a la placa de Petri. 3. Mezclar bien sin levantar la placa. 4. Dejar solidificar sobre la mesa. 5. Añadir otra capa de medio a la placa y dejar solidificar.	Medio de cultivo Agar triptona-sulfito-neomicina (TSN)
	6. Preparar una jarra de anaerobiosis 7. Incubar a 46°C durante 24 horas	Estufa Jarra de anaerobiosis Bolsas de CO <sub>2</sub>
	<u>Recuento</u> 8. Contar todas las colonias con un halo negro 9. Los resultados son expresos en U.F.C./ml 10. Apuntar los resultados obtenidos en el registro interno de análisis del producto final	Contador de colonias

## Anexo 10

# INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

## pH-meter Hanna HI - 2221

### 1. Primera Edición

### 2. Objetivo

Este documento se destina a describir el modo de funcionamiento del pH metro Hanna HI - 2221.

### 3. Manual de instrucciones


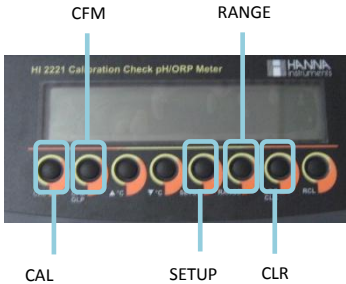
El manual se encuentra en la carpeta de Manuales de equipos de Laboratorio, en la sala de análisis físico-químicos.

### 4. Utilización

El pH-metro realiza la medida del pH de una solución por un método potenciométrico. El equipo es constituido por un electrodo de vidrio de alta sensibilidad y una sonda de temperatura (el comportamiento del electrodo depende de la temperatura de la solución analizada). Se utiliza para medir el pH de muestras de ovoproductos.

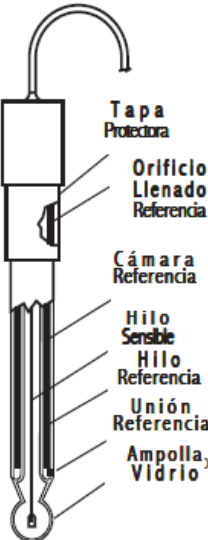

El control del pH de los ovoproductos durante la producción y de los productos finales es importantísimo para garantizar la calidad y salubridad de estos productos pues se relaciona con la inhibición de la carga microbiana.

### 5. Método

Flujograma	Descripción del Método
  	<p><b>Medición del pH</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Encender el instrumento en la tecla ON;</li> <li>2. Sumergir la sonda cerca de 3 cm en la muestra a analizar;</li> <li>3. Mover suavemente y esperar que el electrodo se estabilice;</li> <li>4. Visualizar la lectura del pH en el centro de la pantalla y la temperatura en el lado derecho. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Para medirse soluciones diferentes se debe enjugar el electrodo con agua desionizada y después con la solución a medir para prevenir contaminaciones cruzadas.</li> </ul> </li> </ol>
	<p><b>Medición de la temperatura</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Encender el instrumento en la tecla ON;</li> <li>2. Sumergir la sonda de la temperatura en la muestra;</li> <li>3. Esperar que el valor se estabilice para leer el valor.</li> </ol>
	<p><b>Calibración en tres puntos (pH 4.01, 7.01 y 9.18)</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Poner las soluciones tampón en frascos para proceder a la calibración.</li> <li>2. Sumergir el electrodo y la sonda de temperatura aprox. 3 cm en una solución tampón y mover suavemente.</li> <li>3. Presionar "CAL". Aparecerá en la pantalla "pH" y "CLEAR CALL if new electrode"</li> <li>4. Presionar "CLR" si se está usando un nuevo electrodo o para apagar el historial de calibración. Aparecerá "done" en la pantalla. Presiona "CAL" para continuar la calibración.</li> <li>5. Aparecerá en la pantalla "CAL", "pH" y "BUFFER 7.01". Para alterar el tampón utilizar las flechas (▼▲).</li> <li>6. Mientras la lectura no se estabiliza, el símbolo <math>\infty</math> parpadea.</li> <li>7. Cuando se estabiliza el símbolo "CFM" parpadea. Presionar la tecla "CFM" para confirmar la calibración.</li> <li>8. Quitar el electrodo y la sonda y limpiarlos.</li> <li>9. Cambiar la solución tampón y sumergir el electrodo y la sonda.</li> <li>10. Elegir el valor del tampón que se está midiendo usando las flechas.</li> <li>11. Mientras la lectura no se estabiliza el símbolo <math>\infty</math> parpadea.</li> <li>12. Cuando se estabiliza el símbolo "CFM" parpadea. Presionar la tecla "CFM" para confirmar la calibración.</li> <li>13. Proceder igual a 11 y 12 para el último punto de calibración.</li> <li>14. Presionar "CAL" para que quede memorizado.</li> </ol>

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### pH-meter Hanna HI - 2221

	<p><b>Mantenimiento del electrodo</b></p> <p><b>1. Substitución de la solución electrolito</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Retire la tapa protectora.</li> <li>• Agite el electrodo como lo haría con un termómetro clínico para eliminar las burbujas de aire que pudieran haber quedado dentro de la ampolla de vidrio.</li> <li>• Si la ampolla está seca, sumerja el electrodo en Sol. de almacenamiento HI70300 durante al menos una hora.</li> <li>• Si el nivel de la solución de relleno (electrolito) está a más de 1 cm por debajo del orificio de llenado, añada Sol. 3,5 M KCL+AgCl HI7071 para los de una unión.</li> </ul> <p><b>2. Almacenamiento</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La ampolla de vidrio deberá mantenerse húmeda y no permitir que se sequen.</li> <li>• Sustituya la Sol. de la tapa protectora por unas gotas de <b>Sol. de Almacenamiento HI70300</b> o, a falta de esta, <b>Sol. de Llenado (HI7071)</b> para los electrodos de una unión).</li> <li>• Si no dispone de ninguna de estas soluciones, también puede utilizar agua del grifo durante un corto período (un par de días).</li> <li>• NUNCA GUARDE EL ELECTRODO EN AGUA DESTILADA.</li> </ul> <p><b>3. Mantenimiento Periódico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inspeccione el electrodo para ver si está rayado o tiene grietas, en cuyo caso tendría que ser sustituido.</li> <li>• Si tuviera depósitos de sales, lávelo con agua.</li> </ul>
	<p><b>Limpieza del electrodo</b></p> <p>1.1. <u>Diario</u> - después de utilizar el pH meter, limpiar con agua destilada y colocar en Solución de almacenamiento.</p> <p>1.2. <u>General</u> - Sumérjalo en Sol. General de Limpieza Hanna HI7061 durante aprox. 1 hora.</p> <p>1.3. <u>Eliminar películas, suciedad o depósitos en la membrana/unión:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Proteínas:</b> Sumérjalo en <b>Sol. Limpieza de Proteínas HI7073</b> durante 15 minutos.</li> </ul>
	<p><b>Soluciones utilizadas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solución de almacenamiento: HI 70300L</li> <li>• Solución de limpieza del electrodo: HI 7073L</li> <li>• Solución Electrodo (electrolitos): HI 7071</li> </ul>



#### Puntos clave de inspección

El bulbo de vidrio en el extremo del electrodo de pH es sensible a descargas electrostáticas. Evite tocar este bulbo de vidrio en todo momento.



#### Primeros auxilios

Tfno urgencias: **112**



#### Medidas en caso de derrame

No se aplica.



#### Seguridad y salud

Tfno Emergencias: **112**

Para evitar daños o quemaduras, no realice mediciones en hornos microondas.

## Anexo 11



**INSTRUCCIÓN DE TRABAJO**  
**Medición del Extracto Seco**  
**Equipo: SARTORIUS MA 30**

**1. Primera Edición**

**2. Objetivo**

Este documento se destina a establecer reglas generales para la determinación de extracto seco de una muestra de huevo, yema o clara con el Analizador de Humedad Sartorius - MA 30.


**3. Utilización**

El extracto seco es determinado en productos líquidos y en productos en polvo (huevo entero, yema o clara). La determinación del extracto seco permite saber cuál es el ajuste que es necesario para que el producto se quede dentro de las especificaciones del producto.

**4. Responsabilidad**

La utilización del equipo para determinación del extracto seco es del responsabilidad de

**5. Método**

Fluxograma	Descripción del Método	Equipos/ Materiales
 <p>ON Cf ENTER</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Encender equipo en la tecla ON/ OF.</li> <li>2. Elevar la cubierta, colocar platillo y filtro en su ubicación y cerrar.</li> <li>3. Tarar el aparato presionando Cf. Aparece en la pantalla TAR.</li> <li>4. Presionar ENTER y aparecerá en la pantalla 0,000g con el icono de una cucharilla.</li> <li>5. Sacar el platillo y el filtro y colocar la muestra en el platillo. La muestra debe estar entre 0,460 y 0,880 g aproximadamente.</li> <li>6. Distribuir la muestra equitativamente en el platillo y cubrir con el filtro.</li> <li>7. Colocar nuevamente en el equipo, bajar la cubierta y pulsar ENTER. Se inicia el proceso automáticamente.</li> <li>8. Cuando termina el proceso de medición emite una señal acústica y nos indica END (FIN) e el resultado queda indicado en la pantalla hasta una nueva medición.</li> <li>9. Para iniciar otra medición presionar Cf y ENTER. Continuar como indicado en el punto 5.</li> <li>10. Limpiar el exterior del equipo con una tela suave y agua.</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizador de Humedad Sartorius MA-30</li> <li>• platillos aluminio</li> <li>• filtros fibra vidrio,</li> <li>• cucharilla y/o espátula.</li> </ul>

## Anexo 12

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Viscometer Brookfield DV - II + Pro

#### 1. Primera Edición

#### 2. Objetivo

Este documento se destina a describir el modo de funcionamiento del Viscometer Brookfield DV - II + Pro.

#### 3. Utilización

El viscosímetro es utilizado para medir la viscosidad de productos líquidos como huevo entero, yema o clara. La viscosidad varía con el tipo de producto y con los aditivos añadidos. Así, la clara de huevo presentará una viscosidad inferior a la del huevo entero que por su turno tendrá una viscosidad menor que la de la yema pura o de la yema con sal. La viscosidad del ovoproducto es importante para que el producto que se vaya a producir tenga la textura deseada y que esté de acuerdo con las especificaciones de los clientes.

#### 4. Método

Fluxograma	Descripción del Método
<p>Elegir velocidad (RPM)</p> <p>Menú de la Pantalla</p> <p>Elegir spindle</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Encender el viscometer en el pulsador que se encuentra en la lateral.</li> <li>2. El equipo pedirá automáticamente el autozero - seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla:             <ol style="list-style-type: none"> <li>2.1. Quitar el spindle si se encuentra alguno conectado;</li> <li>2.2. Pulsar cualquier botón y esperar que el aparato haga el autozero.</li> </ol> </li> <li>3. Conectar el spindle de acuerdo con la muestra que se va a utilizar (Tabla 1).</li> <li>4. En el panel principal definir cuál es el spindle (S 61, S 62, S 63, S 64) que se va a utilizar, pulsando SELECT SPINDLE y elegir con las flechas <math>\uparrow\downarrow</math>.</li> <li>5. Definir la velocidad (30, 60, 100, o 200 RPM) pulsando SET SPEED y elegir con las flechas <math>\uparrow\downarrow</math>.</li> <li>6. Bajar la cabeza del equipo hasta que la muestra a analizar cubra la zona hundida del spindle.</li> <li>7. Pulsar MOTOR ON / OFF para iniciar el análisis.</li> <li>8. Leer el resultado en la pantalla:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Esquina superior izquierda: viscosidad en mPas.</li> <li>- Esquina superior derecha: temperatura de la muestra en °C.</li> <li>- Esquina inferior izquierda: el valor de las rotaciones (RPM).</li> <li>- Esquina inferior derecha: porcentaje de la velocidad utilizada.</li> </ul> </li> <li>9. Para cambiar las RPM (rotaciones por minuto) pulsar las <math>\uparrow\downarrow</math> hasta que se quede en la velocidad deseada y que el porcentaje de la velocidad se encuentre por encima de 10.</li> <li>10. Terminar la lectura pulsando MOTOR ON/ OFF.</li> <li>11. Levantar la cabeza del equipo y retirar la muestra.</li> <li>12. Remover y limpiar el spindle con agua e papel suave.</li> <li>13. Para reiniciar, empezar en el punto 3.</li> <li>14. Para apagar el equipo, pulsar el pulsador que se encuentra en la lateral.</li> </ol>

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Viscometer Brookfield DV - II + Pro

**Tabla 1- Spindle a utilizar para cada producto**

Spindles	Velocidad (RPM)	Muestra
S 61	200	Clara
S 62	100	Huevo Entero Huevo Con sal
S 63	60	Yema Pura Yema con sal bajo extracto
S 64	30	Yema com sal alto extracto



#### Puntos clave de inspección

No use productos químicos agresivos o disolventes muy concentrados.



#### Primeros auxilios

Tfno urgencias: **112**



#### Medidas em caso de derrame

No se aplica



#### Seguridad y salud

No se aplica

## Anexo 13

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Conductímetro Serie InLab 738

#### 1. Primera Edición

#### 2. Objetivo

Este documento se destina a describir el modo de funcionamiento del Conductímetro Serie InLab 738.

#### 3. Manual de instrucciones



El manual se encuentra en la carpeta de Manuales de equipos de Laboratorio, en la sala de análisis físico-químicos.

#### 4. Utilización

El conductímetro es utilizado para medir la capacidad de conducción eléctrica del agua. Esto se relaciona con la pureza del agua, cuanto menor el valor de la conductividad más pura es el agua.

De acuerdo con el Real Decreto 140/2003 de 7 de Febrero, la conductividad del agua deberá ser de  $2.500 \mu\text{S cm}^{-1}$  para  $20^\circ\text{C}$ .

#### 5. Método

Flujograma	Descripción del Método
 <p style="text-align: center;">Calibración</p> <p style="text-align: center;">Medición</p>	<p><b>Calibración</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coloque el electrodo en el estándar de calibración definido y pulse <b>CAL</b>.</li> <li>2. Por defecto, el medidor de conductividad llega al punto final automáticamente una vez que la señal se ha estabilizado.</li> <li>3. Para aceptar la calibración y volver a la medición de muestras, pulse <b>READ</b>.</li> </ol> <hr/> <p><b>Medición de muestras</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coloque el electrodo en la muestra y pulse <b>READ</b> para iniciar la medición: el decimal parpadeará.</li> <li>2. Cuando la señal se estabiliza, la pantalla se congela automáticamente.</li> </ol>
	<p><b>Consejos de utilización</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enjuague el sensor con agua destilada o desionizada entre las mediciones. Si no puede disponerse de agua de esta calidad, enjuague el sensor con la solución que va a medir;</li> <li>• Asegúrese de que la solución queda por encima de la cámara de la celda, de forma que toda ella quede sumergida;</li> <li>• Confirme que la zona de medición del electrodo no presente burbujas durante la medida;</li> <li>• Para muestras de diferentes temperaturas debe dejar tiempo suficiente al sensor para que se estabilice;</li> <li>• Eliminar los sólidos acumulados en la cámara de la celda con una varilla de algodón empapada en una solución de detergente y después enjuagar con agua destilada o desionizada;</li> <li>• Para evitar daños por estática en el equipo, desconecte siempre el electrodo de conductividad del medidor antes de limpiarlo.</li> </ul>

**INSTRUCCIÓN DE TRABAJO**  
Conductímetro Serie InLab 738



**Puntos clave de inspección**

No se aplica.



**Primeros auxilios**

Tfno urgencias: **112**



**Medidas en caso de derrame**

No se aplica.



**Seguridad y salud**

Tfno Emergencias: **112**

Evitar tocar la zona de la cámara del sensor. Antes de limpiarlo, desconecte siempre el sensor del medidor;

No utilice el sensor a temperaturas fuera del intervalo recomendado;

No use productos químicos agresivos o disolventes muy concentrados.

---

## Anexo 14



**INSTRUCCIÓN DE TRABAJO**  
**Verificación de limpieza**  
**con torundas Clean Trace (Water & Surface)**

**1. Primera edición**

**2. Objetivo**

Este documento se destina a describir el método interno de verificación de las limpiezas de las superficies/ equipos en contacto con los productos y de las aguas de CIP.

**3. Principios**

La verificación de las limpiezas puede ser verificada mediante testes de bioluminiscencia. Estés testes determinan la presencia de ATP de microorganismos o otros residuos que no fueran destruidos con la desinfección e los traduce en un valor que debe ser inferior a 200 URL.

Es muí importante que los materiales e equipos que están en contacto con los ovoproductos no presenten valores fuera de los parámetros definidos para evitar la contaminación cruzada de los productos.

**4. Responsabilidad**

La aplicación del método descrito en esta instrucción de trabajo es del Técnico de Laboratorio o de otro colaborador que tenga recibido formación para desempeñar estas funciones. Todos los resultados obtenidos fuera de los parámetros pre-establecidos deberán ser comunicados al Jefe del Departamento.

**5. Método**

Fluxograma	Descripción del Método	Equipos/ Materiales
	<p><u>Análisis de superficies en contacto con ovoproductos:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sacar la torunda de su funda con cuidado.</li> <li>2. Pasar el algodón sobre la superficie a analizar, cubriendo una superficie correspondiente a aproximadamente 10 cm<sup>2</sup></li> <li>3. Colocar nuevamente la torunda en su funda, presionando hasta el fondo para que se mezcle la muestra con el reactivo.</li> <li>4. Agitar ligeramente.</li> <li>5. Introducir la torunda en el equipo de bioluminiscencia y presionar el botón ENTER (verde de la derecha).</li> <li>6. Esperar hasta que finalice la lectura del equipo.</li> <li>7. Anotar el resultado en el registro de limpieza correspondiente.</li> </ol>	<p>Torundas Clean Trace Surface®            Clean Trace            Luminometer</p>
	<p><u>Análisis de las aguas de aclarado de las distintas líneas:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sacar la torunda de su funda con cuidado.</li> <li>2. Abrir la muestra del último aclarado.</li> <li>3. Introducir la torunda de aguas, agitando ligeramente dentro del frasco toma muestras, sin rozar con las paredes del vaso.</li> <li>4. Colocar nuevamente la torunda en su funda, presionando hasta el fondo para que se mezcle la muestra con el reactivo.</li> <li>5. Agitar ligeramente.</li> <li>6. Introducir la torunda en el equipo de bioluminiscencia y presionar el botón ENTER (verde).</li> <li>7. Esperar hasta que finalice la lectura del equipo.</li> <li>8. Anotar el resultado en el registro de limpieza correspondiente.</li> </ol>	<p>Torundas Clean Trace Water®            Clean Trace            Luminometer</p>

## Anexo 15

**INSTRUCCIÓN DE TRABAJO**  
**Determinación de Cloruro Sódico**  
**por valoración con Titrador Automático**

**1. Primera Edición**

**2. Objetivo**

Este documento se destina a describir el método de determinación del porcentaje de cloruro sódico en una muestra utilizando un titrador automático – modelo 848 Titrino Plus (*Manual no.:* 8.848.8002 ES).

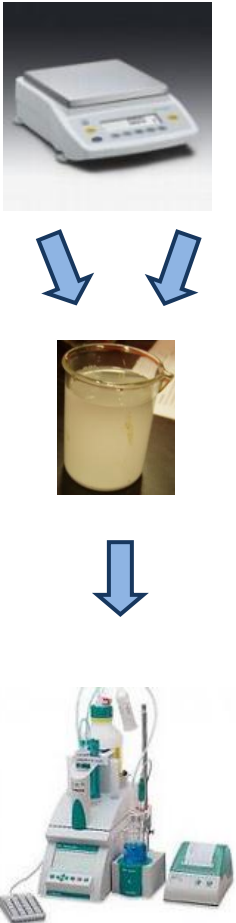
**3. Utilización**

Con la vasta gama de productos con sal que se fabrican en la empresa y con las exigentes especificaciones de clientes, necesitamos obtener datos de cloruro sódico fiables tanto para el ajuste de mezclas como para el análisis físico-químico final del producto. Ese porcentaje se determina por titrometría con nitrato de plata.

**4. Responsabilidad**

La aplicación del método descrito en esta instrucción de trabajo es del Técnico de Laboratorio o de otro colaborador que tenga recibido formación para desempeñar estas funciones. Todos los resultados obtenidos fuera de los parámetros pre-establecidos deberán ser comunicados al Responsable del Departamento.

**5. Método**

Fluxograma	Descripción del Método	Equipos/Materiales
	<p>A. <u>Preparación Muestra:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesar entre 0,5 y 1,0 gr de muestra a analizar y registrar el valor;</li> <li>- Añadir 60 ml de agua desionizada;</li> <li>- Acidificar la solución con 3 a 4 gotas de ácido nítrico;</li> <li>- Colocar un imán dentro del vaso (para agitar la muestra durante la valoración).</li> </ul> <p>B. <u>Funcionamiento Titrador:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Encender el tritador en el botón STOP;</li> <li>- Elegir el método "CLORUROS", que ya está programado con el tampón a utilizar, la dosificación adecuada y con los cálculos necesarios para la obtención del resultado.</li> <li>- Introducir el valor de muestra pesado anteriormente,</li> <li>- Verificar si el electrodo y el doseador se encuentran bien posicionados para iniciar la titración y pulsar "START" dos veces.</li> <li>- Ajustar, si necesario, la velocidad de agitación deseada con las flechas.</li> </ul> <p>C. <u>Resultados:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- El resultado de la medición surge en la pantalla o se puede seleccionar previamente la opción de impresión de informes.</li> <li>- Apuntar los resultados obtenidos en el registro interno de análisis de producto en fabricación o producto final.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuchara</li> <li>• Vaso precipitación 100ml</li> <li>• Bascula (0,001g)</li> <li>• Agua desionizada</li> <li>• Ácido Nítrico 2N</li> <li>• Papel absorbente</li> <li>• Imán</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tritador 848 Titrino Plus</li> </ul>

**INSTRUCCIÓN DE TRABAJO**  
**Determinación de Cloruro Sódico**  
**por valoración con Titrador Automático**



**Puntos clave de inspección**



**Primeros auxilios**

Tfno urgencias: **112**



**Medidas em caso de derrame**

**Ácido Nítrico:** Ventilar el área afectada. Neutralizar los residuos con carbonato sódico. Aclarar abundantemente con agua. No absorber con aserrín.



**Seguridad y salud**

Tfno Emergencias: **112**

Deberá tener atención en lo manoseo de los productos químicos utilizados.  
Al final de cada operación, separe los residuos en los diferentes cubos de basura (de acuerdo con lo que está definido).

---

## Anexo 16

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Rehidratación de la clara en polvo

#### 1. Primera Edición

#### 2. Objetivo

Este documento se destina a establecer reglas generales para reconstituir la clara en polvo para que se utilice como clara normal.


#### 3. Principio del método

La clara en polvo es un ovoproducto que debido a tener bajo contenido de humedad posee una fecha de caducidad más larga do que comparado con la clara de huevo líquida. Puede ser utilizada como clara líquida, pero para eso es necesario volver a hidratar el polvo en las proporciones correctas.

#### 4. Responsabilidad

Departamento de calidad.

#### 5. Método

Diagrama	Descripción del Método	Equipos/ Materiales
<div style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;">Pesar el polvo</div> <div style="font-size: 2em; margin: 5px 0;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;">Añadir el agua</div> <div style="font-size: 2em; margin: 5px 0;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;">Disolver en el agitador</div> </div> 	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. En la báscula determinar el peso de la clara en polvo que se pretende rehidratar.</li> <li>2. Para cada grama de polvo, añadir 7g de agua.</li> <li>3. Con la vareta, mezclar cuidadosamente el polvo en el agua hasta que no haya partículas pegadas a la vareta.</li> <li>4. Colocar el vaso medidor con el imán en el agitador magnético hasta que esté todo disuelto.</li> <li>5. Apagar el agitador magnético y retirar el imán.</li> <li>6. Reposar 5 minutos.</li> </ol> <p>*Nota: Debe-se remover la espuma antes de las determinaciones físico-químicas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Báscula KERN PLS 4200-2A</li> <li>• Vaso medidor</li> <li>• Agitador magnético</li> <li>• Imán</li> <li>• Vareta</li> </ul>

## Anexo 17

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Determinación de la fuerza de gel de la clara

#### 1. Primera Edición

#### 2. Objetivo

Este documento se destina a establecer reglas generales para la determinación de la fuerza de gel de ovoproductos después de la cocción, como por ejemplo, clara de huevo, clara en polvo rehidratada o salchicha de clara utilizando el analizador de textura "Brookfield CT3 Texture analyzer".

#### 3. Principio del método

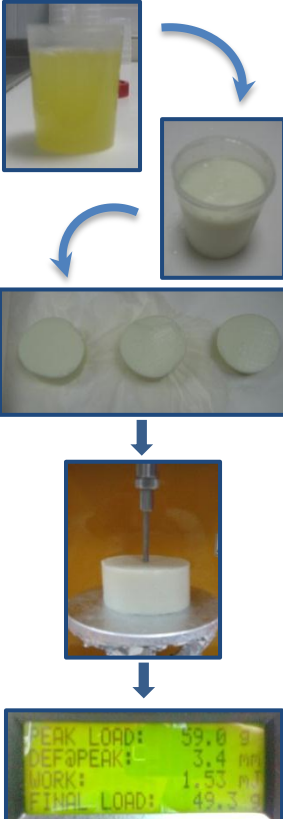
La textura es uno de los parámetros de aceptabilidad de los alimentos más importante en la industria alimentaria. Así, debe asegurarse que la clara después de cocida tenga una textura aceptable por el consumidor. Los procesos químicos y/o térmicos a que se súmete la clara pueden cambiar las suyas características. Con el analizador de textura si puede determinar la fuerza de gel de la clara conociendo para una determinada deformación cual es la tensión ejercida en una muestra cilíndrica.

#### 4. Responsabilidad

Departamento de calidad.

#### 5. Método

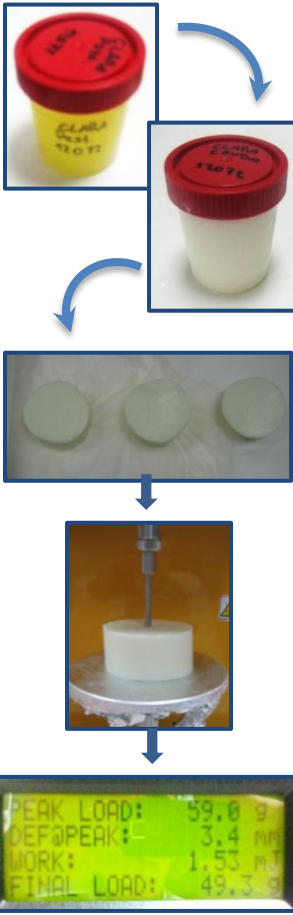
##### 5.1. Determinación de la fuerza de gel de la clara líquida

Diagrama	Descripción del Método	Equipos/ Materiales
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Llenar 3 vasos plásticos con 100 ml de clara líquida cada vaso y quitar la espuma;</li> <li>▪ Cerrar muy bien con la tapa;</li> <li>▪ Identificar los vasos con el lote en la tapa y en el vaso;</li> <li>▪ Colocar los vasos en el baño-maría a 95°C por 30 minutos;</li> <li>▪ Retirar y enfriar los vasos en agua fría (hasta que se queden a 25°C aprox.);</li> <li>▪ Remover la clara cocida de los vasos con el cuchillo sin deshacer la forma cilíndrica;</li> <li>▪ Cortar con el auxilio de una regla uno cilindro con 3 cm de altura a partir del fondo de la muestra con cuidado para que la superficie a analizar este o más lisa posible;</li> <li>▪ Poner el cilindro cortado en el centro del plato del texturómetro;</li> <li>▪ Hacer una prueba, pinchando el START del texturómetro</li> <li>▪ Repetir la prueba por los otros dos cilindros;</li> <li>▪ Registrar los valores de la carga (Peak Load) obtenidos en cada prueba.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasos plásticos 100 mL con tapa roja</li> <li>• Baño-María con termostato</li> <li>• Termografo</li> <li>• Cuchillo / espátula</li> <li>• Papel absorbente</li> <li>• Papel de aluminio</li> <li>• Regla</li> <li>• Texturómetro <i>Brookfield CT3 Texture analyzer</i></li> </ul>



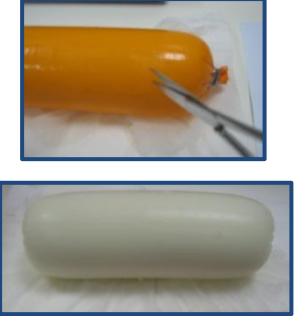
**INSTRUCCIÓN DE TRABAJO**  
**Determinación de la fuerza de gel de la clara**

**5.2. Determinación de la fuerza de gel de la clara en polvo**

Diagrama	Descripción del Método	Equipos/ Materiales
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rehidratar la clara en polvo como descrito en la IT – rehidratación de la clara en polvo</li> <li>▪ Llenar 3 vasos plásticos con 100 ml de clara líquida, filtrándose la espuma;</li> <li>▪ Cerrar muy bien con la tapa;</li> <li>▪ Identificar los vasos con el lote en la tapa y en el vaso;</li> <li>▪ Reposar 5 a 10 minutos;</li> <li>▪ Colocar los vasos en el baño-maría a 95°C por 30 minutos;</li> <li>▪ Retirar y enfriar los vasos en agua fría (hasta lograr una temperatura de 25°C aprox.);</li> <li>▪ Remover la clara cocida de los vasos con el cuchillo sin deshacer la forma cilíndrica;</li> <li>▪ Con el auxilio de una regla cortar un cilindro con 3 cm de altura a partir del fondo de la muestra con cuidado para que la superficie a analizar este o más lisa posible;</li> <li>▪ Poner el cilindro cortado en el centro del plato del texturómetro;</li> <li>▪ Hacer una prueba, pinchando el START del texturómetro</li> <li>▪ Repetir la prueba por los otros dos cilindros;</li> <li>▪ Registrar los valores de la carga (Peak load) obtenidos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasos plásticos 100 mL con tapa roja</li> <li>• Baño-María con termostato</li> <li>• Termografo</li> <li>• Cuchillo / espátula</li> <li>• Papel absorbente</li> <li>• Papel de aluminio</li> <li>• Regla</li> <li>• Texturómetro <i>Brookfield CT3 Texture analyzer</i></li> </ul>

**INSTRUCCIÓN DE TRABAJO**  
**Determinación de la fuerza de gel de la clara**

**5.3. Determinación de la fuerza de gel de la salchicha de clara.**

Diagrama	Descripción del Método	Equipos/ Materiales
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Con las tijeras, remover la tripa de la salchicha sin herirla y con cuidado para no romperla;</li> <li>▪ Cortar con el auxilio de una regla 3 cilindros de 3 cm de altura en el centro de la salchicha. No utilizar las puntas;</li> <li>▪ Poner un cilindro cortado en el centro del plato del texturómetro.</li> <li>▪ Hacer una prueba, pinchando el START del texturómetro;</li> <li>▪ Repetir la prueba por los otros dos cilindros;</li> <li>▪ Registrar los valores de la carga (Peak Load) obtenidos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tijeras</li> <li>• Cuchillo / espátula</li> <li>• Papel absorbente</li> <li>• Papel de aluminio</li> <li>• Regla</li> <li>• Texturómetro Brookfield CT3</li> <li>• Texture analyzer</li> <li>• pHmetro</li> </ul>

**6. Resultados**

Hacer la mediana del Peak Load obtenido en las pruebas y multiplicarlo por 7,96 (área del cilindro de la sonda).

El resultado es la fuerza de gel [g/ cm<sup>2</sup>].

**7. Parámetros del texturómetro:**

Teste: Normal

Trigger: 3,9g

Deformation: 4,2 mm

Speed: 1,5 mm/s



## Anexo 18

## INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

### Batido de clara a punto de nieve

#### 1. Primera Edición

#### 2. Objetivo

Este documento se destina a establecer reglas generales para verificar la capacidad de formación de espuma de clara (clara a punto de nieve) y también la estabilidad de la espuma.

#### 3. Principio del método


Las proteínas existentes en la clara de huevo son las responsables por la formación de espuma. El proceso térmico o químico a que se somete la clara puede cambiar las propiedades de las proteínas, y así, cambiar la capacidad de formación y la estabilidad de la espuma.

Este ensayo puede ser aplicado a clara cruda, clara pasteurizada o clara en polvo rehidratada.

#### 4. Responsabilidad

Técnico o responsable del laboratorio.

#### 5. Método

Flujograma	Descripción del Método	Equipos/ Materiales
<div style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Pesar 100 mL de clara</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Poner 600 mL de clara en la batidora</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Batir</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Pesar 100 mL de espuma</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Poner la espuma en el embudo</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Pesar la probeta de 10 en 10min por 1h</div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">  </div>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verificar las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, °Brix, extracto seco y viscosidad) y sensoriales (color, aspecto, olor) del producto;</li> <li>2. Con el recipiente de 100 mL determinar el peso del recipiente y también del recipiente con 100 mL de clara;</li> <li>3. Con un vaso medidor de 1L, medir 600mL de clara y poner en la batidora;</li> <li>4. Encender la batidora en la primera velocidad por solo un minuto. Cambiar para la segunda velocidad otro minuto;</li> <li>5. Batir la clara en la tercera velocidad durante 2,5 minutos;</li> <li>6. Determinar el peso de 100 mL de espuma con el recipiente de 100 mL;</li> <li>7. Transferir los 100 mL de espuma para el embudo con la gasa y poner en una probeta de peso conocido;</li> <li>8. De 10 en 10 minutos apuntar el valor del peso del líquido (durante 1 hora);</li> </ol> <p style="font-size: small; margin-top: 10px;">*Nota 1: el batido debe ser hecho a temperatura inferior a 10°C *Nota 2: la espuma debe ser pesada y transferida para el embudo o más rápidamente posible.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Batidora SINMAG MIXER SM-200C (cap. 20L)</li> <li>• Vaso medidor 1L</li> <li>• Cuchara</li> <li>• Probeta 100 mL</li> <li>• Embudo con gasa</li> <li>• Báscula KERN PLS 4200-2A</li> <li>• Recipiente 100 mL</li> <li>• Reloj/ cronógrafo</li> </ul>

**INSTRUCCIÓN DE TRABAJO**  
**Batido de clara a punto de nieve**

**6. Registros**

Recipiente de 100 mL (g)	
Recipiente + 100 mL de Clara (g)	
Recipiente + 100 mL de Espuma (g)	

Tiempo (min)	0	10	20	30	40	50	60
Probeta + líquido (g)							

\*Nota: por los 0 minutos el peso es de la probeta vacía.

**7. Interpretación de resultados**

- El valor de la densidad de la espuma es obtenida por:

$$\frac{\text{Peso Espuma (g)}}{\text{Volumen Espuma (L)}} \text{ g/dm}^3$$

- La capacidad de formación de espuma es determinada por la expresión:

$$\frac{\text{Peso Clara} - \text{Peso Espuma}}{\text{Peso Espuma}} \times 100$$

- La estabilidad del batido es verificada por el grafico correspondiente a los valores de líquido perdido durante 1 hora registrados de 10 en 10 minutos.