

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

TAIANE ALMEIDA E SILVA

**ELABORAÇÃO E APLICAÇÃO DE FILMES (BIO)ATIVOS DE
QUITOSANA COM SAIS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO EM OVOS
COMERCIAIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

DOURADOS/MS

2019

TAIANE ALMEIDA E SILVA

**ELABORAÇÃO E APLICAÇÃO DE FILMES (BIO)ATIVOS DE
QUITOSANA COM SAIS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO EM OVOS
COMERCIAIS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos na área de concentração Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jose de Arruda
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sílvia Maria Martelli.

DOURADOS/MS

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

S586e Silva, Taiane Almeida E

Elaboração e aplicação de filmes (bio)ativos de quitosana com sais quaternários de amônio em ovos comerciais [recurso eletrônico] / Taiane Almeida E Silva. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Eduardo José de Arruda.

Coorientador: Sílvia Maria Martelli.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-
Universidade Federal da Grande Dourados, 2019. Disponível no
Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Ovos comerciais. 2. Quitosana. 3. Quaternários de amônio. 4. Filmes poliméricos bioativos. 5. Qualidade microbiológica. I. Arruda, Eduardo José De. II. Martelli, Sílvia Maria. III. Título.

Dedico esse trabalho a minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos.

“Ser feliz não é ter uma vida perfeita, mas deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história”.

Abraham Lincoln

AGRADECIMENTOS

Dedico essa dissertação primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo da minha vida, meu socorro sempre estando ao meu lado preparando o caminho que irei percorrer.

Aos meus pais, irmão, cunhada e filho que sempre me apoiaram e me sustentaram em tempos difíceis, suprimindo minha ausência junto ao meu filho e permitindo que me dedicasse a finalização do meu trabalho.

Ao meu namorado Marcelo Silla que me ajudou em todos os momentos de dificuldade, seu apoio, tempo, incentivo e ajuda foram definitivos para conclusão desse trabalho.

Sou grata a instituição e a todos os meus colegas de trabalho do Senac-MS por proporcionar a realização do mestrado flexionando os horários de trabalho e ajudando a custear minhas despesas.

Ao professor orientador Eduardo José de Arruda e co-orientadora Sílvia Maria Martelli pela orientação, paciência e profissionalismo que tiveram durante esse tempo. Sou grata especialmente ao professor Eduardo que me ajudou na realização dos procedimentos da pesquisa e revisão do trabalho escrito.

Ao professor Cláudio Teodoro Carvalho pela ajuda nas realizações das análises. Ao professor Luís Gorup pela imensurável contribuição em realizar as imagens que ajudou a ilustrar e detalhar o projeto, fazendo parte da minha banca junto com a professora Ana Cláudia Lima que contribuiu com sugestões para o término do trabalho

A você Renata Araújo pelo incentivo, ajuda e conhecimento fornecido para realização desse trabalho. Agradeço a equipe do laboratório de Microbiologia da UFGD professora Kelly Pires, alunos e funcionários.

Enfim, a todos que fizeram parte dessa etapa decisiva em minha vida.

RESUMO

O Brasil ocupa posição de destaque na produção de ovos comerciais. O ovo é um alimento protéico de baixo custo, disponível com composição nutricional equilibrada para uso por consumidores de toda faixa de poder de compra. Entretanto, as condições de produção, transporte, armazenamento e comercialização do produto podem acarretar a perda do valor nutricional e interferir na qualidade microbiológica do ovo. Este fato se deve ao fato do produto ser de origem animal e perecível nas condições ambientais. A sanidade dos ovos comerciais é uma dificuldade que precisa ser superada por uso de tecnologias que garantam a qualidade sanitária, microbiológica e tempo de prateleira do produto. Este trabalho tem por objetivo preparar, caracterizar e avaliar por técnicas físico-químicas e biológicas o revestimento de ovos comerciais por soluções filmogênicas de quitosana e sais quaternários de amônio de I e V geração. O revestimento com filmes poliméricos bioativos pode permitir o aumento da resistência mecânica da casca do ovo, selamento de poros e/ou microfissuras, redução de perda de massa dos ovos e melhoria da qualidade sanitária/microbiológica para aumento do tempo de prateleira. Os experimentos físico-químicos e biológicos foram realizados para determinação de características físicas, físico-químicas e biológica da superfície da casca de ovo após a cobertura por filme de quitosana e quaternários de amônio de I e V gerações. Experimentos foram realizados para a determinação da Concentração Mínima Inibitória e Concentração Bactericida Mínima com cepas/linhagens de micro-organismos ATCC (*Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e testes de proliferação dos micro-organismos em superfícies de cascas de ovos (análise de biofilme) revestidas ou não por filmes de quitosana e sais quaternários de amônio. As técnicas complementares foram utilizadas para análise da superfície da casca de ovo com vista ao aumento da aderência, permeação de vapor dos filmes, cor, microscopia eletrônica de varredura, Raman, análises físicas e químicas. Os resultados mostraram que as concentrações inibitórias mínimas e as concentrações bactericidas mínimas para a I e V geração foram de respectivamente 0,00234% e 0,00117% para *Escherichia coli* ATCC 25922, 0,00014% e 0,00029% *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, 0,00937% e 0,00468% *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e 0,00234% e 0,00117% para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O ângulo de contato (θ) da casca de ovo revestido mostrou que a molhabilidade da superfície é aumentada a partir do aumento de concentração de quaternário de amônio de 0% para 1,0% (v/v) com a formação de filme de água que pode ser depositado, contido e evaporado de forma contínua a depender da temperatura e umidade relativa do ar nos ambientes de armazenagem. O ponto de carga zero em pH de 0 até 13,8 mostrou que se pode modular a carga superficial da casca do ovo para aplicação do revestimento e/ou permitir interações com diferentes espécies químicas carregadas. Para a análise de estabilidade foram realizadas análises físicas e químicas de ovos com e sem revestimentos estocados por 26 dias mantidos em temperatura de 25°C. Os resultados experimentais mostraram que estes permaneceram próximos, permitindo concluir que a qualidade do produto se manteve similar ao do ovo sem revestimento, as perdas de massa dos ovos foram influenciadas pelo tempo de armazenagem, porém os ovos sem revestimento apresentaram maior perda de massa. Pode-se então concluir que a cobertura por filme bioativo melhora a estrutura e mantém a composição do ovo e de suas qualidades nutricionais e a qualidade microbiológica dos mesmos para o consumo.

Palavras Chaves: Ovos comerciais, quitosana, quaternários de amônio, filmes poliméricos bioativos, qualidade microbiológica, tempo de prateleira.

ABSTRACT

Brazil occupies a prominent position in commercial egg production. Egg is a low-cost protein food available with balanced nutritional composition for use by consumers with reduced purchasing power. The egg is a product of animal origin and perishable due to the environment, conditions of transport, storage and commercialization, that can cause loss of the nutritional value, mainly, due to the microbiological quality of the product. The sanity of commercial eggs is a difficulty to be overcome by using technologies that guarantee the sanitary and microbiological quality of the product. The objective of this work is to prepare, characterize and evaluate by physicochemical and biological techniques for commercial egg coating by chitosan filmogenic solutions and quaternary salts of ammonium I and V generation. Coating with bioactive polymeric films may allow for increased egg shell mechanical strength, pore and/or microcracking, reduction of egg weight loss, and improved sanitary/microbiological quality for increased shelf life. The physical-chemical and biological experiments were carried out to determine the physical-chemical and biological characteristics of the eggshell surface. The experiments were carried out to determine Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration with strains of ATCC microorganisms (*Salmonella* spp, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and microbial proliferation tests on eggshell surfaces (biofilm analysis in progress) coated or not by chitosan films and quaternary ammonium salts. Complementary techniques will be used for egg shell surface analysis to increase adhesion, vapor permeability of films, color, scanning electron microscopy, Raman and others. Preliminary results showed that the minimum inhibitory concentrations for I and V generation was respectively 0,00234 and 0,00117 for *Escherichia coli* ATCC 25922, 0,00014%, 0,00029% *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, 0,00937%, 0,00468% *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, 0,00234% and 0,00117% for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The contact angle (θ) of the coated eggshell showed that the wettability of the surface is increased by increasing the quaternary ammonium concentration 0%^o to 1,0% (v/v) with the formation of water film that can be deposited and evaporated continuously depending on the temperature and relative humidity of the air in storage environments. The pcz at pH 0 to 13,8 showed that the surface load of the egg shell can be modulated for coating and/or interaction with charged chemical species. It is sought with the coating by bioactive film improvement of the structure and composition of the egg, maintenance of the nutritional properties and trend of the basic parameters of microbiological quality for its consumption.

Keywords: Commercial eggs, chitosan, quaternary ammonium, bioactive polymer films, microbiological quality, shelf life.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura, composição e detalhes de funcionalidade das partes do ovo.....22
- Figura 2. Estruturas de compostos de amônio quaternário: (a) cloreto de N-alkil dimetil benzilamônio (I geração), (b) cloreto de etilbenzila (II geração), (c) cloreto de dimetil dioctilamônio (IV geração) e (d) cloreto de didecil dimetil amônio (V geração).....38
- Figura 3. Fórmula estrutural geral de um sal de amônio quaternário composto por grupos nitrogenados e radicais ligados com tamanhos e distribuição diferenciados.....39
- Figura 4. Estrutura da quitina (a) e quitosana (b) com detalhe para os grupos desacetilados, obtidos a partir de diferentes graus de desacetilação da quitina e, carregados positivamente quando em meio ácido.....43
- Figura 5. Esquema referente às placas de Concentração Bactericida Mínima (CBM).....50
- Figura 6. Esquema de referência para a análise da Concentração Bacteriana Mínima (CBM).....50
- Figura 7. Esquema referente as placas de Concentração Inibitória Mínima frente a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) contendo o detalhamento das concentrações dos compostos utilizadas nos experimentos.....52
- Figura 8. Esquema de referente ao ensaio de antibiofilme dos quaternários de amônio e complexo quitosana+quaternário de amônio em cascas de ovos.....55
- Figura 9. Esquema referente ao ensaio de antibiofilme dos quaternários de amônio e complexo quitosana+quaternário de amônio em cascas de ovos, montagem do Teste de Viabilidade.....55
- Figura 10. Esquema de medida o ângulo de contato junto à borda da gota do líquido.....59
- Figura 11. Placas referentes aos resultados do teste CIM. Placas I e II estão representados os resultados do teste com PB QT 80 (V geração) e nas placas III e IV estão representados os resultados do teste com PB CLBZ 05 (I geração), onde as placas I e III as colunas 2-11 representam as concentrações de 4,8 à 0,009375% % mL⁻¹ e nas placas II e IV as concentrações de 0,009375 à 0,0000183105 % mL⁻¹.....67
- Figura 12. Placas representativas referentes aos resultados do teste CIM para os compostos ácido acético, quitosana e complexo quitosana+ quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração), frente a linhagem de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.....69
- Figura 13. Efeito dos quaternários PQT 80 e CLBZ na formação do biofilme de *Salmonella* Enteritidis **** p <0.001 (ANOVA).....71

Figura 14. Efeito dos complexos Quitosana 1%+PQT 80 e Quitosana1%+CLBZ na formação do biofilme de <i>Salmonella Enteritidis</i> **** p <0.001 (ANOVA).....	72
Figura 15. Imagens de MEV da superfície do ovo em diferentes magnificações. a) superfície externa; b) superfície da fratura da casca; c) superfície interna da casa do ovo.....	74
Figura 16. Imagens da superfície do ovo. a) superfície da fratura da casca; b) superfície externa do ovo controle; c) superfície externa da casa do ovo recoberto pelo filme de quitosana + quaternário.....	75
Figura 17. Análise da superfície da casca do ovo. a) Gráfico dos resultados da análise SEM/EDS; b) tabela com porcentagens atômicas de oxigênio, carbono e cálcio e imagem de MEV.....	76
Figura 18. Imagens de MEV da superfície externa do ovo controle em diferentes magnificações, mostrando a superfície rugosa.....	77
Figura 19. Imagens de MEV da superfície da fratura do ovo controle em diferentes magnificações, mostrando a espessura da casca e as cavidades esféricas presente na casca.....	78
Figura 20. Imagens de MEV da superfície interna do ovo controle em diferentes magnificações, mostrando o filme de fibras de bio-polímero.....	79
Figura 21. Curva TG/DTG referente à Decomposição da massa de casca de ovo.....	81
Figura 22. Fotografia de gota de água e medidas de ângulo de contato sobre a superfície das cascas de ovo com o depósito de uma gota. Imagem (a) casca de ovo seca com revestimento de filme de quitosana + quaternário de amônio a 0,25%, (b) casca de ovo seca com revestimento de filme de quitosana + quaternário de amônio a 0,5%%, (c) casca de ovo sem revestimento (0%) por filme de quitosana + quaternário de amônio de água e (d) casca de ovo seca com revestimento de quitosana + quaternário de amônio a 1%.....	82
Figura 23. Medidas de ângulo de contato (θ) de casca de ovo sem e com revestimento de filme de quitosana + quaternário de amônio a 0%, 0,25%, 0,50% e 1% (v/v).....	83
Figura 24. Valores experimentais dos experimentos para determinação do ponto isoelétrico (pI) ou ponto de carga zero (pcz) a partir de valores de pHinicial (pHi), pHfinal (R1 e R2) e Δ pH.....	85
Figura 25. Gráficos para a determinação de valores de pI ou pcz da casca de ovos comerciais por pH inicial x pHfinal e pHinicial x Δ pH a 24h e 96h.....	86
Figura 26. Perda de massa em gramas do ovo durante 26 dias.....	91
Figura 27. Média e desvio-padrão de umidade da clara e gema de ovo.	93

Figura 28. Média e desvio-padrão da atividade de água da clara e gema de ovo.	95
Figura 29. Média e desvio-padrão da espessura da casca de ovo.....	96
Figura 30. Média e desvio-padrão da força de resistência da casca do ovo.....	97
Figura 31. Média e desvio-padrão da análise colorimétrica da gema do ovo.....	98

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Diagramas de gotas sobre superfícies com diferentes graus de molhabilidade e valores correspondentes de ângulos de contato (θ).....58
- Tabela 2. Valores experimentais para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos de quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração, concentração de 80%) para as linhagens/cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.....66
- Tabela 3. Valores experimentais da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os quaternários de amônio PBQT80 (V geração) e PB CLBZ 05 (I geração) para as linhagens/cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.....68
- Tabela 4. Valores experimentais Concentração Inibitória Mínima (CIM) em % mL⁻¹ para os compostos ácido acético, quitosana e complexo quitosana+ quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração), frente a linhagem de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.....69
- Tabela 5. Valores experimentais Concentração Bactericida Mínima (CBM) em % mL⁻¹ para os compostos ácido acético, quitosana e complexo quitosana+ quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração), frente a linhagem de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.....70
- Tabela 6. Valores de massa, diâmetro e área superficial de ovos comerciais.....73
- Tabela 7. Valores experimentais de ângulo de contato (θ) e tempo de evaporação total (t_{evap}) de uma gota depositada sobre a superfície da casca de ovos comerciais sem revestimento (controle) e com revestimento por filmes de quitosana + quaternário de amônio a 0%, 0,25%, 0,50% e 1% (v/v). (medidas de ângulos de contato, desvios padrões de ângulo de contato e tempo de evaporação de gotas de 8 uL para as amostras de casca de ovo com revestimentos).....83
- Tabela 8. Resultado dos ensaios da determinação do pcz às 24h e 96h.....86
- Tabela 9. Valores de dimensões (altura e largura), área superficial (As; cm²), volume (V; cm³) de ovos comerciais controle (sem revestimento) ou com revestimento.....87
- Tabela 10. Valores de dimensões (altura e largura), área superficial (As; cm²), volume (V; cm³) de ovos comerciais controle (sem revestimento) ou com revestimento.....88
- Tabela 11. Valores de dimensões (altura e largura), área superficial (As; cm²), volume (V; cm³) de ovos comerciais controle (sem revestimento) ou com revestimento.....88
- Tabela 12. Valores de dimensões (altura e largura), área superficial (As; cm²), volume (V; cm³) de ovos comerciais controle (sem revestimento) ou com revestimento.....88

Tabela 13. Ovos comerciais com revestimento de quitosana + quats I geração (50%).....	89
Tabela 14. Ovos comerciais com revestimento de quitosana + quats I geração (50%).....	89
Tabela 15. Ovos comerciais com revestimento de quitosana +quats V geração (80%).....	89
Tabela 16. Ovos comerciais com revestimento de quitosana + quats V geração (80%).....	89
Tabela 17. Média e desvio-padrão da perda de massa (g).....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

a *	Vermelhidão
AgNPs	Nanopartículas de prata
b *	Amarelecimento
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CBDMA	Benzildimetil dodecil etil amônio
(CAQs/quats)	Quaternários de amônio
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Fosfato de cálcio
CBM	Concentração Bactericida Mínima
(CO ₂)	Dióxido de carbono
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMTA	Cloreto de metiltrialquilamônio
DDAC	Cloreto de didecildimetilamônio
L *	Luminosidade
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MgCO ₃	Carbonato de Magnésio
NaClO	Hipoclorito de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada
PCZ	Ponto de carga zero
PI	Ponto isoelétrico
Polybac CLBZ 05	Quaternário 5 ^o geração
Polybac QT 80	Quaternário 1 ^o geração
Quats	Quaternários de amônio
(SI)	Índice de segurança
TSA	Ágar Triptona de soja
TG/DSC	Termogravimétrica
TSB Caldo	Soja Trypticaseína

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	54
Equação 2	62
Equação 3	62
Equação 4	62
Equação 5	62
Equação 6	62
Equação 7	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1. ASPECTOS NUTRICIONAIS, COMPOSICIONAIS E ESTRUTURAIS DO OVO .21	
3.2 VALOR ALIMENTÍCIO DOS OVOS	23
3.3. CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM OVOS	24
3.4. COMPOSIÇÃO E SUPERFÍCIE DA CASCA DO OVO	30
3.5 <i>SALMONELLA</i>	33
3.6. QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO (QUATS) COMO AGENTE SURFACTANTE E SANITIZANTE	36
3.7. FILMES DE QUITOSANA PARA SANITIZAÇÃO E PROTEÇÃO POR REVESTIMENTO DE OVOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS DE QUITOSANA E QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO (I E V GERAÇÃO)	48
4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS QUATERNÁRIOS I E V GERAÇÃO: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	48
4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ÁCIDO ACÉTICO, QUITOSANA, QUATERNÁRIO I E V GERAÇÃO E COMPLEXO QUITOSANA+QUATERNÁRIO DE AMÔNIO: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	51
4.4 EFEITO DE QUATERNÁRIO DE AMÔNIO E COMPLEXO QUITOSANA + QUATERNÁRIO DE AMÔNIO NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM CASCAS DE OVOS.....	53
4.5 ANÁLISES DA CASCA DE OVO DE GALINHA SEM A MEMBRANA PROTÉICA INTERIOR POR MEV, ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA E TERMOGRAVIMÉTRIA.....	55
4.6 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DA CASCA DE OVO DE GALINHA SEM A MEMBRANA PROTÉICA INTERIOR POR (TG-DSC)	57
4.7 DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO (θ)	57
4.8 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO (PI) OU PONTO DE CARGA ZERO (PCZ) DA QUITOSANA, QUITOSANA + QUATERNÁRIO DE AMÔNIO (I E V GERAÇÃO) E CASCA DE OVOS COMERCIAIS	59
4.8.1 Preparação das amostras circulares de casca de ovo.....	59
4.8.2 Preparação das soluções ácidas e básicas a diferentes pHs	60

4.8.3 Determinação do Ponto Isoelétrico (pI) ou Ponto de Carga Zero (pcz) da casca de ovo	60
4.9 DETERMINAÇÃO DO VOLUME E ÁREA SUPERFICIAL DE OVOS	61
4.10 MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁREA SUPERFICIAL (AS) E VOLUME (V) DE OVOS (MÉTODO PREDITIVO/ESTIMATIVO)	61
4.11 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS OVOS	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS QUATERNÁRIOS DE I E V GERAÇÃO	66
5.1.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	66
5.2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ÁCIDO ACÉTICO, QUITOSANA, COMPLEXO QUITOSANA+QUATERNÁRIO DE AMÔNIO (I E V GERAÇÃO).....	68
5.2.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	68
5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA: EFEITO DE QUATERNÁRIO DE AMÔNIO E COMPLEXO QUITOSANA + QUATERNÁRIO DE AMÔNIO NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME	70
5.4. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE E ESPESSURA DAS AMOSTRAS DE CASCA DE OVO	73
5.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	73
5.4.2 Análise Termogravimétrica (TG/DTG).....	79
5.4.3. Ângulo de Contato (θ) e comportamento da gota de água sobre a superfície da casca de ovo <i>in natura</i> e revestida por filme de quitosana + quaternário de amônio de I e V gerações.....	81
5.4.4. Ponto Isoelétrico (pI) ou Ponto de Carga Zero (pcz)	84
5.4.5 Determinação da área superficial (As) e volume (V) da casca de ovos.....	87
5.4.6 Determinação das massas de ovos com e sem revestimento de quitosana + quaternário de amônio (I e V geração) para classificação do tipo de ovo	88
5.4.7. Experimento de Perda de Massa na Prateleira – Ovos sem e com revestimento de quitosana + quaternário de amônio (quats) (I (50%) e V (80) geração).	89
5.5 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS OVOS	91
6. CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

O ovo é considerado um dos alimentos mais completos em termos nutricionais. Este alimento pode ser caracterizado pela biodisponibilidade de nutrientes que contém proteínas e preço acessível a toda população. Medeiros et al. (2014) mostrou detalhes estruturais, composicionais e nutricionais, fatores essenciais de qualidade, microbiologia e classificação do ovo como produto de qualidade. A fração lipídica da gema do ovo é composta de 8,7g de ácidos graxos saturados, 16,6 gramas de ácidos graxos insaturados totalizando uma porção lipídica de 11,5%, encontra-se em média 13% de proteína com 20 tipos de aminoácidos diferentes, 14 tipos de minerais entre eles sódio, cálcio, ferro, fósforo e potássio. O sódio e o cálcio são os minerais mais abundantes utilizados pelo organismo humano participando da composição de dentes, ossos e líquidos corpóreos. O ovo é uma excelente fonte de vitaminas que ajudam na prevenção de doenças degenerativas. As vitaminas A, D, E e K são encontradas na gema do ovo e a vitamina do complexo B no albumen (clara) e na gema (MEDEIROS et al., 2014).

No aspecto epidemiológico, a produção de ovos deve seguir critérios de sanidade e qualidade, assim, há necessidade de um estreito controle microbiológico, principalmente, por que o consumo do ovo está associado à elevação do número de casos de salmonelose (infecção causada por salmonelas) por contaminação interna do ovo ou por contaminação que pode ser instalada a partir de colonização desses micro-organismos em microfissuras ou rachaduras na casca do ovo que afeta sua qualidade microbiológica e aceitabilidade pelo consumidor. Na maioria das vezes, a contaminação ocorre através da colonização e migração de bactérias para o interior do ovo passando pelas barreiras físicas da casca e filme protéico interno por microfissuras superficiais ou por contaminação no uso do produto (FIGUEIREDO, 2008).

A qualidade nutricional e microbiológica do produto é essencial para seu consumo seguro. Um ovo com qualidade permite que o organismo humano absorva nutrientes, além das outras qualidades nutricionais. Neste aspecto, o ovo deve ser produzido, processado, transportado, armazenado e conservado em condições adequadas desde a postura até o consumo final, incluindo as condições e proteções do produto quando disponível em prateleira para comercialização.

Na estocagem ou prateleira podem ocorrer alterações nas características físicas, químicas e sensoriais do ovo, como por exemplo, da parte da clara, gema, elevação do pH

que pode liquefazer a parte transparente do ovo, permitindo a movimentação de líquidos entre os compartimentos, mudanças na membrana e até rompimento da gema alterando a qualidade do ovo entre outros. Estes aspectos podem influenciar negativamente na sua aceitabilidade no mercado. Quaisquer dessas alterações tornam o produto mais susceptível a contaminações por agentes patogênicos que podem colonizar o produto, diminuindo sua vida útil, alterando o conteúdo nutricional e tornar-se um problema de saúde pública (RAMOS, 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, em inglês: WHO) mais de dois milhões de pessoas morrem por ano por consumir alimentos contaminados por bactérias patogênicas, principalmente, *Salmonella* Typhimurium, que é o sorotipo que apresenta maior prevalência em gastroenterite e bacteremia a partir de contaminações alimentares (OMS, 2006).

Na tentativa de diminuir estas contaminações após a produção dos ovos, diferentes compostos são propostos para tratamento do ovo, por exemplo, compostos a base de cloro (hipocloritos e outros) que são utilizados como sanitizantes, entretanto, esses compostos não apresentam efeitos duradouros e podem apresentar efeitos carcinogênicos a partir dos produtos de reação com o cloro e conteúdos dos ovos. O hipoclorito de sódio (NaClO) é o composto de cloro mais utilizado devido a disponibilidade, reatividade e baixo custo.

Como alternativa de agente sanitizante para tratamento da superfície dos ovos, os quaternários de amônio (CAQs/quats) são também indicados. Neste aspecto, o cloreto de benzalcônio (quaternário de I geração) e outros produtos quaternários de II, III, IV e V gerações são propostos para tratamento dos ovos comerciais. Estes produtos reúnem bioatividade e redução da tensão superficial, detergência e tensoatividade que permitem seu espalhamento e manutenção da concentração em toda superfície do ovo, a partir de umidade. Todos estes produtos são surfactantes bioativos e possuem amplo espectro de atividade para diferentes micro-organismos a partir do aumento das gerações da I para a V geração. A sua ação microbicida dá-se a partir da concentração, estrutura molecular das moléculas e/ou misturas moleculares que interagem com a superfície das células do micro-organismos, interferem na funcionalidade do metabolismo celular, além de romper a membrana com extravasamento do conteúdo celular (ZERDAS, 2016).

De forma geral, os produtos químicos têm sido utilizados na rotina das empresas alimentícias para garantir uma maior segurança contra micro-organismos causadores de doenças. Os produtos são utilizados com ação de limpeza e desinfecção de superfícies de

contato com os alimentos. Na forma preventiva, busca-se sanitizar as superfícies, que em outras palavras significa a redução da carga de micro-organismos que pode originar doenças e de interesse na saúde pública. Este tratamento pode reduzir a carga microbiana na superfície do produto, tornando o produto mais seguro de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação, sem alterar a qualidade final do produto. A eficiência de um produto químico utilizado como sanitizante depende da concentração e do tempo de contato previamente estabelecidos, além do efeito residual seguro do produto utilizado na superfície devido a formação de filmes ou camadas por interações eletrostáticas da molécula do produto com a superfície tratada formando filme residual bioativo (PFUNTNER, 2011).

Se a penetração de bactérias deterioradoras e patogênicas ocorrer no interior dos ovos, estas podem ocasionar a deterioração e infecção via alimentar. Neste sentido, um dos pontos fortes de profilaxia é a redução de contaminação por proteção da superfície dos ovos. Assim, tecnologias que prevejam o desenvolvimento de estratégias ou produtos com formulações e uso de substâncias protetivas, inibidoras e antimicrobianas são de extrema importância quando utilizadas para este fim. Assim, considerando que os ovos podem ser contaminados após a postura, o revestimento por filme, óleos ou a sanitização com quaternário de amônio com uso de polímero combinados para produção de filmes bioativos com efeitos protetivos e sanitizantes pode permitir manter a qualidade do ovo, proteger no armazenamento, além de possíveis danos no transporte e aumentar o seu tempo de prateleira na comercialização (CARMO, 2013).

Nesse trabalho, a incorporação do quaternário de amônio de I e V geração em meio acético (ácido) com o polímero de quitosana pode atuar na superfície do ovo como um tratamento prévio para aumentar a aderência do filme, manter a fixação do produto na superfície do ovo com quaternários incorporados para eliminar ou reduzir a carga microbiana (sanitização) para a proteção da superfície de ovos, além de melhoria dos testes de sensibilidade que objetiva a redução da contaminação do ovo. Agentes antimicrobianos podem, assim, com as devidas precauções, serem aplicados para permitir a interação desses ativos na superfície do ovo por diferentes processos após sua produção na granja. Pode ser realizado por aplicação do produto por contato, pulverização ou difusão após a aplicação devido à redução de tensão superficial do produto e, após a secagem atuar como barreira físico-química e bioativa com agentes que não prejudiquem o alimento, e ao mesmo tempo reduzam a contaminação e deterioração do produto. As substâncias (ou quaternários de

amônio de I e V geração) podem ser contidos no filme polimérico (a partir da contenção e interação com as cadeias poliméricas) com o objetivo de alterar a superfície do produto, produzir um filme bioativo para reduzir ou inibir o crescimento dos micro-organismos na superfície do produto e impedir o acesso do micro-organismo ao interior do ovo, como um substrato adicional inteligente da embalagem natural do produto (casca do ovo) e para manutenção da qualidade alimentar do produto (BELTRAME et al., 2012).

A superfície da casca do ovo constitui uma barreira natural com a função de evitar a contaminação e deteriorização do conteúdo interno nutritivo. As tecnologias ou formulações que possam ser desenvolvidas ou propostas para proteger ou melhorar a ação dessa superfície pode permitir maior eficiência na produção de aves (ovos galados), maior conservação da qualidade do produto por aumento do tempo armazenagem e prateleira, aumento do consumo do produto, melhoria de entendimento e aprofundamento das técnicas de proteção e sanitização com a utilização de diferentes produtos comerciais, que estão disponíveis para a sanitização com vista à garantia e manutenção da qualidade microbiológica do produto, além de garantir a permanência da segurança e das características protetoras da casca do ovo nos processos de reprodução e consumo do produto (GONZALES E CAFÉ, 2003).

Este trabalho propõe a elaboração de soluções filmogênicas para o revestimento de ovos comerciais, utilizando filmes poliméricos bioativos e multifuncionais com quaternários de amônio (quats). Estes filmes, produzidos com polímeros catiônicos como a quitosana e sais quaternários de amônio de I e V gerações, tem por objetivo, atuar como barreira protetiva, biológica e inteligente (por auto-remodelagem via umidade) durante o armazenamento de ovos comerciais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e aplicar filmes superficiais bioativos com sais quaternários de amônio (I e V gerações) visando o controle de bactérias como *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* presentes na superfície da casca do ovo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos sais quaternários de amônio (I e V gerações) para cepas/linhagens de micro-organismos, como a *Salmonella* spp.;
- Identificar a concentração inibitória mínima (CIM) dos quaternários de amônio, quitosana e filmes híbridos (quitosana + quaternários de amônio de I e V geração) para espécie *Salmonella* spp.;
- Avaliação da atividade biológica do quaternário de amônio (I e V gerações) isolado e contido no filme híbrido e multifuncional de quitosana após aplicação e secagem na superfície da casca de ovos, após sua caracterização física, química e biológica;
- Avaliação das propriedades físicas, químicas e biológicas da superfície da casca de ovos revestidos com as soluções filmogênicas de quitosana e quitosana + quaternários de amônio (I e V gerações).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ASPECTOS NUTRICIONAIS, COMPOSICIONAIS E ESTRUTURAIS DO OVO

O ovo é produto de uma transformação biológica de recursos alimentares de baixo valor em alimento rico em nutrientes essenciais à vida. Para que essa transformação biológica ocorra diferentes fatores estão envolvidos no ciclo fisiológico da ave, como a alimentação, ambiente de criação, práticas de manejo e outros procedimentos sanitários. Nos dias atuais uma ave no primeiro ano de postura consegue produzir cerca de 320 ovos por ano. A alta eficiência na produção está relacionada com a tecnologia do cruzamento de várias linhagens genéticas aplicadas em aves poedeiras que resulta em ovos em tempos precoces, com maior resistência mecânica da casca e alto valor nutricional do conteúdo (BERTECHINI, 2004).

A casca de ovo de galinha é composta por substâncias orgânicas e inorgânicas. A película interna que reveste a casca é formada por uma rede polimérica de glicoproteínas, mucoproteínas, colágeno e mucopolissacarídeos com bioatividade, enquanto, na casca compostos como CaCO_3 , MgCO_3 e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ compõem a fração inorgânica do ovo (MEDEIROS et al., 2014) e oferece proteção externa. A função da casca do ovo como superfície de proteção apresenta-se como uma embalagem natural que garante a integridade dos constituintes do ovo e proporciona rigidez suficiente para suportar o peso de uma ave adulta, por exemplo, durante a incubação. Na superfície da casca do ovo, poros podem ser visualizados a partir da magnificação de 10.000x. A estrutura porosa apresenta cerca de 7.000 mil a 17.000 mil microporos que permite a respiração embrionária (GHERARDI, 2018).

Apesar de diferenças na composição, em média a estrutura da casca do ovo é composta de 94% de cristais de carbonato de cálcio (CaCO_3), 1,4% de carbonato de magnésio (MgCO_3), 3% de glicoproteínas, mucoproteínas, colágeno e mucopolissacarídeos (NETO, 2016). A qualidade da hidroxiapatita de ovos pode ser utilizada a partir da reciclagem e utilizada para uso em biomateriais com vista ao crescimento de tecido ósseo e outras aplicações biomédicas (ABDULRAHMAN et al., 2014).

Como principal constituinte os sais de cálcio (Ca^{+2}) e magnésio (Mg^{+2}) representam 10% da massa do ovo. A membrana interna protéica ligado na parte interior a

casca apresenta uma massa desconsiderável. A clara ou albume possui um total de 60% e a gema é responsável por 30% da massa do ovo. A casca do ovo comercial, a depender da alimentação, processo de produção, normalmente, tem entre 0,01 a 0,03 mm ou até com maior de espessura.

A casca é formada por substâncias orgânicas, como colágeno e escleroproteínas e minerais como carbonato de cálcio e magnésio que garante uma formação resistente e diferenciada a partir da cristalização das substâncias inorgânicas presentes. Sua função é de proteção impedindo a perda de água e contaminação por micro-organismos, devido à presença de uma pequena camada de ceras protetivas nos poros da casca e a membrana protéica interna. A membrana interna da casca é formada por fibras protéicas entrelaçadas, que na porção mais larga do ovo permite a entrada de ar, devido aos poros presente na casca, que tem por função a troca de gases com o ambiente externo, após a postura ocorre o resfriamento da porção interna a uma temperatura ambiente, o ar que entra no interior do ovo é essencial para o desenvolvimento do embrião em condições favoráveis (BENITES; FURTADO E SEIBEL, 2005).

Na Figura 1 mostra-se esquematicamente a estrutura, constituintes e funcionalidades de partes do ovo.

Figura 1. Estrutura, composição e detalhes de funcionalidade das partes do ovo.



Fonte: próprio autor.

3.2 VALOR ALIMENTÍCIO DOS OVOS

O ovo é um dos alimentos mais nutritivos e de fácil disponibilidade de proteína. Em sua composição destacam-se as proteínas de alto valor biológico com todos os aminoácidos essenciais, lipídeos, com ácidos graxos favoráveis em relação a outros alimentos de origem alimentar, vitaminas A e B e minerais como fósforo e ferro essenciais para vida. Porém, tais componentes podem sofrer alterações durante o processamento, transporte e armazenamento incorretos (STRINGHINI et al., 2009).

O consumo do ovo tem aumentado consideravelmente, compondo cardápio dos mais variados alimentos e nas mais diferentes classes sociais por ser conhecido pelo baixo valor calórico, preço acessível e alto valor nutricional. Um grande interesse nesse alimento é por este conter aproximadamente 20% da recomendação diária de proteína. A gema do ovo possui carotenóides que possuem ação antioxidantes e protetoras para o organismo humano entre outros nutrientes como a colina e biotina, essenciais para o desenvolvimento das funções das células e outras importantes funcionalidades biológicas (BRITO, 2017).

De acordo com a Portaria nº 1 de 21/02/1990 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1990), o período para consumo de ovos frescos é de até 30 dias nas condições ambientais. Ovos frescos são aqueles disponíveis para comercialização, que não sofreram conservação por processos industriais a partir da refrigeração em temperaturas menores de 8°C. Caso tenham sido submetidos a estes processos deixam de receberem a denominação ovos frescos e seu tempo de consumo é estendido por até 60 dias.

Quanto maior o tempo de armazenamento e a temperatura no qual o ovo fica exposto menor será a qualidade alimentícia. No Brasil, ovos armazenados sem refrigeração podem ter um prazo de validade de quatro a quinze dias após a postura. Portanto, seu consumo deve ser rápido devido a provável deterioração a partir das condições de produção e armazenamento (OLIVEIRA, 2000). Dentre estes fatores a contaminação e a colonização e multiplicação de micro-organismos tem sido observada com maior frequência em ovos armazenados em temperatura mais elevadas, sem qualquer processo de climatização, associando a esta mudança que ocorre no albumen (clara) com a diminuição dos mecanismos de conservação do produto a partir da superfície da casca e proteção interna da membrana protéica (JONES et al., 2004).

3.3. CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM OVOS

A análise dos mecanismos de proteção e características superficiais a partir da casca do ovo, principalmente, por contaminação microbiológica tem mostrado que vários fatores podem influenciar a qualidade dos ovos quer seja interna ou externa e, diminuir sua qualidade e segurança alimentar, a partir da disponibilidade de nutrientes e características sensoriais. Em todos os setores da produção de ovos, criadouros de aves, triagem de ovos, processos e/ou forma ou indústrias de comercialização a principal preocupação está em melhorar continuamente a genética das aves para a garantia da qualidade nutricional, produtividade, qualidade sanitária e alimentícia do produto (TUMOVÁ, 2017).

A produção de ovos ocorre no sistema genital reprodutor da galinha após a ovulação, percorrendo o ovário até a cloaca, onde ocorrem os maiores índices de contaminação principalmente em ambientes inadequados e devido à falta de condições higiênicas ambientais que permite o contato do ovo com as fezes das aves durante a postura, além da passagem do ovo pela cloaca, tempo de permanência no ninho, falta de cuidados na manipulação, transporte e armazenamento inadequados (ANDRADE et al., 2004).

Os estudos relatam que entre os principais micro-organismos presentes as bactérias se destacam, principalmente, as salmonelas que são responsáveis pela contaminação de ovos. Neste aspecto, se destacam as espécies: *Salmonella* Thyphimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Pullorum e *Escherichia coli* que são bactérias enteropatogênica e que podem colonizar a superfície da casca do ovo e penetrar pela superfície que possuam porosidades, microfissuras e quebras. A depender das condições favoráveis de penetração e colonização na superfície o produto perde qualidade nutricional e oferece riscos à saúde do consumidor. Neste cenário, o ovo está entre os alimentos que mais causa a doença salmonelose em humanos (NETO, 2016).

Os ovos de galinha têm sido apontados na literatura e conteúdos técnico-científicos como o alimento de maior qualidade nutricional, mas de maior vinculação com a salmonelose em seres humanos, pois diferentes micro-organismos podem estar presentes e colonizando o produto a partir da superfície de ovos ou ainda presente no seu conteúdo interno. Pode-se verificar e perceber que cascas finas, defeituosas com rachaduras/microfissuras e porosidade ou sujas com matéria orgânica do ambiente ou fezes

das aves ou ainda riscos ou defeitos na comercialização, manuseio e até na produção de ovos podem aumentar os riscos de infecção em humanos, mesmo após uma lavagem ou sanitização no processo de produção nas granjas ou processo industrial (FOOD SAFETY, 2011).

Para inibição de patógenos em ovos propõe-se o uso de sanitizantes. Entretanto, as formulações de desinfetantes, suas concentrações de uso e condições de preparações devem ser cuidadosamente avaliadas quanto à eficiência e segurança nas indústrias de aves. A água oxigenada tem sido proposta e utilizada na concentração de 3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os resultados experimentais mostraram que quando foram utilizados para tratamento ocorreu uma eficiência de 86 a 100% na casca de ovos, 33,4 a 100% na albumina e 34,3 a 100% na gema. O resultado melhor na casca dos ovos em relação ao albúmen (clara) e gema se deve ao fato da incapacidade de o peróxido de hidrogênio não invadir os poros presentes na casca do ovo, possivelmente devido às condições de composição química e porosidade da superfície da casca de ovo (IBRAHIM et al., 2014).

Outros experimentos para avaliar a seguridade do uso de desinfetantes em ovos foram realizados por Cony et al., (2008). O objetivo do estudo era avaliar a eficiência de diferentes desinfetantes e aplicação de dois métodos de desinfecção de ovos. No primeiro experimento, as desinfecções foram realizadas por pulverização. No segundo foram realizadas por imersão dos ovos obtidos após a postura. Os tratamentos sem desinfecção e outros seis utilizando soluções de fenol sintético (1040 ppm), digluconato de clorexidina (200 ppm), amônio quaternário (800 ppm), amônio quaternário (400 ppm) + uréia (600 ppm), amônio quaternário (130 ppm) + glutaraldeído (370 ppm) e formaldeído ($7,7g\ m^{-3}$). Em cada experimento houve tratamentos-controle com fumigação (formaldeído) e sem desinfecção. Após a desinfecção, 40 ovos por tratamento foram avaliados para presença de mesófilos totais, bolores e leveduras, coliformes totais, *Pseudomonas* sp. e *Aspergillus* sp. Após os tratamentos realizados foram aplicados os embriodiagnóstico nos ovos não eclodidos para determinação do período da mortalidade embrionária, contaminação no interior dos ovos, e determinado o nascimento de pintos impróprios para a criação, viabilidade e eclodibilidade dos ovos. Os resultados mostraram que nos experimentos em que os ovos foram desinfetados por pulverização, a associação entre amônio quaternário e glutaraldeído apresentou maior contaminação para mesófilos totais em relação aos demais tratamentos, à exceção do tratamento com fenol sintético, que apresentou contaminação semelhante a todos. Não foram detectadas diferenças entre os tratamentos para bolores e

leveduras, coliformes totais, *Pseudomonas* sp. e *Aspergillus* sp. e, tampouco, entre os resultados de embriodiagnóstico. No experimento em que os ovos foram desinfetados por meio de imersão, foi verificada maior contaminação por mesófilos totais nos ovos não-desinfetados em relação aos tratamentos com os princípios ativos. Os ovos sem desinfecção apresentaram maior contaminação por coliformes totais em relação aos tratados com amônio quaternário e uréia, sendo os demais tratamentos similares a todos. A análise de contaminação por bolores e leveduras, *Pseudomonas* sp. e *Aspergillus* sp. mostrou resultados similares entre os tratamentos. Os ovos desinfetados com formaldeído tiveram maior mortalidade embrionária, no período de quatro a sete dias, em relação àqueles desinfetados com amônio quaternário, sendo os outros tratamentos similares a todos. Pode-se concluir que os desinfetantes utilizados apresentaram capacidade de ação na redução da contaminação microbiana da casca de ovos incubáveis. Todos os desinfetantes demonstraram ser seguros sob o ponto de vista de sobrevivência dos embriões, sem grandes restrições (CONY et al., 2008).

A literatura mostra que as principais bactérias envolvidas na contaminação de ovos estão presentes pela contaminação gastrointestinal das galinhas, as duas vias existente dessa contaminação pode ocorrer pela transmissão horizontal ou seja, através da passagem de bactérias que colonizam o intestino da galinha penetrando na casca do ovo ou por fezes contaminadas durante a passagem pela cloaca. Na transmissão vertical a contaminação em ovos ocorre de forma direta com seu conteúdo interno ainda na fase transuterina por infecção nos órgãos reprodutivos (NETO, 2016).

A salmonela é a principal bactéria que causa contaminação em ovos, e a transmissão do patógeno para animais pode ocorrer através do consumo de água ou alimentos contaminados. Outra forma de transmissão para o ovo pode ocorrer pela falta de higiene do manipulador durante toda etapa de produção, transporte e estocagem dos ovos para distribuição e venda nas prateleiras dos mercados .

A produção de ovos requer um rígido controle de qualidade e sanidade das aves. A cadeia produtiva requer manejos sanitários e controles que garantam a qualidade do produto. O controle de qualidade na indústria de ovos considera que os ovos passem por várias etapas para garantir que o produto final, que chega à mesa do consumidor, esteja em perfeitas condições de consumo. Na granja após o recebimento, os ovos passam por lavagem, secagem com ar filtrado, ovoscopia (inspeção com luz do conteúdo interno), detector de rachaduras, desinfecção com raios UV, balança para classificação de ovos,

detecção de sangue e, depois, são embalados. Para atender os requisitos legais quanto à qualidade dos ovos para consumo, são averiguados, no mínimo, 16 elementos de inspeção. A importância desse manejo sanitário em aves de postura comercial busca garantir as exigências legais e do consumidor final para a ausência de patógenos, redução no uso de antibióticos para a garantia de produtos saudáveis. Neste aspecto, é importante é conhecer as principais doenças de postura e as estruturas e procedimentos necessários para um programa de sanidade eficiente da ave e do produto (BRITO, 2017).

A qualidade dos ovos deve ser considerada a partir do ponto de vista do consumidor, produtor e sanidade do produto. O consumidor busca um produto que atenda às suas necessidades (qualidade, preço e segurança alimentar), estando cada vez menos tolerante a problemas de qualidade, utilizando as mídias sociais para reclamar dos problemas ou difundir as experiências positivas. No Brasil nossas condições climáticas são favoráveis para a produção de ovos durante todo o ano, mas há fatores não favoráveis como qualidade logística e de estradas que podem resultar em perdas indesejáveis e contaminações, como ovos quebrados durante o transporte, e toda uma gama de ações que ocorrem em cadeia, como perda de embalagens, refugagem de uma bandeja inteira em virtude de um ovo quebrado, maior risco de contaminação microbiana entre outros. Neste aspecto, a qualidade dos ovos deve ser garantida no setor produtivo com melhorias e integração de métodos de produção e controle e de novas tecnologias para a empresa produtora de ovos e satisfação do consumidor final. Estas novas metodologias e tecnologias propostas têm sido aplicado com o objetivo de resultar na redução de perdas do produto ao longo da cadeia, reduzir custos de produção, transporte e armazenamento e garantir uma qualidade nutricional e de saúde pública ao consumidor (LIMA, 2012).

As tecnologias de confinamento, ambientação, ração e procedimentos tem sido constantemente propostas, e muitas vezes, empregadas para a produção de ovos de qualidade e nutricionalmente melhores como mostrado e discutido por Oliveira et al (2014). A partir dessas discussões e tendo em vista uma variedade de pontos críticos nas etapas de produção de ovos até seu consumo final.

Para o produtor, diferentes fatores podem ser destacados como ajustes, mudanças e adaptações no modo de produção de ovos, que atendam exigências do mercado consumidor, a disponibilidade da mão de obra, a evolução do potencial genético das linhagens comerciais, as novas tecnologias relacionadas à ambiência das instalações e galpões, a revisão de conceitos nutricionais, a disponibilidade de matérias primas, entre

outros. No tocante a integração entre os galpões e as salas de classificação de ovos, a qualidade dos ovos é de suma importância para que o processo de classificação dos ovos possa ocorrer de modo constante e com poucas interrupções e contaminações. O aumento do tamanho e automação dos galpões de produção, permitem a introdução de otimização de custos fixos, porém, há outras preocupações. Numa condição de maior adensamento dos lotes, a mortalidade ganha importância reduzindo os ganhos obtidos em termos de diluição dos custos com a amortização da instalação e mão de obra, bem como pode aumentar a necessidade de processamento das aves perdidas (mortalidade, refugagem) ao longo do ciclo produtivo, além dos problemas sanitários subclínicos e uma maior dificuldade na identificação destes, pois diminui o tempo de contato visual com as aves, aumentando a dependência dos controles zootécnicos (BRITO, 2017).

No aspecto da sanidade das aves a qualidade do ovo, na granja, começa no primeiro dia de idade. Porque a produção de um ovo de qualidade é dependente do correto aproveitamento dos nutrientes pela ave para a produção dos ovos e que está relacionado a uma ave saudável e desenvolvida. Nessa fase de formação da ave de postura, o comprometimento da formação da estrutura esquelética da ave reduz a eficiência do processo de mobilização do cálcio ósseo, podendo causar problemas de qualidade de casca no longo prazo. Enquanto 2/3 do cálcio para a formação da casca são provenientes das fontes de cálcio contidas na ração, há ainda 1/3 do cálcio é proveniente dessa mobilização dos ossos medulares. Há doenças imunossupressoras, como as doenças Marek e Gumboro, que comprometem o sistema imune das aves e, que pode favorecer o aumento de mortalidade e/ou refugagem e aparecimento de problemas respiratórios recorrentes na criação das aves. O sistema respiratório íntegro é necessário para que a ave controlar os desafios respiratórios suportar as variações ambientais, promover a termorregulação e contribuir para o correto funcionamento do processo de formação da casca do ovo. Doenças como laringotraqueíte, micoplasmose e complicações associadas à colibacilose são recorrentes em aves com doenças, além de doenças como a bronquite infecciosa e o pneumovírus que podem interferir nas fases iniciais de desenvolvimento do oviduto da ave; nesses casos, a imunidade precoce dos lotes é fator crítico e importante (TÉO, 2005).

O sistema digestório da ave possui sua contribuição na produção de ovos de qualidade. A absorção de cálcio é dependente de proteínas carreadoras de cálcio para a corrente sanguínea e o processo de ativação da vitamina D é dependente da integridade de órgãos como o fígado e os rins. Assim, problemas relacionados à coccidiose, clostridiose e

micotoxinas influenciam negativamente a qualidade dos ovos e sanidade das aves. As mudanças de ração ao longo da vida da ave, para atender as suas exigências nutricionais, podem causar oscilações na estabilidade da flora bacteriana. Neste cenário, uma flora bacteriana capaz de favorecer o maior aproveitamento de nutrientes é importante para não comprometer a qualidade dos ovos. Ainda não mais importante é o controle de bactérias sistêmicas causadoras de mortalidade, como a salmonela e a colibacilose, através de vacinações eficazes reduz as perdas no campo e os riscos de seleção de cepas resistentes ou de resíduo de medicamentos em ovos. Sinais de atenção sanitária devem ser disparados quando as recomendações de uso não têm sido suficientes na resolução dos problemas e/ou quando há presença de outros desafios sanitários (como pneumovirose e micoplasmose) (PIRES, 2013).

Neste aspecto, o desenvolvimento de estratégias e produtos que possam realizar prevenções para reduzir o manejo ou ainda solucionar problemas recorrentes das aves e produtos animais são importantes. Não existe ainda uma solução geral para todos os problemas, pois os mercados estão cada vez mais exigentes em qualidade reduzem as aberturas para a ocorrência de reduções bruscas de preços. Nos períodos de crise econômica reestruturação e desenvolvimento de novas tecnologias, além do estreitamento de relação com os agentes do mercado e fornecedores estratégicos são cruciais para o setor produtivo (LIMA, 2012).

As doenças alimentares é um fator preocupante para saúde pública, devido a falta de qualidade microbiológica em ovos que pode resultar em intoxicação alimentar. A contaminação pode ser provocada pelas fezes das aves, ração contaminada ou contaminação cruzada pelo consumo da carne ou ovos contaminados entre outros fatores, incluindo condições de criação. A salmonela pode causar doença no homem como diarreia, infecção no sangue e febre tifoide. A outra bactéria que pode causar contaminação alimentar é *Escherichia coli*, que é uma bactéria residente do intestino humano, porém, existem cepas patogênicas (KARLSSON, 2010).

A salmonelose é uma das doenças responsável pelo maior número de pandemia por alimentos contaminados, principalmente, ovos. Os ovos contaminados por salmonela se tornam veículo da infecção, e a contaminação pode ocorrer pela penetração da bactéria pela microfissura ou quebra da casca ou ainda por contaminação direta do conteúdo do ovo antes da oviposição ou durante o uso do produto. Em uma pesquisa realizada em 2006 na União Européia dos 165,023 casos de salmonelose 62,5%, foram ocasionados pela

Salmonella Enteritidis, 12,9% pela *Salmonella* Typhimurium. As salmonelas podem estar presentes sem a presença de fezes na casca até mesmo viáveis em temperatura de refrigeração (GANTOIS et al., 2008).

Um estudo realizado com ovos demonstrou o alto grau de contaminação de ovos pela bactéria *Staphylococcus*, as maiores quantidades de cepas foram encontradas na superfície de cascas de ovos. As análises das espécies presentes mostraram que a espécie *Staphylococcus aureus* foi a mais prevalente na gema e casca dos ovos (PYZIK, 2009).

3.4. COMPOSIÇÃO E SUPERFÍCIE DA CASCA DO OVO

A casca de ovos possui uma superfície organizada em três camadas composta pela zona mamilar interna, camada paliçada e camada cristalina vertical, abaixo da casca encontra-se uma película protéica interna que delimita o conteúdo interno do ovo com sua casca e possui atividade biológica e controla o trânsito de espécies entre a casca e conteúdo interno do ovo. A atividade bactericida da membrana interna próxima a casca do ovo para micro-organismos (*Escherichia coli* e outras), e a habilidade da membrana interagir e romper a integridade da membrana celular de micro-organismos foram demonstradas (POLAND E SHELDON, 2001; MINE, OBERLE E KASSIFY, 2003).

A casca de ovo é caracterizada por camadas compostas de 96% de carbonato de cálcio e minerais formando a matriz inorgânica. Entre os minerais que formam a fração inorgânica da casca de ovos estão presentes carbonatos e fosfatos (CaCO_3 , MgCO_3 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e outros constituintes em menor proporção que conferem resistência mecânica, dureza e proteção do ovo/embrião (D'ALBA, 2017).

Estudos foram realizados para caracterização da casca de ovos brancos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumentos que variaram de 100 a 10.000 vezes. As imagens de MEV mostraram uma estrutura densa e pouco porosa. A análise por termogravimetria TG/DTG demonstrou a partir de amostras de casca de ovo que a decomposição térmica ocorre em 3 (três) processos: a) perda de massa de 25 a 100°C caracterizado pela perda de umidade e uma variação da fração orgânica, b) perda no intervalo de temperatura de 250 e 600°C no qual ocorre a perda da matéria orgânica composta de 7,68% da película orgânica e perda no intervalo de temperatura a partir de 800°C com a decomposição térmica de 90% do CaCO_3 e MgCO_3 , com liberação de CO_2 e

a formação de CaO (óxido de cálcio, cal virgem) e MgO (óxido de magnésio) (RODRIGUES E AVILA, 2017).

Em cascas de ovos, pode ocorrer com frequência um acúmulo de umidade proveniente do conteúdo interno do ovo, passado através da película e permeando a casca do ovo, proporcionando uma translucidez na casca o que facilita a passagem de raios de luz, micro-organismos, afetando sua aparência e diminuindo seu valor econômico. A membrana abaixo da casca de ovos é uma película formada por (bios) polímeros com estruturas protéicas fibrosas. Nos espaços entre as fibras estão presentes numerosas malhas porosas. Estudos demonstraram que ovos translúcidos podem ser explicados por variações na porosidade das malhas, no diâmetro das fibras, compactação das membranas, e na orientação das fibras individuais, que se apresentando como película mais fina em ovos translúcidos, o que pode permitir a passagem de água para a superfície da casca. A membrana de ovos é a primeira barreira para proteger o conteúdo interno, em ovos translúcidos essa barreira é mais frágil ocasionando a penetração do conteúdo interno do ovo para casca. Esta evidência foi encontrada em amostras pré-históricas e aceita como a continuidade desse processo de proteção do embrião (WANG et al., 2017).

Neste aspecto, a casca de ovo tem papel fundamental quando da incubação do embrião, oferecendo proteção contra micro-organismos, disponibilidade de nutrientes, controlando a troca de água (H₂O) e gases como oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂) (RAHN, 1981; RAHN E PAGANELLI, 1979). A distribuição e o tamanho dos poros superficiais ou ainda sua quantidade e distribuição na casca de ovos pode influenciar na taxa respiratória do embrião e na manutenção da qualidade funcional/nutricional do produto.

Estudos mais recentes demonstram que uma casca de ovo possui em torno de 10.000 a 20.000 microporos (BAXTER-JONES, 1994) onde apenas uma pequena porção pode ser penetrada por bactérias, em relação ao tamanho dos poros. Este aspecto sugere que os poros são escassos sobre a superfície do ovo. La Scala Jr. (2000) mostrou que a técnica por porosimetria de mercúrio pode determinar a maioria dos microporos na casca que estão distribuídos nos tamanhos de 1 a 10 µm. Pode-se também mostrar que o pico de distribuição dos poros é influenciado pela membrana interna do ovo. O conjunto de picos de distribuição dos poros da casca do ovo (em a membrana interna) possui diâmetros de 0,2 ate valores acima de 5 µm. Estes valores correspondem aos poros da casca do ovo e orifícios vesiculares observados na microscopia MEV (LA SCALA JR, 2000).

A superfície da casca do ovo possui grupos funcionais e morfologia que pode ser carregado em função do pH e permitir interações eletrostáticas para cátions e ânions. O mecanismo de camada dupla elétrica foi utilizado para explicar o comportamento de adsorção de cátions azul de metileno (MB) na superfície da casca do ovo, enquanto que a adsorção de ânions de vermelho Congo (CR) foi favorecida a adsorção por atração eletrostática na superfície de casca positivamente carregada em pH mais baixo.

Os estudos de Abdel-Khalek et al. (2017) mostraram que a adsorção de corantes na superfície da casca é dependente do pH, aumentando a partir de pH básico para pH ácido (12-2), apesar da competição de íons H^+ para os cátions presentes que pode ser contrabalanceado por grupos hidroxilas (-OH) na superfície da casca do ovo que pode favorecer a adsorção de moléculas catiônicas. Neste aspecto, a dupla camada elétrica pode manter a neutralidade elétrica e explicar a adsorção de moléculas catiônicas (+) (MB) sob a superfície da casca de ovo. Outro aspecto importante a ser comentado nessa superfície é que os poros/microfissuras entre fibras de colágeno e glicoproteína entre a casca do ovo e o conteúdo interno pode controlar o movimento dos íons (ZHENG et al., 2010; DONG et al., 2007; BURLEY E VADHERA, 1989). A matéria orgânica da casca e a membrana interna ligada a casca contém proteínas como maior constituinte com pequenas quantidades de carboidratos e lipídios. Os processos que podem ocorrer na superfície da casca dos ovos, a depender do pH e espécies presentes, pode ser complexo e seletivo.

Na superfície da casca de ovo existem vários grupos químicos como hidroxilas (-OH), amino (-NH₂) e carboxilas (-COOH) que podem ser afetados pelo pH (ARAMI et al., 2006). Os sais de cálcio que estão presentes na superfície do ovo podem, a depender do pH da solução, solubilizar uma parte desses sais de cálcio e magnésio, com estas espécies ficando em solução (Ca^{+2} , HCO_3^- , CO_3^{-2} e OH^-) (PRAMANPOL E NITAYAPAT, 2006). Estes íons liberados podem adsorver na superfície da casca do ovo e produzir carga negativa (SOMASUNDARAN E AGAR, 1967). A solução pode ainda conter íons alcalinos (Na^+ , Mg^{+2} e K^+) que podem ser adsorvidos na superfície formando uma dupla camada elétrica adquirindo carga positiva (GRAHAME, 1947). Estes processos e mecanismos são importantes para explicar, a depender do pH, as interações que podem ocorrer entre espécies positivas (catiônicas) e negativas (aniônicas) e a superfície do ovo. Estes mecanismos podem ser utilizados nas estratégias de proteção do ovo a partir da casca do ovo e consideram que íons da solução ou solubilizados, a determinados pHs, podem ser atraídos e adsorvidos para formar uma superfície negativamente carregada, formando a

camada de Stern, para espécies positivas (+) do meio. Por outro lado, para espécies aniônicas (-) em meio ácido pode ser considerado que as interações eletrostáticas ocorram entre as espécies negativas (-) e a superfície positiva (+) da casca do ovo.

A adsorção segue uma cinética de segunda ordem, enquanto a isoterma de adsorção obedece ao modelo de Freundlich por adsorção multicamada. A capacidade máxima de adsorção foi estimada em 94,9 mg g⁻¹ de casca e 49,5 mg g⁻¹ de casca para MB e CR a partir de um intervalo de concentração de 50 a 1000 mg L⁻¹ de corante à 25°C. A heterogeneidade da superfície da casca do ovo permite o rearranjo das moléculas de corante na superfície a partir da sua adsorção. A análise da energia livre de adsorção mostrou aumento da adsorção com a temperatura, indicando a ocorrência de adsorção física entre os corantes e superfície da casca dos ovos. Os presentes resultados indicam a adequação dos resíduos de bio-casca de ovo a serem utilizados como adsorventes para remoção de corantes (em inglês, *dyes*). Devido a esta porosidade e características da superfície do ovo, vários estudos foram realizados para verificação da capacidade de adsorção e aproveitamento da casca de ovo para remoção de substâncias, metais tóxicos de água, imobilização de metais presentes no solo e tintas básicas, por meio de análises e técnicas como isotermas de adsorção, energia livre, entalpia e entropia de adsorção. O estudo mostrou a viabilidade do uso da casca de ovo como um adsorvente de baixo custo, natural e permitir o uso desses resíduos industriais para tecnologias com vantagens ambientais, econômicas e tecnológicas na remoção de resíduos e contaminantes, ao mesmo tempo que transformação os resíduos em recursos valiosos e viáveis para as indústrias (ABDEL-KHALEK et al., 2017).

3.5 SALMONELLA

A salmonela pertence à família das enterobactérias, gram-negativas, anaeróbias facultativas, possuindo mais de 2.500 sorotipos. O patógeno pode ser encontrado em uma ampla variedade de espécies entre elas mamífero, aves, répteis e anfíbios. Em condições adequadas a maioria das espécies podem desenvolver a doença, contudo os casos clínicos são mais comuns em bovinos suínos e aves (BIOLOGICS, 2013).

O gênero da *Salmonella* é dividido em duas espécies a *Salmonella enterica*, responsável por 95% dos casos de doenças em humanos e a *Salmonella bongori* a diferenciação é baseada na linhagem genética, estima-se mundialmente 94 milhões de

casos de gastroenterite com cerca de 150.000 mortes e 21 milhões de casos de febre tifóide com 200.000 mortes (WALDNER, 2012).

A precocidade na detecção da *Salmonella* e o controle microbiológico em alimentos é um fator importante para garantia da qualidade nutricional e segurança alimentar do produto. O controle microbiológico pode minimizar riscos de doença como febre tifóide e paratifóide, gastroenterite, pneumonia e bacteremia que estão associadas ao patógeno. A salmonelose não é apenas uma doença de países subdesenvolvidos, mas também em países desenvolvidos como a União Européia que possui mais de 160.000 indivíduos infectados por ano chegando a uma média de 35 casos de mortes a cada 100.000 pacientes, em Hong Kong, das doenças transmitidas por alimentos a *Salmonella* spp. é responsável por 22% dos surtos e nos Estados Unidos anualmente os gastos com a doença podem chegar a US \$ 2,4 bilhões. Os principais alimentos contaminados pela salmonela são alimentos ricos em proteínas como carnes, aves, peixes e ovos (WANG, 2017).

No Brasil as pesquisas de casos de presença de *Salmonella* em alimentos como ovos são ainda escassos, no estado do Paraná há registros no período de 1999 a 2004 de 217 surtos. A contaminação cruzada do patógeno em alimentos está relacionada com a manipulação inadequada e a falta de boas práticas de fabricação (KOTTWITZ, 2008).

A salmonela é uma bactéria entérica de origem alimentar, com capacidade de formarem biofilmes em diferentes superfícies, como: plásticos, metal e borracha. A bactéria adere através de suas fímbrias e por produção de lipopolissacarídeo que estão sempre presentes. Nas indústrias alimentícias a presença de detritos orgânicos e inorgânicos nas superfícies favorece a colonização por micro-organismos, bactérias e, a formação de biofilmes para contaminação e crescimento dos micro-organismos. Os biofilmes também estão presentes nos ambientes naturais ou artificiais como em indústria de alimentos que pode causar a deterioração e contaminação de alimentos e danos para os equipamentos que são utilizados no processamento de alimentos. Para eliminação dos biofilmes formados por micro-organismos, uma adequada higienização da superfície deve ser realizada com aplicação de produtos desinfetantes para evitar a contaminação dos alimentos (MORENO, 2018).

Segundo pesquisas mais de 80% das infecções bacterianas são causadas pela formação de biofilmes, e sua formação depende de fatores como interação bacteriana e suas estruturas, superfície para fixação, pH, temperatura adequada, nutrientes e dinâmica dos fluídos envolvidos na superfície-bactéria. A presença de biofilmes pode estar associada

à resistência da bactéria em permanecer em ambientes de produção de alimentos, o que leva a uma diminuição econômica por deteriorar os alimentos e causar problemas de saúde pública devido à liberação de patógenos durante a quebra desses biofilmes contaminando os alimentos no uso do alimento. De acordo com a pesquisa realizada para verificação da formação de biofilmes em diferentes temperaturas, detectou-se a presença de cepas resistentes quando estas foram incubadas em temperatura de 37°C, e moderadas incubadas a 28°C, porém mais de 50% das cepas de *Salmonella* estudadas foram capazes de produzir biofilmes em temperatura de 12°C, o que produz constante preocupação já que esta é a temperatura exigida pelo serviço sanitário brasileiro de indústrias de aves, em temperaturas de 3°C utilizadas em temperatura de refrigeração residenciais, as cepas de *Salmonella* apresentam capacidade de formarem biofilmes sobre as superfícies porém menores (BORGES, 2018).

A salmonela é transmitida após a ingestão de alimento contaminado incluindo, alimentos de outras origens, por exemplo, manteiga de amendoim e outros derivados de ovos. Muitas espécies de animais não apresentam sintomas e carregam o patógeno no intestino ou vesícula biliar e os liberam nas fezes. Os animais e produtos animais podem ser infectados por rações contaminadas, água e contato com outros animais (BIOLOGICS, 2013).

A *Salmonella* spp. pode estar presente em superfícies como de carcaças durante o abate de animais, em propriedades agrícolas. A sua disseminação pode ocorrer por água contaminada de córregos, rios e esgotos. Nas indústrias de alimentos a maior parte da contaminação ocorre por contaminação cruzada de alimentos crus, mal higienizados e utensílios contaminados. A doença causada pela *Salmonella* spp. é a salmonelose, como causa mais comum a ingestão de alimentos contaminados podendo proceder pelo contato com animais contaminados. A *Salmonella* spp. não forma esporos e pode sobreviver nos alimentos por tempos longos, entre os alimentos citados como veículo de transmissão, os de maior importância são ovos, carne de porco e aves, leite, chocolates, frutas e verduras (FOOD SAFETY, 2011).

No EUA em 2008, a contaminação por *Salmonella* spp. foi responsável por quase 35% de 5.332 surtos que ocorreram por alimentos contaminados. Entre estes alimentos mais frequentes responsáveis por esta contaminação encontram-se os ovos e seus derivados. Em humanos a salmonelose não tifóide provoca diferentes sintomas, como:

febre, diarreia, dor náusea e vômito por se tratar de uma doença gastrointestinal (ÖSTERBERG, 2010).

A presença de *Salmonella* na casca e gema de ovos já foram evidenciados no Brasil, assim como em outros produtos alimentícios. O sorotipo *Salmonella* Enteritidis é o mais presente em contaminações, mas podem ocorrer também contaminações cruzadas pelo sorotipo *Salmonella* Thyphimurium. As medidas de higienização e desinfecção devem ser realizadas para o consumo de ovos, principalmente, quando consumidos crus ou levemente cozidos, como em alimentos em mousse ou a base de maionese, a eliminação das espécies de *Salmonella* depende da temperatura e tempo de exposição à temperatura (qual temperatura), levando se em conta também a redução ou utilização em alimentos à base de ovos crus (SAVE et al., 2011).

3.6. QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO (QUATS) COMO AGENTE SURFACTANTE E SANITIZANTE

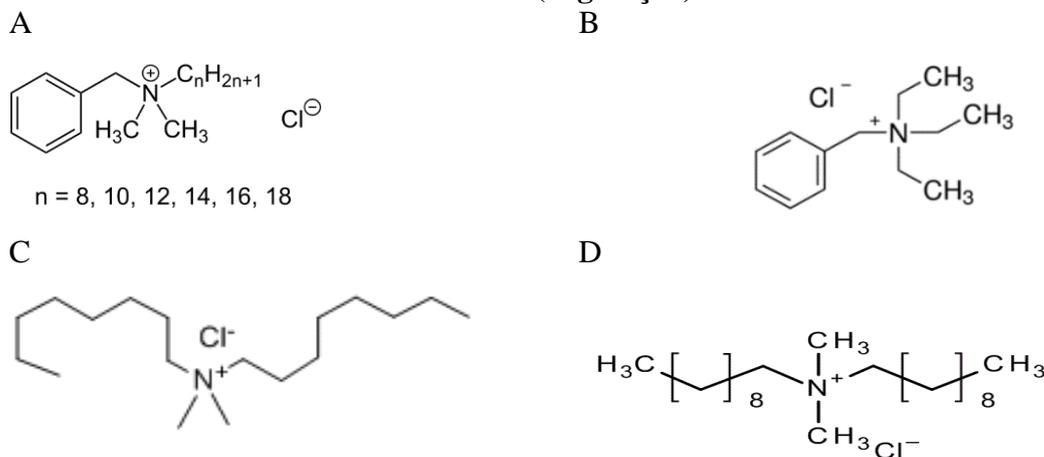
No processo de higienização de ovos alguns agentes químicos são utilizados no intuito de melhorar o aspecto de aparência e qualidade diminuindo a probabilidade de contaminação garantindo uma maior aceitação entre os consumidores. Ácido peracético e cloro são alguns dos produtos químicos utilizados na higienização de ovos, o ácido peracético apesar de sua rápida ação em concentrações baixas necessita de cuidados durante seu manuseio por causar irritações na pele e mucosas além de apresentar baixa estabilidade da solução em temperatura ambiente, o cloro por apresentar um baixo custo e por sua fácil aplicação é um dos sanitizantes mais utilizados no mercado, porém altos índices de cloro podem influenciar na qualidade de ovos tornando-os inaceitáveis além de causar impactos ambientais adversos (NETO, 2016). O uso de desinfetantes na avicultura para desinfecção de ovos férteis é um tema relevante e tem sido pesquisado com diferentes produtos, por exemplo, a análise da eficiência do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) não demonstrando efeitos prejudiciais à saúde. Entretanto, apesar da redução de carga patogênica, o uso prolongado desses produtos pode causar resistência em patógenos. O ácido propiônico utilizado em granjas avícolas com ação no combate de bactérias e fungos, com concentração de 10% apresentou resultados de quase 100% de eficácia em 30% das amostras (NETO, 2016).

A primeira formulação e reconhecimento da atividade bacteriana dos quaternários de amônio (QACs/quats) ocorreu a quase 100 anos, mas foi somente após a segunda guerra mundial que o produto foi utilizado, sua baixa toxicidade e capacidade de formulações permite o uso em diversas ações como limpeza, sanitização, efeito residual por formação de monocamada e desinfecção de superfície (GERBA, 2015).

Os quaternários (quats) de primeira geração (I) são conhecidos como cloreto de benzalcônio ou cloreto de N-alquildimetil amônio. Os quaternários de segunda geração (II) como o cloreto etilbenzil e os quaternários de terceira geração (III) são compostos com maior atividade na presença da água dura (ricas em cálcio, magnésio e ferro), inativam enzimas, desnaturam proteínas e rompem membranas das bactérias, sendo compostos por uma mistura da primeira e segunda geração (I+II). A quarta geração de quaternários (IV) são estruturas químicas que não possui o anel benzeno e apresentam cadeias lineares com tamanhos e distribuição controlados, contém ação germicida superior das outras gerações, formam pouca espuma e são indicados para desinfecção em indústrias alimentícia e de bebidas devido sua baixa toxicidade. O quaternário de amônio de quinta geração (V) é uma mistura convencional do cloreto benzil amônio (I) e cloreto didecil dimetil amônio com estruturas, distribuição e cadeias diferenciadas (IV) (I+IV) (POLYORGANIC, 2018).

Os sais quaternários de amônio (quats) são íons poliatômicos carregados com carga positiva (NR_4^+), onde R é radical alquila de tamanhos diferenciados (radical n). Os cátions quaternários de amônio são sintetizados por alquilação da amônio ou aminas como demonstrado na Figura 2. Os compostos de amônio quaternário (quats) possuem estabilidade e atividade biológica/atividade microbica, dependendo da composição e distribuição das cadeias alquilas (R) no átomo de nitrogênio positivo que interage intensamente com sua perfícies negativas. A maior parte das superfícies naturais são negativas (LOFTSSON, THORSTEINSSON E MÁSSON, 2005).

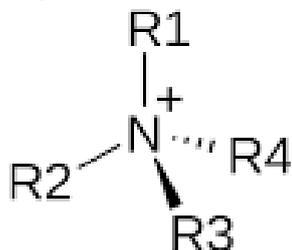
Figura 2. Estruturas de compostos de amônio quaternário: (a) cloreto de N-alquil dimetil benzilamônio (I geração), (b) cloreto de etilbenzila (II geração), (c) cloreto de dimetil dioctilamônio (IV geração) e (d) cloreto de didecil dimetil amônio (V geração).



Os quats possuem a função orgânica nitrogenada composta por nitrogênio ligado a quatro grupos orgânicos (Figura 3). Os cátions com cargas positivas permanecem ligados aos ácidos e fosfolípidos da parede celular dos micro-organismos impedindo a absorção de nutrientes. Os quaternários de amônio são responsáveis por destruir uma grande variedade de micro-organismos, mas não demonstram eficácia na fase esporuladas das bactérias. Em sua maioria, a utilização dos quaternários de amônio como sanitizantes ocorre na concentração de 200 ppm (mg L^{-1}) em superfície de contato com alimentos, após a secagem passam a ter ação germicida, devido a presença de grupamentos hidrofílicos e lipofílicos em concentrações maiores passam a exercer ação de detergentes (PFUNTNER, 2011).

A literatura relata que os compostos de amônio quaternário são surfactantes e estabilizantes para metais nobres como ouro e outros metais (NUNES, 2012). A presença de grupos amônio quaternários pode atribuir atividade biológica complementar (HAN, 2011). Os grupos nitrogenados, como as nanopartículas de metais, por exemplo, AgNPs, podem interagir com membranas celulares de micro-organismos, devido a carga pode ser tornar seletiva e melhorar a permeabilidade celular para indução de estresse oxidativo, desestruturação da membrana celular, danos e comprometimento da viabilidade e sobrevivência de micro-organismos devido à morfologia, topografia e carga positiva ou superfície carregável (SCHARFF, 1960).

Figura 3. Fórmula estrutural geral de um sal de amônio quaternário composto por grupos nitrogenados e radicais ligados com tamanhos e distribuição diferenciados.



As vantagens dos quats estão na capacidade de adsorção, adesão e penetração na parede celular, baixa toxicidade para células e sensibilidade sobre as células de mamíferos devido a diferença de carga superficial, estabilidade e intensa atividade biológica após sua adsorção sobre a superfície (ROY, 2008). O mecanismo para explicar a atividade biológica dos quats não é completamente conhecido, mas, atribui-se a intensa atividade biológica devido à capacidade das espécies catiônicas (+) de interagirem com a carga negativa (-) das células, aumento de permeabilidade celular, desorganização da membrana celular e favorecimento do rompimento e extravasamento dos conteúdos celulares devido a sua intensa atividade superficial, surfactante e tensoativa (DIZMAN, 2004).

O grupo polar (amônio quaternário polar, N^+) e as cadeias alquílicas (apolares, R1, R2, R3 e R4) agem inativando as enzimas envolvidas na oxidação e fermentação ou ainda são capazes de romper a membrana citoplasmática, extravasando eletrólitos e conteúdo nuclear que inviabiliza e provoca a morte da célula. Sobre a dosagem dos (QACs/ quats), estudos demonstram que em concentração 1/1000 em um tempo de contato de 10 minutos espécies de *Staphylococcus aureus* foram destruídas, em matéria orgânica foram testadas as concentrações para eliminação de bactérias gram-positivas e gram-negativas e na concentração 0,1 ocorreu a paralização de toda atividade bacteriana apresentando melhores resultados para os gram positivos (OLIVEIRA, 1985).

Historicamente, os compostos de quaternário de amônio (QACs/quats) como o cloreto de benzalcônio, o cloreto de estearalcônio e o cloreto de cetilpiridina foram introduzidos pela primeira vez em 1916, mas, sua utilização completa foi realizada em 1930. Atualmente, é utilizado em limpeza de indústrias, no tratamento de água, no tratamento de fungos em hortaliças, o cloreto de benzalcônio um dos quaternários de amônio é muito utilizado em produtos farmacêuticos como na fabricação de enxaguantes

buciais, colírios, produtos como lágrimas artificiais, descongestionante nasais, hidratantes faciais, cremes e loções protetoras do sol, loções corporais, hidratantes, analgésicos, e desinfetantes para as mãos (NAGAI, 2003).

Os quaternários de amônio podem ser utilizados como microbiocidas na produção de papel, controle de algas em piscina, resfriamento de água, adicionados como conservantes e possuem ação como desinfetantes comuns, semicríticos (superfície dura), fungicidas, viruscidas, germicidas, bactericidas, bacteriostáticos e agente de controle de bolor. Porém apresentam dificuldades na compatibilidade com outros compostos como na presença de aniônicos que neutraliza sua ação tornando os quaternários ineficazes (POLYORGANIC, 2018).

Os quaternários de amônio (quats) possuem atividade biológica/bactericida sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, e outras espécies patogênicas (fungos, vírus e protozoários). Os quats como cloreto de benzalcônio e cloreto de cetilpiridínio, são surfactantes catiônicos e utilizados como bactericidas nas formulações de desinfetantes de amplo espectro (LOFTSSON, THORSTEINSSON E MÁSSON, 2005).

Em relação às vantagens apresentadas pelo quaternário de amônio destacam-se a estabilidade, baixa toxicidade, atividade superficial e atividade biológica contra micro-organismos. Estes produtos podem ser formulados com fragrância, polímeros, corantes que desodorizam, além de realizar limpeza e desinfecção. O principal mecanismo dos quats é o elevado potencial de permeação celular para induzir alterações celulares em micro-organismos, acredita-se que o quaternário de amônio interfira na função da membrana celular bacteriana provocando lise e vazamento dos componentes celulares e morte e destruição do micro-organismo. Estas características estimulou o desenvolvimento de várias estruturas diferentes de quaternário para ampliação da atividade biológica, superficial e compatibilidade. Entre os quaternários desenvolvidos os mais utilizados com ação desinfetante são o cloreto de alquildimetilbenzilamônio (ADBAC) com eficácia máxima obtida com comprimentos de cadeia entre C_{12} e C_{16} e cloreto de dialquil dimetilamônio com cadeias C_8 e C_{10} (PINTO, 2006).

O comprimento da cadeia carbônica (C) tem sido o diferencial molecular para o aumento da atividade biológica e aumento do espectro microbicida. O uso de desinfetantes é frequentemente recomendado na prática para exterminação de bactérias resistentes. Uma das grandes utilizações dos compostos quaternários de amônio (QACs/quats) são nas indústrias alimentícias em procedimentos de higiene e desinfecção. De acordo com as

literaturas sabe-se que as bactérias gram-negativas apresentam menos susceptibilidade do que as bactérias gram-positivas. Neste aspecto, os desinfetantes devem ser utilizados com cuidado para evitar possível resistência cruzada (LANGSRUD, 2004).

Os quaternários de amônio (quats) são produtos conhecidos por causarem alguns efeitos colaterais e/ou reações tóxicas a partir de suas concentrações e/ou devido as associações, mas principalmente devido a sua estabilidade química. Entretanto, análogos de quats de menor cadeia e toxicidade foram sintetizados e suas propriedades físico-químicas investigadas, como a constante de taxa hidrolítica, atividade superficial e lipofilicidade. Existem inúmeros estudos disponíveis na literatura que relacionam a estrutura-atividade mostrando que a atividade bactericida é fortemente influenciada pela lipofilicidade e estabilidade química e que no aumento da atividade biológica amplia-se com o aumento da lipofilicidade e estabilidade química. O índice de segurança (SI) dos compostos foi definido como a constante da taxa hidrolítica dividida pela concentração inibitória mínima. Observou-se que o índice de segurança SI dos agentes antibacterianos aumentava com o aumento da lipofilicidade, mas o SI ideal foi obtido quando o seu hidrolítico $t_{1/2}$, a pH 6 e 60°C em 11 horas. A otimização dos agentes antibacterianos pelo SI resultou em agentes antibacterianos de amônio quaternário mais potentes, mas quimicamente instáveis (LOFTSSON, THORSTEINSSON E MÁSSON, 2015).

O cloreto de benzalcônio (BAC) é composto por uma mistura de cloretos de alquilbenzildimetilamônio de vários alquilas pares comprimentos de cadeia (C8-C18) e o cloreto de didecildimetilamônio (DDAC) é uma mistura de sais de amônio alquil-quaternário com comprimentos de cadeia de alquila típicos de C₈, C₁₀ e C₁₂. Os quats com cadeia C₁₀ e suas misturas (BAC+DDAC, V e IV gerações) são os produtos mais utilizados em indústrias de alimentos, como em laticínios na prevenção de mastite sendo utilizados na desinfecção do úbere e aparelhos de ordenha devido ao seu alto valor higiênico e econômico, os BAC e DDAC não causa irritação na pele (EURL-SRM, 2016).

Os QACs/quats são agentes que permeiam e agem na membrana de bactérias e lipídeos dos vírus desestruturando e alcançando os constituintes celulares causando danos e morte celular. A utilização dos quats como ativos bactericidas para desinfetantes estão entre os produtos mais utilizados, porém há sempre uma preocupação em relação ao fato de causarem resistências nos micro-organismos diminuindo a possível ação dos antibióticos. Para aumentar sua eficácia ou atingir certos micro-organismos, muitos produtos contêm em sua composição os QACs, devido à grande variedade de grupamentos

químicos esses agentes ativos. Esta diversidade molecular de estruturas possibilitou um aumento de suas aplicações, eficácia, diminuição de custos e toxicidade (GERBA, 2015).

Os antibióticos e biocidas possuem características comuns em relação ao mecanismo de ação e susceptibilidade m bactérias, mas se diferenciam nas utilizações. Estes produtos antibióticos, podem ser utilizados como drogas quimioterápicas e os biocidas como anti-sépticos, desinfetantes e conservantes para diferentes finalidades. A ação bactericida pode ser alterada pela concentração do produto, tempo de contato, pH, temperatura, tipo e quantidade de micro-organismo e presença de materiais que interferentes. A suscetibilidade de bactéria por biocidas pode ser estável ou instável muitos estudos estão sendo realizados para determinar se possui relação como a resistência a antibióticos. Os descartes dos produtos causam preocupações, apesar de estudos realizados em esgotos domésticos, no ambiente de saúde e em indústrias não evidenciaram resistência de bactérias por antibióticos nos locais onde foram utilizados biocidas, quando comparados com áreas sem a utilização de biocidas (RUSSELL, 2003).

Os estudos de Borowsky (2006) foram realizados para verificação da sensibilidade e resistência de *Salmonella* Typhimurium ao agente desinfetante de composto com o ativo químico de quaternário de amônio (cloreto de benzalcônio, I geração) testados em suínos abatidos, os resultados demonstraram que as amostras de *Salmonella* foram sensíveis e inativadas em 100% dos produtos independente do tempo de contato e concentração exposta.

Outro estudo avaliou cinco compostos de quaternário de amônio sendo cloreto de alquilbenzil dimetilamônio (BAC), cloreto de metiltrialquilamônio (CMTA), cloreto de benzidimetil dodecil etil amônio (CBDMA), cloreto de metil dodecilbenzil trimetil amônio (CMDA) e o formulado comercial (BAC + ETB) também foram testados em maçã, tomate e rúcula contaminados com espécies de estirpes de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 23109 e os fungos *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea* em meio sólido e de macrodiluição. Os resultados experimentais mostraram que o cloreto de benzalcônio (BAC) e de um formulado comercial (BAC + ETB) foram mais eficientes para os dois tipos de fungos, enquanto, os compostos de quaternário de amônio (CMTA, CBDMA CMDA) não apresentaram atividade fungicida, no teste de macrodiluição para bactérias. Estes cinco compostos apresentaram resultados semelhantes para as duas espécies, enquanto no teste de difusão

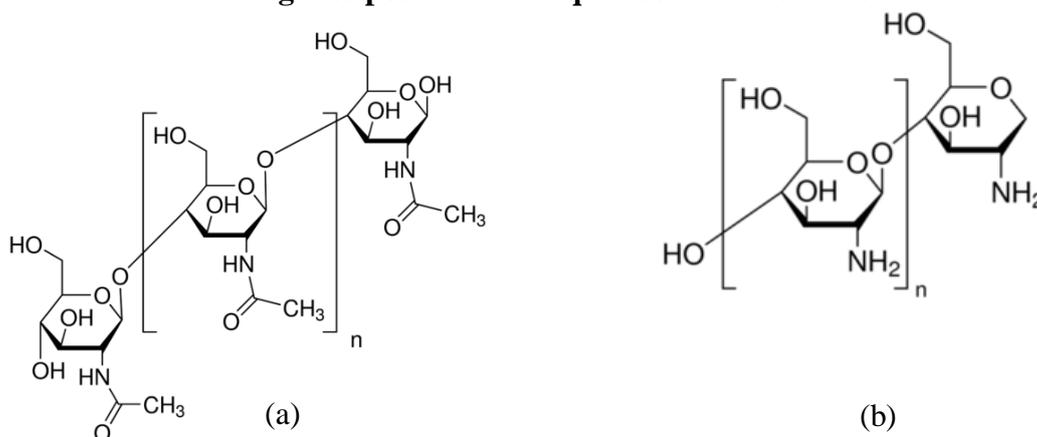
em meios sólidos os resultados de inibição foram menores para BAC e (BAC + ETB) (ZERDAS, 2016).

3.7. FILMES DE QUITOSANA PARA SANITIZAÇÃO E PROTEÇÃO POR REVESTIMENTO DE OVOS

O ovo possui excelente qualidade nutricional e problemas têm sido encontrados na produção, estocagem e disposição do produto na prateleira. Os problemas mais comuns encontrados são perda de massa, deteriorização do conteúdo interno e contaminação microbiana. A troca gasosa de CO₂ e outros gases através da casca podem alterar a qualidade dos ovos. Neste aspecto é importante proteger e dar proteção adicional a casca do ovo para conservar sua qualidade nutricional durante o período de prateleira. A cobertura por filmes de polímeros naturais (polissacarídeos, proteínas, lipídios isolados ou em mistura) tem sido proposta para a proteção dos ovos no período de 3 a 5 semanas com aceitabilidade do produto pelo consumidor (BHALE et al, 2003).

A quitosana é um polímero natural obtido por desacetilação da quitina (Figura 4). A quitina é o maior constituinte de carapaças de crustáceos como caranguejo, camarão e lagosta/lagostim. A quitosana em diferentes formas, isolada ou modificada tem sido proposta para diferentes aplicações em alimentos, industriais tecnológicas e até na área da saúde.

Figura 4. Estrutura da quitina (a) e quitosana (b) com detalhe para os grupos desacetilados, obtidos a partir de diferentes graus de desacetilação da quitina e, carregados positivamente quando em meio ácido.



A literatura mostra que quitosanas de concentrações em ácido acético de 1% a 2% em massa (quitosana:ácido acético (1:1)) com diferentes massas molares, viscosidades e graus de desacetilação ($1,8 \cdot 10^6$ a $6,6 \cdot 10^5$ Da/360 Cp a 14 Cp/Grau de Desacetilação (GD) de 86 a 91%) são excelentes materiais filmogênicos, não tóxico, comestível e, que pode ser utilizada para aumentar o tempo de prateleira e/ou a vida útil dos alimentos com a vantagem de ser produto comestível (JEON et al., 2002), e pode ainda oferecer propriedades (bio)ativas (BUTLER et al., 1996) e atividade bactericida (NO et al., 2002).

A quitosana é um dos polímeros naturais com extensa aplicação e possui atividade antimicrobiana. Neste aspecto, pode ser boa escolha para aplicação em diferentes produtos como filmes protetivos, preparação de adsorventes, uso como intermediário e complexantes de metais nas indústrias farmacêuticas, alimentos, cosméticos, produtos químicos, culturas agrícolas, entre muitas outras aplicações (MAHL et al., 2018).

A literatura mostra que a quitosana pode ser utilizada na preparação de filmes (bio)ativos para exercício da atividade bactericida e fungicida. A atividade biológica é dependente de pH, tipo de micro-organismo, estrutura molecular, espécies presentes e grupos vizinhos e superficiais da quitosana e membrana do micro-organismo. A estrutura molecular e atividade biológica do polímero depende da massa molecular, grau de desacetilação, tipo de micro-organismo, tipo de modificação, pH e concentração. Neste sentido, pesquisas e estudos devem ser realizados para conjugação desses fatores para obtenção da maior atividade bactericida e proteção do filme (bio)ativo.

No et al. (2002) avaliou a atividade biológica de diferentes quitosanas e oligômeros de quitosana. Os resultados dos estudos com as atividades biológica de seis quitosanas e seis oligômeros com diferentes massas moleculares (quitosana, Mw = 1671, 1106, 746, 470, 224 e 28 kDa) e oligômeros de quitosana (Mw = 22, 10, 7, 4, 2 e 1 kDa) foram testados contra quatro bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella Typhimurium* e *Vibrio parahaemolyticus*) e sete bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* e *L. bulgaricus*). As quitosanas apresentaram maior atividade bactericida que os oligômeros de quitosana e, inibiram o crescimento das bactérias testadas. Os efeitos inibitórios diferiram a partir das massas moleculares (MMs) da quitosana e do tipo de bactéria em particular. Pode-se perceber que as atividades bactericidas das diferentes quitosanas foram mais intensos em bactérias gram-positivas do que em bactérias gram-negativas na presença de 0,1% de quitosana em meio ácido. A

concentração inibitória mínima (MIC) da quitosana variou de 0,05% a > 0,1%, a depender das bactérias testadas e massas moleculares (MMs) da quitosana. A análise a partir do solvente utilizado para a solubilização da quitosana e oligômeros mostrou que o ácido acético a 1% foi eficiente na inibição do crescimento das bactérias, entretanto, os resultados foram melhores com 1% de ácido láctico ou 1% de ácido fórmico. A atividade bactericida da quitosana foi mais intensa quanto menor o pH (faixa de pH 4,5-5,9). Pode-se verificar que o pH é um parâmetro importante, pois a maior atividade bactericida foi verificada no menor valor de pH testado (pH 4,5) (NO et al., 2002).

A quitosana possui elevada (bio) degradabilidade, não é tóxica, possui propriedades antimicrobianas e filmogênicas. Assim a quitosana é uma opção para aplicações na preparação de filmes (bio) ativos com vista à proteção de alimentos, podendo conjugar/oportunizar a sanitização e proteção superficial para diferentes tipos de micro-organismos. Neste aspecto, estudos dos fatores e o mecanismo de ação são partes importantes a serem investigadas (HOSSEINNEJAD E JAFARI, 2016).

A quitosana como forma desacetilada da quitina é um polímero disponível na biomassa, com tecnologia de preparação simples e pode ser obtida a partir de diferentes fontes de resíduos, principalmente, de crustáceos. A atividade antimicrobiana da quitosana para fungos e bactérias gram-positivas e gram-negativas é uma parte importante para a sua proposta de utilização como filmes (bio) ativos. Os parâmetros mais importantes da (bio) atividade são: massa molecular, grau de desacetilação, pH e outros fatores do microambiente. Estudos mostram que a atividade e efeito antimicrobiano não é apenas afetado pelo tipo particular do micro-organismo (fungos ou bactérias), mas é, principalmente, influenciado pelo grau de desacetilação, massa molecular, métodos de obtenção, derivatização e/ou preparação que são utilizados. A (bio) atividade contra fungos e bactérias pode ser potencializada por aumento do grau de desacetilação. Esse fenômeno/atividade pode ser explicada por aumento da interação eletrostática entre a quitosana e grupos/componentes aniônicos da parede celular do micro-organismo (BEZERRA, 2009).

A influência da massa molecular parece depender do tipo de micro-organismo testado (bactérias e fungos). As quitosanas de baixa, média e alta massa molecular (em inglês, LMW, MMW e HMW) tendem a serem mais ativas que oligômeros de quitosana. Para a atividade antifúngica, a quitosana de baixa massa molecular (LMW) parece ser a mais efetiva, embora as diferenças sejam insignificantes em comparação com a quitosana

de alta massa molecular (HMW) e é dependente do tipo de fungos. A quitosana de baixa massa molecular (LMW) parece possuir, um modo duplo de ação, contra fungos, sendo provável, que a quitosana de baixa massa molecular (LMW) possa permear/penetrar mais facilmente na parede da célula fúngica em comparação com a quitosana de média (MMW) ou alta massa molecular (HMW) e, que ainda seja grande o suficiente para realização de interações eletrostáticas, que pode resultar na ruptura da membrana celular e extravasamento do meio intracelular (PAVINATTO, 2009).

Na atividade bactericida, esse modo dual de ação é menos pronunciado e o principal modo de ação é, principalmente, devido à interação eletrostática com os componentes aniônicos da parede celular e seu bloqueio funcional. Em comparação com a quitosana, os derivados de quitosana (oligômeros) e nanopartículas de quitosana têm se mostrado uma alternativa importante para aumento da permeação celular e potencialização da atividade antimicrobiana (NO et al., 2002; HOSSEINNEJAD E JAFARI, 2016; KONG et al. 2010).

Bhale et al. (2003) mostrou que quitosanas de diferentes massas molares (alta, média e baixa) e o filme de quitosana de diferentes massas molares (alta massa molar: 1100kDa, média: 746 kDa e baixa: 470 kDa) pode oferecer proteção ao ovo como um filme de revestimento e uma barreira protetiva contra contaminação e proteção física e mecânica ao ovo para manutenção da massa e aumento da durabilidade do produto à temperatura ambiente, 25°C. Os autores mostraram a viabilidade do uso e que filmes de quitosana de baixa massa molar foram mais efetivos na proteção dos ovos (clara e gema) por até 5 semanas a temperatura ambiente de 25°C.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A quitosana, compostos quaternários de amônio (quats) (I e V geração), soluções e a superfície dos ovos foram caracterizados físico-química e biologicamente para utilização nos experimentos para análise da atividade biológica, bactericida e análise da efetividade de formação de filmes com quaternários de amônio de I geração (PB CLBZ 05) e V geração (PB QT 80) gerações comerciais para sanitização ou redução da contaminação bacteriana na superfície de ovos.

A proposta é utilizar a quitosana (Polymar, CE) de alta massa molar e quaternários de amônio (na forma de uma estrutura híbrida catiônica) para obtenção de formulações poliméricas de revestimento das superfícies externas dos ovos que podem ser aplicados a diferentes concentrações. Foram utilizados um total de 174 ovos para a realização das análises, dos quais 24 ovos obtidos em supermercados da cidade de Dourados/MS, de coloração branca foram avaliados e classificados em tamanhos médios (50 a 55g) e grandes (55 a 60g). A região de Dourados/MS apresenta classificação climática de Köppen Cwa (clima mesotérmico úmido, verões quentes e invernos secos). Em seguida da mensuração das massas e classificação em balança digital com precisão de 0,05, para não ocorrer interferências do ambiente na massa, área superficial e volume, foram escolhidos e transportados ovos do dia no período matutino segundo a metodologia e predições propostas por Silva (2014). Os outros 150 ovos obtidos direto da coleta na granja JBS localizada na rodovia MS 379 Km 03 na cidade de Dourados distrito de Panambi, foram utilizados nas análises físico-químicas.

Para os experimentos dos ovos que foram comprados de forma aleatória nos mercados da cidade, após o uso doméstico, a casca foi separada e seca para caracterização e estudos de aplicação e atividade dos filmes. A análise microbiológica foi realizada para os quaternários de amônio de I e V geração e cascas de ovos revestidas por filme de quitosana+quaternários de amônio de I e V geração para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ou concentração bactericida mínima para análise de contaminação e efetividade do filme (bio) ativo conforme a metodologia descrita na norma M7-A9 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Todos os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia da UFGD.

A superfície externa dos ovos (cascas) foi caracterizada por análise elementar, técnicas espectroscópicas, microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise

termogravimétrica (TG) para análise de composição, morfologia, análise do revestimento por filme, interações/características superficiais das espécies presentes e aplicadas.

Para os experimentos as amostras de casca de ovos foram cortadas no tamanho de (1,19cm+/- 4,74 desvios padrão), utilizando enchimento de gesso para suporte da casca de ovo, realizada a marcação por molde e corte por uma ponta de microrretífica da marca Mondial modelo FMR-01.

As padronizações foram realizadas para os experimentos em placa de acrílico com poços para análise da atividade bactericida no tamanho e áreas de corte equivalentes ou foram realizadas a partir de um diâmetro ou raio médio e desvio padrão. As análises foram realizadas, por no mínimo, medições de 12 amostras (ovos) para cálculo da área superficial (As) e o desvio padrão e volume (V) e o desvio padrão.

4.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS DE QUITOSANA E QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO (I E V GERAÇÃO)

Para o experimento utilizou-se três amostras em triplicata de cascas de ovos com quitosana e quaternário a 1%, 0,5% e 0,25%. Inicialmente as soluções foram preparadas com 198 mL água destilada com 2 mL de ácido acético obtendo uma concentração de 1% de diluente. Para a preparação das soluções também foram pesadas 2g da amostra de quitosana e diluída em 198 mL da solução de ácido acético a 1% com a concentração de quitosana a 1%. A amostra permaneceu em agitação por um período de 24 horas mantida em uma temperatura de 35 a 40°C. Na etapa seguinte, após a agitação por 24 horas, foram adicionados os quaternários de amônio (I e V geração) em função do volume das concentrações 1%, 0,5% e 0,25%, ambas em um volume de 50 mL. Após preparadas às concentrações de quaternário e quitosana as amostras de cascas de ovos foram emersas na solução por 5 segundos alocados em placas de petri para secagem em temperatura ambiente por 18 horas.

4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS QUATERNÁRIOS I E V GERAÇÃO: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).

A atividade antibacteriana dos quaternários de amônio foi determinada pelo método

de microdiluição em caldo em placas de poliestireno de 96 poços, conforme a metodologia descrita na norma M7-A9 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

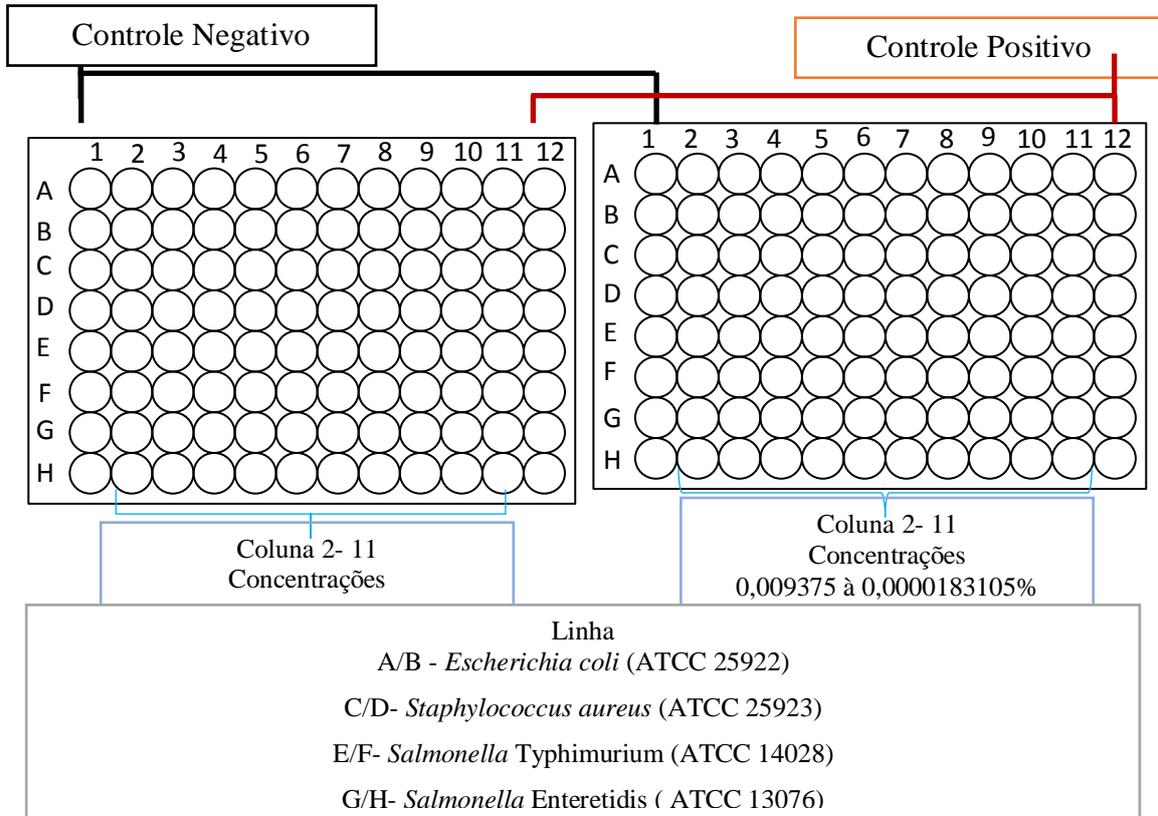
Para os ensaios foram utilizadas bactérias da coleção padrão da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As bactérias foram cultivadas em ágar Triptona de Soja (TSA, Himedia, Mumbai, IND) a 37°C por 24 horas e a concentração do inóculo foi ajustado para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, utilizando o comprimento de onda de 625 nm em espectrofotômetro (Visível Digital Microproce Q898DRM - QUIMIS ISO 8001).

As soluções dos quaternários de amônio Polybac CLBZ 05 (I geração) e Polybac QT 80 (V geração) foram preparadas, alíquotas de quaternários de amônio concentrados e dissolvidos em água destilada para preparação de solução padrão com concentração inicial de 4,8% submetidos a diluições sucessivas (1:2) até 0,009375% de concentração em microplacas de 96 poços com caldo Müeller Hinton (Himedia, Mumbai, IND). Pode-se obter concentração inicial de 4,8% e concentração final de 0,0000183105%. Estas soluções diluídas de quaternário de amônio de I e V gerações foram incubadas com os micro-organismos ATCCs *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) a 37°C por 24 horas.

Para o controle positivo do ensaio foi utilizado o antibiótico Ampicilina (AMP, Sigma-Aldrich, São Paulo, BRA). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração do composto no qual os micro-organismos não apresentaram crescimento visível após incubação, foi realizada a leitura visual para determinar se houve crescimento do micro-organismo, além da leitura visual, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada adicionando aos poços 50µL de solução 0,1% de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC, Vetec/Sigma-Aldrich, São Paulo, BRA) por 30 minutos (PANGHAL E KAUSHAL, 2010).

Para avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) uma alíquota de 5µL de cada poço da microplaca foi transferido para uma placa de Ágar Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A CBM foi determinada como a menor concentração que não apresentou crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em duplicada em três ensaios independentes (BAGIU et al., 2012).

Figura 5. Esquema referente às placas de Concentração Bactericida Mínima (CBM)

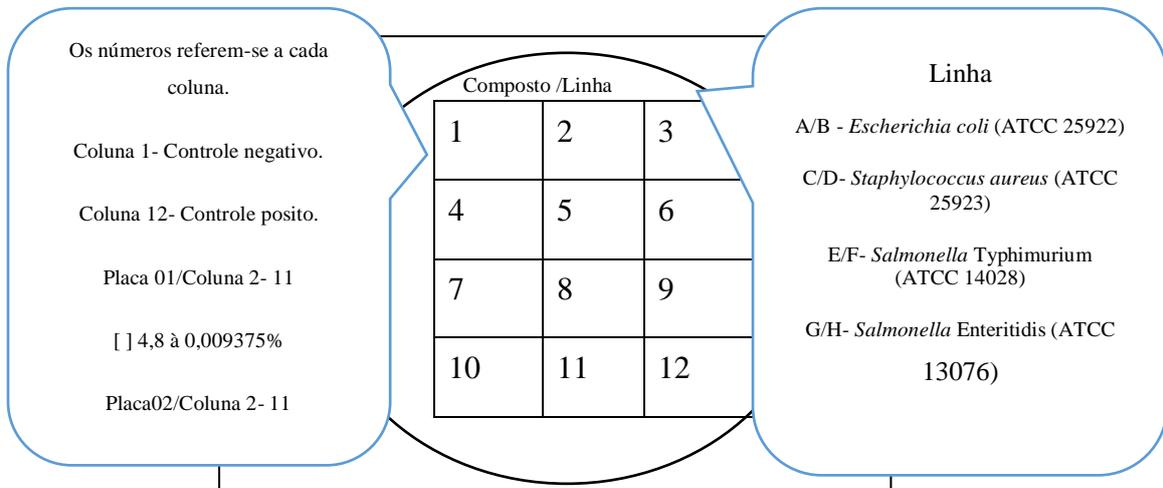


Na coluna 1 e 12 estão representados os controles negativos e positivos respectivamente. Nas colunas de 2 a 11 estão distribuídas as concentrações na primeira placa de 4,8 à 0,009375% e na segunda placa nas colunas de 2 a 11 as concentrações 0,009375 à 0,0000183105 %. Nas linhas de A à H estão alocadas e identificadas as linhagens de cepas utilizadas.

Fonte: próprio autor.

Figura 6. Esquema de referência para a análise da Concentração Bacteriana Mínima (CBM).

Concentração Bactericida Mínima



Fonte: próprio autor.

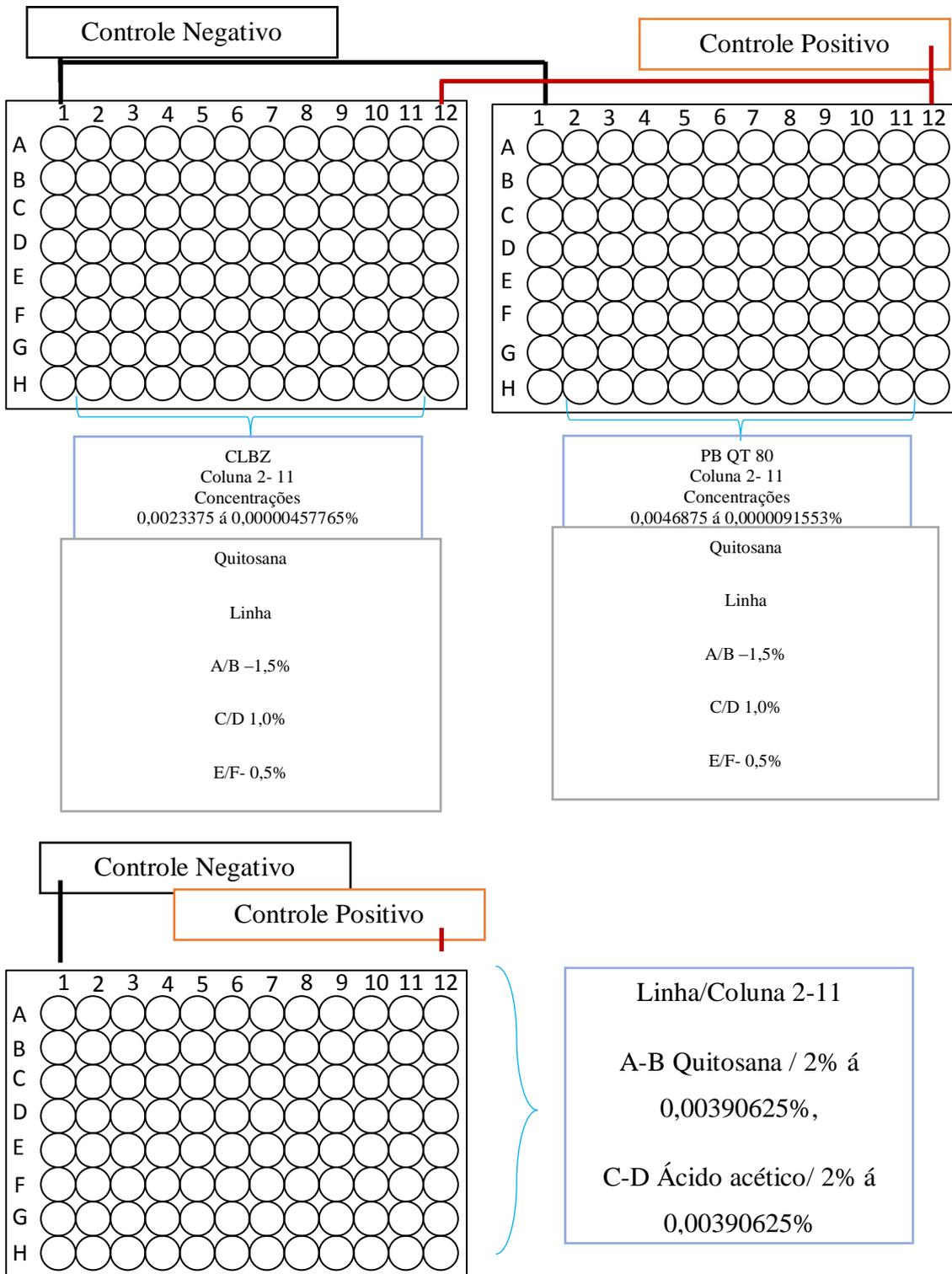
4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ÁCIDO ACÉTICO, QUITOSANA, QUATERNÁRIO I E V GERAÇÃO E COMPLEXO QUITOSANA+QUATERNÁRIO DE AMÔNIO: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).

A atividade antibacteriana dos compostos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo em placas de poliestireno de 96 poços, conforme a metodologia descrita na norma M7 – A9 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Foi utilizada bactéria da coleção padrão da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076).

A bactéria foi cultivada em ágar Triptona de Soja (TSA, Himedia, Mumbai, IND) a 37°C por 24 h e a concentração do inóculo foi ajustado para $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, utilizando o comprimento de onda de 625 nm em espectrofotômetro (Visível Digital Microproce Q898DRM - QUIMIS ISO 8001).

Os compostos de quaternários de amônio (Polybac QT 80 e Polybac CLBZ 05) foram dissolvidos em água destilada, e submetidos a diluições sucessivas (1:2) em microplacas de 96 poços com caldo Müeller Hinton (Himedia, Mumbai, IND) obtendo uma concentração inicial de 4,8% e final de 0,0000183105%, Ácido acético uma concentração inicial de 2% e final de 0,00390625%, quitosana uma concentração inicial de 2% e final de 0,00390625%, e complexo quitosana+quaternários de amônio Polybac QT 80 1,5% á 0,25/0,0046875 á 0,0000091553% e complexo quitosana+quaternários de amônio Polybac CLBZ 05 1,5% á 0,25/ 0,0023375 á 0,00000457765% incubadas a 37°C por 24 horas. Para o controle do ensaio foi utilizado o antibiótico ampicilina (AMP, Sigma-Aldrich, São Paulo, BRA). A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração do composto no qual os micro-organismos não apresentaram crescimento visível após incubação, foi realizada a leitura visual para determinar se houve crescimento do micro-organismo, além da leitura visual, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada adicionando aos poços 50 µL de solução 0,1% de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC, Vetec, Sigma-Aldrich, São Paulo, BRA) por 30 min (Paghal e Kaushal, 2010).

Figura 7. Esquema referente as placas de Concentração Inibitória Mínima frente a *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076) contendo o detalhamento das concentrações dos compostos utilizadas nos experimentos.



Fonte: próprio autor.

Para avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) uma alíquota de 5 µL de

cada poço da microplaca foi transferido para uma placa de Ágar Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a CBM foi determinada como a menor concentração que não apresentou crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em duplicada em três ensaios independentes (BAGIU et al., 2012).

4.4 EFEITO DE QUATERNÁRIO DE AMÔNIO E COMPLEXO QUITOSANA+QUATERNÁRIO DE AMÔNIO NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM CASCAS DE OVOS

A atividade antibiofilme dos compostos foi realizada de acordo Trevisan et al. (2018) com adaptações. Amostras ou cupons de casca de ovo circulares com uma área total de 1,10 cm² foram utilizados como superfície de adesão, dos quais foram primeiramente higienizados e autoclavados antes do teste. O teste foi realizado em microplaca de poliestileno de 24 poço, onde as amostras ou cupons foram depositados nos poços. Foi utilizada bactéria da coleção padrão da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), este micro-organismo foi selecionado por ser um dos principais sorovar causador de salmoneloses e o mais prevalente em produtos de frangos.

As bactérias foram primeiramente cultivadas em caldo Soja Trypticaseína (TSB, Himedia, Mumbai, IND) a 37°C por 24 h, e a concentração do inóculo foi ajustado para 1,5x10⁸ UFC/mL, utilizando o comprimento de onda de 625 nm em espectrofotômetro (Visível Digital Microproce Q898DRM - QUIMIS ISO 8001).

Para este teste foram utilizadas concentrações sub CIM para os quaternários de amônio (Polybac QT 80 e Polybac CLBZ 05) até detectar uma concentração que inibisse a formação de biofilme, as concentrações do complexo quaternário+quitosana foram realizadas com base na aplicabilidade destes dois compostos juntos e com base no teste de biofilme utilizando apenas os quaternários de amônio. Os quaternários e complexo quaternário+quitosana foram dissolvidos em meio TSB, (Himedia, Mumbai, IND), para o composto PBQT80 iniciou-se com concentração de 0,00029% e concentração final de 0,009375% para o composto PB CLBZ iniciou-se com a concentração de 0,00014% e concentração final de 0,00046875%, no teste com complexo quaternário PBQT80+quitosana, o PBQT80 iniciou-se com concentração de 0,01875% e concentração

final de 0,004666% e 1% de quitosana, no complexo quaternário PB CLBZ+quitosana, CLBZ iniciou-se com 0,09375% e concentração final de 0,00237% e 1% de quitosana.

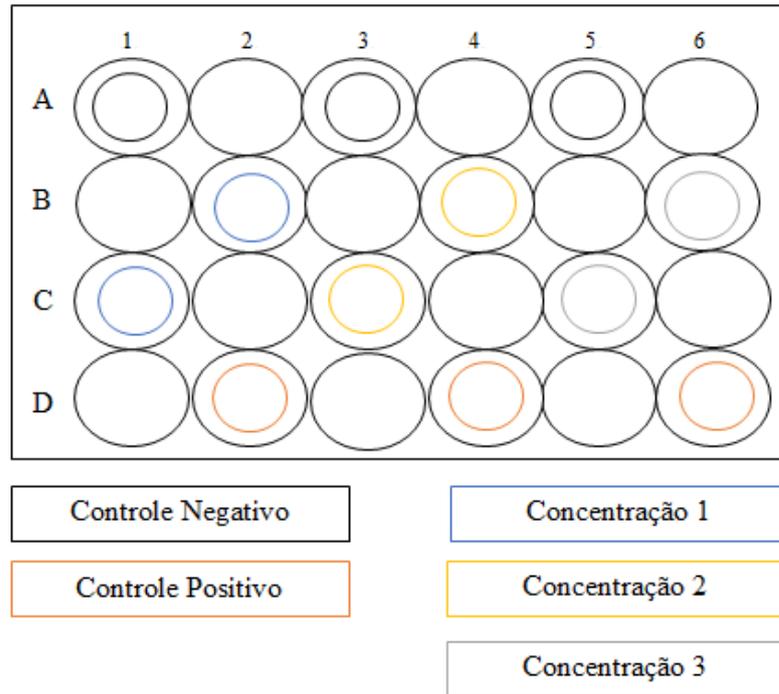
A montagem das placas foi realizada inicialmente colocando os cupons de casca de ovo nos poços, em seguida foram inseridas alíquotas de 980µL de diferentes concentrações dos quaternários diluídos em caldo TSB, para os complexos quaternários +quitosana foram inseridas alíquotas de 490µL de diferentes concentrações dos quaternários e 490µL de quitosana 1% diluída em caldo TSB em duplicada, seguido da inserção de alíquotas de 20µL de inóculo. Para o controle negativo foram inseridas alíquotas de 1000µL de diferentes concentrações do composto diluídos em caldo TSB em duplicada e para o controle positivo foram inseridas alíquotas de 900µL de caldo TSB em duplicada, seguido da inserção de alíquotas de 100µL de inóculo, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, com agitação orbital de 50rpm.

Para avaliar a atividade dos compostos na formação do biofilme na superfície dos discos da casca de ovo, após o tempo de incubação o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os poços foram lavados três vezes com 1000 µL solução salina tamponada (PBS) para retirada de células bacterianas planctônicas, em seguida os discos foram transferidos para tubos contendo 10 mL de solução salina estéril a 0,9% dos quais foram agitados em vortex por 10 minutos para desagregar o biofilme formado na casca, em seguida foram realizadas diluições seriadas de cada suspensão e as mesmas foram plaqueadas pela técnica "drop plate" em ágar triptona de soja (TSA). As unidades formadoras de colônia foram contadas após incubação por 24 horas a 37°C, os resultados foram expressos em Log_{10} , e o percentual de inibição foi realizado seguindo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição do biofilme} = 100 - (\text{Log}_{\text{teste}} / \text{Log}_{\text{controle}}) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

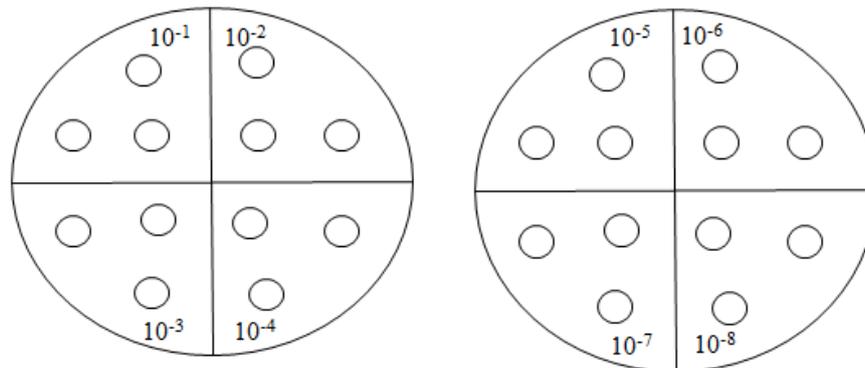
O experimento foi realizado em três momentos diferentes. As análises estatísticas foram realizadas por one-way ANOVA e teste Tukey através do programa estatístico Graph Pad Prism 7.0 software.

Figura 8. Esquema de referente ao ensaio de Antibiofilme dos quaternários de amônio e complexo quitosana+quaternário de amônio em cascas de ovos.



Fonte: próprio autor.

Figura 9. Esquema referente ao ensaio de antibiofilme dos quaternários de amônio e complexo quitosana+quaternário de amônio em cascas de ovos, montagem do Teste de Viabilidade.



Fonte: próprio autor.

4.5 ANÁLISES DA CASCA DE OVO DE GALINHA SEM A MEMBRANA PROTÉICA INTERIOR POR MEV, ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA E TERMOGRAVIMÉTRIA

As espessuras e morfologias da casca do ovo foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Utilizou-se um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM), trabalhando a 3 a 5 keV e spot 3. Para preparar as amostras, adicionou-se pequenos fragmentos do filme fixados sobre fita carbono adesiva posicionando as amostras em ângulos de 180, 90 e 45°, por último, as amostras foram secadas em estufa a 40°C por 12 horas. Este procedimento analítico permitiu que as amostras estivessem livres de umidade. As amostras foram recobertas por uma fina camada de ouro utilizando o equipamento Balzers Sputter Coater SCD 004 por 90 segundos. Essa película de ouro auxilia na condução dos elétrons que chegam até a superfície do material, contribuindo para uma imagem sem interferência e de melhor qualidade e resolução.

Foram realizadas análises de EDS (energy dispersive x-ray detector, EDX ou EDS) com mapeamento em 2D trabalhando em 25 keV e spot 4. Este dispositivo acessório foi essencial no estudo de caracterização da dispersão dos átomos de carbono, cálcio, sódio na amostra. Quando o feixe de elétrons incide sobre o material, os elétrons das camadas internas dos átomos são removidos. Os átomos dos níveis logo acima ocupam a posição do elétron removido, nesse processo o elétron libera a energia quantizada referente a diferença entre os níveis de energia da camada. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a emissão desse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local e identificar a composição química na área observada. As imagens em 2D são construídas pela análise da energia liberada da emissão dos átomos. Os raios X gerados pelos átomos atingem o detector que os transformam em sinal elétrico e o software gera a imagem de mapeamento em 2D de cada elemento químico. As imagens em 2D são construídas pela análise da energia liberada da emissão Si K_α, C K_α, O K_α, P K_α, Na K_α e Ca L_{α1}. Nas imagens, atribui-se falsas cores para os elementos, a fim de distingui-los para destacar a distribuição.

A termogravimetria (TG/DTG) foi realizada para a caracterização das amostras de casca de ovo de galinha quanto a sua composição de água/umidade, estabilidade térmica, processos de degradação térmica e etapas reacionais sob um gradiente crescente de temperatura. As amostras de cascas de ovos foram cortadas e secadas em estufa mantidas a 100°C durante 1 hora com o objetivo de eliminar resíduo de umidade antes da realização da análise térmica. As imagens foram registradas e os gráficos de degradação plotados para

a realização das análises e comparações com trabalhos disponíveis na literatura (RODRIGUES E ÁVILA, 2017).

4.6 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DA CASCA DE OVO DE GALINHA SEM A MEMBRANA PROTÉICA INTERIOR POR (TG-DSC)

As curvas TGA-DSC foram realizadas na Universidade Federal da Grande Dourados em analisador termogravimétrico Netzsch STA449 F3 Jupiter®. O sistema é constituído de um comparador de massa vertical com capacidade máxima de 20,00 mg, com forno de carbetto de silício capaz de operar no intervalo de temperatura de 30 a 1550 °C e um sistema de termopares controlados pelo software Proteus®. Para a análise das amostras foram utilizadas massas próximas a 7,935 mg e cadinhos de α -alumina com fluxo de gás de purga (ar) de 50 mL min⁻¹ e razão de aquecimento de 20°C min⁻¹.

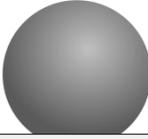
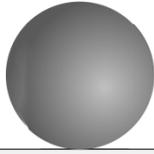
4.7 DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO (θ)

O arranjo para a medida de ângulo de contato é uma ferramenta auxiliar na investigação das propriedades físico-química de superfícies (OLIVEIRA, 2012).

Nos experimentos de medida de ângulo de contato se obtém a caracterização de hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície que está diretamente relacionada à conformação molecular da interface líquida sobre sólido.

As medidas de ângulo de contato são centrais na definição do grau de molhabilidade das superfícies. A Tabela 1 mostra os intervalos de valores de ângulos de contato compreendidos entre 0 (zero) e 180 graus acompanhada de diagramas representando os formatos esperados para as gotas d'água sobre superfícies em diferentes regimes de molhabilidade. Na Tabela 1 são apresentados os ângulos de contato e a molhabilidade da gota na superfície.

Tabela 1. Diagramas de gotas sobre superfícies com diferentes graus de molhabilidade e valores correspondentes de ângulos de contato (θ).

Regime	Super-hidrofílico	Hidrofílico	Hidrofóbico	Super-hidrofóbico
Diagrama da gota				
Ângulo de contato	$\theta < 10^\circ$	$\theta < 90^\circ$	$\theta > 90^\circ$	$\theta > 150^\circ$

Fonte: próprio autor.

Na Tabela 1 são apresentadas o comportamento da gota sobre uma superfície. Os exemplos mostram que o líquido pode molhar a superfície completamente, neste caso, a superfície é chamada super-hidrofílica. Estas superfícies são caracterizadas por apresentarem ângulos de contato (θ) com a água menores que 10° . Na sequência da Tabela 1, são apresentados dois casos, em que no primeiro, a superfície apresenta $\theta < 90^\circ$, chamada de superfície hidrofílica, ao passo que aquela no segundo, com $\theta > 90^\circ$, corresponde a uma superfície hidrofóbica (BICO, MARZOLIN E QUERE, 1999). Por fim, as superfícies nomeadas de super-hidrofóbicas são aquelas que apresentam $\theta > 150^\circ$ (NAKAGIMA, HASHIMOTO E WATANABE, 2001).

As determinações de ângulo de contato foram realizadas com amostras de casca de ovos comerciais *in natura* e revestida por filmes de quitosana a diferentes concentrações de quaternário de amônio (quats). A medida de ângulo de contato foi realizada utilizando uma câmera para aquisição das imagens, uma fonte de luz para a formação de uma imagem nítida da gota do líquido sobre a superfície estudada.

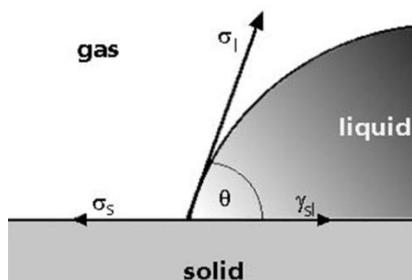
Para cada amostra foram obtidas 10 fotografias distintas de gotas d'água, de 8 microlitros (μL), aplicadas sobre a amostra seca. Uma vez que foram obtidos os ângulos de contato de ambos os lados da fotografia, lado direito e esquerdo da gota d'água, foram obtidas 20 diferentes medidas de ângulo de contato para cada amostra.

Foi utilizado o “*software*” livre para tratamento de imagem GIMP 2.8 para aferição do ângulo de contato, que é identificado na tangente à borda da gota, partindo a intersecção dos meios: líquido, sólido e gasoso.

Outro experimento foi realizado para observar o tempo de evaporação da gota d'água (e, observar a evaporação a partir da molhabilidade da superfície e tensão superficial alterada da gota). Após a deposição a gota foi deixada sobre a superfície da amostra, e acompanhada durante a evaporação no ambiente no tempo até sua completa

evaporação sob uma umidade relativa de 58 %. O esquema de medida do ângulo de contato é mostrado na Figura 10.

Figura 10. Esquema de medida o ângulo de contato junto à borda da gota do líquido.



Fonte: próprio autor.

4.8 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO (PI) OU PONTO DE CARGA ZERO (PCZ) DA QUITOSANA, QUITOSANA+QUATERNÁRIO DE AMÔNIO (I E V GERAÇÃO) E CASCA DE OVOS COMERCIAIS

A metodologia empregada para a determinação do PCZ é a do “experimento dos 11 pontos”, onde se usa pH variando de 1,0 a 12. A metodologia foi modificada para obtenção mais pontos variando o pH de pHs de 0 (1M HCl) até pH 13,8 (1M NaOH).

A metodologia empregada para a determinação do ponto de carga zero (pcz) é denominada por Regalbuto et al. (2014) como “experimento dos 11 pontos”. As amostras circulares de casca de ovos com área de 1,1035 cm² e massa média de 0,1g foram utilizadas em 40 mL de solução a diferentes pHs em tubo Falcon de 50 mL para a determinação do ponto isoelétrico (pI) ou ponto de carga zero (pcz). Normalmente, as amostras devem ser trituradas para a determinação do pI ou pcz. Entretanto, para entender as características de carga da superfície da casca ovos comerciais foram realizadas medidas após 24 horas e 96 horas de exposição aos diferentes pHs.

4.8.1 Preparação das amostras circulares de casca de ovo

Primeiramente, as cascas de ovos foram lavadas com o uso de água destilada. Após serem lavadas, as cascas foram secas em estufa (SOLAB) à 70°C por 24 horas, para

eliminação total da umidade e, assim, atingissem a condição ideal para corte de amostras circulares ou trituração. Amostras circulares foram obtidas, revestidas ou não por filme de quitosana e sais quaternários de amônio de I e V gerações, posteriormente, foram trituradas em almofariz para caracterizações. Depois de trituradas, as cascas de ovos foram peneiradas utilizando uma peneira com 0,177mm de abertura e marca GRANUTEST, obtendo-se assim um fino pó e armazenadas para experimentos.

4.8.2 Preparação das soluções ácidas e básicas a diferentes pHs

As soluções empregadas nos experimentos foram obtidas de soluções comerciais padronizadas de 1 M de HCl e 1 M de NaOH, da marca Dinâmica. As soluções padrões foram sucessivamente diluídas na relação de 1:10 (v/v) com o pH corrigido para os valores de pHs estipulados pela metodologia no Laboratório de Química de Alimentos da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD.

A preparação de soluções ácida e básicas a diferentes pHs consistiu em diluir sucessivamente 50 mL de cada solução preparada em balão volumétrico de 500 mL, completando o mesmo com solução de NaCl a 0,1M. Obtendo-se soluções de pH de 0 a 13,8 em NaCl a 0,1M. A partir da solução de ácido clorídrico pH 0 (1M), pode-se por diluição sucessivas preparar soluções de pH 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. A preparação da segunda solução básica consistiu em diluir sucessivamente 50 mL de solução em balão volumétrico de 500 mL com água destilada, completando o mesmo com água destilada. Pode-se, assim, obter soluções de NaOH de pH 13,8 (1M) até pH 13, 12, 11, 10, 9 e 8.

4.8.3 Determinação do Ponto Isoelétrico (pI) ou Ponto de Carga Zero (pcz) da casca de ovo

Para a determinação do ponto de carga zero foi-se pesado as amostras circulares das cascas de ovos com aproximadamente 0,1g (100 mg) e adicionadas aos mesmos 50 mL de solução aquosa 0,1 M NaCl com valores de pH variando de 0 a 13,8 em tubos Falcon de 50mL, os quais foram transferidos para uma mesa agitadora (marca QUIMIS) sob agitação de 10 rpm, por 24 horas e 96 horas. Depois de 24 horas e 96 horas de equilíbrio mediu-se o pH final com o auxílio de um pHmetro de bancada (PHMETER JK-PHM-005) previamente calibrado com soluções padrão de pH 4 e de pH 7.

4.9 DETERMINAÇÃO DO VOLUME E ÁREA SUPERFICIAL DE OVOS

Para a determinação do volume (V) e área superficial (As) dos ovos de galinha foram utilizadas os métodos de predição/estimativa por meio de equações empíricas segundo a metodologia e equações propostas por Ebersson Silva (2014).

Estes valores experimentais ou preditos/estimados são importantes para a produção e análise da espessura e comportamento dos filmes de quitosana com ou sem quaternários de amônio (I e V geração), principalmente, para análise da permeação a vapor de água (PVA), resistência mecânica e outras propriedades. A partir da análise da área superficial (As), volume (V) e determinação da massa de embebição dos ovos por soluções de quitosana ou quitosana + quaternários de amônio (I e V geração) que serão produzidos sobre a superfície do ovo ou em placa de Petri os filmes equivalentes de quitosana e quitosana + quaternários de amônio (I e V geração) para análise do comportamento dos filmes, capacidade de selamento da superfície, influência da permeação de vapor de água (PVA), aderência, porosidade e outras propriedades sobre a estrutura superficial dos ovos compostas basicamente de carbonatos de cálcio e magnésio (calcárea) dos ovos.

4.10 MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁREA SUPERFICIAL (AS) E VOLUME (V) DE OVOS (MÉTODO PREDITIVO/ESTIMATIVO)

As medições foram realizadas por paquímetro digital da longitude (maior comprimento) e lateral/largura (tomando duas medidas a 90° e realizando a média para o cálculo) com as equações 4 ($As = (3,155 - 0,0136.C + 0,0115.L).C.L$) e 6 ($V = 2.\pi.C^3 / 3.(3.n+1)$) de Narushin (2005) e validadas por Silva (2014) por ajuste de polinômios para análise da precisão e continuidade dos estudos de aplicação do filme bioativo e estabelecimento do processo de recobrimento superficial por solução filmogênia com quitosana e quaternários de amônio (I e V geração). Os valores experimentais das pesagens de ovos, no mínimo, de 12 ovos foram realizados para análise de perda de massa de ovos comerciais revestidos por filmes de quitosana e quaternários de amônio e não revestidos.

Métodos preditivos e estimativos podem ser utilizados com relativa precisão para a estimativa de área superficial (As) (cm²) e volume (V) (cm³). A literatura disponibiliza estudos e equações que podem ser utilizados a partir de considerações estabelecidas para a

predição e estimativa da área e volume de ovos, com erros estimados em +/- 5% (NARUSHIN, 1993; NARUSHIN, 1997, NARUSHIN, 2001).

Narushin (1993; 1997; 2001; 2005) disponibiliza inúmeras relações e equações empíricas para determinação de área superficial (A_s) e volume (V) de ovos de galinha poedeira e equações mais abrangentes para qualquer tipo de ovos. O autor mostra que se pode predizer/estimar a área superficial (A_s) e volume (V) em função do comprimento (C), largura do ovo (L), circunferência longitudinal (C_L) e volume do ovo (V) obtidos por medidas experimentais em milímetro (mm) ou centímetro (cm) ou por deslocamento de volume por imersão, usos de parquímetro e/ou fita métrica. As equações e respectivos parâmetros de cálculo são mostrados a seguir:

$$A_s = 4,7881 \cdot V^{2/3} \cdot C^{0,104}/L \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: A_s : é área superficial do ovo (cm^2); V : volume do ovo (cm^3); C : comprimento (mm) e L : largura máxima (mm)

$$A_s = 3,142 \cdot C^2 \cdot n^{-0,532} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde, o parâmetro n pode ser calculado pela equação (3) e os parâmetros da equação (2) são: A_s : área superficial do ovo (cm^2); C : comprimento máximo do ovo (mm); n : parâmetro usado para o cálculo de A_s e L : largura máxima do ovo (mm).

$$n = 1,057 \cdot (C/L)^{2,372} \quad (\text{Equação 4})$$

Narushin (2005) mostra que pode se utilizar os parâmetros comprimento (C) e largura máxima para cálculo da área superficial (A_s) de ovos de galinha poedeira pelas equações 4 e 5 com coeficiente de determinação de 0,96.

$$A_s = (3,155 - 0,0136 \cdot C + 0,0115 \cdot L) \cdot C \cdot L \quad (\text{Equação 5})$$

$$A_s = (0,9658 \cdot L/C + 2,1378) \cdot C \quad (\text{Equação 6})$$

Para o volume (V) Narushin (2001) mostra que o volume do ovo de galinha poedeira pode ser estimado pela equação 6 com coeficiente de determinação de 0,955 para qualquer tipo

de ovo.

$$V = 2.\pi.C^3 / 3.(3.n+1) \quad (\text{Equação 7})$$

Onde: C: comprimento do ovo (cm); n: coeficiente da formula (adimensional)

Para o experimento do trabalho as análises de medida de área e volume foram realizadas em 24 ovos baseadas nas equações 4 e 6 e Narushin validadas por Silva (2014), para as medições utilizou-se um parquímetro digital da longitude (maior comprimento) e lateral/largura (tomando duas medidas a 90° e realizando a média para o cálculo) as medidas foram inseridas nas fórmulas e os resultados obtidos. Após os cálculos, os 24 ovos foram pesados e revestidos por um filme de bioativos quitosana 1% e quaternário 1%, para verificação de perda de massa de ovos comerciais revestidos por filmes de quitosana e quaternários de amônio. As pesagens foram realizadas utilizando-se uma balança analítica a cada dois dias.

4.11 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS OVOS

As análises foram realizadas dois dias após a postura, os ovos receberam a pulverização do revestimento de quitosana e quaternário de amônio I e V geração nas devidas proporções, ovos identificados com a numeração 1 a 4 ovos com 1% de quitosana, numeração 5 a 8 ovos revestidos com 1% de quitosana e 1% de quaternário de amônio de I geração, ovos número 9 a 12 revestidos com 1% de quitosana e 1% de quaternário de amônio de V geração, ovos numeração 13 a 16 revestidos com quitosana a 2%, ovos número 17 a 20 revestidos com 2% de quitosana e 1% de quaternário de amônio de I geração, ovos 21 a 24 revestidos com 2% de quitosana e 1% de quaternário de amônio de V geração e ovos numerados 25 a 28 sem revestimentos. Os ovos foram mantidos na temperatura de 25°C por 28 dias em embalagens vazadas para distribuição do ar. De cada amostra numerada foram separados quatro ovos para que as análises fossem repetidas durante quatro semanas a partir da análise ponto 0. Um total de 28 ovos foram separados para análise de perda de massa específica durante 26 dias, sendo repetidas as pesagens a cada dois dias 48/h total de três análises por semana. Os ovos foram individualmente identificados e pesados em balança analítica da marca Bel engineering M214A com escala de precisão de 0,5 gramas. Cada grupo foi submetido à quebra em texturômetro o qual registrou a força necessária para romper as cascas. Os ovos separados utilizados para as

medições de resistência e espessura da casca também foram usados para a determinação da colorimetria da gema, assim como atividade de água e umidade da gema e clara.

Nas avaliações de resistência da casca, utilizou-se três amostras de ovos com seus devidos revestimentos e sem revestimento uma vez por semana durante quatro semanas. A força necessária para quebrar a casca, em gramas, foi determinada por meio do aparelho Texture Analyser- Stable microsystems TAHDi 3010 pertencente ao Setor de Análise de Alimentos, da Universidade UFGD. Foi utilizada uma sonda P4 DIA Cylinder de aço inoxidável de 4mm de diâmetro, com distância de 6mm e velocidade pré, durante e pós-teste de 0,5; 0,5; e 2,0mm/s, respectivamente. A força de gatilho da sonda foi de 3,0g. O teste seguiu o método de fratura por compressão, em que o ovo inteiro é colocado longitudinalmente, sobre um suporte de metal em forma de anel com 6cm de diâmetro dentro de um béquer. A casca é pressionada até que ocorra a fratura, e a força necessária usada é a indicadora da resistência da casca.

A medida da espessura da casca foi realizada com um auxílio de um micrômetro digital 0-25mm. A mensuração foi efetuada nos ovos utilizados para a análise de resistência. Estas cascas foram separadas e medida da espessura de cada região sem a retirada da membrana interna, espessura média da casca do ovo, foi calculada por meio da média das três regiões e seu valor foi expresso em milímetros (mm).

Os métodos colorimétricos são importantes para avaliar a pigmentação da gema que atribui uma maior aceitação do produto no mercado, a gema é alocada no aparelho Chroma Meter CR-400 Konica Minolta o resultado é mensurado em um contraste de cores que vão do amarelo claro ao vermelho alaranjado. As análises de cor de gema foram realizadas através do método objetivo (L, a, b) e os resultados obtidos submetidos a comparação de médias.

A quantificação da cor da gema foi registrada com o colorímetro Chroma Meter CR-400 Konica Minolta previamente calibrado, avaliando o espaço de cores L, a * b * onde (L) significa leveza a luminosidade variando do branco ao preto, (a) vermelhidão caracterizando a região do vermelho ao verde, e (b) intervalos que vão do amarelo ao azul. Foram realizadas médias de luminosidade (L *), vermelhidão (a *) e amarelecimento (b *) de ovos sem revestimentos e com diferentes revestimentos sob diferentes condições de tempo de armazenamento à temperatura ambiente. Os ovos foram quebrados em superfície plana e a medição foi realizada diretamente na superfície da gema, mantendo-a íntegra.

A análise de atividade de água foi realizada em duplicata nas amostras de clara e gema de ovos utilizando o aparelho aqualab Braseq que dispõe de lâmina higroscópica de cloreto de lítio e altera a resistência elétrica fornecendo a umidade relativa.

A análise de umidade de foi realizada no laboratório de alimentos da UFGD, os cadinhos após identificados e pesados foram colocados na mufla a 105°C por duas horas após período foram resfriados em dessecadores e submetidos a nova pesagem. As amostras de claras e gemas de ovos foram pesadas nos cadinhos preparados e tarados em uma quantidade entre 3 a 5 gramas e encaminhadas a estufa a 105° por 24 horas. Retiradas as amostras foram alocadas em dissecadores para esfriar e em seguidas pesadas em balança eletrônica determinando a quantidade de matéria seca e a umidade em relação ao peso inicial da amostra. Tais análises foram repetidas por quatro semanas.

No início do experimento (dia zero) todos os ovos foram pesados individualmente de acordo com cada tratamento utilizando uma balança analítica da marca Bel engineering M214A e um béquer de apoio em cada tempo de avaliação. Foram realizadas 13 pesagens e pela diferença de massas inicial e final foi obtida a percentagem da perda de massa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS QUATERNÁRIOS I E V GERAÇÃO

5.1.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

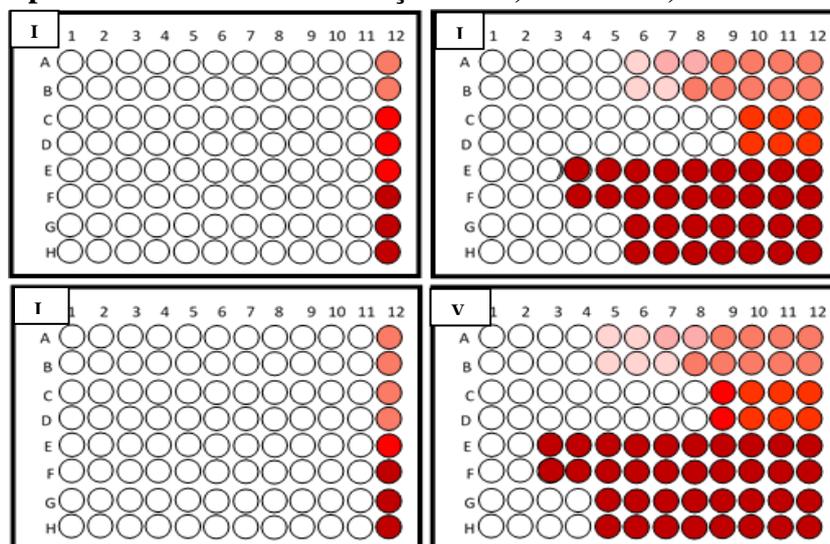
Os compostos de quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração, concentração de 80%) apresentaram atividade antibacteriana de inibição de crescimento frente às linhagens de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, com CIM variando de 0,00014 a 0,00937 % mL⁻¹, dados apresentados na Tabela 2 e representado na Figura 11.

Tabela 2. Valores experimentais para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos de quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração, concentração de 80%) para as linhagens/cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Micro-organismo	CIM (% mL ⁻¹)	
	PB QT 80	PB CLBZ 05
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,00117	0,00234
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	0,00029	0,00014
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	0,00468	0,00937
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,00117	0,00234

Fonte: próprio autor.

Figura 11. Placas referentes aos resultados do teste CIM. Placas I e II estão representados os resultados do teste com PB QT 80 (V geração) e nas placas III e IV estão representados os resultados do teste com PB CLBZ 05 (I geração), onde as placas I e III as colunas 2-11 representam as concentrações de 4,8 à 0,009375% % mL⁻¹ e nas placas II e IV as concentrações de 0,009375 à 0,0000183105 % mL⁻¹.



Fonte: próprio autor.

Os compostos de quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração, concentração de 80%) apresentaram atividade antibacteriana bactericida frente às linhagens de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, com CBM variando de 0,00014 a 0,00937 % mL⁻¹, dados apresentados na Tabela 3 e representado na Figura 11. As concentrações que apresentaram inibição de crescimento no teste CIM foram às mesmas que apresentaram ação bactericida do teste CBM.

Tabela 3. Valores experimentais da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os quaternários de amônio PBQT80 (V geração) e PB CLBZ 05 (I geração) para as linhagens/cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
CBM (% mL⁻¹)

Micro-organismo	PB QT 80	PB CLBZ 05
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,00117	0,00234
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	0,00029	0,00014
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	0,00468	0,00937
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,00117	0,00234

Fonte: próprio autor.

A atividade antimicrobiana do quaternário de amônio é atribuída à inativação de enzimas responsáveis pelos processos de transformação de energia, à desnaturação de proteínas celulares e à ruptura da membrana celular (ROMÃO, 1996). Borowsky et al. (2006) ao confrontar amostras de *Salmonella* Typhimurium a duas concentrações diferentes, $0,1\text{mgL}^{-1}$ (concentração recomendada) e $0,05\text{mg L}^{-1}$ (subconcentração) de amônio quaternário observou eficiência de 100% em ambas as concentrações.

5.2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ÁCIDO ACÉTICO, QUITOSANA, COMPLEXO QUITOSANA+QUATERNÁRIO DE AMÔNIO (I E V GERAÇÃO)

5.2.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

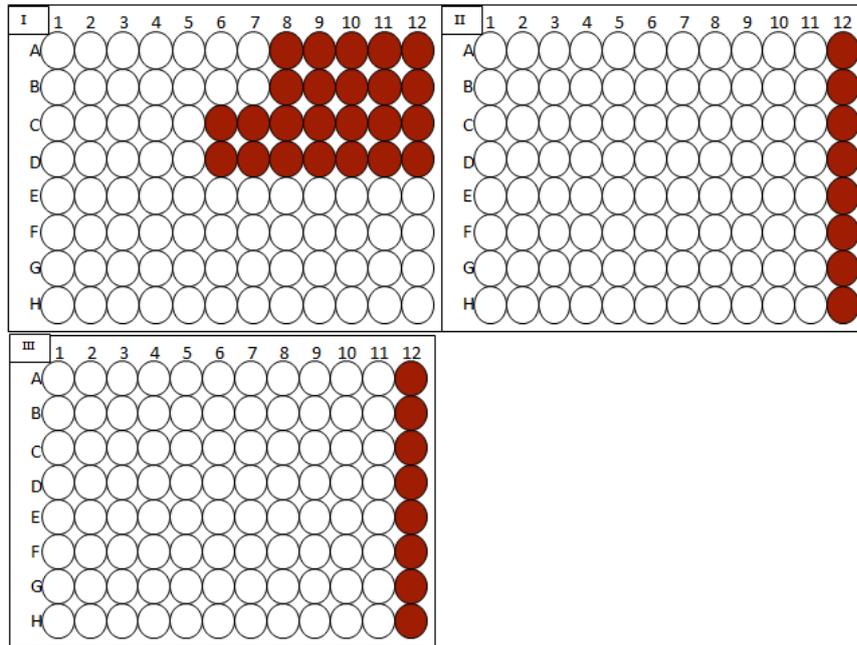
Os compostos ácido acético, quitosana e complexo quitosana+ quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração, concentração de 80%) apresentaram atividade antibacteriana de inibição de crescimento frente a linhagem *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, com CIM de $0,25\%/mL$ para ácido acético, de $0,0625\% \text{ mL}^{-1}$ para quitosana, de $0,25/0,0000091553$ para o complexo Quitosana+ PB QT 80 e de $0,25/0,00000457765\% \text{ mL}^{-1}$ para o complexo Quitosana+ PB CLBZ 05, dados apresentados Tabela 4 e representado na Figura 12.

Tabela 4. Valores experimentais Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\% \text{ mL}^{-1}$ para os compostos ácido acético, quitosana e complexo quitosana+ quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração), frente a linhagem de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.

Compostos	CIM ($\% \text{ mL}^{-1}$)
Ácido acético	0,25
Quitosana	0,0625
Quitosana+ PB QT 80	0,25/0,0000091553
Quitosana+ PB CLBZ 05	0,25/0,00000457765

Fonte: próprio autor.

Figura 12. Placas representativas referentes aos resultados do teste CIM para os compostos ácido acético, quitosana e complexo quitosana+ quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração), frente a linhagem de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.



Fonte: próprio autor.

Os compostos, ácido acético, quitosana e complexo quitosana+ quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração, concentração de 80%) apresentaram atividade bactericida frente a linhagem *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, com CBM de 1,0% mL⁻¹ para ácido acético, de 0,25 % mL⁻¹ para quitosana, de 0,25/0,0000091553 para o complexo Quitosana+ PB QT 80 e de 0,25/0,0000091553% mL⁻¹ para o complexo Quitosana+ PB CLBZ 05, dados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores experimentais Concentração Bactericida Mínima (CBM) em % mL⁻¹ para os compostos ácido acético, quitosana e complexo quitosana+ quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração), frente a linhagem de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.

Compostos	CBM (% mL ⁻¹)
Ácido acético	1,0
Quitosana	0,25
Quitosana+ PB QT 80	0,25/0,0000091553
Quitosana+ PB CLBZ 05	0,25/0,00000457765

Fonte: próprio autor.

A atividade antimicrobiana de grupos quaternários de amônio é atribuída à sua parte iônica combinada a uma cadeia lipofílica (MUNHOZ-BONILLA E FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2015). Palermo et al.(2011) descobriu que a cadeia alquílica pode penetrar na célula causando lise e morte. Li et al.(2013) mostrou uma grande diminuição na unidade formadora de colônias (UFC) em amostras contendo grupos de amônio com 12 carbonos de comprimento.

A atividade antimicrobiana da quitosana pode estar relacionada com sua natureza catiônica (RABEA et al., 2003; GOY et al., 2009). A interação eletrostática entre os sítios RN (CH₃)³⁺ carregados positivamente e as membranas celulares microbianas carregadas negativamente ocasiona na lise celular microbiana sendo este o principal mecanismo antimicrobiano, além de que a quitosana também pode interagir com nutrientes essenciais, interferindo no crescimento microbiano (JIA et al.,2001; RABEA et al., 2003; TRIPATHI et al., 2008). Zheng e Zhu (2003) relacionaram a ação antimicrobiana da quitosana frente a bactérias gram negativas que a quitosana de baixa massa molar penetra mais facilmente nessas bactérias, causando distúrbios no metabolismo desses micro-organismos.

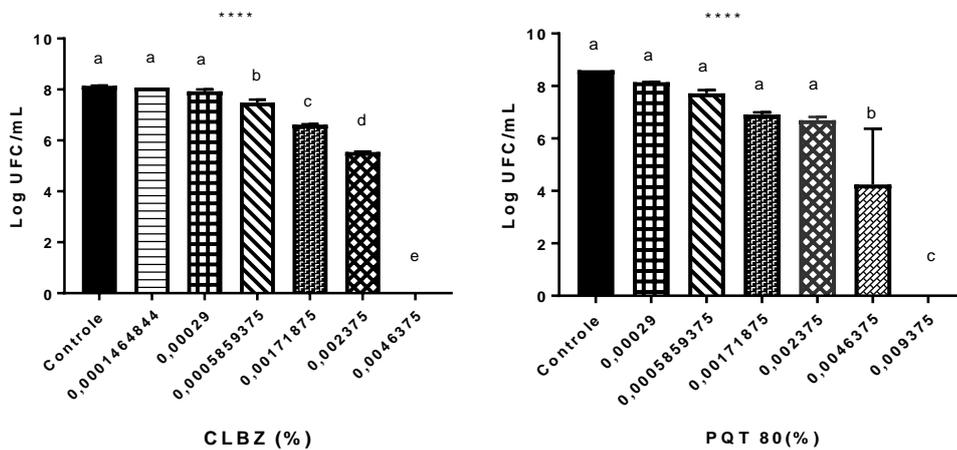
Ação sinérgica de quitosana e outros compostos vêm sendo utilizada, neste trabalho podemos avaliar que a houve uma melhora na atividade dos quaternários de amônio em conjunto com a quitosana. Em uso conjunto, ambos os compostos podem assegurar sua atividade antimicrobiana, pois a quitosana se torna eficiente por ser um polímero policatiônico, que compete com os cátions bivalente ligando-se na camada externa dos micro-organismos e por ser eficiente como matriz para revestimento (VU et al., 2011) e os quaternários de amônio pela sua atividade antimicrobiana e de seus derivados contra um largo espectro de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.

5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA: EFEITO DE QUATERNÁRIO DE AMÔNIO E COMPLEXO QUITOSANA+QUATERNÁRIO DE AMÔNIO NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

A atividade de quaternários de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração, concentração de 80%) e do complexo quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração, concentração de 80%)+quitosana sobre a formação de biofilme de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076

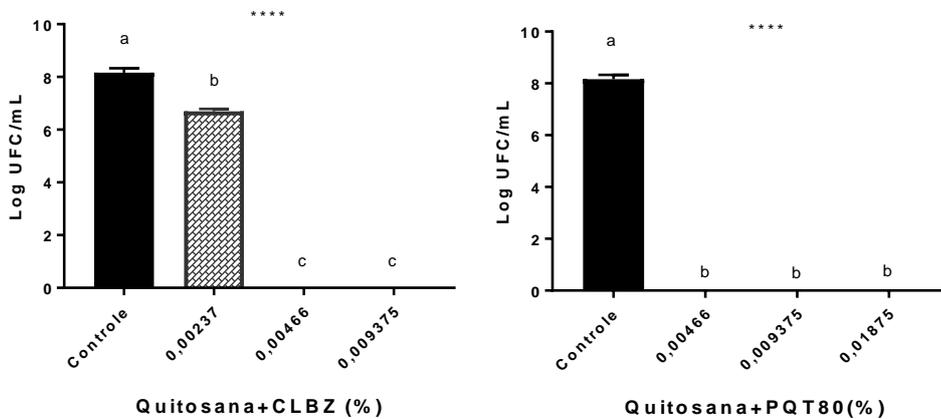
pode ser observada na Figuras 13 e 14 por meio do número das células viáveis (em Log UFC). Pode-se observar que, quando utilizado os compostos em menor concentração, houve uma redução das células capazes de formar biofilme. Nas concentrações de 0,0046375 %/mL para quaternários de amônio PB CLBZ 05, 0,009375% mL⁻¹ para quaternários de amônio PB QT 80, 0,0046375/1 % mL⁻¹ para complexo quaternários de amônio PB CLBZ 05/quitosana e 0,0046375/1 % mL⁻¹ para complexo quaternários de amônio PB QT 80/quitosana houve redução de 100% das células com capacidade de formar biofilme de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 quando comparada ao controle sem tratamento.

Figura 13. Efeito dos quaternários PQT 80 e CLBZ na formação do biofilme de *Salmonella* Enteritidis ** p <0.001 (ANOVA).**



Fonte: próprio autor.

Figura 14. Efeito dos complexos Quitosana 1%+PQT 80 e Quitosana1%+CLBZ na formação do biofilme de *Salmonella* Enteritidis ** p <0.001 (ANOVA).**



Fonte: próprio autor.

Importante característica das espécies de *Salmonella* é a habilidade de formar biofilmes em diferentes superfícies presentes em ambientes de processamento de alimentos (STEENACKERS et al., 2012). A formação de biofilmes tornou-se um problema de grande importância em uma ampla gama de indústrias alimentícias. Esses estão associados a deterioração e doenças transmitidas por alimentos podendo resultar em enormes perdas econômicas e ameaça a segurança alimentar (GIBSON et al., 1999).

Os biofilmes inseridos em uma superfície são mais resistentes que bactérias em forma planctônicas (NGUYEN E YUK, 2013). A resistência do biofilme pode ser devida a diferentes fatores, desde a inibição da difusão do agente desinfetante por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), heterogeneidade fisiológica causada pelos gradientes de nutrientes e oxigênio gerados no biofilme. Por isso, os processos de limpeza e desinfecção são as atividades mais importantes para o controle de biofilmes na indústria de alimentos, sem um tratamento adequado pela aplicação de desinfetantes, os micro-organismos podem colonizar e persistir em superfícies de contato com alimentos (GIBSON et al., 1999; MAH E O'TOOLE, 2011)

Os resultados experimentais do estudo mostraram que os quaternários de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração, concentração de 80%) apresentaram atividade similar contra a formação de biofilme de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Brake e Sheldon (1990) encontraram redução de 98% da contaminação microbiológica da casca de ovos pulverizados com solução de quaternário de amônio. Estes agentes podem ser utilizados como desinfetantes de superfícies de ovos com o intuito de controlar a salmonelose (SPINOSA et al., 2006).

O complexo quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração, concentração de 80%)+quitosana também apresentaram atividade contra a formação de biofilme de de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Porém, o uso sinérgico se manteve nas mesmas concentrações para o quaternário de amônio PB CLBZ 05 e que houve uma melhora na atividade do quaternário de amônio PB QT80 em conjunto com a quitosana. Filme de quitosana em ovos tem demonstrado ser um método de conservação e barreira física, a fim de minimizar a perda de qualidade durante o armazenamento, possibilitando extensão da vida de prateleira por evitar perda de água e dióxido de carbono através dos poros da casca, fatores estes responsáveis por alterações na qualidade interna e a quitosana forma uma barreira para os micro-organismos (BHALE et

al., 2003, STADELMAN, 1995; LIU, 2007). Sendo assim o uso sinérgico fornece uma segurança microbiana e de qualidade superficial e interna para os ovos.

5.4. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE E ESPESSURA DAS AMOSTRAS DE CASCA DE OVO

Na Tabela 6 são mostradas as dimensões das amostras circulares cortadas para realização dos experimentos físico-químicos e microbiológicos.

Tabela 6. Valores de massa, diâmetro e área superficial de ovos comerciais.

Amostras	Massa (g)	Diâmetro (cm)	Área superficial (cm ²); $As = \pi.r^2$
Casca de ovo (controle)	0,1005±0,0133	1,17±0,06	1,076±0,003
Casca de ovo+filme 1%+quaternário 0,25%	0,1010±0,030	1,2±0,00	1,131±0,00
Casca de ovo+filme 1%+quaternário 0,50%	0,0989±0,015	1,2±0,00	1,131±0,00
Casca de ovo+filme 1%+quaternário 1,0%	0,0959±0,045	1,17±0,06	1,076±0,003
	Σ 0,3963 0,0991	Σ 4,74 1,19	Σ 4,414 1,1035

* mesmas amostras preparadas e enviadas para análise na Horiba, UFSCar, ângulo de contato e TG/DSC-UFGD.

Fonte: próprio autor.

5.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

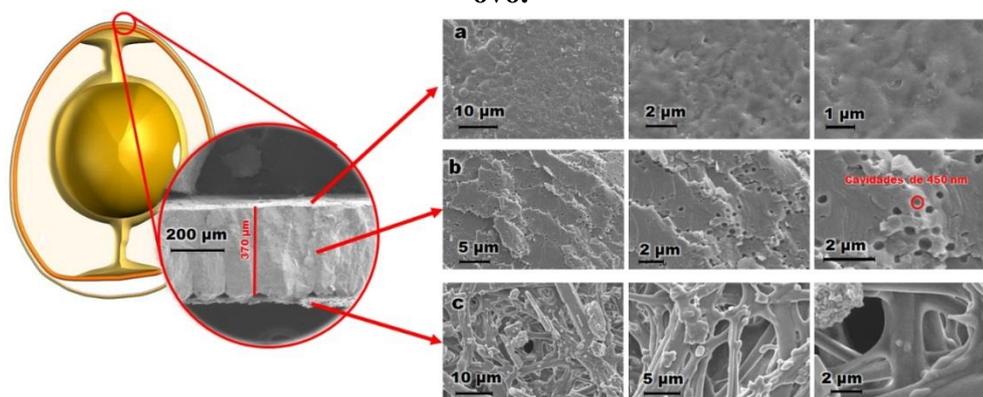
As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram que a casca possui espessura de 353 nm, na imagem são destacadas três regiões da casca do ovo (Figura 15). A primeira região é a superfície externa do ovo que possui uma superfície rugosa com cavidades esféricas (Figura 15a). A morfologia da casca do ovo pode sofrer alterações relacionados a transformação biológica e por fatores relacionados com ciclo fisiológico da ave, como a alimentação, ambiente de criação, práticas de manejo e outros procedimentos sanitários.

A segunda região é a secção transversal da casca, mais especificamente a imagem em ângulo de 90° da casca e na região de fratura, podemos observar a prevalência de maior número de cavidade esféricas, muito possivelmente eram bolhas de água que ficaram

aprisionadas no processo de formação da casca, que depois de um tempo secaram e deram origem a cavidade esféricas com tamanho homogêneo em torno de 450 nm (Figura 15b). As cavidades estão distribuídas homogeneamente em uma relação de 6 cavidades/10 μm^2 . A superfície externa também possui cavidades que são mais difíceis de perceber devido a rugosidade e material orgânico que recobre parte das cavidades.

A terceira região é a superfície interna do ovo, essa superfície está recoberta por um filme proteico na forma de longas fibras de 2 μm de espessura (Figura 15c). O filme não é compacto, sendo possível observar a formação de poros na estrutura das fibras. A estrutura do filme proteico é composta por uma rede polimérica de glicoproteínas, mucoproteínas, colágeno e mucopolissacarídeos, que possui atividade bactericida e é a segunda barreira de proteção do ovo.

Figura 15. Imagens de MEV da superfície do ovo em diferentes magnificações. a) superfície externa; b) superfície da fratura da casca; c) superfície interna da casa do ovo.

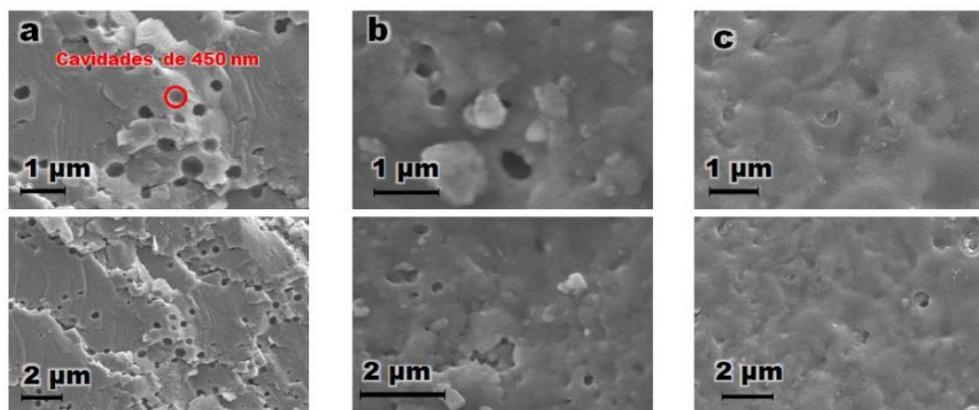


Fonte: próprio autor.

O tratamento da superfície externa com quitosana + quaternário de amônio possibilita a formação de um filme fino que recobre a superfície conferindo uma barreira contra a proliferação de micro-organismo. Uma análise qualitativa da presença do filme pode ser observada na Figura 16. No item 16 a podemos observar a superfície da fratura contendo inúmeras cavidades esféricas com tamanho de 450 nm distribuídos homogeneamente por toda a extensão da superfície. O item 16b mostra a superfície externa do ovo controle, observamos uma superfície irregular apresentando inúmeras cavidade. No item 16c observamos a superfície externa da casca do ovo tratado com o polímero quitosana+quaternário. Quando comparamos as três superfícies observa-se que a imagem

16c apresenta cavidade recobertas e em alguns casos elas não aparecem claramente. A análise de EDS vem confirmar a observação qualitativa.

Figura 16. Imagens da superfície do ovo. a) superfície da fratura da casca; b) superfície externa do ovo controle; c) superfície externa da casa do ovo recoberto pelo filme de quitosana + quaternário.



Fonte: próprio autor.

Na Figura 16 podemos observar o gráfico de EDS da superfície da fratura da casca do ovo e superfície recoberta com quitosana+quaternário de amônio. Podemos observar que a composição em ambas as superfícies são similares, contendo a energia liberada da emissão C K α , O K α , Mg K α , P K α e Ca K α . É possível observar claramente, depois do zoom na região entre 0,2 a 0,8 KeV, os picos referentes a emissão do C K α e O K α . O gráfico deixa claro que há uma maior quantidade de carbono na superfície da casca tratada com quitosana+quaternário quando comparada com a superfície da fratura da casca. A Tabela no item 17b apresenta os valores em porcentagem atômica dos elementos carbono, oxigênio e cálcio. É possível constatar que a superfície tratada com o polímero contém 39,93% de carbono e a fratura possui 19,57% de carbono. Esse é um indício quantitativo da presença do filme polimérico de quitosana na superfície do ovo.

Figura 17. Análise da superfície da casca do ovo. a) Gráfico dos resultados da análise SEM/EDS; b) tabela com a porcentagens atômicas de oxigênio, carbono e cálcio e imagem de MEV

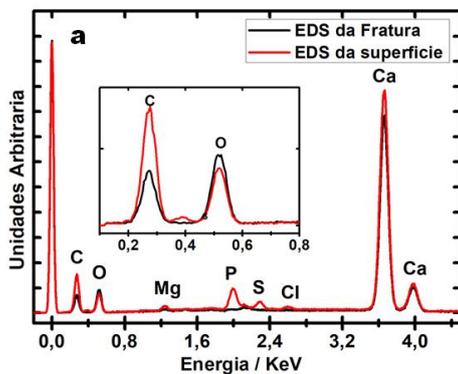
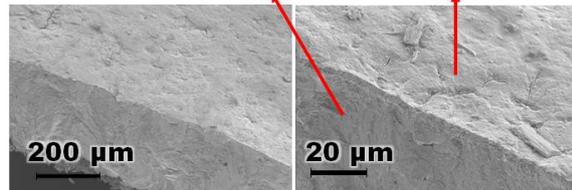


Tabela 1: Análise de EDS da superfície e da fratura da casca do ovo

Elemento	% atômica fratura	% atômica superfície
Carbono	19,57	39,93
Oxigênio	51,58	32,73
cálcio	28,18	23,58

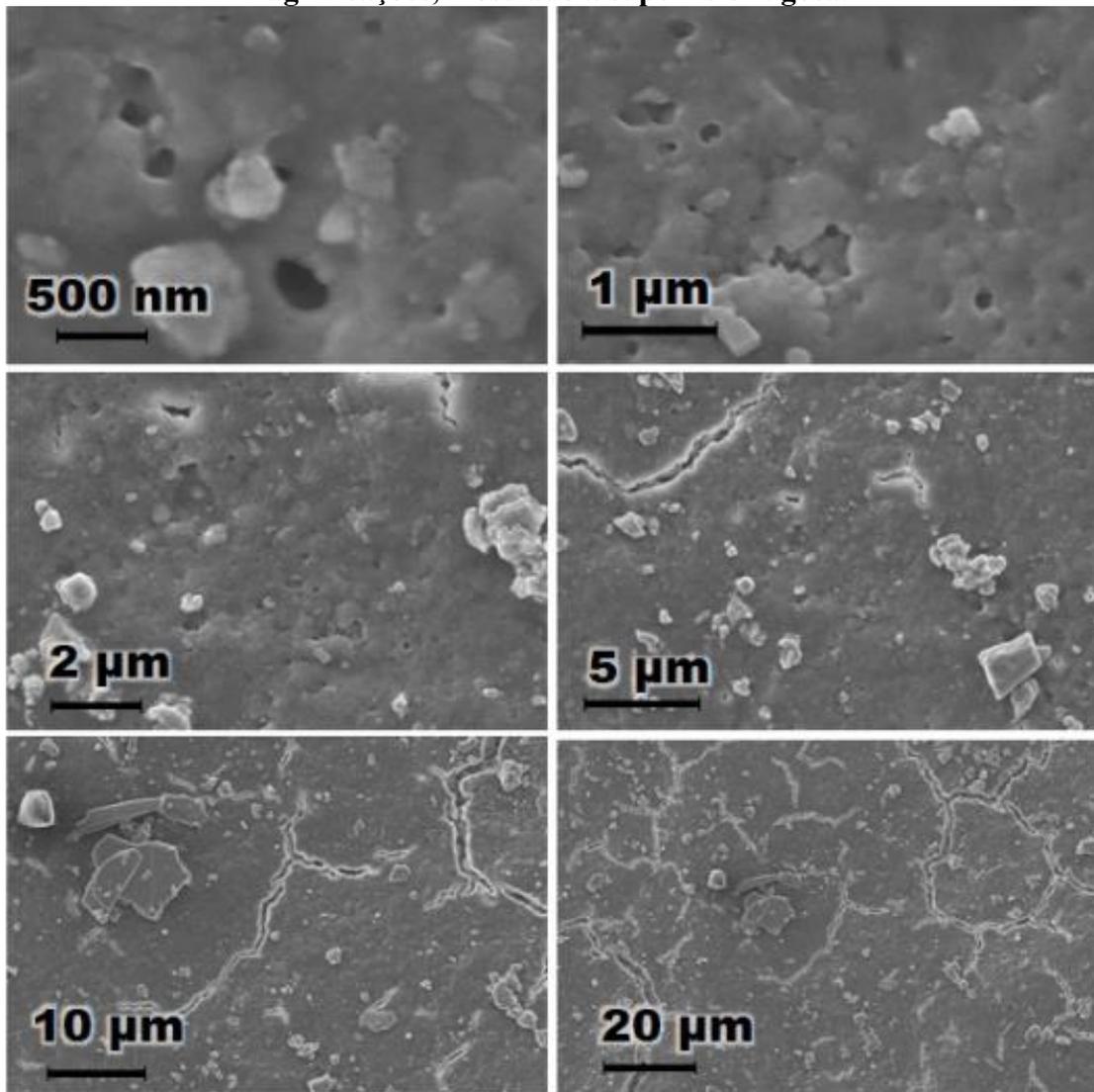


Fonte: próprio autor.

A sequência de Figuras 08, 09 e 10 são imagens da superfície da casaca do ovo, superfície da fratura da casca e superfície interna da casca, respectivamente.

A primeira região é a superfície externa do ovo que possui uma superfície rugosa com cavidades esféricas (Figura 08a) em oito magnificações, onde é possível observar os detalhes micrométricos e milimétricos da superfície.

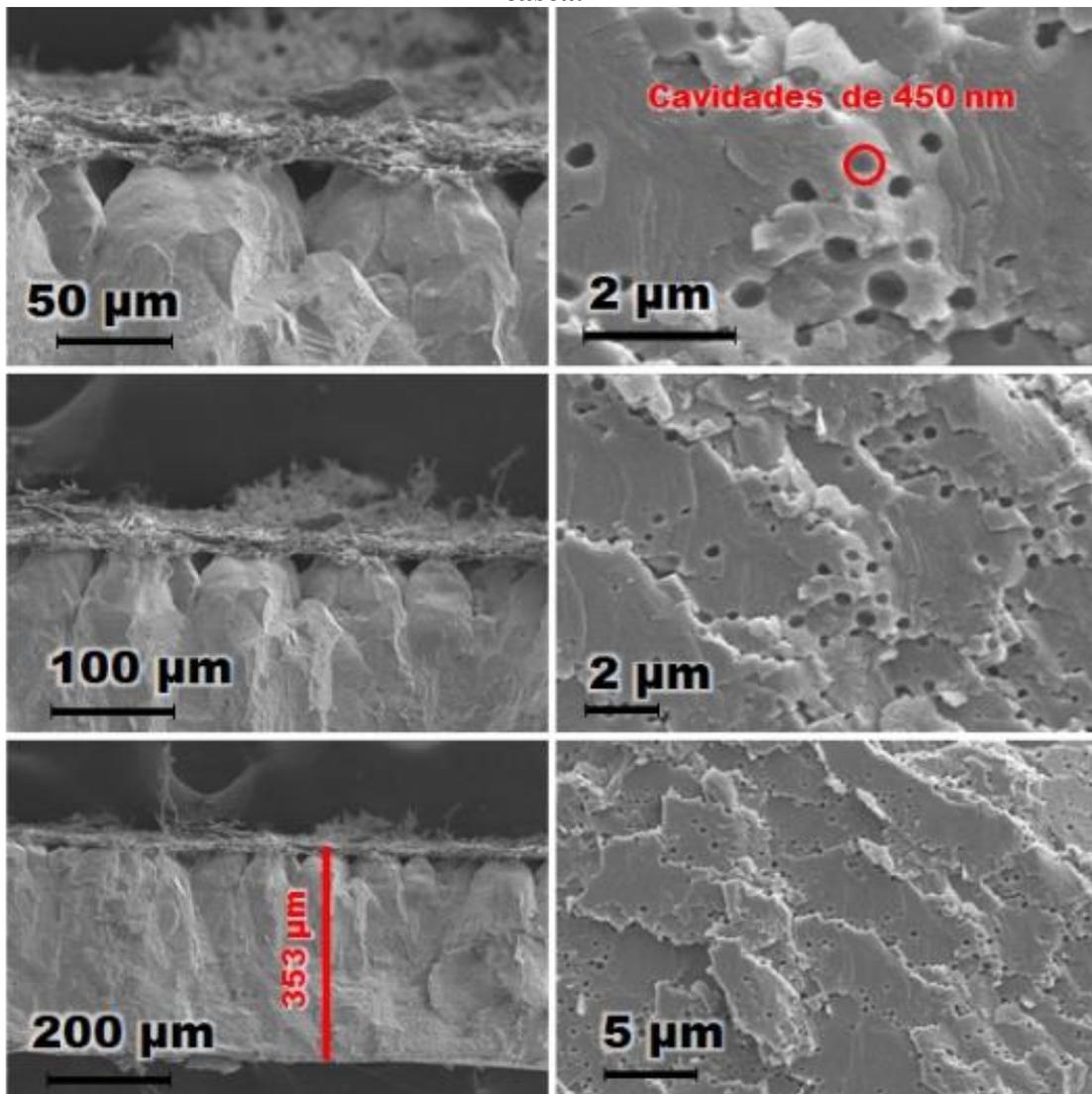
Figura 18. Imagens de MEV da superfície externa do ovo controle em diferentes magnificações, mostrando a superfície rugosa.



Fonte: próprio autor.

A segunda região é a secção transversal da casca, mais especificamente a imagem em ângulo de 90° da casca e na região de fratura, podemos observar a prevalência de maior número de cavidade esféricas (Figura 19) em oito magnificações, onde é possível observar os detalhes micrométricos e milimétricos da superfície.

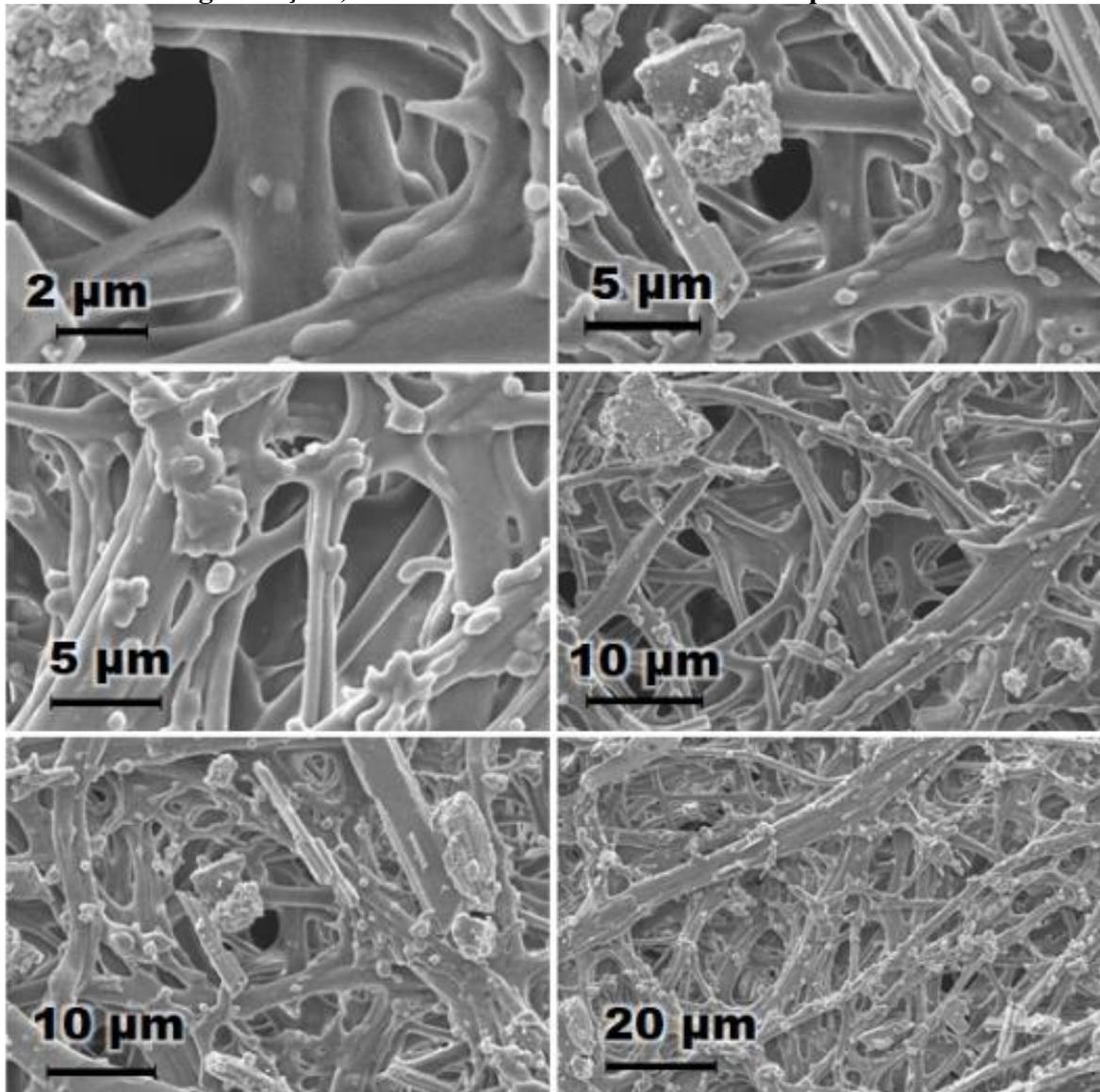
Figura 19. Imagens de MEV da superfície da fratura do ovo controle em diferentes magnificações, mostrando a espessura da casca e as cavidades esféricas presente na casca.



Fonte: próprio autor.

A terceira região é a superfície interna do ovo, essa superfície está recoberta por um filme proteico na forma de longas fibras de 2 μm de espessura (Figura 20) em oito magnificações, onde é possível observar os detalhes micrométricos e milimétricos da superfície.

Figura 20. Imagens de MEV da superfície interna do ovo controle em diferentes magnificações, mostrando o filme de fibras de bio-polímero.



Fonte: próprio autor.

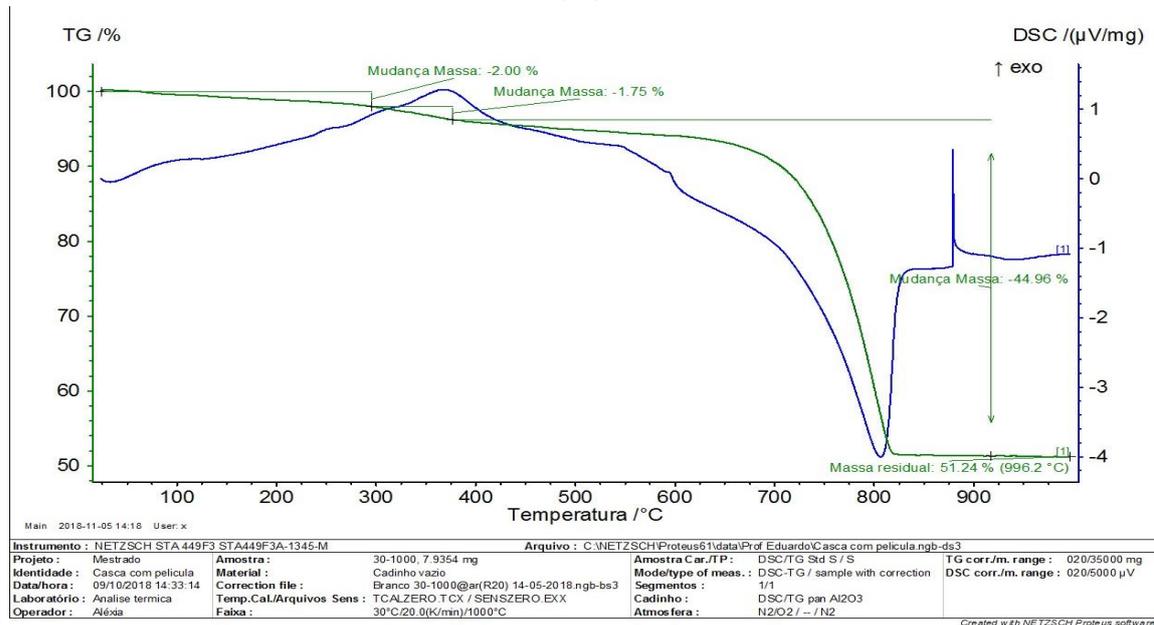
5.4.2 Análise Termogravimétrica (TG/DTG)

A casca do ovo é constituída basicamente por carbonato de cálcio (CaCO_3) e pequenas quantidades de outros minerais como carbonato de magnésio (MgCO_3), fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), além de substâncias orgânicas. Para determinar o conteúdo de material orgânico e inorgânico, uma análise preliminar de TG/DSC da casca de ovo recoberta com uma película de quitosana foi realizada. As curvas TG/DSC, Figura 21, mostra que a decomposição desse material ocorre basicamente em três etapas: a primeira etapa ocorre em aproximadamente 100°C com perda de massa de aproximadamente 0,48%.

provavelmente atribuída a perda de umidade. A perda de massa é relativamente pequena até 300°C com 2,06%. Essa primeira perda de massa no intervalo de 25°C a 300°C pode ser considerada como informação importante para avaliar a estabilidade térmica da casca do ovo com o filme de quitosana + quats depositados na superfície, que recobre toda a superfície do ovo.

A partir da primeira etapa de decomposição segue-se a segunda etapa de decomposição ainda com lenta perda de massa, provavelmente, devido à carbonização do filme polimérico de quitosana + quats e do conteúdo orgânico da casca de ovo que ocorre entre de 350 a 400°C com 4,13% de massa na TG e que esta associado a uma exoterma na curva DSC. No intervalo de 400°C até 700°C a perda de massa foi de 5,38%. Acima de 730°C até 1000°C a perda de massa é intensa e a decomposição térmica está relacionada ao material inorgânico, composto majoritariamente pela decomposição térmica do carbonato de cálcio (CaCO_3), carbonato de magnésio (MgCO_3) e fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), o qual decompõe com perda de massa de 44,96 % na curva TG. Essa perda de massa está associada a um intenso pico endotérmico na curva DSC, devido à liberação de dióxido de carbono (CO_2), a qual leva a formação de um resíduo final de óxido de cálcio (CaO). Esse resíduo mineral final com massa de 51,24% provavelmente, contenha pequenas quantidades de óxido de magnésio (MgO), e outros óxidos metálicos em quantidades traços. Os micros e macro elementos na superfície foram determinados por MEV/EDX. A Figura 21 apresenta as curvas TG/DSC referentes a este ensaio preliminar da casca de ovos.

Figura 21. Curva TG/DSC referente à Decomposição da massa de casca de ovo.

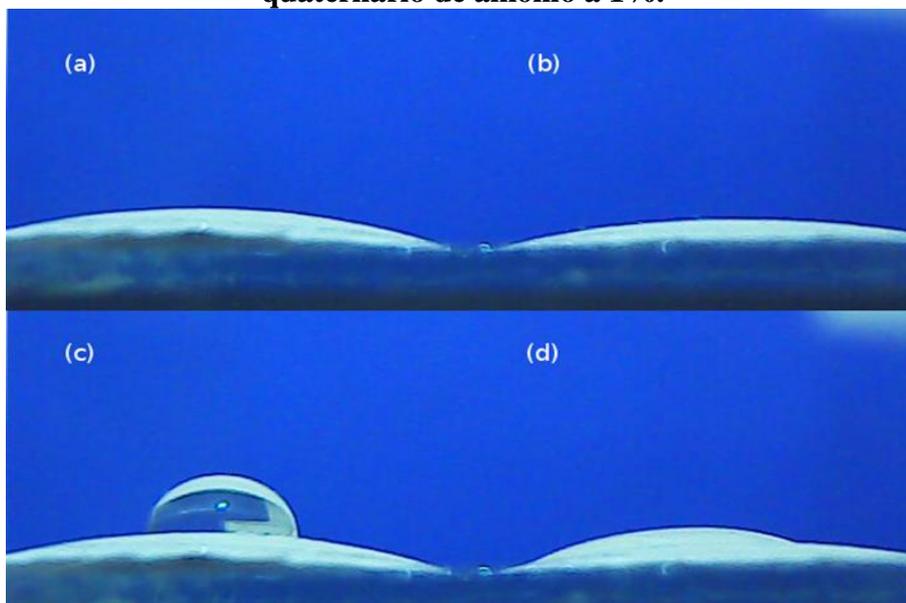


Fonte: próprio autor.

5.4.3. Ângulo de Contato (θ) e comportamento da gota de água sobre a superfície da casca de ovo *in natura* e revestida por filme de quitosana + quaternário de amônio de I e V gerações.

As medidas de ângulo de contato (θ) das amostras de casca do ovo foram resumidas na Tabela 7. A amostra de referência (casca *in natura*, sem tratamento) consta na Figura 22 (imagem c) e Tabela 7 com a indicação 0%. O ângulo de contato medido foi de 61 graus (61°). As outras amostras de casca de ovo sofreram o tratamento (revestimento por filme de quitosana + quaternário de amônio I e V gerações a diferentes concentrações 0,25%, 0,50% e 1% (v/v). Os resultados registraram uma significativa redução do valor de ângulo de contato (θ), e portanto, maior molhabilidade ou hidroflicidade. Na Figura 23 mostram-se as imagens das gotas de água sobre a superfície das amostras de casca de ovo sem e com revestimento por filmes de quitosana + quaternário de amônio a 0%, 0,25%, 0,50% e 1% (v/v).

Figura 22. Fotografia de gota de água e medidas de ângulo de contato sobre a superfície das cascas de ovo com o depósito de uma gota. Imagem (a) casca de ovo seca com revestimento de filme de quitosana + quaternário de amônio a 0,25% , (b) casca de ovo seca com revestimento de filme de quitosana + quaternário de amônio a 0,5%, (c) casca de ovo sem revestimento (0%) por filme de quitosana + quaternário de amônio de água e (d) casca de ovo seca com revestimento de quitosana + quaternário de amônio a 1%.



Fonte: próprio autor.

A análise das imagens e os ângulos de contato (θ) e tempo de evaporação (t_{evap}) da gota de água (Tabela 6) e Figura 22 mostraram o comportamento (espalhamento) da gota de água na superfície do ovo após o depósito de forma espontânea sobre a superfície do ovo sem e com revestimento por filme de quitosana + quaternário de amônio de I e V gerações a diferentes concentrações (0%, 0,25%, 0,50% e 1% (v/v)). As imagens mostraram que o espalhamento da gota de água depositada sobre a superfície do ovo indica aumento de hidrofiliabilidade da superfície revestida e, as variações dos ângulos de contato (θ) indicaram que a molhabilidade (hidrofiliabilidade) aumenta por aumento da concentração dos quaternários de amônio I e V gerações no filme polimérico de 0% até 1,0% (v/v). Assim, a superfície torna-se mais molhável (hidrofílica) à medida que se aumentou a concentração do quaternário de amônio de 0% até 1,0% (v/v) nos filmes de quitosana.

O comportamento de secagem da gota de água espalhada sobre a superfície da casca do ovo foi realizado. Os resultados de ângulo de contato (θ) e tempo de evaporação total foram verificados. Os resultados experimentais são mostrados na Tabela 7.

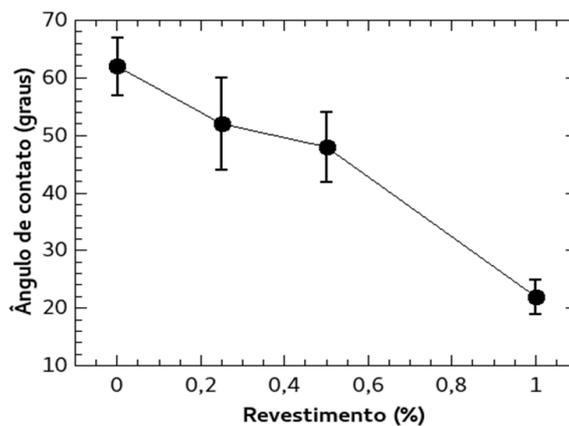
Tabela 7. Valores experimentais de ângulo de contato (θ) e tempo de evaporação total (t_{evap}) de uma gota depositada sobre a superfície da casca de ovos comerciais sem revestimento (controle) e com revestimento por filmes de quitosana + quaternário de amônio a 0%, 0,25%, 0,50% e 1% (v/v). (medidas de ângulos de contato, desvios padrões de ângulo de contato e tempo de evaporação de gotas de 8 μL para as amostras de casca de ovo com revestimentos).

Amostras	Ângulo de Contato (θ)	Desvio-padrão de θ	Tempo de evaporação (t_{evap})
0,00 %	62°	5°	52 minutos
0,25 %	52°	8°	22 minutos
0,50 %	48°	6°	15 minutos
1,00%	24°	3°	9 minutos

Fonte: próprio autor.

Na Figura 23 são mostrados os valores médios e desvios padrões ($\theta^\circ \pm dp$) na forma de representação gráfica que mostram o aumento da molhabilidade da superfície da casca do ovo sem e com revestimento de filme de quitosana + quaternário de amônio à medida que se aumentam as concentrações de quaternário de amônio.

Figura 23. Medidas de ângulo de contato (θ) de casca de ovo sem e com revestimento de filme de quitosana + quaternário de amônio a 0%, 0,25%, 0,50% e 1% (v/v).



Fonte: próprio autor.

Estes valores de ângulo de contato (θ) mostraram uma atividade superficial de água muito interessante sobre as superfícies do ovo comercial sem revestimento e revestidos com o filme de quitosana e quaternários de amônio de I e V gerações.

Os quaternários de amônio de I e V gerações por terem tensoatividade melhoram a molhabilidade da superfície reduzindo o ângulo de contato (θ) em função da concentração dos quaternários de amônio no filme de quitosana. A superfície do ovo revestida por filme

de quitosana + quaternários de amônio de I e V gerações tornam-se mais molháveis (aumento de hidrofiliçidade da superfície).

Esta propriedade mostrada pelo revestimento polimérico + sais quaternário de amônio pode ser importante no processo de estocagem ou na disposição dos ovos nas embalagens em prateleira devido a variação de temperatura e umidade relativa dos ambientes de exposição devido a formação e manutenção de um filme de água superficial que permite a disponibilização de quaternário de amônio no filme e induzir um controle microbiológico mais eficiente (bio)atividade devido a disponibilidade das moléculas no filme para um controle biológico mais eficiente em relação ao filme seco. Os valores dos experimentos mostraram a dependência do ângulo de contato (θ) (molhabilidade) da superfície do ovo para a concentração dos quaternários de amônio em relação a superfície do ovo comercial sem revestimento.

Os valores de tempo de secagem da gota de água mostrou que o aumento da concentração de quaternário de amônio de I e V gerações, além do espalhamento da gota de água na superfície dos ovos comerciais, reduziu o tempo de evaporação da gota de água, provavelmente, devido a difusão das moléculas do quaternário de amônio do filme para a gota de água, reduzindo as interações intermoleculares entre as moléculas de água e seu espalhamento sobre a superfície, disponibilizando maior área superficial do filme de água para a evaporação da gota de água.

5.4.4. Ponto Isoelétrico (pI) ou Ponto de Carga Zero (pcz)

Na Figura 25 foi realizado a plotagem dos valores de pH inicial, pH final (R1 e R2) e Δ pH. Os gráficos de pH inicial versus pH e Δ pH versus pH inicial (média de R1 e R2) foram utilizados para estimar o valor do ponto isoelétrico (pI) ou ponto de carga zero (pcz) da superfície da casca do ovo. O pI ou pcz da amostra de casca de ovo comercial foram obtidos no intervalo do efeito tampão, ou seja, onde o pH não variou (pH final versus pH inicial; independentemente do pH inicial) ou onde o gráfico cruzou o eixo x do pH inicial (Δ pH versus pH inicial) ou ponto de anulação da carga superficial. A partir dos valores dos experimentos dos experimentos em duplicatas o pI e pcz foram estimados por média aritmética dos valores de pH inicial e pH final que tendem aos mesmos valores.

O pI ou pcz corresponde ao ponto que o pH se mantém constante, depois do sistema ter atingido o equilíbrio. Na Figura 24 é possível observar todos os valores encontrados

para o pHs das soluções a diferentes pHs com amostras da casca do ovo.

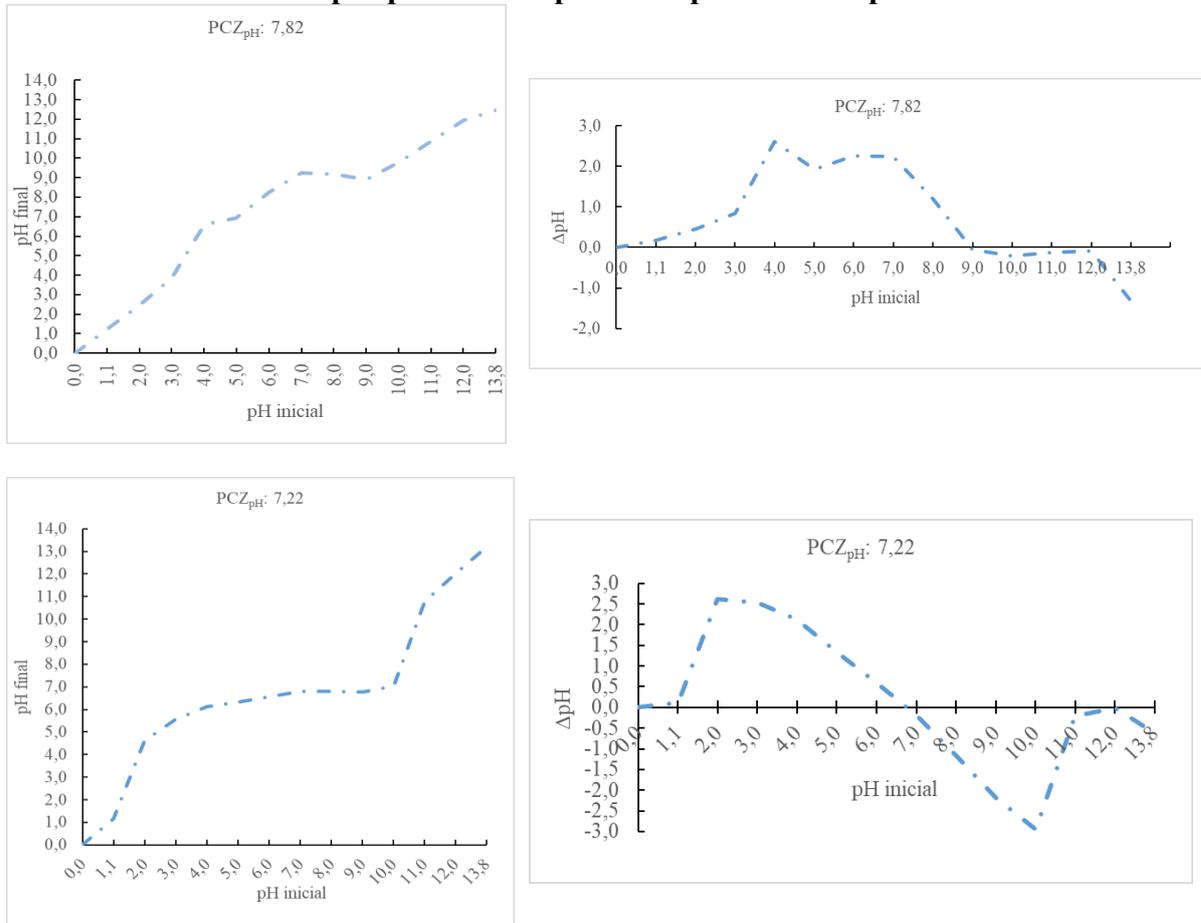
Figura 24. Valores experimentais dos experimentos para determinação do ponto isoelétrico (pI) ou ponto de carga zero (pcz) a partir de valores de pHinicial (pHi), pHfinal (R1 e R2) e ΔpH

pH	0 horas	24 horas					96 horas				
	pHi	R1	R2	Méd	ΔpH	Desv. P.	R1	R2	Méd	ΔpH	Desv. P.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
1	1,06	1,19	1,28	1,24	0,18	0,06	1,18	1,17	1,18	0,12	0,01
2	2,00	2,48	2,44	2,46	0,46	0,03	4,25	4,97	4,61	2,61	0,51
3	3,03	3,76	3,97	3,87	0,84	0,15	5,52	5,62	5,57	2,54	0,07
4	4,00	6,75	6,46	6,61	2,61	0,21	6,08	6,17	6,13	2,13	0,06
5	5,00	6,63	7,22	6,93	1,93	0,42	6,25	6,42	6,34	1,34	0,12
6	5,98	7,55	8,92	8,24	2,26	0,97	6,52	6,59	6,56	0,57	0,05
7	7,00	9,27	9,23	9,25	2,25	0,03	6,79	6,83	6,81	-0,19	0,03
8	7,99	9,19	9,17	9,18	1,19	0,01	6,85	6,78	6,82	-1,18	0,05
9	8,96	8,53	9,27	8,90	-0,06	0,52	6,82	6,75	6,79	-2,18	0,05
10	9,98	9,78	9,75	9,77	-0,22	0,02	7,02	7,06	7,04	-2,94	0,03
11	11,00	10,89	10,85	10,87	-0,13	0,03	10,8	10,79	10,80	-0,21	0,01
12	12,02	11,93	11,93	11,93	-0,09	0,00	12,00	12,03	12,02	0,00	0,02
13	13,82	12,48		12,48	-1,34	0,00	13,21		13,21	-0,61	-
				7,82					7,22		
				7,30					6,80		

Fonte: próprio autor.

A Figura 25 apresenta os gráficos entre o pH inicial x pHfinal e pHinicial x ΔpH das soluções de pHs 0 e 13,82. A partir dos valores experimentais obtidos após 24h e 96h foi possível estimar o ponto isoelétrico (pI) ou ponto de carga zero (pcz) por média aritmética dos pontos que compõem o platô do pH final ou pontos que se mantêm constante para pHinicial x pHfinal ou ainda da anulação da carga quando o trecho de reta corta o eixo X no pH inicial.

Figura 25. Gráficos para a determinação de valores de pI ou pcz da casca de ovos comerciais por pH inicial x pH final e pH inicial x Δ pH a 24h e 96h.



Fonte: próprio autor.

Os valores experimentais podem ser utilizados por média aritmética para estimar o pI ou pcz a partir das soluções com amostras de casca do ovo comerciais sem revestimento por filme polimérico de quitosana com sais quaternários de amônio (casca *in natura*) a diferentes pHs é mostrado na Tabela 8.

Tabela 8. Resultado dos ensaios da determinação do pcz às 24h e 96h

Amostra	Ponto Isoelétrico (pI) ou Ponto de Carga Zero (pcz)		
	24h	96h	Valor médio
Casca de ovo comercial seca sem revestimento (<i>in natura</i>)	7,82	7,22	7,52

Fonte: próprio autor.

O entendimento do valor médio de pI ou pcz permite estabelecer um limite em termos de pH (fronteira) para análise do comportamento de carga em função do pH na

superfície da casca de ovo. O pI ou pcz foi estimado em pH 7,52 (neste pH a carga superficial é zero). A carga superficial pode ser variada. Quando um material sólido entrar em contato com uma solução líquida com pH abaixo do pI ou pcz, a superfície é carregada positivamente (+) e, assim, grande número de ânions (-) é adsorvido para balancear as cargas positivas da superfície da casca do ovo. Assim, as superfícies da casca do ovo podem ser empregadas como adsorventes eficazes para a remoção, por exemplo, de materiais aniônicos (-) abaixo do pI ou pcz (RIBEIRO et al., 2011). Em soluções aquosas com um pH mais alto do que o pI ou pcz, a superfície é carregada negativamente (-) e, adsorve, preferencialmente, cátions (+). Neste caso, a casca de ovo pode ser um adsorvente mais eficaz para a adsorção de materiais catiônicos (-) em valores de pHs > pI ou pcz (+) (RIBEIRO et al., 2011). Na Tabela 8 encontram-se os pontos de carga zero da casca de ovo (pI=pcz= 7,52). No qual a adsorção do cátion é favorecida a um pH > pI ou pcz, enquanto que a adsorção de ânions (-) é favorecida quando pH< pI ou pcz.

5.4.5 Determinação da área superficial (As) e volume (V) da casca de ovos

Os resultados da determinação das medidas realizadas em 24 ovos comerciais, divididos em duas parcelas de 12 ovos, sem revestimento por filme, para cálculo das áreas superficiais (As) e volume (V). Os resultados experimentais por média e desvio padrão são mostrados nas Tabelas 9, 10, 11 e 12.

Tabela 9. Valores de dimensões (altura e largura), área superficial (As; cm²), volume (V; cm³) de ovos comerciais controle (sem revestimento) ou com revestimento.

Amostra (s) g 05.11.2018/07.11.2018	L1	L2	As (cm ²)	V (cm ³)
1 (56,3780g)/(56,1110g)	4,27	4,20	73,27	50,79
2 (57,7196g)/(57,4399g)	4,32	4,29	75,29	52,91
3 (59,6378g)/(59,3735g)	4,36	4,32	77,09	54,30
4 (57,0149g)/(56,7330g)	4,17	4,17	75,56	51,51
5 (57,0639g)/(56,7574g)	4,26	4,26	74,69	52,77
6 (58,6682g)/(58,4665g)	4,38	4,30	76,57	54,36
Σ	Σ 25,76	Σ 25,54	Σ 452,47	Σ 316,64
Média	4,29 cm	4,26 cm	75,41 cm ²	52,77 cm ³

Fonte: próprio autor.

Tabela 10. Valores de dimensões (altura e largura), área superficial (As; cm²), volume (V; cm³) de ovos comerciais controle (sem revestimento) ou com revestimento.

Amostra(s) g 05.11.2018/07.11.2018	L1	L2	As (cm ²)	V (cm ³)
7 (58,3592g)/(58,1591g)	4,30	4,34	74,13	51,93
8 (57,4938g)/(57,3113g)	4,14	4,16	76,45	51,67
9 (50,7428g)/(50,5493g)	4,11	4,15	69,91	47,15
10 (53,5017g)/(53,3034g)	4,22	4,28	70,80	49,25
11 (55,0687g)/(54,8866g)	4,20	4,18	74,14	50,74
12 (54,2265g)/(53,9689g)	4,24	4,18	74,11	50,96
Σ	Σ 25,21	Σ 25,29	Σ 439,54	Σ 301,70
Média	4,20	4,22	73,26	50,28

Fonte: próprio autor.

Tabela 11. Valores de dimensões (altura e largura), área superficial (As; cm²), volume (V; cm³) de ovos comerciais controle (sem revestimento) ou com revestimento.

Amostra(s) g 05.11.2018/07.11.2018	L1	L2	As (cm ²)	V (cm ³)
13 (58,3167g)/(58,1010g)	4,38	4,44	73,92	53,34
14 (56,7199g)/(56,4280g)	4,26	4,24	74,57	44,02
15 (57,1060g)/(56,7936g)	4,27	4,24	76,61	53,27
16 (55,3005g)/(53,0444g)	4,29	4,27	71,97	50,41
17 (55,0880g)/(54,7235g)	4,23	4,23	72,79	50,40
18 (54,6016g)/(54,3184g)	4,23	4,20	73,17	50,47
Σ	Σ 25,66	Σ 25,62	Σ 443,03	Σ 301,91
Média	4,27	4,27	73,83	50,31

Fonte: próprio autor.

Tabela 12. Valores de dimensões (altura e largura), área superficial (As; cm²), volume (V; cm³) de ovos comerciais controle (sem revestimento) ou com revestimento.

Amostra(s) g 05.11.2018/07.11.2018	L1	L2	As (cm ²)	V (cm ³)
19 (57,4613g)/(57,1776)	4,32	4,38	73,83	52,57
20 (54,1250g)/53,8464	4,14	4,13	71,76	48,43
21 (58,3991g)/58,0526	4,33	4,31	75,95	53,77
22 (55,6884g)/55,4099	4,29	4,30	73,14	51,45
23 (58,2180g)/57,9342	4,29	4,26	76,97	53,91
24 (58,9550g)/58,5788	4,31	4,28	77,73	54,54
Σ	Σ 25,68	Σ 25,66	Σ 449,38	Σ 314,67
Média	4,28	4,28	74,90	52,45

Fonte: próprio autor.

5.4.6 Determinação das massas de ovos com e sem revestimento de quitosana + quaternário de amônio (I e V geração) para classificação do tipo de ovo

As determinações das massas de ovos em gramas foram realizadas com e sem revestimento de quitosana + quaternário de amônio de I e V geração, as pesagens de ovos sem revestimentos estão representadas nas Tabelas 7, 8, 9 e 10, onde m1 (C) são as massas

de ovos sem revestimentos, m2 (ru) revestimento úmido massas de ovos após o revestimento e m3 (rs) revestimento seco massas de ovos após a secagem do revestimento.

Tabela 13. Ovos comerciais com revestimento de quitosana + quats I geração (50%)

Amostra(s)	m1 (C)	m2 (ru)	m3 (rs)
1	56,1110	56,1310	56,0980
2	57,4399	57,4430	57,4268
3	59,3735	59,4210	59,3684
4	56,7530	56,7858	56,7499
5	56,7545	56,8200	56,7501
6	58,4665	58,5100	58,4620
Média	57,48307	57,51847	57,47587

Fonte: próprio autor.

Tabela 14. Ovos comerciais com revestimento de quitosana + quats I geração (50%)

Amostra(s)	m1(g)	m2(g)	m3(g)
7	58,1591	58,1857	58,1611
8	57,3113	57,3540	57,3138
9	50,5493	50,6138	50,5524
10	53,3034	53,3546	53,3090
11	54,8866	54,9301	54,8924
12	53,9689	54,0516	53,9792
Média	54,69643	54,7483	54,70132

Fonte: próprio autor.

Tabela 15. Ovos comerciais com revestimento de quitosana + quats V geração (80%)

Amostra(s)	m1(g)	m2(g)	m3(g)
13	58,1010	58,1105	58,0995
14	56,4280	56,4680	56,4270
15	56,7936	56,8516	56,7932
16	55,0444	55,1100	55,0444
17	54,7235	54,8290	54,7273
18	54,3184	54,4103	54,3232
Média	55,90148	55,96323	55,90243

Fonte: próprio autor.

Tabela 16. Ovos comerciais com revestimento de quitosana + quats V geração (80%)

Amostra(s)	m1(g)	m2(g)	m3(g)
19	57,1776	57,2650	57,1838
20	53,8464	54,3095	53,8513
21	58,0526	58,1875	58,0595
22	55,4099	55,5324	55,4172
23	57,9342	58,0574	57,9381
24	58,5788	58,7264	58,5851
Média	56,83325	57,01303	56,83917

Fonte: próprio autor.

5.4.7. Experimento de Perda de Massa na Prateleira – Ovos sem e com revestimento de quitosana + quaternário de amônio (quats) (I (50%) e V (80) geração).

A análise de variação da massa do ovo feita para acompanhar a perda de gás carbônico e água está relacionada com um menor tempo de vida e qualidade do ovo, as avaliações de perda de massa foram realizadas para averiguar os fatores que afetam a perda de qualidade da casca do ovo gerando prejuízos a toda cadeia produtiva. Os dados referente a porcentagem de perda de massa e média e desvio-padrão estão representados na tabela abaixo. Os resultados foram influenciados pelo tempo de estocagem, podemos observar que a perda de massa dos ovos do ponto inicial e dos ovos mantidos até 7 dias de estocagem foram menores do que o observado no 26º dia de estocagem. Os resultados apontados por Thimotheo (2016) corroboram com os resultados apresentados na Tabela 17 para perda de massa dos ovos do estudo. Stadelman e Cotterill (1994) relacionam a perda de massa durante o período de estocagem com à perda de água do albúmen para o meio ambiente devido a presença de poros na casca dos ovos.

Tabela 17. Média e desvio-padrão da perda de massa (g).

TABELA PERDA DE MASSA (g 100g ⁻¹)							
Nº ovos	1% quitosana	1% quit+quat.1°	1% quit+quat.5°	2% quitosana	2% quit+quat.1°	2% quit+quat.5°	Controle
1	1,94±1,12	2,43±1,89	1,84±0,99	2,00±1,29	3,47±2,26	1,53±0,85	2,39±1,29
2	2,18±1,09	2,89±2,16	1,74±0,97	2,21±1,24	3,77±2,67	3,00±1,72	2,18±1,22
3	3,15±1,67	2,24±1,22	2,18±1,18	1,78±0,99	1,87±1,13	1,89±1,03	2,15±1,19
4	2,07±1,54	1,57±0,91	3,45±2,06	2,20±1,20	2,46±1,05	4,25±1,25	1,92±1,11

Fonte: próprio autor.

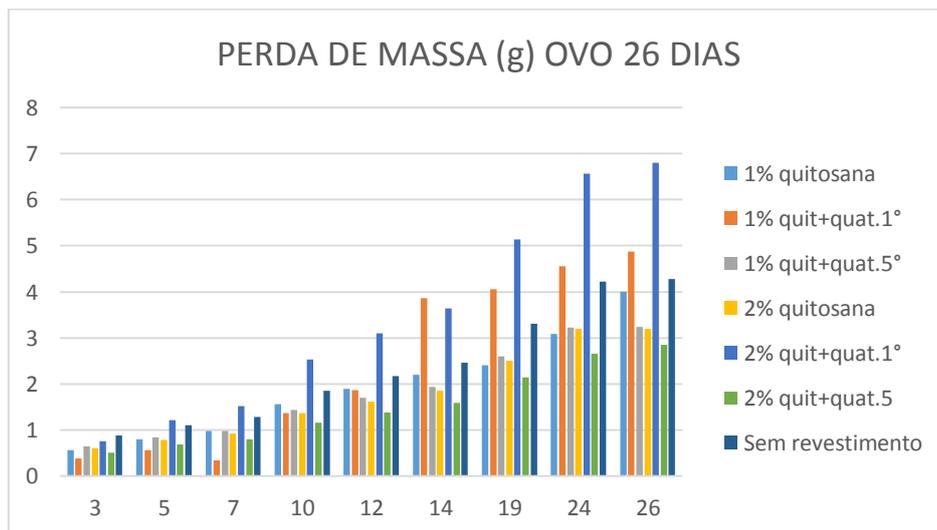
A perda de peso é acelerada em altas temperaturas estudo realizado por Singh e Panda (1990) evidenciam uma maior perda de peso em ovos armazenados em temperatura ambiente obtendo um resultado de 9,25 gramas após 21 dias de armazenamento, Barbosa (2008) apresenta uma média de perda de peso de 9,20% após o período de 35 semanas. O presente estudo demonstrou uma maior perda de massa para o revestimento de quitosana a 2% com quaternário 1º geração em um total de 6,80 gramas durante o período de estocagem de 26 dias.

Podemos observar que para todos os testes realizados o tempo de armazenamento apresentou resultados progressivos a cada medida, isso ocorre devido a perda de umidade e dióxido de carbono durante o armazenamento. No 19º e 24º dia de análises as perdas de

massa foram maiores, provavelmente, pelo fato de ocorrer transformações nos constituintes do ovo devido a troca do meio interno com o meio externo.

Observa-se até o 7º dia uma maior perda de massa para os ovos controle sem revestimento, após esse período as amostras revestidas com quitosana a 2% e quaternário 1º geração passaram a ter uma maior porcentagem na perda de massa. Podemos confirmar assim como em outros estudos, que o tempo de estocagem dos ovos contribui para maior perda de massa, os recobrimentos analisados não alteraram a perda de massa do ovo, porém os ovos revestidos com quitosana a 2% e quaternário de amônio 5º geração apresentaram uma menor redução da perda de massa comparados com os outros revestimentos.

Figura 26. Perda de massa em gramas do ovo durante 26 dias.



Fonte: próprio autor.

5.5 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS OVOS

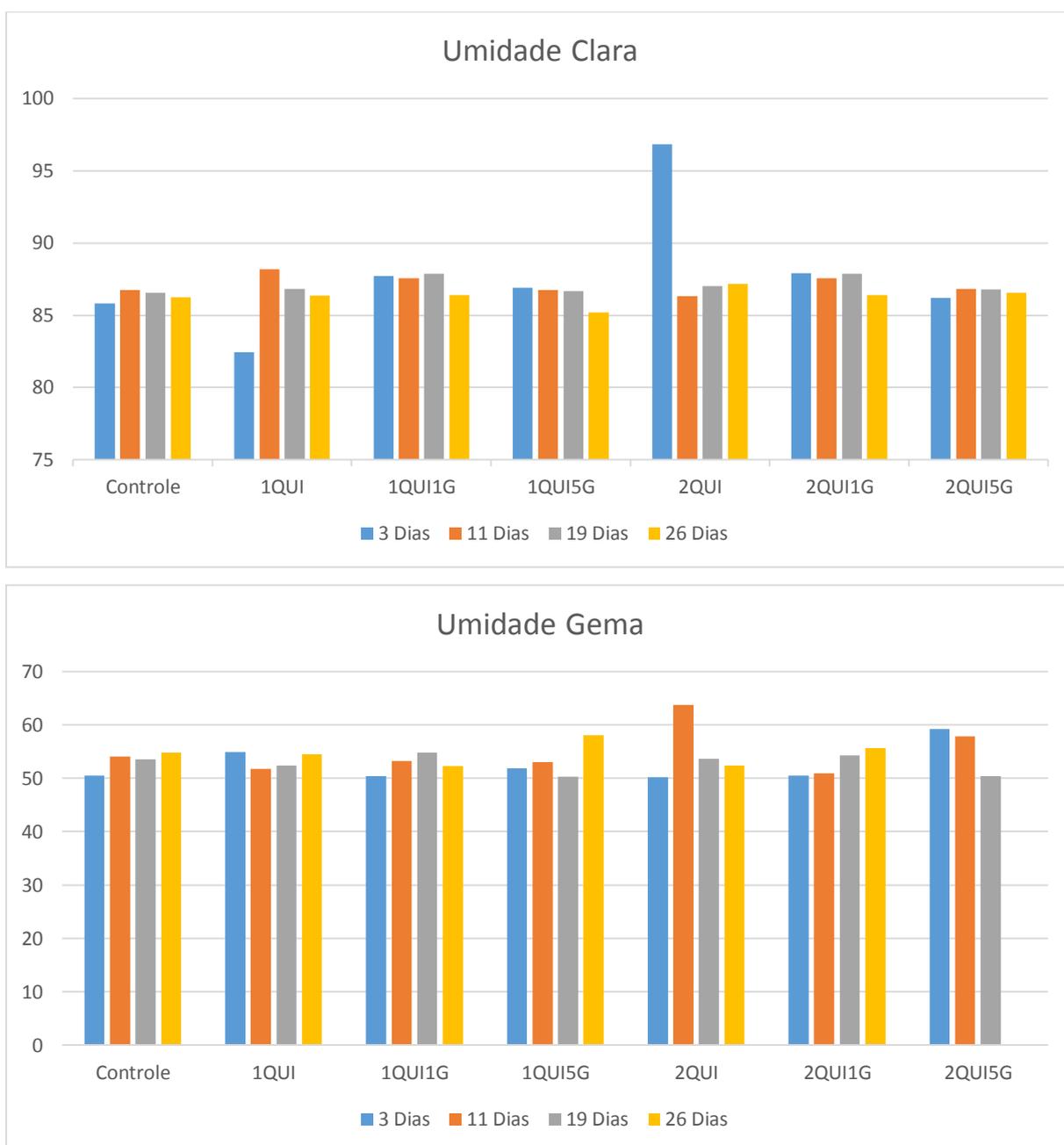
A água está presente nos alimentos por meio de ligações fracas com o substrato favorecendo o crescimento microbiológico ou por interações fortes com o substrato retardando as alterações químicas, tendo influência na qualidade e estabilidade do produto. Os alimentos são classificados de acordo com o teor de água em alimentos com baixa umidade atividade de água até 0,60, como umidade intermediária atividade de água entre 0,60 e 0,90 e alimentos com alta umidade atividade de água com valores acima de 0,90 (ZENEON, 2014).

A determinação da umidade está relacionada com parâmetros de composição, qualidade e estabilidade do ovo, presença de umidade em alimentos influencia no período de estocagem e na capacidade de deterioração por micro-organismos. A perda de umidade do ovo se dá pela transferência de água para o meio externo devido a presença de poros na casca do ovo. Podemos observar que os resultados de umidade da clara e gema do ovo representados na Figura 27 demonstram valores próximos aos citados por Sarcinelli (2007) de 51 a 52% de umidade para gema e 87 a 88% para clara. Para diferenças em relação ao tempo de armazenamento mantidos a temperatura de 25°C, a clara do ovo possui um teor alto de umidade alta.

A umidade é necessária para expressar a perecibilidade do alimento um fator indicativo para deterioração e contaminação de um produto é a medida da quantidade total de água contida em um alimento. A análise de umidade corresponde a perda de peso sofrida pelo alimento quando exposto a temperaturas em que a água é removida. Os poros presentes na casca do ovo facilitam a perda de umidade para o meio externo, temperaturas maiores de estocagem também influenciam acelerando esse processo.

As análises de perda de massa estão diretamente relacionadas com o teor de umidade dos constituintes interno do ovo, isto ocorre porque durante o tempo de armazenamento há perdas de umidade pelos poros da casca o que contribui para uma maior perda da massa, quanto maior o tempo de estocagem menor a qualidade interna do ovo devido a uma maior liquefação do albumen. Nas análises realizadas a clara do ovo apresenta maior teor de umidade quando comparado com a gema, a diminuição gradativa do teor de umidade por tempo de estocagem não pode ser evidenciada nas análises por serem realizadas em ovos diferentes a cada semana, mas sabe-se que essa diminuição está associada a uma maior perda de massa.

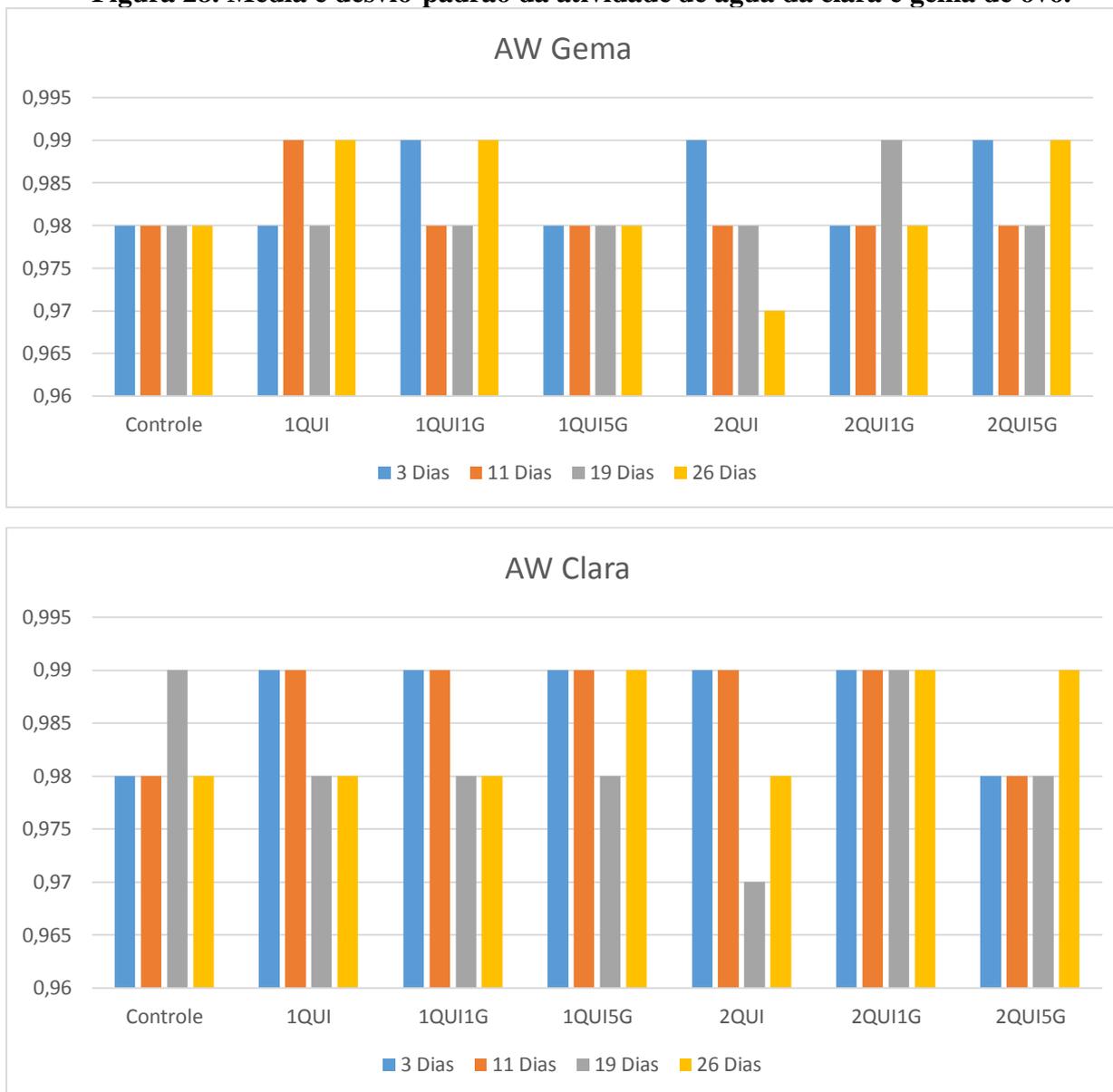
Figura 27. Média e desvio-padrão de umidade da clara e gema de ovo.



Fonte: próprio autor.

A atividade de água está relacionada a umidade do alimento a uma temperatura constante e fornece valores que permite um maior controle de matéria-prima, tal método vem sendo empregado na avicultura com o intuito de permitir uma avaliação microbiológica para espécies *Salmonella* sp., *S. enteritidis* e *S. Thyphimurium* a maioria das bactérias patogênicas crescem em um valor de atividade de água superior a 0,90 (GARCIA, 2004).

Figura 28. Média e desvio-padrão da atividade de água da clara e gema de ovo.



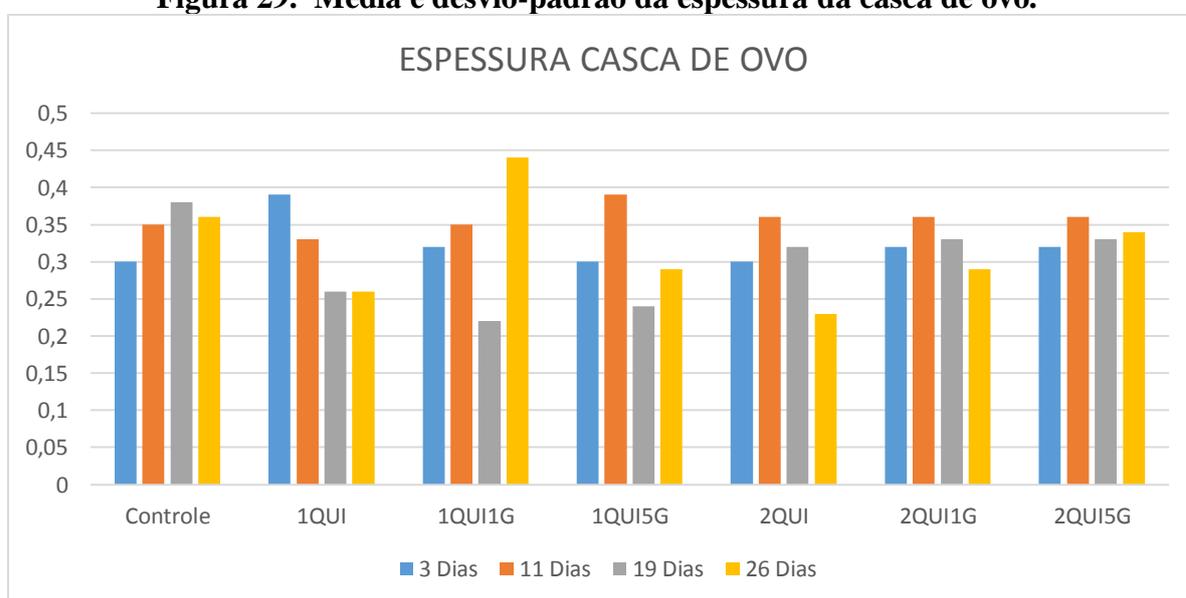
Fonte: próprio autor.

A atividade de água é uma medida relacionada a umidade do alimento variando de 0 a 1 quanto mais próxima de 1 maior o índice de atividade de água, podemos observar nos resultados apresentados na Figura 28 que quanto a clara e a gema de ovos possuem um alto teor de aw o que proporciona um ambiente propício para contaminação. Comparados com estudos de Scatolini (2013) para atividade de água de ovos com conteúdo interno misturado, os resultados foram parecidos com uma média em torno de 0,96 o estudo demonstrou uma maior atividade de ovos não higienizados quando comparados com ovos

higienizados. Na literatura de análises de ovos frescos a indicação de parâmetro para atividade de água varia de 0,93 a 0,98 (LEITÃO, 1988). As análises demonstraram alto teor de água na clara e gema dos ovos o que influencia diretamente no controle da estabilidade e qualidade do produto, alimentos com maior atividade de água são mais propensos à deterioração por micro-organismos.

A medida de espessura da casca do ovo não revelou diferença significativa em relação aos revestimentos recebidos, os resultados não foram influenciados pelo tempo de armazenamento realizado, as médias mantiveram-se próxima ao controle ovos sem revestimentos como podemos observar na Figura 29.

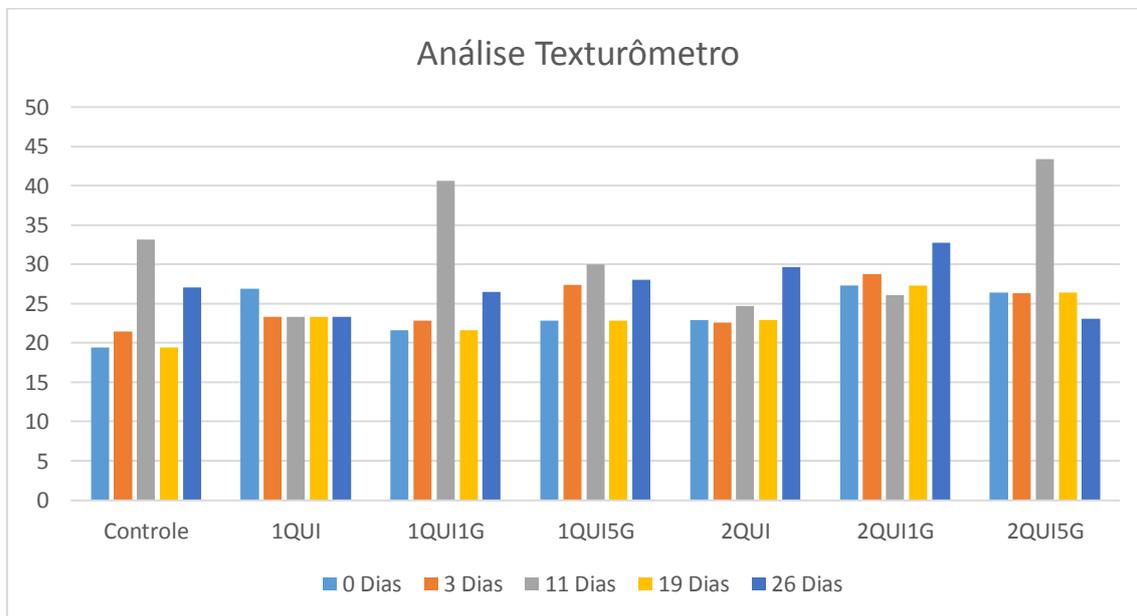
Figura 29. Média e desvio-padrão da espessura da casca de ovo.



Fonte: próprio autor.

A resistência da casca é uma característica importante na qualidade do ovo interferindo no aumento de fraturas e quebra da casca possibilitando uma contaminação. Os dias de armazenamento não influenciaram na resistência da casca do ovo, de acordo com os resultados obtidos os ovos sem revestimento apresentaram semelhanças nas variações quando comparados com os ovos revestidos, porém os ovos revestidos apresentam maior resistência da casca à quebra quando comparados com os ovos sem revestimentos, proporcionado maior proteção contra rachaduras e trincados.

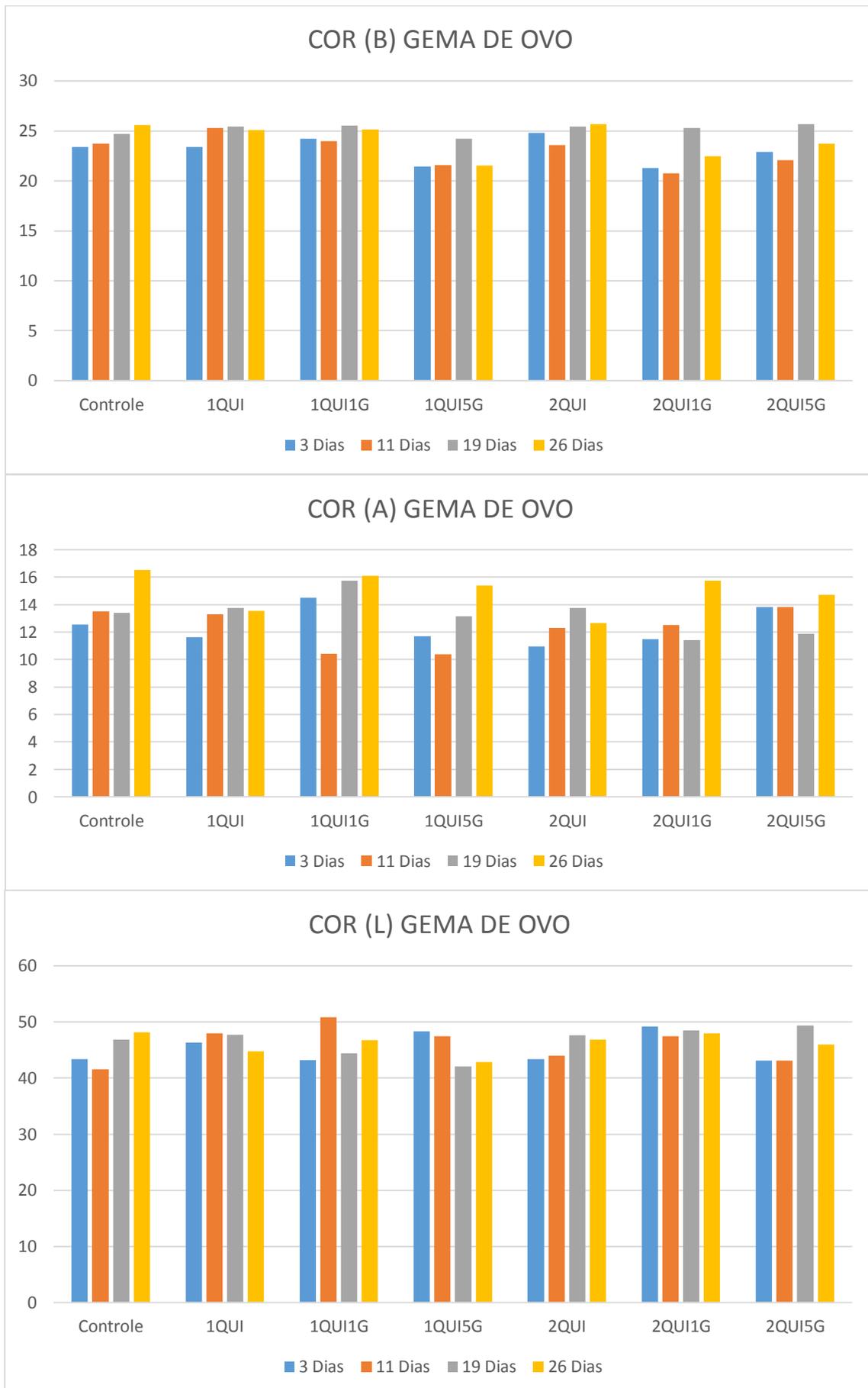
Figura 30. Média e desvio-padrão da força de resistência da casca do ovo.



Fonte: próprio autor.

A pigmentação da gema é importante na valorização dos ovos no mercado devido a do apesar de não influenciar na qualidade nutricional do ovo. É facilmente mensurada pelo leque colorimétrico, onde a gema é disposta e comparada com diferentes matizes de cores que vão do amarelo claro ao vermelho alaranjado, os consumidores preferem cores mais intensas por deixar o alimento mais atrativo (HERNANDEZ, 2000).

Figura 31. Média e desvio-padrão da análise colorimétrica da gema do ovo.



Fonte: próprio autor.

A análise é importante para garantir que não houve alteração nos níveis pigmentantes da gema com adição dos revestimentos. As análises do valor a^* obtiveram resultados satisfatórios quando comparados com o controle e outros estudos realizados com revestimentos diferentes, todos apresentaram resultados expressivos para coloração vermelho o que garante uma melhor aceitação na preferência do consumidor. Para o parâmetro b^* houve uma maior tendência ao amarelo no revestimento de quitosana a 2%, Barbosa (2004) encontrou valores de L^* que variaram de 53,4 a 64,5, semelhante aos valores encontrados neste trabalho Figura 31.

Foi observado também que o tempo de armazenamento de 26 dias não alterou a pigmentação da gema. Sandeski (2013), afirma que a cor da gema pode ser alterada pela composição da ração consumida devido a adsorção dos componentes de carotenoides presentes, podemos observar que o tratamento com diversos revestimentos de quitosana e quaternário de amônio não demonstraram diferenças significativas comparados com o controle para análise de colorimetria da gema.

6. CONCLUSÃO

Os experimentos e análises realizadas demonstraram que a quitosana e sais de amônio quaternário são adequados em termos de compatibilidade física, química e microbiológica com polímero de revestimento quitosana. A cobertura ou filme de revestimento apresenta atividade bactericida para ovos comerciais. O revestimento a partir de uma solução filmogênica de quitosana e sais quaternários podem ser aplicadas de diferentes formas por banho de imersão, pulverização ou micropulverização, com secagem rápida, para a proteção de ovos comerciais.

Os estudos físico-químicos e biológicos mostraram efetividade no controle de micro-organismos de superfície como *Salmonella* Enteritidis, normalmente, os micro-organismos mais presentes nas cascas de ovos. O filme polimérico de quitosana com sais de quaternário de amônio de I e V gerações uma vez aplicado pode-se comportar de modo diferencial sobre a superfície da casca do ovo, atuando como uma proteção física e microbiológica e com adequada umidade pode se remodelar sobre a superfície, garantindo uma proteção estendida. A deposição do filme e a evaporação do ácido acético cria um ambiente diferencial e transiente sobre a superfície dos ovos, preparando a superfície do ovo para o revestimento, facilita o preenchimento de microfissuras ou poros dos ovos controlando a difusão dos gases e a perda de massa dos ovos, realiza desinfecção superficial e o gradiente de pH superficial que permite a adesão e formação de forma relativamente rápida de um filme bioativo sobre a superfície do ovo que pode trabalhar nas variações ambientais de temperatura e umidade relativa. O baixo ângulo de contato (θ) dependente da concentração e o pI ou pcz dependente do pH da solução filmogênica e as características das superfícies das cascas de ovos comerciais podem ser combinadas para formulação da solução filmogênica e permitir a aplicação e a formação de filme polimérico flexível e, até multifuncional para o controle da difusão de gases, proteção física e microbiológica para atuar a partir da variação de temperatura e umidade relativa na armazenagem do produto e/ou na comercialização para aumentar o tempo de prateleira de ovos revestidos.

A alta atividade de água, umidade e presença de nutrientes nos alimentos são fatores que proporcionam crescimento bacteriano nos alimentos, os resultados nas análises demonstraram que o ovo é um ambiente propício para crescimento bacteriano. A perda de massa aumenta durante o tempo de estocagem estando relacionada com a perda de

umidade do ovo através de poros presentes na casca. Por ser perecível é preciso proteger o ovo, os ovos revestidos apresentam maior resistência na casca quando comparados com ovos sem revestimentos, portanto os revestimentos proporcionam maior proteção e resistência mecânica.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o complexo quaternário de amônio PB CLBZ 05 (I geração, concentração de 50%) e PB QT 80 (V geração, concentração de 80%) + quitosana apresentaram atividade contra a formação de biofilme de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. O uso sinérgico se manteve nas mesmas concentrações para o quaternário de amônio PB CLBZ 05 e para quaternário de amônio PB QT80 apresentou uma melhora na atividade em conjunto com a quitosana. Filme de quitosana em ovos tem demonstrado ser um método de conservação e barreira física e microbiológica, a fim de minimizar a perda de qualidade durante o armazenamento, possibilitando extensão da vida de prateleira por evitar perda de água e dióxido de carbono através dos poros da casca e colonização por micro-organismos, fatores estes responsáveis por alterações na qualidade interna. Sendo assim o uso sinérgico do filme quitosana+quaternários de amônio de I e V gerações oferecem uma segurança física e bacteriológica para garantia da qualidade de ovos comerciais.

REFERÊNCIAS

ABDEL-KHALEK, M. A.; RAHMAN, MK Abdel; FRANCIS, A. A. Exploring the adsorption behavior of cationic and anionic dyes on industrial waste shells of egg. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 5, n. 1, p. 319-327, 2017.

ABDULRAHMAN, Idris et al. From garbage to biomaterials: an overview on egg shell based hydroxyapatite. **Journal of Materials**, v. 2014, 2014.

ANDRADE, Maria Auxiliadora et al. Avaliação da qualidade bacteriológica de ovos de galinha comercializados em Goiânia, Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 4, p. 221-228, 2004.

ARAMI, Mokhtar; LIMAE, Nargess Yousefi; MAHMOODI, Niyaz Mohammad. Investigation on the adsorption capability of egg shell membrane towards model textile dyes. **Chemosphere**, v. 65, n. 11, p. 1999-2008, 2006.

BAGIU RV, VLAICU B, BUTNARIU M. Chemical Composition and in Vitro Antifungal Activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 1426-1436, 2012.

BARBOSA, N. A. A. et al. Qualidade de ovos comerciais provenientes de poedeiras comerciais armazenados sob diferentes tempos e condições de ambientes. **Ars Veterinaria**, v. 24, n. 2, p. 127-133, 2009.

BAXTER-JONES, C. Egg hygiene: Microbial contamination, significance and control. In: Avian incubation. Tulleh SG, ed. Butterworth, Heinemann. p. 269-276, 1994.

BELTRAME, C. A. et al. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 32(2): 228-233, abr.-jun. 2012.

BELTRAME, Cezar Augusto et al. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 2, p. 228-232, 2012.

BENITES, C.I.; FURTADO, P.B.S.; SEIBEL, N.F. Características e aspectos nutricionais do ovo. In: SOUZA-SOARES, L. A.; SIEWERDT, F. Aves e ovos. PELOTAS: UFPEL, 2005. p. 57-64.

BERTECHINI, A. G. Mitos e Verdades Sobre o Ovo de Consumo. **Trabalho publicado nos Anais da Conferência APINCO**, 2004. p.19, disponível em: <https://www.avisite.com.br/cet/trabalhos_versao_imprimir.php?codigo=64>. Acesso em: 25 ago. 2018.

BEZERRA, A. M. Síntese e Avaliações Físico-químicas e Biológicas de Derivados de Quitosana de Alta e Baixa Massa Molecular. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BHALE, S. et al. Chitosan coating improves shelf life of eggs. **Journal of food Science**, v. 68, n. 7, p. 2378-2383, 2003.

BICO, J.; MARZOLIN, C.; QUERE, D. Pearl drops. **Europhysics Letters**, v. 47, n. 2, p. 220, 1999.

BIOLOGICS, Institute for International Cooperacion In Animal. Salmonellosis. **Iowa State University**, v.00, n.11, p.111-222, 2013.

BORGES, K. A. et al. Capacidade de formação de biofilme de sorotipos de Salmonella em diferentes condições de temperatura. **Pesq. Veterinário. Bras.** Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 71-76, janeiro de 2018. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X2018000100071&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 12 de novembro de 2018.

BOROWSKY, Luciane et al. Sensibilidade e resistência de amostras de Salmonella Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. **Ciência rural. Santa Maria**. v. 36, n. 5 (set./out. 2006) p. 1474-1479, 2006.

BRAKE, J.; SHELDON, B. W. Effect of a quaternary ammonium sanitizer for hatching eggs on their contamination, permeability, water loss, and hatchability. **Poultry science**, v. 69, n. 4, p. 517-525, 1990.

BRASIL. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 1 de 21/02/1990. Publicada em 06/03/1990. Oficializa as normas gerais de inspeção de ovos e derivados. Brasília. DF: MAPA, 1990. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>. Acesso em: 07 jul. 2018.

BURLEY, R. W.; VADEHRA, D. V. The egg shell and shell membranes: properties and synthesis. **The Avian Egg, Chemistry and Biology. John Wiley, New York**, p. 25-64, 1989.

BUTLER, B. L. et al. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. **Journal of food science**, v. 61, n. 5, p. 953-956, 1996.

CARMO, L; KEIKO, N. M; KORDIAK, J; MILLÉO, A. D; BOTEGA, J.C. Atividade antimicrobiana em caixas de ovos. IX Congresso Nacional de Excelência em Gestão, jun. 2013.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard 9. ed. Edition. CLSI document M7-A9 (ISBN 1-56238-587-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

CONY, Huldo Colares et al. Técnicas de pulverização e imersão com distintos desinfetantes sobre ovos incubáveis. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1407-1412, 2008.

D'ALBA, Liliana et al. What does the eggshell cuticle do? A functional comparison of avian eggshell cuticles. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 90, n. 5, p. 588-599, 2017.

DE OLIVEIRA, Daniele L. et al. Desempenho e qualidade de ovos de galinhas poedeiras criadas em gaiolas enriquecidas e ambiente controlado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 18, n. 11, 2014.

DIZMAN, B; MOHAMED, O. E; MATHIAS, L. J. Síntese e atividades antimicrobianas de Novos Recursos Hídricos Metacrilato de Amônio bis-quaternário solúvel polímeros. **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 94, 635–642, 2004.

DONG, Qun et al. Synthesis and characterizations of hierarchical biomorphic titania oxide by a bio-inspired bottom-up assembly solution technique. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 180, n. 3, p. 949-955, 2007.

EURL-SRM. **Analysis of Quaternary Ammonium Compounds (QACs) in Fruits and Vegetables using QuEChERS and LC-MS/MS**. Fellbach, Germany, 2016.

FIGUEIREDO, T.C. **Características físico-química e microbiológica e aminas bioativas em ovos de consumo**. 2008. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FOOD SAFETY. **Salmonella species**. Microbial Factsheet Series, September 2011.

GANTOIS, Inne et al. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of Salmonella. **Avian Pathology**, v. 37, n. 4, p. 399-406, 2008.

GARCIA, D. M. **Análise de Atividade de Água em Alimentos Armazenados no Interior de Granjas de Integração Avícola**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

GERBA, C. P. **Biocidas Quaternários de Amônio: Eficácia na Aplicação**. Publicado online em 5 de janeiro de 2015.

GHERARDI, S. R. M; VIEIRA, R. P. Fatores que Afetam a Qualidade da Casca do Ovo: Revisão de Literatura. **Nutri Time**. Viçosa, v. 15, n. 03, p. 8172-8181, 2018.

GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of applied microbiology**, v. 87, n. 1, p. 41-48, 1999.

GONZALES, E.; CAFÉ, M. B. Produção de pintinhos com qualidade total. **MACARI, M.; GONZÁLES, E. Manejo da incubação**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 515-526, 2003.

GOY, Rejane C.; BRITTO, Douglas de; ASSIS, Odilio BG. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

GRAHAME, David C. The electrical double layer and the theory of electrocapillarity. **Chemical reviews**, v. 41, n. 3, p. 441-501, 1947.

HAN, Hua et al. Immobilization of amphiphilic polycations by catechol functionality for antimicrobial coatings. **Langmuir**, v. 27, n. 7, p. 4010-4019, 2011.

HERNANDEZ, J. M. et al. Perceptions of egg quality in Europe. **International Poultry Production**, v. 8, n. 5, p. 7-11, 2000.

HOSSEINNEJAD, Mahmoud; JAFARI, Seid Mahdi. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. **International journal of biological macromolecules**, v. 85, p. 467-475, 2016.

IBRAHIM, Waleed A. et al. A comparative study on the use of real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and standard isolation techniques for the detection of Salmonellae in broiler chicks. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 67-71, 2014.

JEON, You-Jin; KAMIL, Janak YVA; SHAHIDI, Fereidoon. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 18, p. 5167-5178, 2002.

JIA, Zhishen et al. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. **Carbohydrate research**, v. 333, n. 1, p. 1-6, 2001.

JONES, D. R. et al. Microbial contamination in inoculated shell eggs: II. Effects of layer strain and egg storage. **Poultry science**, v. 83, n. 1, p. 95-100, 2004.

KARLSSON, Å. **Bacterial contamination of egg shells in deep litter floor systems and conventional cages in Jordan**. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala – 2010 - Department of Animal Nutrition and Management. 28p. Available from: https://stud.epsilon.slu.se/2014/1/carlsson_a_101114.pdf

KONG, Ming et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

KOTTWITZ, L. B. M. et al. Contaminação por Salmonella spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 60, n. 2, p. 496-8, 2008.

LA SCALA JR, N. et al. Pore size distribution in chicken eggs as determined by mercury porosimetry. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 2, n. 2, p. 177-181, 2000.

LEITÃO, M. F. F.; JUNQUEIRA, VCA. Microbiologia aplicada à esterilização de alimentos. **Roitman, I.; Travassos, LR e Azevedo, JL Tratado de microbiologia. Manole. São Paulo**, 1988.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIM G.; HOLCK A.L. Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. *Journal Applied Microbiology*, v. 96, p. 201-208, 2004.

LI, F.; WEIR, M. D.; XU, H. H. K. Effects of quaternary ammonium chain length on antibacterial bonding agents. *Journal of dental research*, v. 92, n. 10, p. 932-938, 2013.

LIMA, L. G. **Influência da temperatura, período de armazenamento e da cor da casca na qualidade interna e externa de ovos de poedeiras comerciais.** 2012. 71 p. Dissertação (Mestre em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2012.

LIU, Jia et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 44, n. 3, p. 300-306, 2007.

LOFTSSON, Thorsteinn; THORSTEINSSON, Thorsteinn; MÁSSON, Már. Hydrolysis kinetics and QSAR investigation of soft antimicrobial agents. *Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 57, n. 6, p. 721-727, 2005.

MAH TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiology*, v.9, p. 34-39, 2011.

MAHL, Cynthia RA et al. Chitosan Functionalization with Amino Acids Yields to Higher Copper Ions Adsorption Capacity. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 26, n. 12, p. 4338-4349, 2018.

MEDEIROS, F. N; ALVES, M. G. M. Qualidade de Ovos Comerciais. *Revista Eletrônica Nutritime*, Volume 11 - Número 04– p. 3515- 3524 – Julho/Agosto 2014.

MINE, Yoshinori; OBERLE, Cedric; KASSAIFY, Zeina. Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 51, n. 1, p. 249-253, 2003.

MORENO, M. I. et al. Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. sob condições de mono e dupla espécie e sua sensibilidade ao brometo de cetrimônio, ácido peracético e hipoclorito de sódio. *Braz. J. Microbiol.* vol.49, no.2, 2018.

MUNOZ-BONILLA, Alexandra; FERNANDEZ-GARCIA, Marta. The roadmap of antimicrobial polymeric materials in macromolecular nanotechnology. *European Polymer Journal*, v. 65, p. 46-62, 2015.

NAGAI, K; MURATA, T; OHTA, S; ZENDA, H; OHNISHI, M; HAYASHI, T. Dois mecanismos diferentes estão envolvidos na resistência de cloreto de benzalcônio de nível extremamente elevado de uma estirpe de *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology and Immunology*, Tóquio, v47, p.709-715, 2003.

NAKAJIMA, A.; HASHIMOTO, K.; WATANABE, T. Recent studies on super-hydrophobic films. *Monatshefte für Chemie*, v. 132, p. 31, 2001.

NARUSHIN, V. G. AP—Animal Production Technology: Shape Geometry of the Avian Egg. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 79, n. 4, p. 441-448, 2001.

NARUSHIN, V. G. Egg geometry calculation using the measurements of length and breadth. **Poultry science**, v. 84, n. 3, p. 482-484, 2005.

NARUSHIN, V. G. New indestructive method of egg parameters and eggshell quality determination. In: **Proceedings of Fifth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Tours, France**. 1993. p. 217-222.

NARUSHIN, V. G. The avian egg: geometrical description and calculation of parameters. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 68, n. 3, p. 201-205, 1997.

NETO, J.P.S. **Ocorrência de aeróbios mesófilos, coliformes e salmonella sp., em ovos comerciais higienizados por diferentes métodos**. Uberaba, MG, 2016. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo. Dissertação (Mestrado). 54p. Disponível em: http://www.iftm.edu.br/visao/loader_anexo_cursos.php?src=250517095421_33_-_joao_paixao_dos_santos_netto.pdf.

NGUYEN H. D. N.; YUK, H. G. Changes in resistance of Salmonella Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 236-240, 2013.

NO, Hong Kyoon et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International journal of food microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 65-72, 2002.

NUNES, Michael R. et al. Charged silsesquioxane used as a vehicle for gold nanoparticles to perform the synthesis of catalyst xerogels. **Journal of sol-gel science and technology**, v. 63, n. 2, p. 258-265, 2012.

OLIVEIRA, B. L. **Processamento e industrialização de ovos**. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA, 4., 2000, Goiânia. Anais... Goiânia: AGA, 2000. p. 177-189.

OLIVEIRA, Elisângela et al. Análise da qualidade dos ovos comercializados na cidade de Boa Vista – RR. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2017, . Anais eletrônicos... Campinas, GALOÁ, 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/zootec/papers/analise-da-qualidade-dos-ovos-comercializados-na-cidade-de-boa-vista-%E2%80%93-rr?lang=pt-br>> Acesso em: 17 jul. 2018.

OLIVEIRA, J. F. A. de. **Funcionalização de nanopartículas de prata com antibióticos β-lactâmicos: uma alternativa para a resistência bacteriana**. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química da UNICAMP. Campinas, 2014.

OLIVEIRA, M.R.S. **Superfícies super-hidrofóbicas obtidas através de microestruturas litografadas**. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Politécnica, USP, São Paulo, 2012.

OLIVEIRA, M.S. et al. Reflexões sobre a desinfecção hospitalar. Loes & Haes, 66-8,1985. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Cinco chaves para uma alimentação mais segura. Português, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/consumer/manual_keys_portuguese.pdf>. Acessado em: 05 de agosto de 2018.

ÖSTERBERG, J. Salmonella in pig's infection dynamics of different serotypes. University of Agricultural Sciences, Suecia, Uppsala, 2010.

PALERMO, Edmund F. et al. Role of cationic group structure in membrane binding and disruption by amphiphilic copolymers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 2, p. 366-375, 2010.

PANGHAL, Manju; KAUSHAL, Vivek; YADAV, Jaya P. In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. **Annals of clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 1, p. 21, 2011.

PAVINATTO, A. **Efeito de Características Estruturais da Quitosana Sobre sua Interação com Filmes de Langmuir como Modelo Biomembrana**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Interunidades de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

PFUNTNER, A. Saneantes e desinfetantes: os produtos químicos da prevenção. Food Safety Magazine, n.11, p.111-222, ago. 2011.

PINTO, M.P. **Avaliação da eficácia de dois protocolos de higienização em áreas de produção de alimentos de um supermercado**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Porto Alegre, p.134. 2006.

PIRES, M. F. **Aspectos De Qualidade Físico-Química E Microbiológica De Ovos Comerciais**. Trabalho De Conclusão De Curso, Graduação em Zootecnia da Universidade, Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

POLAND, Angela L.; SHELDON, Brian W. Altering the thermal resistance of foodborne bacterial pathogens with an eggshell membrane waste by-product. **Journal of food protection**, v. 64, n. 4, p. 486-492, 2001.

POLYORGANIC. Informativo Técnico. Descubra as vantagens do quaternário de 5ª geração. Disponível em: <<https://polyorganic.com.br/descubras-as-vantagens-do-quaternario-de-5a-geracao/>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

PRAMANPOL, N., NITAYAPAT, N. Adsorption of reactive dye by eggshell and its membrane. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 40(xx):192-197, 2006.

PRAMANPOL, Nuttawan; NITAYAPAT, Nuttakan. Adsorption of reactive dye by eggshell and its membrane. **Kasetsart J.(Nat. Sci.)**, v. 40, p. 192-197, 2006.

PYZIK, Ewelina; MAREK, Agnieszka; HAUSCHILD, Tomasz. Characterisation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus*-like strains isolated from table eggs. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 58, n. 1, p. 57-63, 2014.

RABEA, Entsar I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

RAHN, H.; CHRISTENSEN, V. L.; EDENS, F. W. Changes in shell conductance, pores, and physical dimensions of egg and shell during the first breeding cycle of turkey hens. **Poultry Science**, v. 60, n. 11, p. 2536-2541, 1981.

RAHN, Hermann; AR, Amos; PAGANELLI, Charles V. How bird eggs breathe. **Scientific American**, v. 240, n. 2, p. 46-55, 1979.

RAMOS, K.C.B.T.; FLOR, H.R.; CAMARGO, A.M.; CEDRO, T.M.M.; MORENZ, M.J.F. Aspectos qualitativos de ovos comerciais armazenados em diferentes embalagens. XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2008.

RIBEIRO, G. A. C.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. S.; VIEIRA, A. P. **Casca de arroz in natura e tratada com ácido nítrico como adsorventes para remoção do corante têxtil violeta brilhante remazol**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 51., 2011. São Luís. Anais... São Luís, 2011.

RODRIGUES, A. S.; ÁVILA, S. G. Caracterização Físico-Química da Casca de Ovo de Galinha e Utilização como Fonte para Produção Compostos de Cálcio. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 4, p. 596-607, 2017.

ROMÃO C.M.C.A. 1996. Desinfecção e esterilização química, p.133-162. In: Teixeira P. (Ed.), **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Fiocruz, Rio de Janeiro.

ROY, Debashish et al. Antibacterial cellulose fiber via RAFT surface graft polymerization. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 1, p. 91-99, 2007.

RUSSELL, A. D. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 597-599, 2002.

SANDESKI, L. M. **Otimização da Pigmentação da Gema do Ovo**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. Características dos Ovos. **Boletim Técnico da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES**, Espírito Santo, 20 ago. 2007.

SAVE, G.D; BORTOLOTTI, T; SIMÕES, L.R; BARICHELLO, T. Eliminação de *Salmonella* entérica sorovar Typhimurium em ovos artificialmente contaminados por meio

de procedimentos corretos de cozimento e fritura. *Ciência Tecnol. Aliment. rev*, vol.31, n 2. Campinas, 2011.

SCATOLINI-SILVA, A. M. et al. Qualidade física de ovos armazenados em diferentes condições de embalagens sob temperatura ambiente. **Archivos de zootecnia**, v. 62, n. 238, p. 247-254, 2013.

SCHARFF, T. G.; MAUPIN, W. C. Correlation of the metabolic effects of benzalkonium chloride with its membrane effects in yeast. **Biochemical pharmacology**, v. 5, n. 1-2, p. 79-86, 1960.

SILVA, E. **Predição da área superficial e volume de ovos de galinhas poedeiras**. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, 2014. 61p.

SINGH, R. P.; PANDA, B. Comparative-study on some quality attributes of quail and chicken eggs during storage. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 60, n. 1, p. 114-117, 1990.

SOMASUNDARAN, P.; AGAR, G. E. The zero point of charge of calcite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 24, n. 4, p. 433-440, 1967.

SPINOSA, H., GORNIK, S., BERNARDI, M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap.35, p. 441-447.

STADELMAN, W. J. The preservation of quality in shell eggs. **Egg science and technology**, v. 4, p. 67-79, 1995.

STEENACKERS H.; HERMANS K.; VANDERLEYDEN J.; DE KEERSMAECKER S.C.J. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 502-531, 2012.

STRINGHINI, M.L.F. **Perfil socioeconômico e microbiológico de manipuladores e qualidade de ovos de granjas de produção comercial**: Influência da contaminação experimental por *Pseudomonas aeruginosa* sobre a qualidade de ovos não-lavados e lavados. 2008. 142 f. Tese. (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

TÉO, Carla Rosane Paz Arruda; DE OLIVEIRA, Tereza Cristina Rocha Moreira. *Salmonella* spp.: o ovo como veículo de transmissão e as implicações da resistência antimicrobiana para a saúde pública. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, p. 195-210, 2005.

THIMOTHEO, M. **Duração da Qualidade de Ovos Estocados de Poedeiras Criadas no Sistema “Cage-Free”**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

TREVISAN, Daliah Alves Coelho et al. Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, 2018.

TRIPATHI, Shipra; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Chitosan based antimicrobial films for food packaging applications. **e-Polymers**, v. 8, n. 1, 2008.

TŮMOVÁ, Eva; VLČKOVÁ, Jana; CHODOVÁ, Darina. Differences in oviposition and egg quality of various genotypes of laying hens. **Czech Journal of Animal Science**, v. 62, n. 9, p. 377-383, 2017.

VU, K. D. et al. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 198-203, 2011.

WALDNER, Landon et al. From exit to entry: long-term survival and transmission of *Salmonella*. **Pathogens**, v. 1, n. 2, p. 128-155, 2012.

WANG, Jinyan et al. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Shanghai, China. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 510, 2017.

ZENEON, O.; PASCUET, N. S. ; TIGLEA, P (Coord.). Métodos físico- -químicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020. Disponível em: Acesso em: 30 jan. 2019.

ZERDAS, E. R. M. A. **Avaliação da eficiência de compostos quaternário de amônio na sanitização de tomate, maçã e rúcula**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, 2016.

ZHENG, Baozhan et al. Preparation of gold nanoparticles on eggshell membrane and their biosensing application. **Talanta**, v. 82, n. 1, p. 177-183, 2010.

ZHENG, Lian-Ying; ZHU, Jiang-Feng. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate polymers**, v. 54, n. 4, p. 527-530, 2003.

ANEXO A – Imagens MEV

Figura A1. Imagens de MEV da superfície externa do ovo controle em diferentes magnificações, mostrando a superfície rugosa.

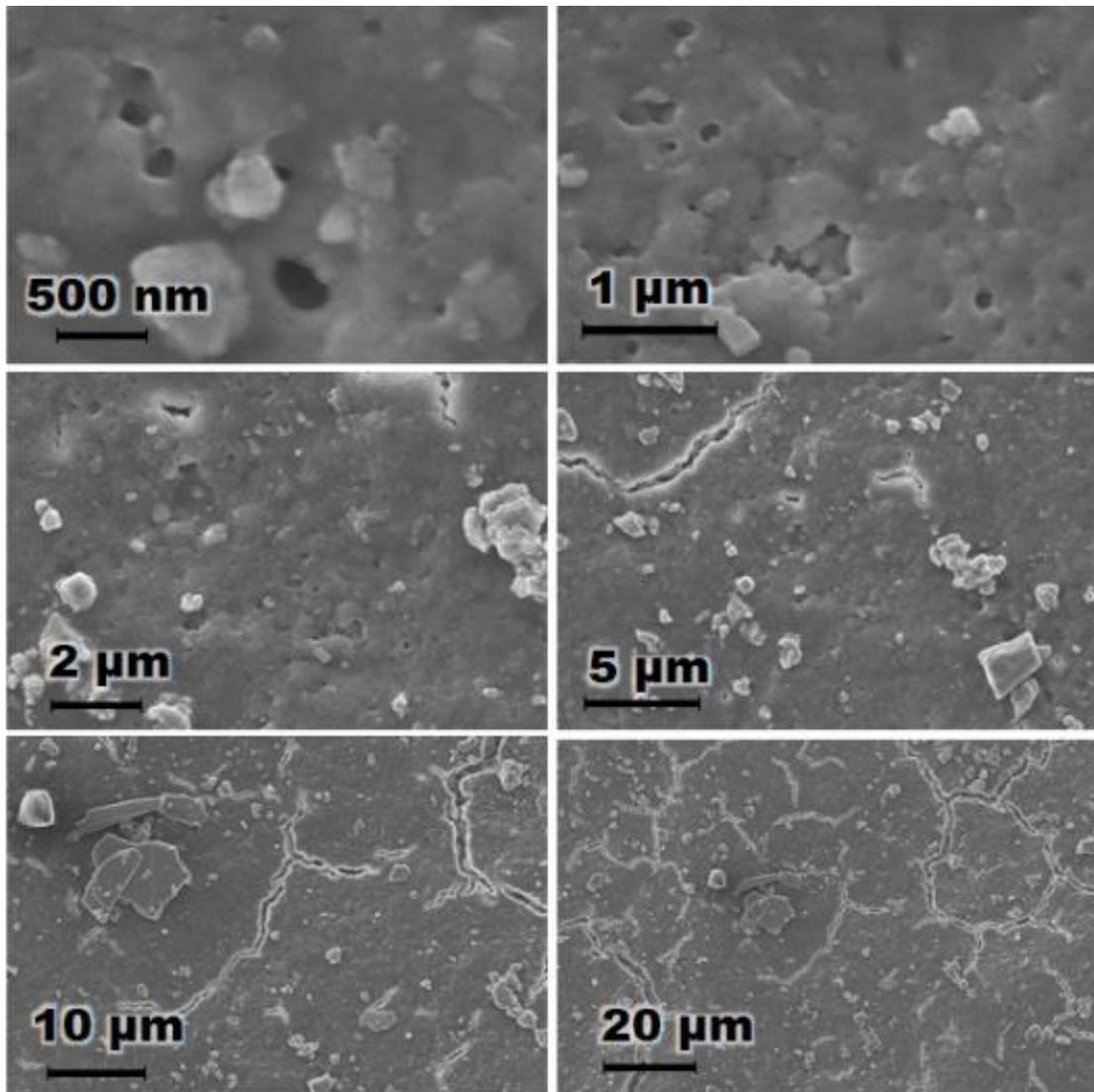


Figura A2. Imagens de MEV da superfície da fratura do ovo controle em diferentes magnificações, mostrando a espessura da casca e as cavidades esféricas presente na casca.

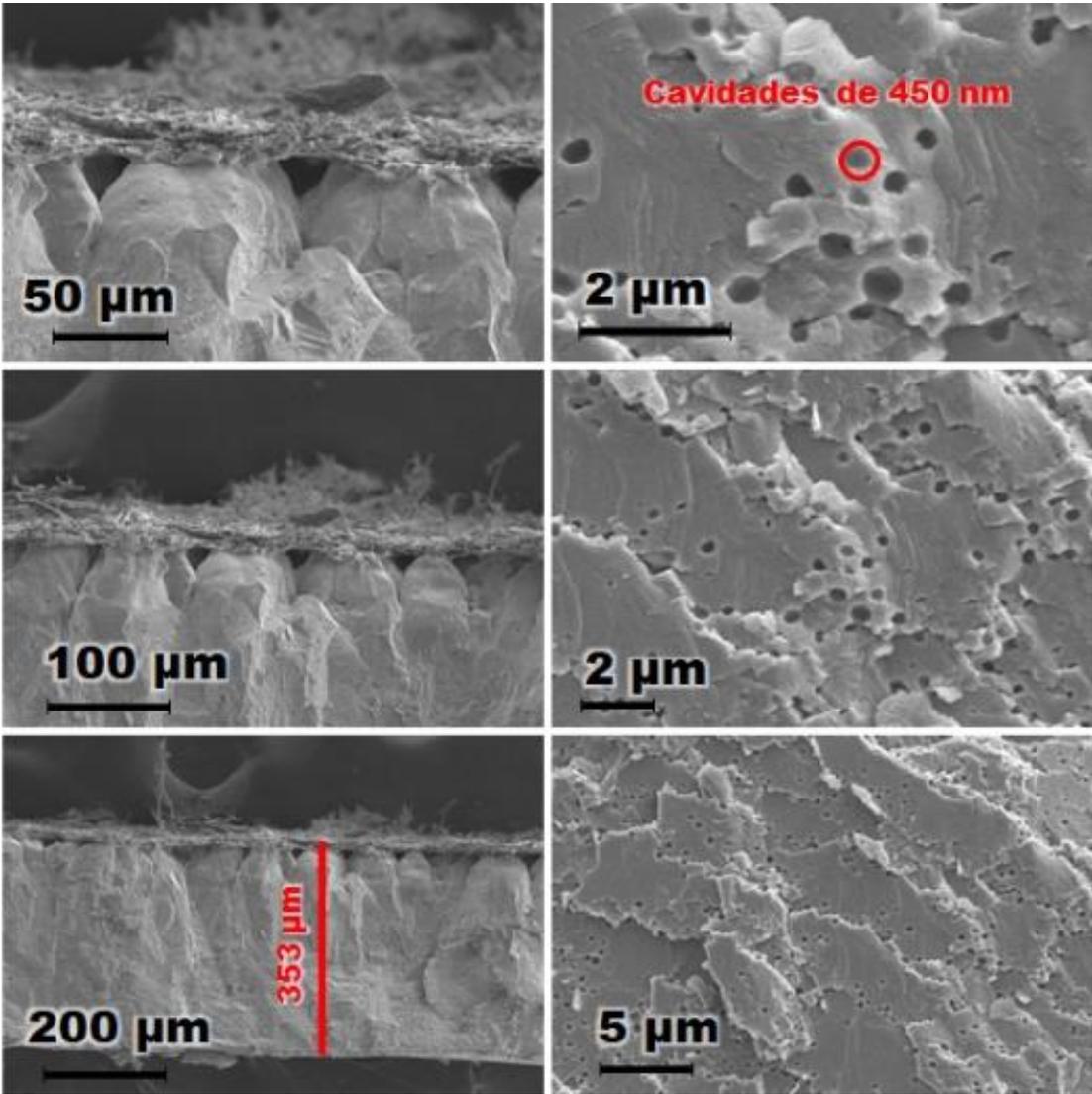
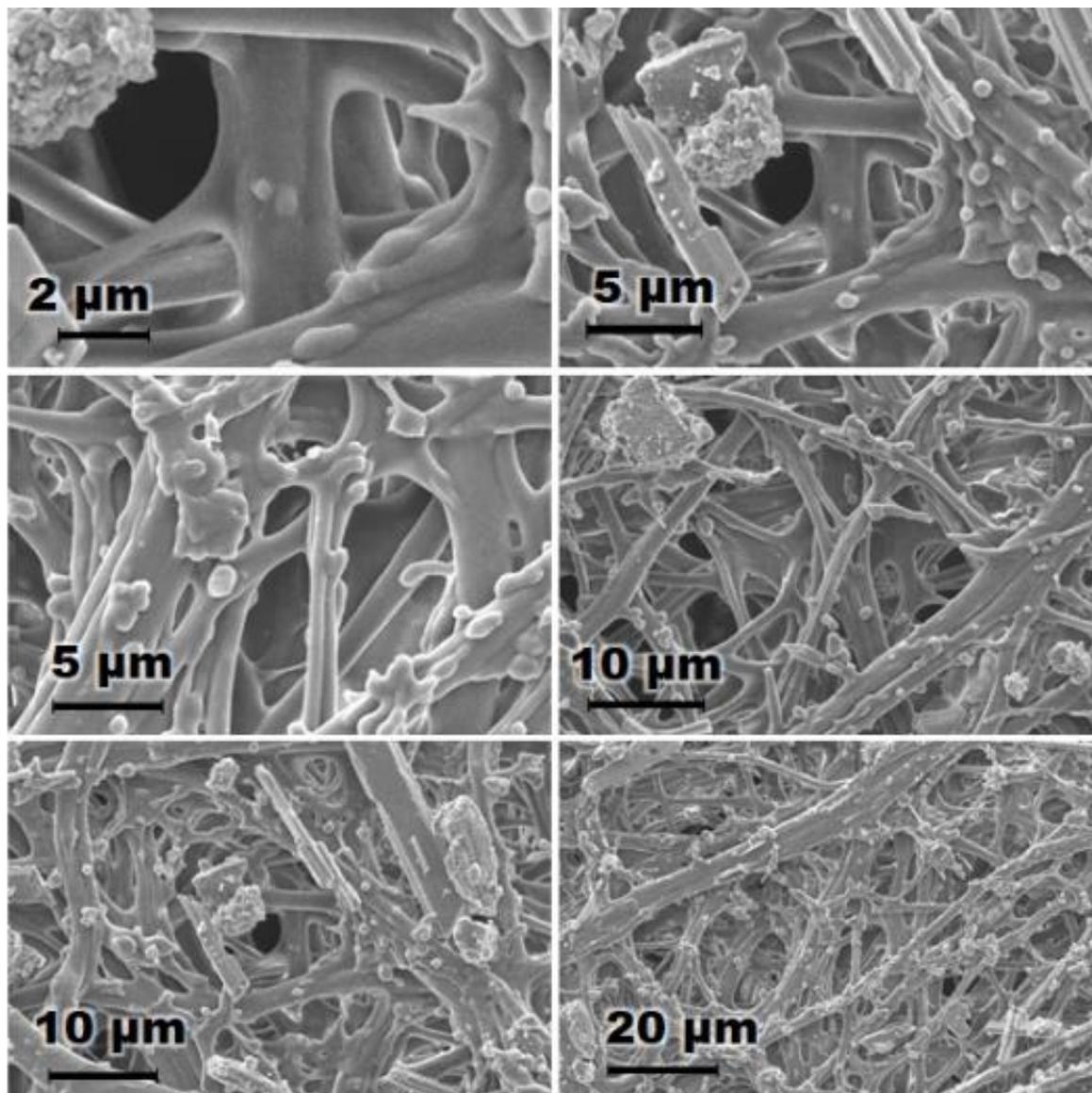


Figura A3. Imagens de MEV da superfície interna do ovo controle em diferentes magnificações, mostrando o filme de fibras de bio-polimero.



ANEXO B - Patente

COBERTURAS E FILMES BIOATIVOS PARA CONTROLE SANITÁRIO E PRESERVAÇÃO DE OVOS

[01] A presente invenção descreve formulações, produtos e dispositivos como filmes e coberturas poliméricas bioativas para aplicação como revestimento de alimentos, principalmente, de ovos. As soluções filmogênicas são preparadas por solubilização acética da quitosana, seguida da incorporação de quaternários de amônio de I a VII geração e plastificantes, como glicerol, sorbitol e outros, além de coadjuvantes para atividade complementar antioxidante, barreira UV e outras. As coberturas podem ser obtidas pela solubilização de quitosana em solução acética. Os filmes ou dispositivos obtidos de quitosana e quaternários de amônio podem ser produzidos por diferentes técnicas como evaporação de solvente, termomoldagem, rotomoldagem, extrusão e injeção. Os dispositivos como filme ou não, possuem funcionalidade e/ou atividade biológica abrangente e podem ser utilizados para produção de embalagens multifuncionais, revestimentos e proteção de alimentos, i.e. ovos. A aplicação pode ser realizada de forma direta por pulverização, banho ou deposição controlada para obtenção de filmes (bio)miméticos auto-secantes. A deposição superficial melhora as propriedades mecânicas, térmicas e, pode atuar como barreira protetiva e biológica para a melhoria da qualidade sanitária da casca dos ovos e aumento do tempo de vida de prateleira.

Estado da técnica

[02] O Brasil é destaque na produção de ovos comerciais. O ovo é um alimento proteico disponível para a população, com composição nutricional equilibrada e baixo custo para os consumidores. O ovo é um produto de origem animal e, portanto, perecível devido às condições ambientais, de produção, transporte, armazenamento e comercialização. Todas estas condições podem, em diferentes intensidades e inter-relações acarretar perda do valor nutricional do produto (OLIVEIRA, E., BRITO, V.M., UMIGI, R.T., VÉRAS, R.M.S. 2018, Análise da qualidade dos ovos comercializados na cidade de Boa Vista – RR. Em: Anais do Congresso Brasileiro de Zootecnia. Campinas: GALOÁ. 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/zootec/papers/analise-da-qualidade-dos-ovos-comercializados-na-cidade-de-boa-vista-%E2%80%93-rr?lang=pt-br>>. Acessado: 16 mar. 2019), principalmente, a qualidade microbiológica com o uso inadequado de produtos nos

processos de higienização, com o aparecimento de linhagens resistentes e toda sua implicação na saúde pública (TÉO, C.R.P.A; OLIVEIRA, T.C.R.M. de. *Salmonella spp*: o ovo como veículo de transmissão e as implicações da resistência antimicrobiana para a saúde pública/*Salmonella spp*.: The egg as vehicle of transmission and the implications of antimicrobial resistance for public health. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 26(2):195-210, abr./jun. 2005. Disponível em: <https://www.redalyc.org/html/4457/445744076009/>. Acessado: 17 mar. 2019).

[03] A sanidade dos ovos comerciais e o tempo de prateleira são condições que precisam ser superadas através do uso de tecnologias e/ou produtos que garantam a adequada qualidade sanitária e microbiológica do produto a partir da superfície da casca do ovo que é sua proteção natural.

[04] No aspecto epidemiológico, a produção de ovos deve seguir critérios de sanidade e qualidade, assim, há necessidade de um estreito controle bacteriológico, principalmente, porque o consumo do ovo esta associado à elevação do número de casos de salmonelose (infecção causada por salmonelas) a partir da contaminação do ovo ou por contaminação que pode ser instalada com a colonização desses micro-organismos a partir das microfissuras ou rachaduras na casca do ovo, que afetam sua qualidade microbiológica e sua aceitabilidade pelo mercado consumidor. Na maioria das vezes a contaminação ocorre através da migração de bactérias para o interior do ovo passando pelas barreiras físicas da casca e microfissuras superficiais ou por contaminação no uso do produto (FIGUEIREDO, T.C. Características físico-química e microbiológica e aminas bioativas em ovos de consumo. 2008. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte).

[05] A qualidade nutricional e microbiológica do produto é essencial para o consumo. Um ovo com qualidade permite ao organismo humano absorção de nutrientes. Neste aspecto, o ovo deve ser processado, transportado, armazenado e conservado em condições adequadas desde a postura até o consumo final.

[06] Na estocagem ou prateleira podem ocorrer alterações nas características físicas, químicas e sensoriais do ovo, como por exemplo, da parte da clara, gema, elevação do pH que pode liquefazer a parte transparente do ovo, permitindo a movimentação de líquidos entre os compartimentos, mudanças na membrana e até rompimento da gema alterando a qualidade do ovo. Estes aspectos podem influenciar negativamente na sua aceitabilidade no mercado. Quaisquer dessas alterações tornam o produto mais susceptível a contaminações

por agentes patogênicos que podem colonizar o produto, diminuindo sua vida útil, alterando o conteúdo nutricional e tornando-se um problema de saúde pública (RAMOS, K.C.B.T.; FLOR, H.R.; CAMARGO, A.M.; CEDRO, T.M.M.; MORENZ, M.J.F. Aspectos qualitativos de ovos comerciais armazenados em diferentes embalagens. XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2008).

[07] De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de dois milhões de pessoas morrem ao ano por consumir alimentos contaminados por bactérias patogênicas, como a *Salmonella typhimurium*, que é o sorotipo que apresenta maior prevalência em gastroenterite e bacteremia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Cinco chaves para uma alimentação mais segura. Portugal, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/consumer/manual_keys_portuguese.pdf>. Acessado em: 05 de agosto de 2018).

[08] Na tentativa de diminuir estas contaminações após a produção dos ovos, diferentes compostos são propostos para tratamento do ovo, por exemplo, compostos a base de cloro que são utilizados como sanitizantes, entretanto, esses compostos não apresentam efeitos duradouros e podem apresentar efeitos carcinogênicos a partir dos produtos de reação com o cloro e conteúdos dos ovos. O hipoclorito de sódio (NaClO) é o composto de cloro mais utilizado devido a disponibilidade, reatividade e baixo custo.

[09] Como alternativa de agente sanitizante para tratamento da superfície dos ovos, os quaternários de amônio (CAQs/quats) são os mais utilizados. Neste aspecto, o cloreto de benzalcônio (quaternário de I geração) e outros produtos quaternários de II, III, IV e V gerações tem sido proposto para tratamento dos ovos comerciais. Estes produtos são interessantes, pois reúnem bioatividade e redução da tensão superficial/detergência/tensoatividade. Todos estes produtos são surfactantes e possuem espectro de bioatividade cada vez mais abrangente para micro-organismos a partir do aumento das gerações da I para a V geração. A sua ação biocida dá-se a partir da sua concentração e estrutura molecular das moléculas e misturas moleculares que interagem com a superfície das células, interferindo na funcionalidade do metabolismo celular, além de romper a membrana com extravasamento do conteúdo celular (ZERDAS, E. R. M. A. Avaliação da eficiência de compostos quaternário de amônio na sanitização de tomate, maçã e rúcula. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa. VIÇOSA MINAS GERAIS- BRASIL 2016).

[010] De forma geral, os produtos químicos são utilizados na rotina das empresas alimentícias para garantir uma maior segurança contra micro-organismos causadores de doenças. Os produtos são utilizados com ação de limpeza e desinfecção de superfícies de contato com os alimentos. Na forma preventiva, busca-se sanitizar as superfícies, que em outras palavras significa a redução da carga de micro-organismos que podem originar doenças. Este tratamento pode reduzir a carga microbiana na superfície, tornando o produto mais seguro de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação, sem alterar a qualidade final do produto. A eficiência de um produto químico utilizado como sanitizante depende da concentração e do tempo de contato previamente estabelecidos, além do efeito residual seguro do produto utilizado na superfície devido à formação de filmes ou camadas por interações eletrostáticas da molécula do produto com a superfície tratada (PFUNTNER, A. Saneantes e desinfetantes: os produtos químicos da prevenção. *Food Safety Magazine*, n.11, p.111-222, ago. 2011).

[011] Se a penetração de bactérias deterioradoras ou patogênicas ocorrer no interior dos ovos, estas podem ocasionar a infecção ou intoxicação via alimentar. Neste sentido, um dos pontos fortes de prevenção é a redução de contaminação. Assim, tecnologias que prevejam o desenvolvimento de estratégias ou produtos com formulações de substâncias protetivas, inibidoras e antimicrobianas são de extrema importância. Considerando que os ovos podem ser contaminados após a postura, o revestimento por filme, óleos ou sanitização com quaternário de amônio com uso de polímero pode permitir manter a qualidade do ovo, proteger durante o armazenamento e aumentar o seu tempo de prateleira na comercialização (CARMO, LIVIA, KEIKO NAGAO DE MEDEIROS JOSIANE KORDIAK DENISE MILLÉO ALMEIDA JULIO CESAR BOTEGA DO. Atividade antimicrobiana em caixas de ovos. IX Congresso Nacional de Excelência em Gestão, jun. 2013).

[012] A superfície da casca do ovo constitui uma barreira natural com a função de evitar a contaminação do conteúdo interno nutritivo. As tecnologias ou formulações que possam ser desenvolvidas ou propostas para proteger ou melhorar a ação dessa superfície pode permitir maior eficiência na produção de aves (ovos galados), maior conservação da qualidade do produto por aumento do tempo de armazenamento ou de prateleira, aumento no consumo do produto, melhoria de entendimento e aprofundamento das técnicas de proteção e sanitização com a utilização de diferentes produtos comerciais, que estão disponíveis para a sanitização com vista à garantia e manutenção da qualidade

microbiológica do produto. Além disso, podem garantir a permanência da qualidade e das características protetoras da casca do ovo nos processos de reprodução e consumo do produto (GONZALES, E.; CAFÉ, M.B. Produção de pintos com qualidade total. In: MACARI, M.; GONZALES, E. Manejo da incubação. Campinas: FACTA, 2003. p.515-526).

[013] Apesar de os ovos de galinha terem sido apontados na literatura como o alimento de maior qualidade nutricional, são também considerados como o de maior vinculação com a salmonelose, pois diferentes micro-organismos podem estar presentes e/ou colonizando o produto a partir da superfície de ovos ou ainda presente no seu conteúdo interno. Pode-se verificar e perceber que cascas finas e/ou defeituosas com rachaduras, microfissuras, porosidade ou sujas com matéria orgânica do ambiente podem aumentar os riscos de infecção em humanos, mesmo após uma lavagem ou sanitização no processo de produção nas granjas ou processo industrial (FOOD SAFETY. *Salmonella* species. Microbial Factsheet Series, September 2011).

[014] As tecnologias de confinamento, ambientação, ração e procedimentos tem sido constantemente propostas, e muitas vezes, empregadas para a produção de ovos de qualidade e nutricionalmente melhores como mostrado e discutido por Oliveira et al (OLIVEIRA, D.L., NASCIMENTO, J.W.B., CAMERINI, N.L., SILVA, R.C., FURTADO, D.A., ARAUJO, TG.P. Desempenho e qualidade de ovos de galinhas poedeiras criadas em gaiolas enriquecidas e ambiente controlado. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. v.18, n.11, p.1186–1191, 2014).

Problemas existentes

[015] O ovo é produto de uma transformação biológica de recursos alimentares de baixos valores em um alimento rico em nutrientes essenciais à vida. Para que essa transformação biológica ocorra, diferentes fatores estão envolvidos no ciclo fisiológico da ave, como a alimentação, ambiente de criação, práticas de manejo e outros procedimentos sanitários. Nos dias atuais, uma ave no primeiro ano de postura consegue produzir cerca de 320 ovos. A alta eficiência na produção está relacionada com a tecnologia do cruzamento de várias linhagens genéticas aplicadas em aves poedeiras que resulta em ovos mais precoces, com maior resistência mecânica da casca e alto valor nutricional do conteúdo (BERTECHINI, A. G. **Mitos e Verdades Sobre o Ovo de Consumo**. Trabalho publicado nos Anais da Conferência APINCO, 2004. p.19, disponível em:

<https://www.avisite.com.br/cet/trabalhos_versao_imprimir.php?codigo=64>).

[016] A casca de ovo de galinha é composta por substâncias orgânicas e inorgânicas. A película interna que reveste a casca é formada por uma rede polimérica de glicoproteínas, mucoproteínas, colágeno e mucopolissacarídeos, enquanto, na casca compostos como CaCO_3 , MgCO_3 e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ compõem a fração inorgânica do ovo (MEDEIROS, F. N; ALVES, M. G. M. Qualidade de Ovos Comerciais. Revista Eletrônica Nutritime, Volume 11 - Número 04– p. 3515- 3524 – Julho/Agosto 2014). A função da casca do ovo como superfície de proteção apresenta-se como uma embalagem natural que garante a integridade dos constituintes do ovo e proporciona rigidez suficiente para suportar o peso de uma ave adulta, por exemplo, durante a incubação. Na superfície da casca do ovo, poros podem ser visualizados a partir da magnificação de 10.000x. A estrutura porosa apresenta cerca de 7.000 mil a 17.000 mil microporos que permite a respiração embrionária. A casca do ovo é, apesar de diferenças de composição, uma estrutura composta de cristais de carbonato de cálcio (CaCO_3) tendo 94% desse componente, 1,4% de carbonato de magnésio (MgCO_3), 3% de glicoproteínas, mucoproteínas, colágeno e mucopolissacarídeos (NETO, J.P.S. Ocorrência de aeróbios mesófilos, coliformes e salmonella sp., em ovos comerciais higienizados por diferentes métodos. Uberaba, MG, 2016. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo. Dissertação (Mestrado). 54p. Disponível em: http://www.iftm.edu.br/visao/loader_anexo_cursos.php?src=250517095421_33_-_joao_paixao_dos_santos_netto.pdf).

[017] A casca é também formada por substâncias orgânicas como colágeno, escleroproteínas e minerais como carbonato de cálcio e magnésio que garantem uma formação resistente e diferenciada de cristalização das substâncias inorgânicas presentes. Sua função é de proteção impedindo a perda de água e contaminação por micro-organismos, devido à presença de uma pequena camada de ceras protetivas nos poros da casca. A membrana interna da casca é formada por fibras proteicas entrelaçadas, que na porção mais larga do ovo permite a entrada de ar, devido aos poros presentes na casca, que tem por função a troca de gases com o ambiente externo, após a postura ocorre o resfriamento da porção interna a uma temperatura ambiente, o ar que entra no interior do ovo é essencial para o desenvolvimento do embrião em condições favoráveis (BENITES, C.I.; FURTADO, P.B.S. E SEIBEL, N.F. Características e aspectos nutricionais do ovo. In:

SOUZA-SOARES, L. A.; SIEWERDT, F. Aves e ovos. PELOTAS: UFPEL, 2005. p. 57-64).

Contaminação microbiológica em ovos

[018] A análise dos mecanismos de proteção e características superficiais a partir da casca do ovo, principalmente, por contaminação microbiológica tem mostrado que vários fatores podem influenciar a qualidade dos ovos interna ou externamente e, diminuir sua qualidade e segurança alimentar, pela disponibilidade de nutrientes ou características sensoriais. Em todos os setores da produção de ovos, criadouros de aves, triagem de ovos, processos ou indústrias de comercialização, a principal preocupação está em melhorar continuamente a genética das aves para a garantia da qualidade nutricional, produtividade, qualidade sanitária e alimentícia do produto (EVA TŮMOVÁ, JANA VLČKOVÁ, DARINA CHODOVÁ. Differences in oviposition and egg quality of various genotypes of laying hens. Czech J. Anim. Sci., 62, 2017 (9): 377–383. doi: 10.17221/22/2017-CJAS).

[019] A produção de ovos ocorre no sistema genital reprodutor da galinha após a ovulação, percorrendo o ovário até a cloaca, onde ocorrem os maiores índices de contaminação que estão relacionados à produção de ovos, principalmente, devido a produção de aves em ambientes inadequados, a falta de condições higiênicas ambientais que permitem o contato do ovo com as fezes das aves durante a postura, a passagem do ovo pela cloaca, o tempo de permanência no ninho, a falta de cuidados na manipulação, transporte e armazenamento (ANDRADE, M. A. *et al.* Avaliação Da Qualidade Bacteriológica De Ovos De Galinha Comercializados Em Goiânia, Goiás, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v. 5, n. 4, p. 221-228, out./dez. 2004).

[020] Os estudos relatam que dentre os principais micro-organismos presentes, as bactérias se destacam, principalmente, *Salmonella thyphimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pullorum* e *Escherichia coli* que são bactérias enteropatogênicas e que podem colonizar a superfície da casca do ovo e penetrar pela superfície que possui porosidades, microfissuras e quebras. A depender das condições favoráveis de penetração e colonização na superfície o produto perde qualidade nutricional e oferece riscos à saúde do consumidor. Neste cenário, o ovo está entre os alimentos que mais causam a doença salmonelose em humanos (NETO, J.P.S. Ocorrência de aeróbios mesófilos, coliformes e *Salmonella* sp., em ovos comerciais higienizados por diferentes métodos. Uberaba, MG, 2016. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto

Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo. Dissertação (Mestrado). 54p.
Disponível em:

http://www.iftm.edu.br/visao/loader_anexo_cursos.php?src=250517095421_33_-_joao_paixao_dos_santos_netto.pdf).

[021] A busca de anterioridade mostrou que diversos estudos têm sido realizados para diminuir a contaminação de ovos.

[022] Algumas patentes, como a patente **US3041212A**, **US5756139A**, **US3113872A**, **US2439808A** e **PI0107967-0** apresentam métodos de tratamento, lavagem e desinfecção dos ovos com ou sem uso de quaternários de amônio. A patente **PI0107967-0** propõe o uso de soluções diluídas ou concentradas de quaternários de amônio (QA) para aplicação sobre alimentos com solubilização dos QA por uso de solventes alcoólicos (glicerol, glicóis e outros) para evitar contaminação e/ou proliferação de micro-organismos em produtos alimentícios, principalmente, produtos cárneos.

[023] A patente **US5753493A** apresenta uma solução de descontaminação dos ovos com saponina triterpênica, para remoção de sujeira e contaminação bacteriana. A solução é uma emulsão coloidal de saponina triterpênica dentro de uma formulação que, quando aplicada sob certas condições, é capaz de reduzir a tensão superficial de um biofilme permitindo a remoção e controle de bactérias subjacentes. O processo consiste em preparar uma solução reciclável usada no enxágue de ovos crus.

[024] A patente **US5756139A** refere-se a um processo de lavagem e desinfecção dos ovos com uma solução aquosa compreendendo quantidades eficazes de um surfactante não-iônico, um surfactante anfotérico e um perácido orgânico.

[025] A patente **EP0738110A1** refere-se ao uso de tratamento térmico para reduzir ou eliminar salmonelas em ovos e para melhorar o seu armazenamento.

[026] As patentes abaixo relacionadas apresentam revestimentos ou embalagens para diminuir a contaminação dos ovos e manter sua qualidade.

[027] A patente **CN1541066B** que apresenta um revestimento para frutos, vegetais e ovos, particularmente orgânicos, para proteger e prolongar o prazo de validade desses produtos. A composição aquosa consiste em: a) um componente hidrofóbico, compreendendo pelo menos um membro do grupo consistindo de cera natural ou óleo vegetal; b) um agente alcalino; c) água; d) aditivo selecionado de extrato de alecrim, extrato de sálvia, água de chá verde, óleo de eucalipto, óleo de lavanda, óleo cítrico, etanol,

extrato de camomila alcoólica, extrato alcoólico de cipreste, extrato de álcool de pera espinhosa, extrato alcoólico ou aloe vera.

[028] A patente **CN101779701B** refere-se a um revestimento para ovo composto por 5-100g de pulunano, 10-100g de glicerol, 10-50g água-repelente, 1-50g de surfactante e o restante sendo solvente. O processo consiste em, primeiramente lavar os ovos, em seguida colocar o agente de revestimento imerso durante 30 segundos.

[029] A patente **PI9903668-1A** apresenta um revestimento (por imersão, aspersão ou atomização) com uma película protetora que funcione como envasamento hermético isolando-o da contaminação externa. Os produtos para fazer o encapsulamento podem ser de cera de abelha, cera vegetal, cera artificial, parafina, plásticos e similares ou produtos que tenham as características de solidificação. A novidade desta invenção consiste em obter por meio do encapsulamento do ovo, que ele adquira uma característica de confinamento hermético, tal como já existe por outros meios na conservação dos alimentos.

[030] A patente **US2340260A** trata de uma embalagem para ovos de borracha sintética clorada que preserva os ovos da ação do ar.

[031] A patente **JP4371806B2** apresenta uma dispersão aquosa para prolongar o prazo de validade de alimentos frescos, incluindo ovos. Esta dispersão compreende um componente hidrofóbico, sendo pelo menos um grupo consistindo em ceras naturais ou vegetais, um agente alcalino natural, água e emulsionante.

[032] No mesmo sentido, a patente **CA2748498C** apresenta uma composição de revestimento contendo um solvente aquoso, um agente formador de película e um tensoativo para formar um revestimento na superfície externa do ovo. As composições e métodos de revestimento líquido descritos facilitam a aplicação mecânica do invólucro, a proteção contra condições ambientais adversas, a prevenção da contaminação, a diferenciação de parentesco dos ovos e permitem a troca de gás apropriada durante os períodos de armazenamento ou transporte.

[033] A invenção **US5019403A** refere-se a uma emulsão ou suspensão hidrofóbica e uma solução aquosa de um material solúvel em água para substratos de alta umidade. A invenção é útil na preservação da qualidade e prazo de validade de produtos agrícolas de alta umidade, como frutas, verduras, ovos e filés de peixe.

[034] A patente **EP0470292B1** tem por objetivo fornecer um método para manter o frescor dos ovos por mais tempo. Consiste em pulverizar a superfície da casca do ovo com

uma composição de triglicerídeos de ácidos graxos saturados, como uma base ativa, contendo de 5 a 21 átomos de carbono ou combinado com triglicerídeos de ácidos graxos saturados contendo de 12 a 22 átomos de carbono. Além disso, é aceitável a adição de germicida e/ou fungicida para preservar ainda mais o grau de frescura dos ovos.

[035] A patente **US3527646A** descreve um revestimento que pode ser utilizado em praticamente todos os alimentos, inclusive ovos. O processo inclui: 1. umedecer a superfície do alimento; 2. aplicar um pó seco contendo um ou mais materiais de amido pré-gelatinizado; 3. a camada de pó aplicada ao alimento é umedecida de modo limitado para formar uma suspensão coloidal contínua na superfície do alimento; e 4. a suspensão de pó é seca para formar uma película flexível amorfa na superfície do alimento e proporcionar o revestimento. O amido pré-gelatinizado que constitui um ingrediente essencial no processo desta invenção pode ser formado a partir de um amido modificado; um derivado de amido ou um derivado de amido com alto teor de amilose.

[036] A patente **JP2000505835A** descreve películas poliméricas opacas e seu método de produção para uso em alimentos. O polímero utilizado pode ser qualquer um, desde que o material resultante apresente pelo menos 50% de cristalinidade e pode estar misturado com outros para chegar a esse resultado.

Quaternários de amônio (quats) como agente surfactante e sanitizante

[037] No processo de higienização de ovos alguns agentes químicos são utilizados no intuito de melhorar o aspecto de aparência e qualidade diminuindo a probabilidade de contaminação, garantindo uma maior aceitação entre os consumidores. Ácido peracético e cloro são alguns dos produtos químicos utilizados na higienização de ovos. O ácido peracético apesar de sua rápida ação em concentrações baixas necessita de cuidados durante seu manuseio por causar irritações na pele e mucosas, além de apresentar baixa estabilidade da solução em temperatura ambiente. O cloro por apresentar um custo baixo e por sua fácil aplicação é um dos sanitizantes mais utilizados no mercado, porém altos índices de cloro podem influenciar na qualidade de ovos tornando-os inaceitáveis, além de causar impactos ambientais adversos (NETO, J.P.S. Ocorrência de aeróbios mesófilos, coliformes e salmonella sp., em ovos comerciais higienizados por diferentes métodos. Uberaba, MG, 2016. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo. Dissertação (Mestrado).

54p.

Disponível

em:

http://www.iftm.edu.br/visao/loader_anexo_cursos.php?src=250517095421_33_-_joao_paixao_dos_santos_netto.pdf).

[038] O uso de desinfetantes na avicultura para desinfecção de ovos férteis é um tema relevante e tem sido pesquisado com diferentes produtos, por exemplo, a análise da eficiência do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não demonstrando efeitos prejudiciais à saúde. Entretanto, apesar da redução de carga patogênica, o uso prolongado desses produtos pode causar resistência em patógenos. O ácido propiônico utilizado em granjas avícolas com ação no combate de bactérias e fungos, com concentração de 10% apresentou resultados de quase 100% de eficácia em 30% das amostras (NETO, J.P.S. Ocorrência de aeróbios mesófilos, coliformes e salmonella sp., em ovos comerciais higienizados por diferentes métodos. Uberaba, MG, 2016. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo. Dissertação (Mestrado). 54p. Disponível em: http://www.iftm.edu.br/visao/loader_anexo_cursos.php?src=250517095421_33_-_joao_paixao_dos_santos_netto.pdf).

[039] A primeira formulação e reconhecimento da atividade bacteriana dos quaternários de amônio (QACs/quats) ocorreu há quase 100 anos, mas foi somente após a segunda guerra mundial que o produto foi utilizado, sua baixa toxicidade e capacidade de formulação permite o uso em diversas ações como limpeza, sanitização, efeito residual por formação de monocamada e desinfecção de superfície (GERBA, C. P. Biocidas Quaternários de Amônio: Eficácia na Aplicação. Publicado online em 5 de janeiro de 2015).

[040] *Os quaternários (quats) de primeira geração (I) são conhecidos como cloreto de benzalcônio ou cloreto de N-alquildimetil amônio. Os quaternários de segunda geração (II) como o cloreto etilbenzil e os quaternários de terceira geração (III) são compostos com maior atividade na presença da água dura (ricas em cálcio, magnésio e ferro), inativam enzimas, desnaturam proteínas e rompem membranas das bactérias, sendo compostos por uma mistura da primeira e segunda geração (I+II). A quarta geração de quaternários (IV) são estruturas químicas que não possuem o anel benzeno e apresentam cadeias lineares com tamanhos e distribuição controlados, contém ação germicida superior das outras gerações, formam pouca espuma e são indicados para desinfecção em indústrias alimentícias e de bebidas, devido a sua baixa toxicidade. O quaternário de amônio de quinta geração (V) é uma mistura convencional do cloreto benzil amônio (I) e*

cloreto didecil dimetil amônio com estruturas, distribuição e cadeias diferenciadas (IV) (I+IV) (POLYORGANIC. Informativo Técnico. Descubra as vantagens do quaternário de 5ª geração. Disponível em: <<https://polyorganic.com.br/Descubras-as-vantagens-do-quaternario-de-5a-geracao/>>. Acesso em: 15 jun. 2018).

[041] Os sais quaternários de amônio (quats) são íons poliatômicos carregados com carga positiva (NR_4^+), onde R é radical alquila de tamanhos diferenciados (radical n). Os cátions quaternários de amônio são sintetizados por alquilação da amônio ou amins. Os compostos de amônio quaternário (quats) possuem estabilidade e atividade biológica/atividade microbicida, dependendo da composição e distribuição das cadeias alquilas (R) no átomo de nitrogênio positivo que interage intensamente com sua superfície negativa (LOFTSSON, T., THORSTEINSSON, T., MÁSSON, M. Hydrolysis kinetics and QSAR investigation of soft antimicrobial agents. *J Pharmacy and Pharmacology*. 57(6):721-727, June 2005. doi: <https://doi.org/10.1211/0022357056226>).

[042] Os quats possuem a função orgânica nitrogenada composta por nitrogênio ligado a quatro grupos orgânicos (Figura 1). Os cátions com cargas positivas permanecem ligados aos ácidos e fosfolipídeos da parede celular dos micro-organismos impedindo a absorção de nutrientes. Os quaternários de amônio são responsáveis por destruir uma grande variedade de micro-organismos, mas não demonstram eficácia na fase esporuladas das bactérias. Em sua maioria, a utilização dos quaternários de amônio como sanitizantes ocorre na concentração de 200 ppm (mg L^{-1}) em superfície de contato com alimentos, após a secagem passam a ter ação germicida, devido a presença de grupamentos hidrofílicos e lipofílicos em concentrações maiores passam a exercer ação de detergentes (PFUNTNER, A. Saneantes e desinfetantes: os produtos químicos da prevenção. *Food Safety Magazine*, Cidade (não entendi), n.11, p.111-222, ago. 2011. (verificar cuidadosamente esta citação).

[043] A literatura relata que os compostos de amônio quaternário são surfactantes e estabilizantes para metais nobres como ouro e outros metais (NUNES, M.R.; GUSHIKEM, Y.; LANDERS, R.; DUPONT, J.; COSTA, T.M.H.; BENVENUTTI, E.V. Charged silsesquioxane used as a vehicle for gold nanoparticles to perform the synthesis of catalyst xerogels. *J Sol-Gel Sci Technol* (2012) 63: 258. <https://doi.org/10.1007/s10971-012-2696-8>). A presença de grupos amônio quaternários pode atribuir atividade biológica complementar (HAN, 2011). Os grupos nitrogenados, como as nanopartículas de metais, por exemplo, AgNPs, podem interagir com membranas celulares de micro-organismos devido a carga, podendo se tornar seletiva e melhorar a permeabilidade celular para

indução de estresse oxidativo, desestruturação da membrana celular, danos e comprometimento da viabilidade e sobrevivência de micro-organismos devido à morfologia, topografia e carga positiva e/ou superfície carregável (SCHARFF, T.G., MAUPIN, W.C. Correlation of the metabolic effects of benzalkonium chloride with its membrane effects in yeast. *Biochemical Pharmacology* Volume 5, Issues 1–2, October 1960, Pages 79-86. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(60\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(60)90010-1)).

[044] As vantagens dos quats estão na capacidade de adsorção, ancoragem/adeseção e penetração na parede celular, baixa toxicidade para células e sensibilidade sobre as células de mamíferos devido a diferença de carga superficial, estabilidade e intensa atividade biológica após sua adsorção sobre a superfície (ROY, 2008). O mecanismo para explicar a atividade biológica dos quats não é completamente conhecido, mas, atribui-se a intensa atividade biológica devido à capacidade das espécies catiônicas (+) de interagirem com a carga negativa (-) das células, aumento de permeabilidade celular, desorganização da membrana celular e favorecimento do rompimento e extravasamento dos conteúdos celulares devido a sua intensa atividade superficial, surfactante/tensoativa (DIZMAN, B; MOHAMED, O. E; MATHIAS, L. J. Síntese e atividades antimicrobianas de Novos Recursos Hídricos Metacrilato de Amônio bis-quaternário solúvel polímeros. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 94, 635–642, 2004.).

[045] Os quaternários de amônio (quats) possuem atividade biológica/bactericida sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, e outras espécies patogênicas (fungos, vírus e protozoários). Os quats como cloreto de benzalcônio e cloreto de cetilpiridínio, são surfactantes catiônicos e utilizados como bactericidas nas formulações de desinfetantes de amplo espectro (LOFTSSON, T., THORSTEINSSON, T., MÁSSON, M. Hydrolysis kinetics and QSAR investigation of soft antimicrobial agents. *J Pharmacy and Pharmacology*. 57(6):721-727, June 2005. doi: <https://doi.org/10.1211/0022357056226>).

[046] A patente **US20020041921A1** apresenta um método de pasteurização dos ovos em banho líquido com agentes antimicrobianos para prevenir a recontaminação dos produtos após a pasteurização e reduzir as bactérias dentro do ovo. Dentre os agentes antibacterianos preferíveis, cita-se quaternário de amônio (QAS), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ozônio, mas pode ser utilizado qualquer outro que seja seguro para consumo humano e apresente atividade antimicrobiana durante a pasteurização.

[047] No mesmo sentido, as patentes **US6692784B2** e **WO2003013278A1** fornecem um método de pasteurização de ovos em um fluido aquecido com temperatura entre 128°F e

146°F (53,33°C e 63,33°C, respectivamente) até que haja uma redução de pelo menos 4,6 log de *Salmonella* dentro dos ovos. Os ovos são removidos do fluido aquecido e colocados em uma atmosfera gasosa. Depois disso, são expostos a um líquido antibacteriano, de modo a evitar a podridão dos ovos. O agente antibacteriano contido no fluido pode ser qualquer um dos bactericidas aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration), incluindo cloro, bromo, ozono, peróxido de hidrogênio e quaternário de amônio.

[048] As invenções **US20130239896A1** e **US20100186674A1** apresentam métodos e composições para aumentar a produtividade de aves fertilizadas oferecendo proteção aos ovos contra condições ambientais adversas, prevenção da contaminação, diferenciação de parentesco dos ovos e permite a troca gasosa durante os períodos de armazenamento e transporte. O revestimento consiste em um solvente aquoso, um agente formador de filme e um tensoativo, podendo ser adicionados ainda, agentes antimicrobianos (como quitosana e quaternário de amônio), corantes, agentes de reticulação, plastificantes, solubilizantes, antioxidantes, ajustadores de pH, agentes umectantes, antiespumantes, extensores, auxiliares de processamento e agentes que aumentem o desempenho.

[049] A patente **US8124169B2** fornece um sistema de revestimento antimicrobiano que pode incluir uma composição filmogênica compreendendo um polímero com peso molecular eficaz e um agente antimicrobiano disperso no polímero. O agente antimicrobiano pode incluir pelo menos um ácido graxo, um monoéter de ácido graxo, um composto contendo íon de metal de transição, um quaternário de amônio, uma biguanida e suas combinações.

[050] A patente **BR102016028651-4** considera o uso de polissacarídeos modificados por substituintes catiônicos (amônio quaternário) e de sílcio numa densidade de 0,1 a 2,5 meq g⁻¹(amônio quaternário) e siliconatos com cerca de 300 a 5000 mg L⁻¹ (ppm) em sílcio. Propõe o uso de diferentes tensoativos para a solução de aplicação em diferentes superfícies queratinácea, celulose, madeira, cerâmica, vidro ou metal.

[051] A patente **BR102017020962-8 A2** descreve mistura polimérica biodegradável com atividade biológica (antimicrobiana) e antioxidante com poli(ácido láctico), poli(etileno-co-acetato de vinila), polietilenoglicol e quitosana para aplicações em alimento, engenharia e farmácia.

[052] A patente **CN109135142-A** propõe um material para embalagem de alimento a partir de um processo com a formulação de premix e extrusão. O produto possui atividade antimicrobiana e formulado a partir de álcool polivinílico, hemicelulose, aldeído oxálico,

proteína de milho, óleo essencial, goma arábica, carboximetil quitosana, composto antibacterial, surfactante e água destilada e/ou diferentes soluções com etanol, óleo essencial ou solução de cloreto de cálcio.

[053] A patente **CN101130574-A** propõe um sal quaternário de amônio de quitosana para uso como umectante ou antioxidante para uso na indústria cosmética ou de alimento considerando o quaternário de amônio derivatizado em quitosana como sal de quitoooligossacarídeos e/ou sal quaternário de amônio de quitosana.

[054] A patente **CN102153673-A** propõe a preparação e uso de um novo sal quaternário de amônio de N-p-fenilmetoximetilquitosana como aditivo conservante de alimentos com massa molar de 45-50 kDa.

[055] A patente **CN102276757-A** descreve a preparação de um sal quaternário de amônio de quitina para uso em cosméticos ou alimentos por adição de hidróxido de sódio, uréia e cloreto de 2,3-trimetilamonio a uma solução de quitina.

[056] A patente **CN103467623-A** e **CN1034467623-B** descrevem a preparação e uso de um novo derivado da quitosana usado como cobertura e preservação de alimentos. A molécula possui um nitrogênio quaternário e um grupo guanidino para atividade biológica e solubilidade em água.

[057] A patente **CN107793855-A** descreve um método de preparação de uma cobertura biodegradável em várias etapas para obter um sal quaternário de amônio de quitosana para aumento da durabilidade de ovos de patos salgados. A cobertura na forma de um filme é preparada a partir da dissolução de quitosana em ácido acético e neutralização controlada por hidróxido de sódio até a formação do filme sobre os ovos.

[058] A patente **CN108752501-A** descreve a preparação de um sal quaternário de amônio contendo um sal ácido orgânico para aplicação na área da medicina, saúde, alimento funcional e cosmético preparado por reação de quitosana com cloreto de 3-cloro-2-hidroxipropil-trimetil amônio.

[059] A patente **CN108795232-A** propõe a preparação e uso de cobertura ou embalagem de alimentos que contém hidroximetilcelulose, 3-glicidoxipropiltrióxissilano, 2-butil-2-etil-1,3-propenodiol e difenilmetanodiisocianato e quitosana tratada.

Filmes de quitosana para sanitização e proteção por revestimento de

OVOS

[060] O ovo possui excelente qualidade nutricional e problemas têm sido encontrados durante sua estocagem/disposição na prateleira. Os problemas mais comuns encontrados são perda de massa, deterioração do conteúdo interno e contaminação microbiana. A troca gasosa de CO₂ e outros gases através da casca podem alterar a qualidade dos ovos. Neste aspecto, é importante proteger e dar proteção adicional à casca do ovo para conservar sua qualidade nutricional durante o período de prateleira. A cobertura por filmes de polímeros naturais (polissacarídeos, proteínas, lipídios isolados ou em mistura) tem sido proposta para a proteção dos ovos no período de 3 a 5 semanas com aceitabilidade do produto pelo consumidor (BHALE et al, 200 BHALE, S., NO, H.K., PRINYAWIWATKUL, W., FARR, A.J., NADARAJAH, K., MEYERS, S.P. Chitosan coating improves shelf life of eggs. JFS: sensory and nutritive qualities of food. Journal of Food Science. 68(7):2378-2383, 2003).

[061] A quitosana é um polímero natural obtido por desacetilação da quitina (Figura 2). A quitina é o maior constituinte de carapaças de crustáceos como caranguejo, camarão e lagosta/lagostim. A quitosana em diferentes formas, isolada ou modificada tem sido proposta para diferentes aplicações em alimentos e na área da saúde.

[062] A quitosana é um polímero natural com extensa aplicação e possui atividade antimicrobiana. Neste aspecto, pode ser uma boa escolha para aplicação em diferentes produtos como filmes protetivos, preparação de adsorventes, uso como intermediário e complexantes de metais nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, cosméticos, produtos químicos, culturas agrícolas, dentre muitas outras aplicações (MAHL, C.R.A., TAKETA, T.B., BATAGLIOLI, R.A, ARRUDA, E.J., BEPPU, M. Chitosan functionalization with amino acids yields to higher copper ions adsorption capacity. Journal of Polymers and the Environment. 2018 26(12):4338-4349. DOI: 10.1007/s10924-018-1306-4).

[063] A literatura mostra que a quitosana pode ser utilizada na preparação de filmes (bio)ativos para exercício da atividade bactericida e/ou fungicida. A atividade biológica é dependente de pH, tipo de micro-organismo, estrutura molecular, espécies presentes e grupos vizinhos e/ou superficiais da quitosana e membrana do micro-organismo.

[064] A quitosana possui elevada (bio)degradabilidade, não é tóxica, possui propriedades antimicrobianas e filmogênicas. Assim a quitosana é uma opção para aplicações na preparação de filmes (bio)ativos com vista a proteção de alimentos, podendo conjugar/oportunizar a sanitização e proteção superficial para diferentes tipos de micro-organismos. Neste aspecto, estudos dos fatores e o mecanismo de ação são partes

importantes a serem investigadas (HOSSEINNEJAD, M., JAFARI, S.M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 85: 467-475, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>).

[065] A influência da massa molecular parece depender do tipo de micro-organismo testado (bactérias e fungos). As quitosanas de baixa, média e alta massa molecular (em inglês, LMW, MMW e HMW) tendem a serem mais ativas que oligômeros de quitosana. Para atividade antifúngica, a quitosana de baixa massa molecular (LMW) parece ser a mais efetiva, embora as diferenças sejam insignificantes em comparação com a quitosana de alta massa molecular (HMW) e seja dependente da espécie de fungos. A quitosana de baixa massa molecular (LMW) parece possuir, um modo duplo de ação, contra fungos, sendo provável, que a quitosana de baixa massa molecular (LMW) possa permear/penetrar mais facilmente na parede da célula fúngica em comparação com a quitosana de média (MMW) ou alta massa molecular (HMW) e, que ainda seja grande o suficiente para realização de interações eletrostáticas, que pode resultar na ruptura da membrana celular e extravasamento do meio intracelular.

[066] Na atividade bactericida, esse modo dual de ação é menos pronunciado e o principal modo de ação é, principalmente, devido à interação eletrostática com os componentes aniônicos da parede celular e seu bloqueio. Em comparação com a quitosana, os derivados de quitosana (oligômeros) e/ou nanopartículas de quitosana têm se mostrado uma alternativa importante para aumento da permeação celular e potencialização da atividade antimicrobiana (NO, H.K., PARK, N.Y., LEE, S.H., MEYERS, S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol*. 2002 Mar 25;74(1-2):65-72; HOSSEINNEJAD, M., JAFARI, S.M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 85: 467-475, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>; KONG MING, XI GUANG CHEN, KE XING, HYUN JIN PARK. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144 (2010) 51–63. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012).

[067] A patente **KR2009006230A** apresenta um revestimento de quitosana contendo um plastificante para preservar a qualidade do ovo. Esse revestimento compreende uma solução de quitosana 2% (m/v), a qual é dissolvida em 1% de ácido acético e contém 2%

(m/v) de plastificante (glicerol, propilenoglicol, sorbitol e sua mistura). O método de revestimento pode ser por imersão, pulverização ou pincel.

[068] A patente japonesa **JP2749764B2** apresenta também um revestimento formado por uma solução ácido fraco de quitosana a ser aplicada na superfície da casca do ovo.

[069] A patente **KR20170127823A** propõe o revestimento de ovos com uma solução de quitosana (1% m/v) com ácido acético (6%) seguida da irradiação gama para aumentar a vida de prateleira do alimento.

[070] Bem como, as patentes **JP200950936A**, **EP0265561B1**, **KR100693803B1**, **BR1020170184749A2**, **BR1020160263140A2**, **BR1020160183065A2**, **BR1020160183081A2**, também apresentam revestimentos para alimentos utilizando quitosana em diversas formulações, mas não combinados com sais quaternários.

[071] A patente **PI1005297-6** refere-se a métodos e composições para tratamento de ovos de aves fertilizados para aumentar a produtividade da incubadora. A composição de revestimento líquido compreende solvente aquoso, agente de revestimento formador de película (álcool de polivinila e copolímero, pvp, poliacrilato), tensoativos, glicóis, agente antimicrobiano (quaternário de amônio) e outros aditivos sobre os ovos durante o armazenamento e de transporte para garantia da viabilidade do ovo).

[072] A patente **PI0417486-0 A** refere-se a processo para tratamento superficial de alimentos através da aplicação de um filme de polímero a base de álcool polivinílico-poliéter tipo enxerto (PVA-PEG/PVAc) em base aquosa e diferentes proporções. A dispersão aquosa permite o tratamento superficial de alimentos e/ou alimentos revestidos com este filme polimérico.

[073] A patente **PI0606561-9 A2** refere-se a um método para a prevenção de crescimento de colônia microbiana sobre uma superfície inanimada (plástica, metálica, vidro ou cerâmica) a partir de uma composição para prevenção de crescimento de colônia microbiana. A patente descreve métodos e composições que podem prevenir crescimento de colônia microbiana, pelo menor, por uma semana sobre uma superfície a partir do revestimento por esta película seca ou substancialmente seca de álcool polivinílico, composto quaternário de amônio e surfactante auxiliar. A película formada *in situ* realiza a proteção a partir da aplicação da solução filmogênica ou emulsão.

[074] A patente **PI0616086-7 A2** refere-se a polímeros quaternizados do tipo quitina/quitosana e polímeros carboidratos funcionalizados solúveis com grupos de amônio quaternário, especialmente, grupo piperazínio.

[075] A patente **PI9607992-4 A** refere-se a um processo para ativação de polissacarídeos, polissacarídeos explodidos na forma de celulose cristalina e aplicação de celulose. O material de partida é polissacarídeo em amônio líquida a pressão maior que a atmosférica a uma temperatura mínima de 25°C, seguido da expansão. O processo pode ser utilizado para ativar celulose, goma guar, amido e quitina. O processo permite a modificação dos polímeros e reatividade maior e eliminação de reagentes no processo de acilação, alquilação, sililação, xantogenação e carbamoilação em reações homogêneas.

Objetivos da invenção

[076] A presente invenção tem por objetivo o uso de quitosana e aditivos antimicrobianos (quaternários de amônio de I a VII geração) para proteção de ovos comerciais. Busca desenvolver tecnologia de aplicação e produção de coberturas e filmes superficiais bioativos com uso de quaternários de amônio (I a VII geração) para controle de microorganismos presentes na superfície da casca do ovo com vista ao aumento da qualidade, segurança e controle sanitário e microbiológico dos ovos comerciais.

Novidade/Inovação

[077] As soluções de quitosana em ácido acético e quaternários de amônio podem ser utilizadas para o revestimento de ovos com atividade abrangente e multifuncional contribuindo para o controle sanitário desse alimento, pois combinam a proteção mecânica e atividade biológica a partir da ação surfactante, atividade biológica antimicrobiana de forma conjunta e abrangente em diferentes níveis de controle sanitário.

[078] A dissolução em meio acético do produto formulado na forma sólida, líquida, emulsões e suspensões pode ser utilizada para sanitização e revestimento de ovos por filmes poliméricos. A produção das formulações pode ser realizada para formulações e aplicações específicas ou diferenciadas.

Descrição detalhada

[079] A presente invenção se refere a composições multifuncionais de quitosana e quaternários de amônio de I a V geração (podendo ser estendido até a VII geração) com atividade biológica abrangente para proteção e sanitização de ovos.

[080] Os produtos e métodos de revestimento por filmes poliméricos bioativos tem por finalidade o controle sanitário e microbiológico da superfície do ovo de forma eficaz,

seletiva e segura. As composições compreendem o uso de quitosana e quaternários de amônio de I a VII gerações na forma sólida, líquida ou emulsões, além de pellets poliméricos com quaternários de amônio para posterior solubilização, com atividade biológica de forma prolongada sobre diferentes micro-organismos.

[081] As formulações filmogênicas de quitosana acética e quaternários de amônio de I a VII geração podem ser produzidas e aplicadas na forma livre (misturas, pellets, soluções filmogênicas), ou contidas em substratos ou matrizes poliméricas, e ainda na forma de emulsões filmogênicas com diferentes neutralizações por bases, metais e aminas, sobre diferentes superfícies para o controle microbiológico.

[082] As diferentes composições são propostas para uso abrangente dos produtos de quitosana, quaternários de amônios e coadjuvantes para diferentes aplicações e formulações no controle primário de micro-organismos. Nesta situação pode inviabilizar diferentes organismos por contato, formação de filmes ou revestimento na superfície de diferentes produtos e embalagens a partir da sua contenção, disseminação, dispersão ou ainda solubilização por umidade após a adesão no substrato ou matriz de contenção por permeação e/ou distribuição superficial para inviabilização de micro-organismos patogênicos ou de interesse agrícola, principalmente a partir da sua distribuição superficial ou absorção pelo organismo.

[083] Os produtos de quitosana acética e quaternários de amônio podem proporcionar controle primário e complementar de micro-organismos presentes na superfície de ovos. As moléculas de quaternário de amônio são biologicamente ativas. A disponibilização e liberação das moléculas de quaternários de amônio podem alterar as condições da superfície para a microfauna presente na superfície dos ovos, interferir no processo de colonização e interações entre as espécies da superfície ou presentes no revestimento. A atividade microbicida pode-se dar a partir do contato e/ou permeação dos ativos para colônias de micro-organismos. O filme polimérico bioativo pode controlar a liberação/retenção de compostos bioativos para controle biológico das diferentes espécies de micro-organismos.

[084] A utilização das formulações e composições com quitosana, quaternários e coadjuvantes/aditivos pode ainda permitir a redução dos impactos ambientais ou contaminação pelo uso massivo de produtos sanitários convencionais, prejudiciais ao ambiente e a saúde humana. A opção de uso de um produto residual da biomassa, quitosana, quaternários de amônio que são derivados de ácidos graxos ou constituintes

modificados por síntese, permite propor e prever uma linha de divisão importante para a pesquisa e utilização de produtos naturais ou seminaturais no controle de microorganismos. Estes produtos podem ser constituídos a partir do resíduo ou subproduto industrial, mesmo que na forma de misturas complexas de quaternários de amônio, comercialmente disponíveis com relativo baixo custo e com reduzido impacto ambiental. A atividade biológica abrangente pode ser explorada em sistemas micelares/nanoparticulados, biodegradáveis, compatíveis com outros produtos sanitizantes ou bactericidas e com reduzido custo, baixo impacto ambiental e para a saúde humana.

[085] Esta invenção pode ser melhor compreendida considerando-se os exemplos de 1 a 4, mostrados a seguir:

[086] **EXEMPLO 1:** Preparação das soluções filmogênicas de quitosana e quaternários de amônio (I a VII geração)

[087] Para o experimento utilizaram-se três amostras em triplicata de cascas de ovos com quitosana e quaternário a 1%, 0,5% e 0,25%. Inicialmente, as soluções foram preparadas com 198 mL água destilada com 2 mL de ácido acético obtendo uma concentração de 1% de diluente. Para a preparação das soluções também foram pesadas 2g de quitosana e esta diluída em 198 mL da solução de ácido acético a 1%(v/v) com a concentração de quitosana a 1%. A amostra permaneceu em agitação por um período de 24 horas, mantida em uma temperatura de 35 a 40°C. Na etapa seguinte, após a agitação por 24 horas, foram adicionados os quaternários de amônio (I e V geração) em função do volume das concentrações 1%, 0,5% e 0,25%, ambas em um volume de 50 mL. Após preparadas as concentrações de quaternário e quitosana as amostras de cascas de ovos foram emergidas na solução por 5 segundos alocadas em placas de petri para secagem em temperatura ambiente por 18 horas.

[088] **EXEMPLO 2:** Análise microbiológica dos quaternários I e V geração com ou sem as amostras revestidas ou não de casca de ovos: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) (Tabela 1).

[089] A atividade antibacteriana dos compostos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo em placas de poliestireno de 96 poços, conforme a metodologia descrita na norma M7-A9 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Informational Supplement. M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012 Jan. 2012;32(3)).

[090] Para os ensaios foram utilizada bactéria da coleção padrão da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076). A bactéria foi cultivada em ágar Triptona de Soja (TSA, Himedia, Mumbai, IND) a 37°C por 24 horas e a concentração do inóculo foi ajustado para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, utilizando o comprimento de onda de 625 nm em espectrofotômetro (Visível Digital Microproce Q898DRM - QUIMIS ISO 8001).

[091] Os compostos de quaternários de amônio (Polybac QT 80 e Polybac CLBZ 05) foram dissolvidos em água destilada, e submetidos a diluições sucessivas (1:2) em microplacas de 96 poços com caldo Müeller Hinton (Himedia, Mumbai, IND) obtendo uma concentração inicial de 4,8% e final de 0,0000183105%, Ácido acético uma concentração inicial de 2% e final de 0,00390625%, quitosana uma concentração inicial de 2% e final de 0,00390625%, e complexo quitosana+quaternários de amônio Polybac QT 80 1,5% á 0,25/0,0046875 á 0,0000091553% e complexo quitosana+quaternários de amônio Polybac CLBZ 05 1,5% á 0,25/0,0023375 á 0,00000457765% incubadas a 37°C por 24 horas. Para o controle do ensaio foi utilizado o antibiótico ampicilina (AMP, Sigma-Aldrich, São Paulo, BRA). A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração do composto no qual os micro-organismos não apresentaram crescimento visível após incubação, foi realizada a leitura visual para determinar se houve crescimento do micro-organismo, além da leitura visual, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada adicionando aos poços 50 µL de solução 0,1% de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC, Vetec, Sigma-Aldrich, São Paulo, BRA) por 30 min (PANGHAL, M.; KAUSHAL, V.J.P. 2010. In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10: 101-200).

[092] Para avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) uma alíquota de 5µL de cada poço da microplaca foi transferido para uma placa de Ágar Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A CBM foi determinada como a menor concentração que não apresentou crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em duplicada em três ensaios independentes (BAGIU, R.V; VLAICU, B; BUTNARIU, M. 2012. Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). *Int J Mol Sc* 13: 1426-1436).

[093] **EXEMPLO 3:** Efeito de quaternário de amônio e complexo quitosana+quaternário de amônio na inibição da formação de biofilme.

[094] A atividade antibiofilme dos compostos foi realizada de acordo Trevisan (Trevisan, D.A.C.; Silva, A.F.; Negri, M. ; Abreu Filho, B.A.; Machinski Junior, M. ; Patussi, E.V. ; Campanerut-Sá, P.A.Z. ; Mikcha, J.M.G. Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences (ONLINE), v. 54, p. e17229, 2018) com adaptações. Cupons de casca de ovo circulares foram utilizados como superfície de adesão, dos quais foram primeiramente higienizados e autoclavados antes do teste. O teste foi realizado em microplaca de poliestileno de 24 poços, onde os cupons foram depositados nos poços. Foi utilizada bactéria da coleção padrão da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), este micro-organismo foi selecionado por ser um dos principais sorovar causador de salmoneloses e o mais prevalente em produtos de frangos.

[095] As bactérias foram primeiramente cultivadas em caldo Soja Trypticaseína (TSB, Himedia, Mumbai, IND) a 37°C por 24 h, e a concentração do inóculo foi ajustado para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, utilizando o comprimento de onda de 625 nm em espectrofotômetro (Visível Digital Microproce Q898DRM - QUIMIS ISO 8001).

[096] Para este teste foram utilizadas concentrações sub CIM para os quaternários de amônio (Polybac QT 80 e Polybac CLBZ 05) até detectar uma concentração que inibisse a formação de biofilme, as concentrações do complexo quartenário+quitosana foram realizadas com base na aplicabilidade destes dois compostos juntos e com base no teste de biofilme utilizando apenas os quartenários de amônio. Os quaternários e complexo quartenário+quitosana foram dissolvidos em meio TSB, (Himedia, Mumbai, IND), para o composto PBQT80 iniciou-se com concentração de 0,00029% e concentração final de 0,009375% para o composto PB CLBZ iniciou-se com a concentração de 0,00014% e concentração final de 0,00046875%, no teste com complexo quartenário PBQT80+quitosana, o PBQT80 iniciou-se com concentração de 0,01875% e concentração final de 0,004666% e 1% de quitosana, no complexo quartenário PB CLBZ+quitosana, CLBZ iniciou-se com 0,09375% e concentração final de 0,00237% e 1% de quitosana.

[097] A montagem das placas foi realizada inicialmente colocando os cupons de casca de ovo nos poços, em seguida foram inseridas alíquotas de 980µL de diferentes concentrações dos quaternários diluídos em caldo TSB, para os complexos quaternários +quitosana foram inseridas alíquotas de 490µL de diferentes concentrações dos quaternários e 490µL de quitosana 1% diluída em caldo TSB em duplicada, seguido da inserção de alíquotas de

20µL de inóculo. Para o controle negativo foram inseridas alíquotas de 1000µL de diferentes concentrações do composto diluídos em caldo TSB em duplicada e para o controle positivo foram inseridas alíquotas de 900µL de caldo TSB em duplicada, seguido da inserção de alíquotas de 100µL de inóculo, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, com agitação orbital de 50rpm.

[098] Para avaliar a atividade dos compostos na formação do biofilme na superfície dos discos da casca de ovo, após o tempo de incubação o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os poços foram lavados três vezes com 1000 µL solução salina tamponada (PBS) para retirada de células bacterianas planctônicas, em seguida os discos foram transferidos para tubos contendo 10 mL de solução salina estéril a 0,9% dos quais foram agitados em vortex por 10 minutos para desagregar o biofilme formado na casca, em seguida foram realizadas diluições seriadas de cada suspensão e as mesmas foram plaqueadas pela técnica "drop plate" em ágar Triptona de soja (TSA). As unidades formadoras de colônia foram contadas após incubação por 24 horas a 37 °C, os resultados foram expressos em Log₁₀, e o percentual de inibição foi realizado seguindo a fórmula abaixo: % inibição do biofilme = 100 - (Log_{teste} / Log_{controle}) × 100.

[099] O experimento foi realizado em três momentos diferentes. As análises estatísticas foram realizadas por one-way ANOVA e teste Tukey através do programa estatístico Graph Pad Prism 7.0 software.

[0100] **EXEMPLO 4:** Caracterização térmica da casca de ovo de galinha sem a membrana protéica interior por (MEV).

[0101] Para análise das características superficiais e morfologia da casca de ovos foram realizados ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figuras 5 a 10). A morfologia da casca do ovo de produção comercial (ovo de granja) e ovo de produção familiar (ovo caipira) foi analisada para averiguar as diferenças na estrutura da casa. Para esse efeito, utilizou-se um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM), trabalhando a 10 kV. Para preparar as amostras, um pedaço a casca em formato circular de 11 mm de diâmetro foi fixado na porta amostra com fita carbono. O material foi secado em estufa a 40°C por 12 horas.

REINVINDICAÇÃO

1. COBERTURAS E FILMES BIOATIVOS PARA CONTROLE SANITÁRIO E PRESERVAÇÃO DE OVOS, caracterizado por ser fabricado e apresentar diferentes formas de aplicação, como:

a) Filmes, soluções, emulsões, pellets/granulados, sólidos (pastosos, géis, resinosos, emulsionáveis ou ainda dispersáveis em água) e solventes a base de quitosana e quaternários de amônio;

2. COBERTURAS E FILMES BIOATIVOS PARA CONTROLE SANITÁRIO E PRESERVAÇÃO DE OVOS, conforme a reivindicação 1, os produtos caracterizam-se por apresentar:

- a) Atividade biológica abrangente e multifuncional;
- b) Ação sanitizante em alimentos.

3. COBERTURAS E FILMES BIOATIVOS PARA CONTROLE SANITÁRIO E PRESERVAÇÃO DE OVOS, conforme a reivindicação 1, os produtos caracterizam-se por apresentar:

- a) Formulações de sais quaternários de amônio de I a VII geração;
- b) Formulações de um ou mais (misturas) sais quaternários de amônio de I a VII geração.

4. COBERTURAS E FILMES BIOATIVOS PARA CONTROLE SANITÁRIO E PRESERVAÇÃO DE OVOS, conforme a reivindicação 1, os produtos caracterizam-se por apresentar:

- a) Formulações de sais quaternários de amônio em forma de filmes, revestimentos ou para aspersão;
- b) Formulações de sais quaternários de amônio com quitosana em forma de filmes, revestimentos ou para aspersão.

5. COBERTURAS E FILMES BIOATIVOS PARA CONTROLE SANITÁRIO E PRESERVAÇÃO DE OVOS, conforme a reivindicação 1, os produtos caracterizam-se por apresentar aplicação como:

- a) Material para revestimento, aspersão ou filmes em ovos;
- b) Material para revestimento, aspersão ou filmes em caixas para ovos.

6. COBERTURAS E FILMES BIOATIVOS PARA CONTROLE SANITÁRIO E PRESERVAÇÃO DE OVOS, conforme a reivindicação 1, os produtos caracterizam-se por apresentar aplicação como:

- a) Produto comercial em pó para aplicação caseira, contendo quitosana e quaternário de amônio (10% massa total).

FIGURAS E TABELAS

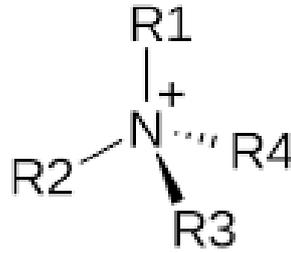


Figura 1. Fórmula estrutural geral de um sal de amônio quaternário composto por grupos nitrogenados e radicais ligados com tamanhos e distribuição diferenciados.

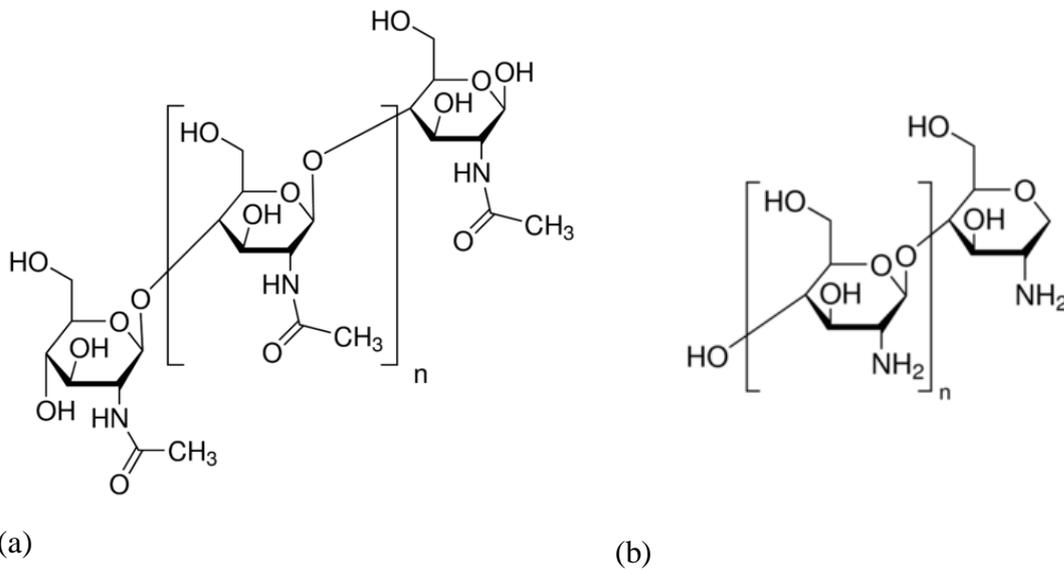


Figura 2. Estrutura da quitina (a) e quitosana (b) com detalhe para os grupos desacetilados, obtidos a partir de diferentes graus de desacetilação da quitina e, carregados positivamente quando em meio ácido.

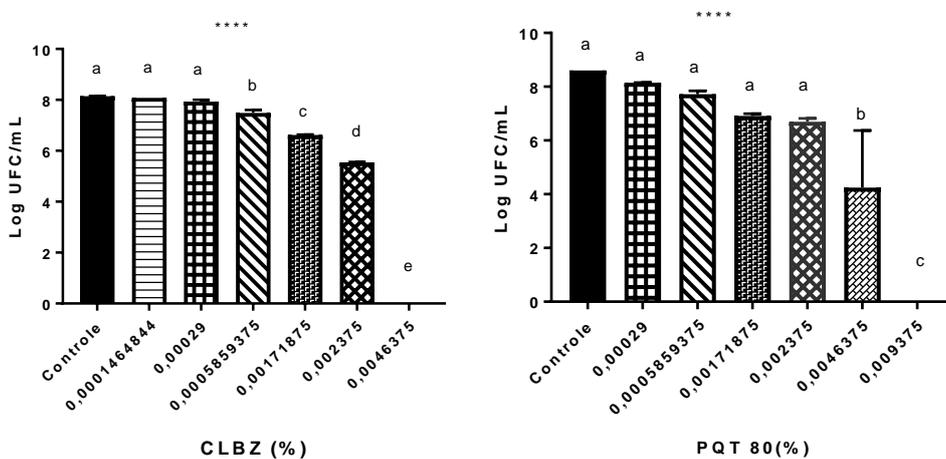


Figura 3. Efeito dos quartenários PQT 80 e CLBZ na formação do biofilme de *Salmonella* Enteritidis **** $p < 0.001$ (ANOVA).

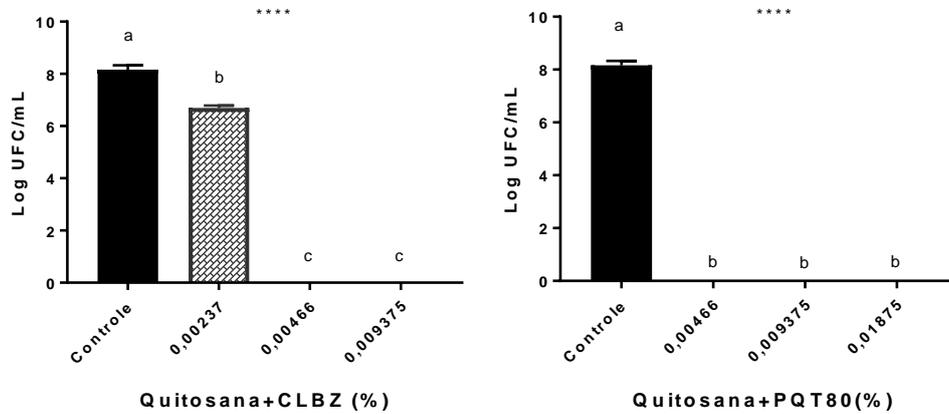
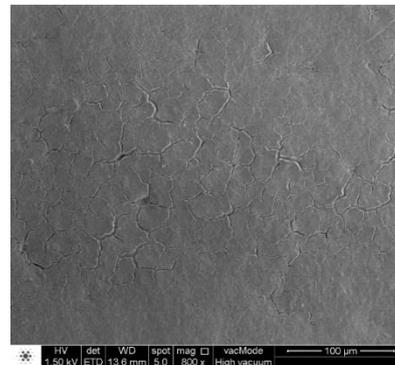
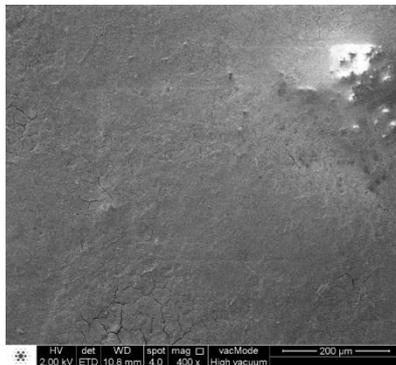


Figura 4. Efeito dos complexos Quitosana 1%+PQT 80 e Quitosana1%+CLBZ na formação do biofilme de *Salmonella* Enteritidis **** $p < 0.001$ (ANOVA).

Na Figura 5 são mostradas micrografias da casca de ovos de galinha comerciais com diferentes magnificações de 400x, 800x, 1.200x e 2.500x, respectivamente. As imagens mostram detalhes superficiais da casca do ovo como microfissuras, espessura, compactação, filme proteico interno e outras detalhes de morfologia.



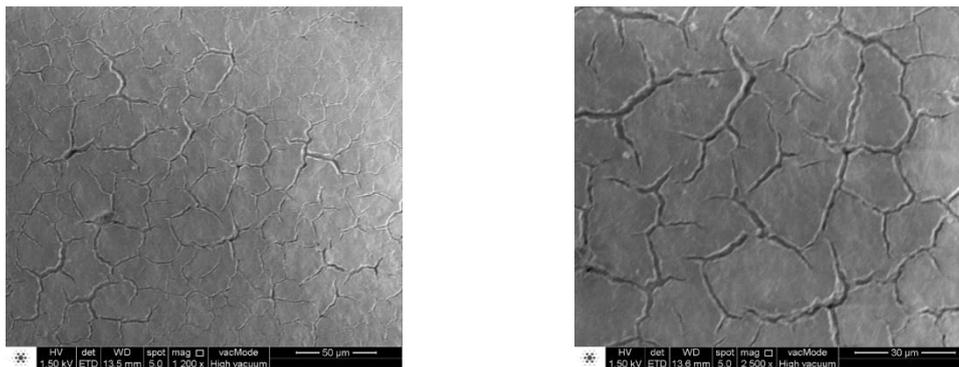


Figura 5. Micrografias da superfície do ovo com diferentes ampliações.

A Figura 6 apresenta uma imagem lateral da espessura e morfologia da casca com um aumento de (400x, 800x, 1.600x e 3.000x), respectivamente, evidenciando detalhes de compactação da estrutura, filme proteico interno e morfologia da superfície.

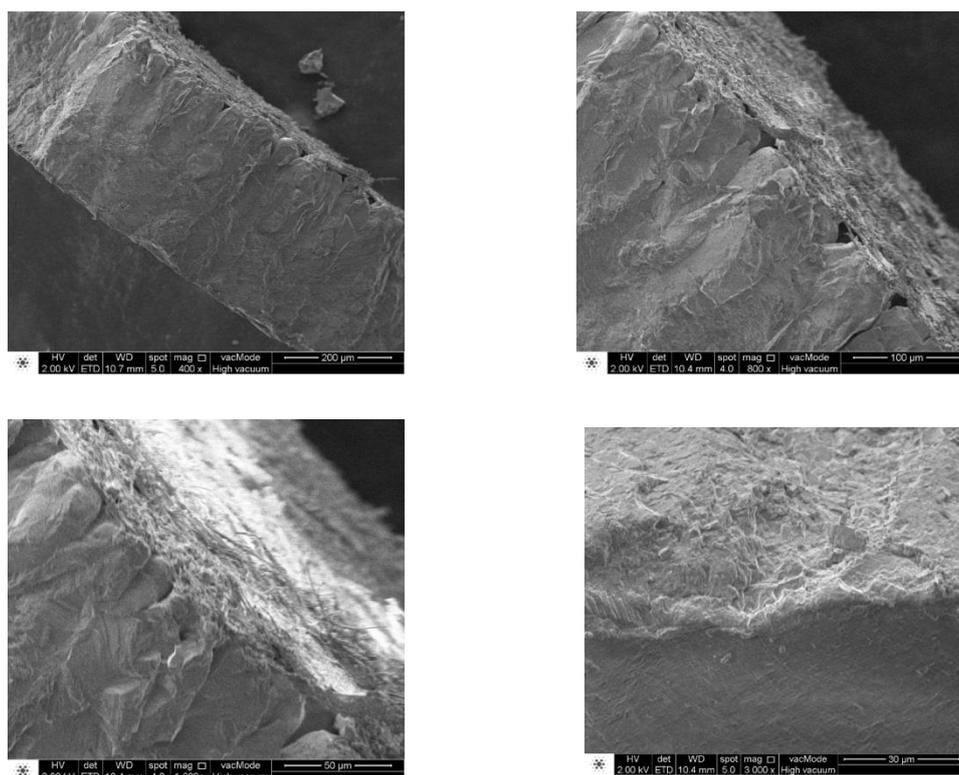


Figura 6. Microscopia da lateral da casca de ovo evidenciando detalhes de compactação da estrutura, filme proteico interno e morfologia da superfície.

Na Figura 7 observam-se detalhes do filme proteico, que possui atividade

bactericida e é a segunda barreira de proteção do ovo. As magnificações das micrografias são 300x, 800x, 1.000x e 3.000x, respectivamente.

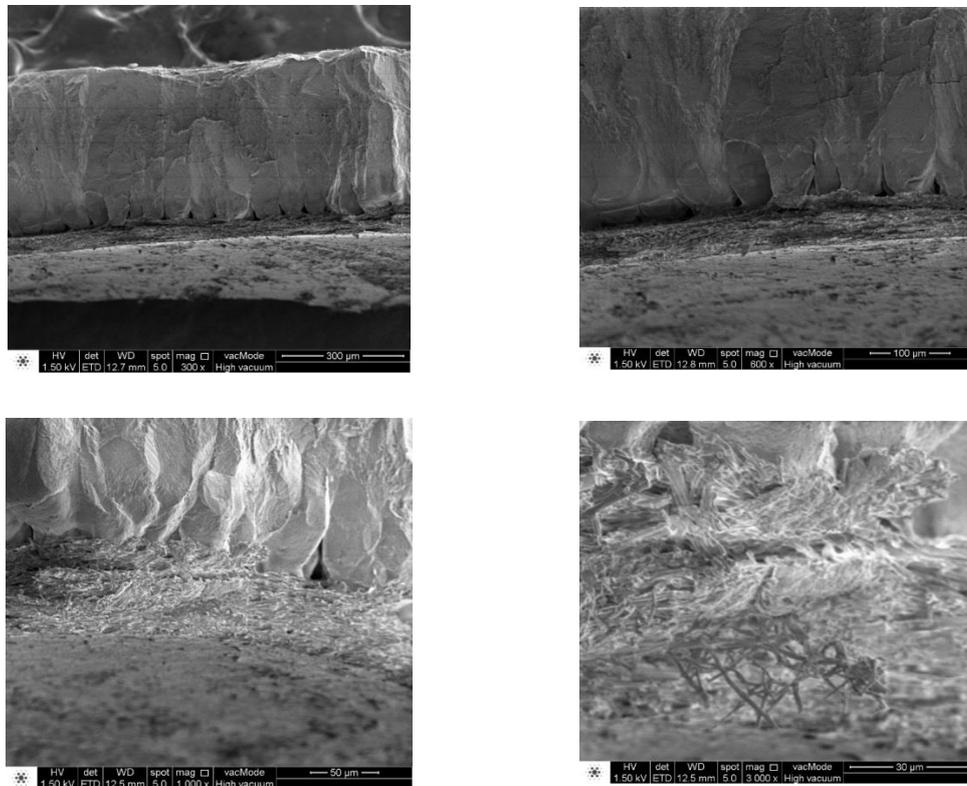


Figura 7. Microscopias com detalhes do filme protéico interno da casca do ovo.

Na **Figura 8** pode-se observar detalhes da casca de ovos que apresentam uma estrutura pouco porosa em diferentes magnificações 200x, 500x, 1.500x e 3.000x, respectivamente.

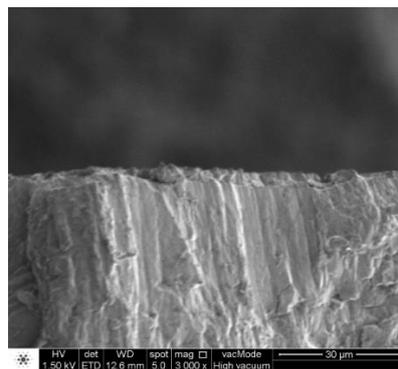
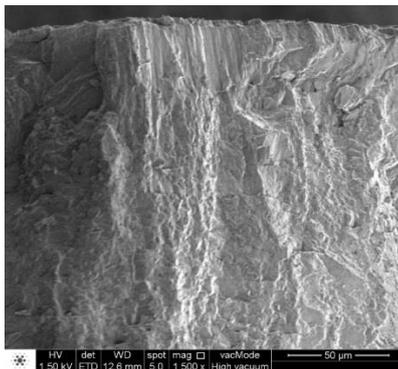
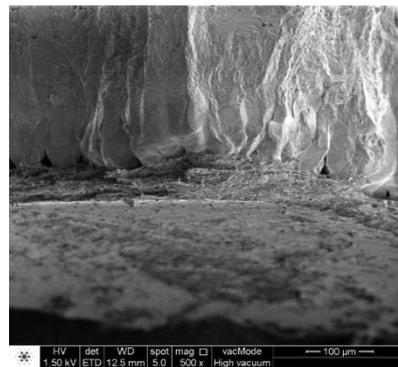
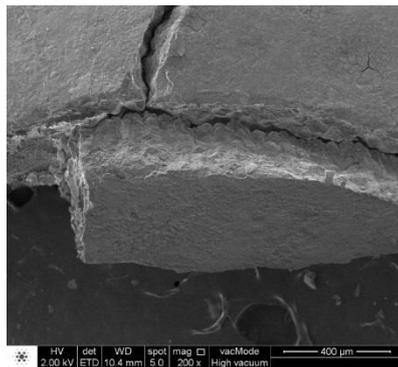
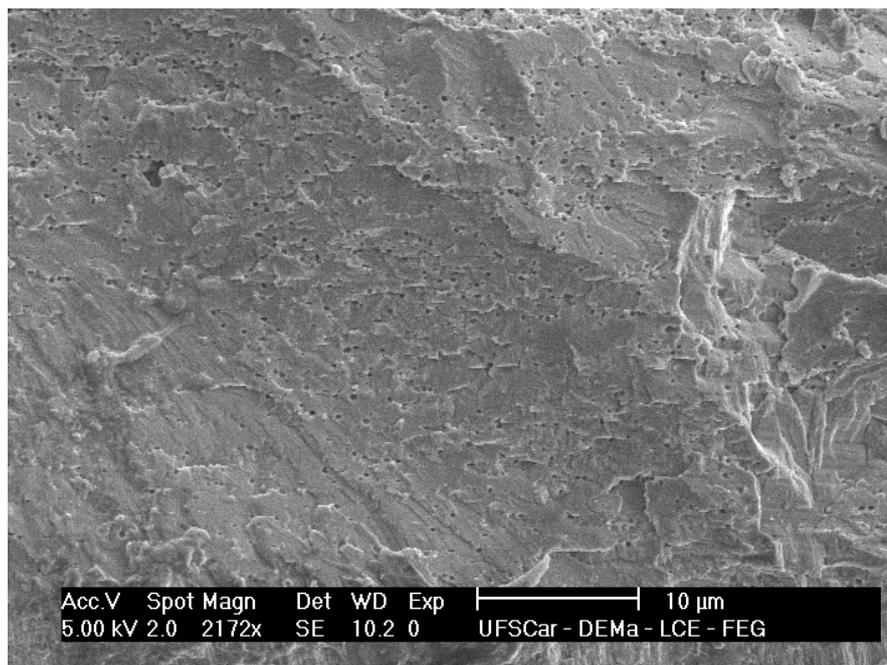
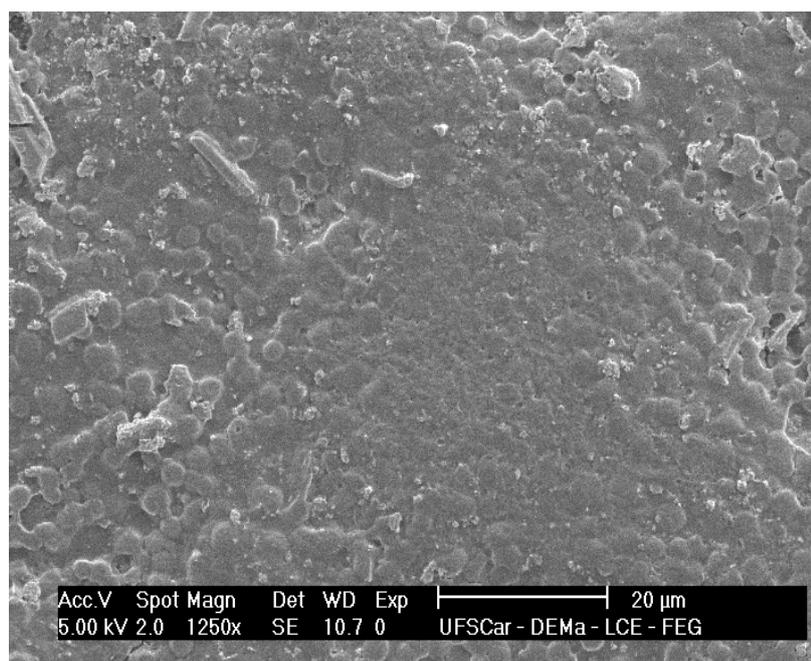


Figura 9. Microscopias com detalhes em ampliação contínua da lateral da casca do ovos para análise de porosidade.



A



B

Figura 10. A) Poros característicos do ovo sem recobrimento de filme. B) Ovo com recobrimento de filme.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em %/mL dos compostos utilizados frente à *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.

Compostos	CIM (%/mL)	CBM (%/mL)
Ácido acético	0,25	1,0
PB QT 80	0,00029	0,00029
PB CLBZ 05	0,00014	0,00014
Qitosana	0,0625	0,025
Qitosana+ PB QT 80	0,25/0,0000091553	0,25/0,0000091553
Qitosana+ PB CLBZ 05	0,25/0,0000091553	0,25/0,0000091553

RESUMO

COBERTURAS E FILMES BIOATIVOS PARA CONTROLE SANITÁRIO E PRESERVAÇÃO DE OVOS, se refere ao uso de soluções filmogênicas bioativas, (bio)miméticas e auto restauráveis com quitosana e quaternários de amônio de I a V geração e seu uso em diferentes formas de formulações (soluções, emulsões, pellets/granulados, líquidas, emulsões, géis e dispersões) com atividade microbiológica e de proteção na superfície de ovos de forma abrangente. A quitosana e os quaternários de amônio na forma livre ou combinada em produtos com formulações diferenciadas podem ser utilizados para a dispersão, (micro)pulverização, impregnação ou encapsulação, incluindo alimentos e outros substratos. Estes produtos filmogênicos ou de liberação controlada podem reduzir a incidência de contaminações e redução dos impactos na saúde pública, além do aumento da qualidade sanitária e tempo de vida de prateleira. Além disso, reduzem os custos econômicos de produção e comercialização de ovos e/ou similares a partir da proteção dos filmes bioativos pelo controle biológico.