

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO: “Influência da temperatura e da atividade de água na sobrevivência da *Salmonella* em ovo em pó”

PESQUISADOR: Fábio Sandon

ORIENTADORA: Bernadette Dora Gombossy Melo Franco

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

FINALIDADE: Mestrado

PARTICIPANTES: Antonio Carlos Pedroso de Lima

Bernadette Dora Gombossy Melo Franco

Carmen Diva Saldiva

Fábio Sandon

Felipe Villarino Prieto

DATA: 31/07/01

FINALIDADE DA CONSULTA: Sugestão sobre o planejamento experimental

RELATÓRIO ELABORADO POR: Felipe Villarino Prieto

1. Introdução

Nos últimos anos no Brasil, o mercado de ovos desidratados vem crescendo consideravelmente e conquistando espaço na indústria de alimentos. Esse aumento deve-se às diversas vantagens que os ovos desidratados apresentam em relação aos ovos frescos. Dentre elas podemos citar um custo menor para estocá-los, a facilidade da sua utilização na fabricação de novos alimentos, eliminação do peso da casca e de ser menos suscetível à deterioração pela ação de microorganismos.

Entretanto, o processo de desidratação do ovo integral (gema e clara) pode alterar a eficiência de algumas estruturas que impedem a sua contaminação por microrganismos externos, em particular algumas espécies de *Salmonella*. A contaminação do ovo cru pode ocorrer dentro do ovário da ave, pela penetração da bactéria em rupturas na casca ou ainda durante a manipulação pelo homem. Quanto aos ovos desidratados ou pasteurizados, a presença da *Salmonella* deve-se às falhas durante o processo de pasteurização de ovos contaminados, formas incorretas de estocagem que propiciam o aumento da umidade ou mesmo à contaminação dos locais de industrialização.

A *Salmonella* é capaz de sobreviver por longo período de tempo em ovos desidratados, embora não seja capaz de se multiplicar. Para multiplicar-se ela depende da atividade de agentes antimicrobianos naturalmente presentes nos ovos e que ainda permanecem ativos após as etapas de industrialização, da Atividade de Água (quantidade de água) e da temperatura de armazenamento. A uma temperatura de 35°C e Atividade de Água (Aa) acima de 0,93, a bactéria encontra-se na condição ideal para a sua multiplicação. Além disso, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos para o controle de enfermidades das aves, surgiram novas linhagens de bactérias resistentes aos antibióticos.

Este projeto baseia-se num experimento laboratorial onde serão inoculadas cepas (culturas de microrganismos) de *Salmonella* em algumas amostras de ovo em pó desidratado, adicionadas de água e mantidas a diferentes temperaturas. As amostras serão analisadas periodicamente quando será contado o número desses microrganismos para verificar sua capacidade de multiplicação. Desta maneira, espera-se conseguir avaliar a capacidade de sobrevivência da *Salmonella* em ovos

desidratados, em função de diferentes valores de Atividade de Água e de temperatura de estocagem.

A finalidade da entrevista é auxiliar o pesquisador no planejamento experimental, fornecendo informações sobre o número de unidades experimentais e fatores limitantes do experimento.

2. Descrição do Estudo

Para a realização do experimento serão utilizadas duas espécies de *Salmonella*. Cada espécie terá bactérias sensíveis aos antibióticos comumente utilizados e bactérias resistentes aos mesmos, perfazendo um total de quatro cepas.

Inicialmente se adicionará ao ovo em pó integral desidratado, água destilada até que se obtenham amostras com diferentes valores de Aa. Cada uma dessas amostra serão classificadas em quatro faixas de valores Aa: 0,35 a 0,50; 0,51 a 0,75; 0,76 a 0,93 e maior que 0,93.

Após a preparação das amostras de ovo com as Aa desejadas, cada uma das quatro cepas será inoculada separadamente, de modo a fornecer duas concentrações finais de inóculo (quantidade de bactérias): alta e baixa. Em seguida as amostras inoculadas deverão ser armazenadas em quatro diferentes temperaturas: 8°C (geladeira), 15°C (fria), 25°C (ambiente), 35°C (ideal para a multiplicação).

As amostras, que constituirão as unidades experimentais, serão analisadas periodicamente para a contagem do número de bactérias. A periodicidade da contagem será determinada em função do valor da Aa e da temperatura de armazenamento. O experimento é encerrado quando o número de bactérias se mantiver aproximadamente constante durante três contagens consecutivas.

Tem-se assim um delineamento fatorial com 128 tratamentos (4 cepas X 4 Aa X 4 faixas de temperatura X 2 inóculos). Porém, o pesquisador já admite trabalhar com apenas uma espécie de *Salmonella*, o que diminuiria pela metade o número de tratamentos. Em cada tratamento, a mesma amostra será analisada em diferentes instantes de tempo. Discute-se ainda a necessidade de se realizar a cada instante de observação três réplicas com o objetivo de aumentar a confiabilidade da contagem. O

número de réplicas dependerá da variabilidade obtida após uma análise preliminar dos dados.

3. Descrição das Variáveis e Processo de Coleta de Dados

As variáveis envolvidas no estudo são as seguintes:

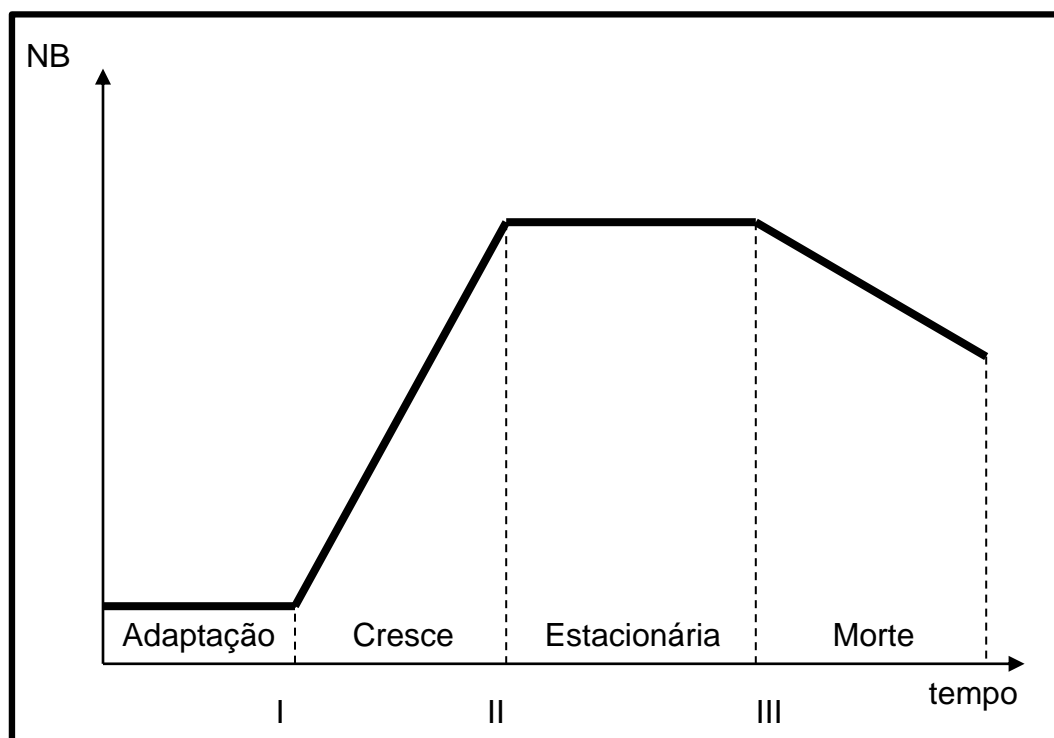
- ✓ **ES** - espécie de *Salmonella* (*S. enteritidis* = 0 , *S. hadar* = 1).
- ✓ **RES** - resistência ao antibiótico (resistente = 0 , sensível = 1).
- ✓ **FAA** - faixa de classificação da Atividade de Água (adimensional).
 - 1: 0,35 - 0,50;
 - 2: 0,51 - 0,75;
 - 3: 0,76 - 0,93;
 - 4: maior que 0,93;
- ✓ **TEMP** - temperatura em graus Celsius.
 - 1: 8°C;
 - 2: 15°C;
 - 3: 25°C;
 - 4: 35°C;
- ✓ **INO** - concentração de inóculo (alta = 0 , baixa = 1).
- ✓ **NB** - número de bactérias por grama de amostra.
- ✓ **TEMPO** – instante de tempo.

Os dados obtidos serão armazenados em uma planilha do Microsoft Excel.

4. Objetivo

Após a coleta dos dados, pretende-se ajustar curvas de crescimento para cada uma das unidades experimentais. Um possível padrão de crescimento é ilustrado na Figura 4.1. Num primeiro instante, imediatamente após a inoculação das cepas as bactérias não se multiplicam, pois estão num período de adaptação. Logo após, ocorre um aumento considerável no número de *Salmonella* e em seguida uma estabilização. Na última etapa inicia-se o processo de morte das bactérias. Uma condição satisfatória para o consumo do ovo seria aquela em que o tempo de adaptação é grande. Os instantes de mudança de fase (I, II, III) são de grande interesse no estudo, pois através deles pode-se comparar as curvas de crescimento.

Figura 4.1: Situação ideal da curva de crescimento



O objetivo principal é ajustar e comparar as curvas de crescimento da *Salmonella* nos diferentes tratamentos, avaliando assim sua capacidade de sobrevivência.

5. Sugestão do CEA

Uma possível abordagem para a análise estatística envolve a modelagem de curvas de crescimento. Porém, para o emprego dessa técnica é necessário realizar uma modelagem para cada um dos 128 tratamentos, o que tornaria inviável o estudo. Assim sendo é necessário estudar formas de reduzir o número de níveis em cada fator, sem que haja comprometimento dos objetivos do estudo.

A comparação das curvas também poderia ser feita por uma análise de agrupamentos, considerando os estimadores dos parâmetros das curvas de crescimento como variáveis que seriam observadas em cada tratamento. Desta forma, tratamentos nos quais fossem observados curvas com comportamentos semelhantes pertenceriam a um mesmo grupo.

O CEA sugere que o pesquisador realize alguns experimentos, de forma que se possa identificar a periodicidade da contagem das bactérias para o ajuste das curvas de crescimento. De posse dessas informações espera-se obter uma compreensão mais ampla do problema para a sugestão da técnica mais apropriada na análise estatística.

Ficou estabelecido que o pesquisador retornará no final de outubro, para uma nova consulta e possível encaminhamento do projeto para a triagem a ser realizada pelo CEA no 1º semestre de 2002.