

Petrifilm™, Um Método Alternativo no Controlo Microbiológico de Margarinas?

Carla Marina Rosa *

Maria Fernanda Ferreira, Prof. Adj., Área Departamental Eng.^a Alimentar, EST/UAAlg

RESUMO

O método Petrifilm, também conhecido como *dry film*, foi utilizado na comparação dos coeficientes de correlação obtidos no controlo microbiológico de margarinas.

1. INTRODUÇÃO

O procedimento do método tradicional e do método de Petrifilm têm apenas em comum a colheita e preparação da amostra. Segundo o método tradicional seguir-se-ia a sementeira da amostra em placa de Petri, utilizando o método de incorporação e sua incubação á temperatura indicada pelo fornecedor.

O método de Petrifilm resume-se a três passos simples e rápidos: 1) Inoculação e espalhamento do inóculo em meio de cultura apropriado; 2) Incubação; 3) Contagem de colónias.

Um método para ser aceite tem ser considerado satisfatório e aplicável. Se o método de determinação utilizado depender de uma curva de calibração, esta deve ser realizada a partir de um mínimo de seis padrões analisados em duplicado e respeitando as condições de repetibilidade. (AFNOR 1992, J.O.C.E. 1989).

2. PROCEDIMENTO

2.1.MATERIAL LABORATORIAL

- Placas de Petri
- Membranas 3M™ Petrifilm™
- Bico de Bunsen
- Pipetas graduadas (1,00 ml, 2,00 ml, 5,00 ml, 10,00 ml, 20,00 ml)
- Copos esterilizados
- Balança Analítica
- Provetas graduadas
- Balões de fundo raso (50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml)

➤ Estufas

- Autoclaves
- Termoestatizador
- Difusor plástico do meio de cultura
- Frascos Durhan

2.2. PRODUTOS^(*)

- Margarina A1 (250 g)
- Margarina A2 (1 Kg)
- Margarina B1 (250 g)
- Margarina B2 (500 g)

2.3. MEIOS DE CULTURA

No controlo microbiológico de margarinas pelo método tradicional e pelo método de Petrifilm, utilizaram-se os seguintes meios: no primeiro método utilizou-se o meio **Plate Count Agar (PCA)**, para a determinação de microrganismos mesófilos aeróbios totais, o meio **Oxytetracycline Glucose Yeast Agar (OGYEA)** selectivo para bolores e leveduras e o meio **Violet Red Bile Agar (VRBA)** selectivo para as *Enterobacteriaceae*.

Para o segundo método, utilizou-se o meio **Aerobic Count Petrifilm (ACP)**, indicado para a determinação de microrganismos mesófilos aeróbios, o meio **Petrifilm Yeast & Mould (PYM)** selectivo para bolores e leveduras e o meio **Enterobacteriaceae (ENT)** selectivo para a Família *Enterobacteriaceae*, que inclui todas as bactérias coliformes e não coliformes fermentadoras da glucose.

2.4. MÉTODOS

2.4.1. Colheita da amostra

Com os devidos cuidados de assépsia foi feita a recolha dos vários tipos de amostras de margarinas, incluindo as suas fases

^(*) - Por razões de confidencialidade foram atribuídos estes códigos aos dois tipos de margarina:(culinária e barrar)

aquosa, oleosa, emulsão antes e depois do cristizador. Foi também feita a recolha do leite nos vários locais onde estava armazenado, incluindo o carro, o flexível, e os vários tanques.

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia imediatamente, a fim de ser feito o respectivo controlo microbiológico.

2.4.2. Preparação da amostra

No laboratório todas as amostras foram devidamente codificadas e colocadas sob uma bancada previamente desinfectada.

Para a análise das margarinas retirou-se 20 gramas de cada amostra, que foram colocados num frasco com 37 ml de soro fisiológico ambos esterilizados.

Para a análise das emulsões das margarinas, foram retirados 33 ml da amostra, com a ajuda de uma pipeta graduada esterilizada, que foram colocados num frasco com 37 ml de soro fisiológico ambos esterilizados.

Para a análise das fases oleosas retiraram-se 37 ml que foram introduzidos num frasco esterilizado com 37 ml de soro fisiológico esterilizado. Posteriormente as amostras das fases oleosas e as emulsões foram colocadas em banho-maria a uma temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante ± 45 minutos, a fim de separar as duas fases da emulsão. Após a separação das fases aquosa e gordurosa, os frascos foram retirados do banho-maria, e foram homogeneizados durante alguns segundos num agitador mecânico, a fim de se obter uma dispersão homogénea dos microrganismos. Para análise microbiológica retirou-se 1 ml da solução mãe e colocou-se num tubo de ensaio com 9 ml de soro fisiológico esterilizado (diluição 1:10).

2.4.3. Sementeira da amostra

2.4.3.1. Método tradicional

A partir da solução mãe das amostras de leite e margarina foram preparadas as diluições de 1:10 e 1:100 respectivamente. Da suspensão mãe e de cada uma das diluições preparadas, retirou-se assepticamente 1 ml, que se colocou na placa de Petri juntando-se logo de seguida o

meio apropriado pelo método de incorporação.

2.4.3.2. Método de Petrifilm

A partir da solução mãe das amostras de leite e margarina foram preparadas as diluições de 1:10 e 1:100 respectivamente. Colocou-se a membrana de Petrifilm sob uma superfície plana, levantou-se a folha superior da membrana e colocou-se separadamente 1ml da suspensão mãe e 1 ml de cada uma das diluições da amostra a analisar no centro da folha inferior da membrana que contém o meio selectivo apropriado (varia para cada diluição de cada amostra). Recobriu-se com a folha superior e espalhou-se a amostra com um difusor plástico especial, com o lado liso para baixo, exercendo uma ligeira pressão. A água contida na amostra rehidrata os componentes formando um gel entre as duas folhas com uma área aproximadamente de 30 cm^2 para o meio selectivo de bolores e leveduras, e uma área aproximadamente de 20 cm^2 para o meio de mesófilos aeróbios totais. A solidificação do meio obteve-se ao fim de 2 minutos.

2.4.4. Contagem de colónias

Em todos estes meios a contagem está muito facilitada, uma vez que todos os microrganismos que crescerem, se identificam bem por absorverem o corante incluído no meio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados das fases aquosas, a contagem de microrganismos mesófilos totais para a margarina B1 e B2 no tanque (4*)⁽¹⁾ e para o Folhado no tanque (1)⁽²⁾, apresentou apenas quatro padrões. Nos resultados dos produtos finais foram obtidos apenas dois padrões, para margarina A1, cinco para B1 e quatro para a B2 o que poderá influenciar o resultado da correlação linear levando assim a resultados com algum nível de erro por defeito. Devido ao material ser dispendioso, não se efectuaram análises em duplicado em todas as amostras realizadas, aumentando assim a margem desse erro.

⁽¹⁾ ⁽²⁾ - Designações dadas pela fábrica

A correlação linear pode ter valores entre -1 e +1 inclusive, correspondendo a primeira a uma relação negativa perfeita, e a segunda a uma relação positiva perfeita. Comparando as duas fases aquosas das margarinas B1 e B2, no tanque (4*) e Folhado no tanque (1), verificou-se uma grande diferença entre as correlações para mesófilos aeróbios totais, de cada uma das amostras referidas. As margarinas B1 e B2 apresentaram uma correlação de 0,99 para 25 °C e 30 °C e o Folhado apresentou uma correlação de 0,44 para 25 °C e uma correlação de -0,109 para 30 °C.

Uma possível explicação para tal desconformidade, poderá estar na diferença dos tanques, pois a fase aquosa antes de chegar ao tanque (1), tem de passar por várias etapas. Neste tanque as fases aquosas estão em movimento contínuo, pois o tanque (1) está inserido numa linha de produção com muita saída, o que não acontece no tanque (4*), em que todo o processo de pasteurização e armazenamento é realizado no mesmo local.

A margarina **A1** analisada segundo os métodos tradicional e Petrifilm a 25 °C, apresentou uma correlação de **0,55** para a fase aquosa (Gráfico 1) e sem correlação para o produto final (Gráfico 2). Na comparação do método tradicional a 25 °C com o método de Petrifilm a 30 °C a correlação para a fase aquosa é de **0,22** (Gráfico 1) e para o produto final é de **1** (Gráfico 2).

Gráfico 1 - Comparação dos valores obtidos nos dois métodos (PCA/ACP), na fase aquosa da margarina A1 a 25 °C e 30 °C.

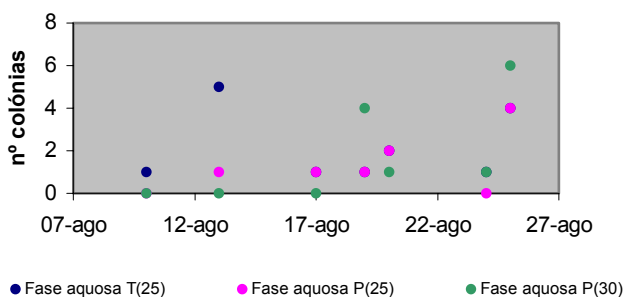
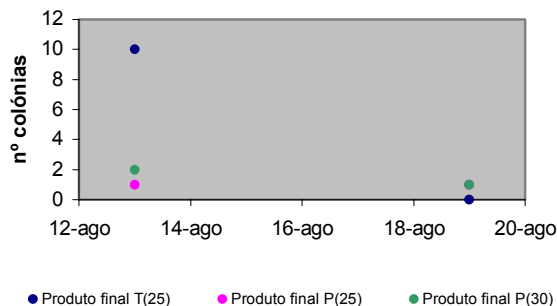


Gráfico 2 - Comparação dos valores obtidos nos dois métodos (PCA/ACP), no produto final da margarina A1 a 25 °C e 30 °C.



Na Tabela 1 é possível verificar a relação entre os valores obtidos na correlação obtidos entre os dois métodos utilizados para a margarina A1.

Tabela 1- Coeficientes de correlação linear obtidos nos dois métodos (Tradicional/ Petrifilm) para a margarina A1.

PCA/ACP	Tradicional (25°C) / Petrifilm (25°C)		Tradicional (25°C) / Petrifilm (30°C)	
	F.Aquosa	P.Final	F. Aquosa	Produto Final
	0,55	0	0,22	1,00

Analisando a margarina **A2**, verificou-se que na comparação entre os métodos tradicional e Petrifilm a 25 °C, a fase aquosa teve uma correlação de **0,55** (Gráfico 3) e o produto final apresentou uma correlação linear de **0,959** (Gráfico 4). Na comparação do método tradicional a 25 °C e do método de Petrifilm a 30 °C, a fase aquosa teve uma correlação de **0,22** (Gráfico 3) e o produto final teve uma correlação linear de **0,948** (Gráfico 4). Em ambas se verificou que as correlações foram melhores no produto final do que na fase aquosa, sugerindo a possível aplicação do método de Petrifilm no controlo microbiológico destas margarinas.

Gráfico 3 - Comparação dos valores obtidos nos dois métodos (PCA/ACP), na fase aquosa da margarina A2, a 25 °C e 30 °C.

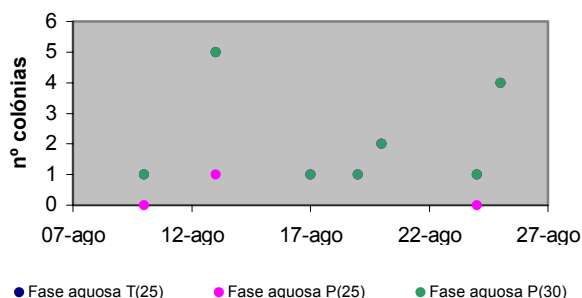
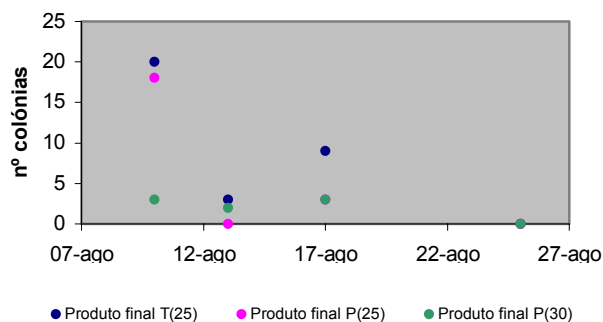


Gráfico 4 - Comparação dos valores obtidos nos dois métodos (PCA/ACP), no produto final da margarina A2, a 25 °C e 30 °C.



Na Tabela 2 é possível verificar as correlações entre os dois métodos para margarina A2

Tabela 2 - Coeficientes de correlação obtidos entre os dois métodos (Tradicional/ Petrifilm) para a margarina A2.

PCA/ACP	Tradicional (25°C) / Petrifilm (25°C)		Tradicional (25°C) / Petrifilm (30°C)	
	Fase Aquosa	Produto Final	Fase Aquosa	Produto Final
	0,55	0,96	0,22	0,95

Para a margarina **B1** verificou-se que na comparação segundo os métodos tradicional e Petrifilm a 25 °C, a fase aquosa apresentou uma correlação linear de **0,99** (Gráfico 5) e o produto final uma correlação linear de **0,986** (Gráfico 6). Na comparação do método tradicional a 25 °C com o método Petrifilm a 30 °C, a fase aquosa teve uma correlação linear de **0,99** (Gráfico 5) e o produto final teve uma

correlação linear de **0,983** (Gráfico 6). No caso desta margarina os valores de correlação linear são muito próximos, o que significa que os valores obtidos pelo método de Petrifilm são viáveis e de confiança, sugerindo a viabilidade da aplicação do método de Petrifilm no controlo microbiológico das margarinas B1 e B2.

Gráfico 5 - Comparação dos valores obtidos nos dois métodos (PCA/ACP), na fase aquosa da margarina B1 a 25 °C e 30 °C.

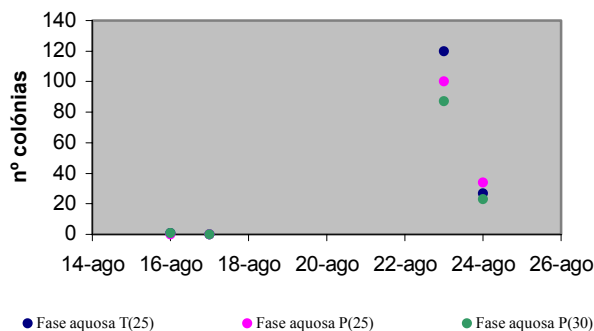
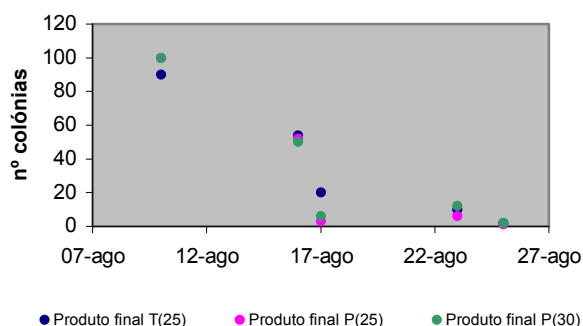


Gráfico 6. - Comparação dos valores obtidos nos dois métodos (PCA/ACP), no produto final da margarina B1, a 25 °C e 30 °C.



Na Tabela 3 é possível verificar a correlação linear entre os dois métodos para margarina B1

Tabela 3- Coeficientes de correlação linear obtidos entre os dois métodos (Tradicional/ Petrifilm) para margarina B1.

PCA/ACP	Tradicional/Petrifilm 25°C		Tradicional/Petrifilm 30°C	
	F. Aquosa	P. Final	F. Aquosa	P. Final
	0,99	0,99	0,99	0,98

Para a margarina **B2**, verificou-se que na comparação entre o método tradicional e o método de Petrifilm a 25 °C, a fase aquosa apresentou uma correlação linear de **0,99** (Gráfico 7) e o produto final não apresentou correlação (Gráfico 8). Na comparação entre o método tradicional a 25 °C e o método de Petrifilm a 30 °C, a fase aquosa teve uma correlação de **0,99** (Gráfico 7) e o produto final não apresentou correlação (Gráfico 8). Na comparação dos valores obtidos desta margarina desde o início até ao fim da sua produção, verificou-se que a relação entre os dois métodos não é perfeita, pois embora haja concordância nos valores da fase aquosa, o mesmo não se verificou nos valores do produto final.

Gráfico 7 - Comparação dos valores obtidos nos dois métodos (PCA/ACP), na fase aquosa da margarina B2, a 25 °C e 30 °C.

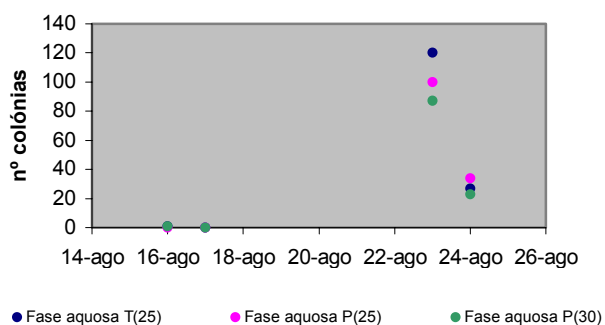
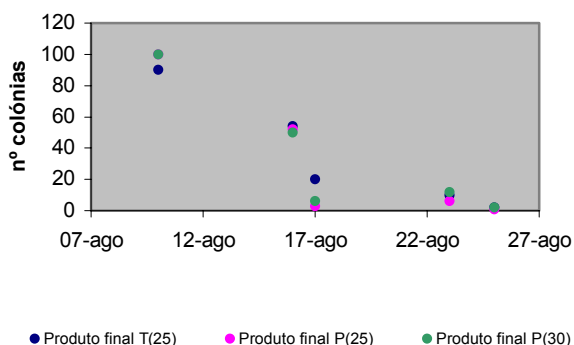


Gráfico 8 - Comparação dos valores obtidos nos dois métodos (PCA/ACP), no produto final da margarina B1, a 25°C e 30°C.



Na Tabela 4 é possível verificar as correlações entre os dois métodos para margarina **B2**.

Tabela 4- Coeficientes de correlação linear obtidos nos dois métodos (Tradicional/Petrefilm) para margarina **B2**.

PCA/ACP	Tradicional/Petrefilm 25°C		Tradicional/Petrefilm 30°C	
	F. Aquosa	P. Final	F. Aquosa	P. Final
	0,99	0	0,99	-0,08

Uma possível explicação para algumas destas diferenças, poderá ser atribuída ao curto período de tempo em que foram realizados os ensaios e pouca experiência do operador.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as fases aquosas das margarinas do tanque (1), têm uma correlação muito baixa.

Para o tanque (4*), a correlação é bastante elevada. Comparando as várias margarinas, conclui-se que para as margarinas **A1** e **A2** de um modo geral as correlações das fases aquosas, apresentaram valores de correlação baixos enquanto que os produtos finais das mesmas margarinas apresentaram uma correlação mais elevada.

Para a margarina **B1**, pode-se concluir que tanto nas suas fases aquosas como para os produtos finais os valores de coeficiente de correlação são muito próximos, havendo uma grande homogeneidade entre os dois métodos.

Os valores obtidos para margarina **B2**, são completamente opostos aos valores da margarina **B1**, visto a fase aquosa apresentar uma correlação de 0,99, e o produto final não apresentar correlação. Estes valores contraditórios, podem ter a sua causa em vários factores:

- Erros técnicos no laboratório, a nível das diluições e/ou eventuais falhas na medição do volume de inóculo.
- O período de tempo durante o qual este trabalho se realizou foi apenas de 2 meses, não sendo suficiente para validar um novo método, mas é um ponto de partida para o seu estudo mais aprofundado.
- Por ser um método dispendioso, não se efectuou o mínimo de seis padrões em duplicado.

Todos estes pontos podem ser causas prováveis para que alguns valores entre os dois métodos não sejam relacionáveis entre si, o que sugere a necessidade de novos ensaios para validar este método no controlo microbiológico de margarinas.

* Aluna do 4º ano do 2º Ciclo do Curso Biotápico de Engenharia Alimentar, EST/Ualg.

5. BIBLIOGRAFIA

Branger, A., *et. al.* - **Étude du Pétrifilm VRB^R 3M pour le dénombrement des coliformes dans les fromages à pâte molle**, Revue des EVIL n° 12.

Branger, A., *et. al.* - **Étude du Pétrifilm VRB^R 3M pour le dénombrement des coliformes dans le beurre et dans le lait cru**, Revue des ENIL n° 117.

Carlier, V., Rozler, J., Gauthler, M., Dufour, C. - **Film Compte-Colonies**, RIA 408 du 11 Juillet au 12 Septembre, 1988.

Curiale, Michael S., *et. al.* - **Dry Rehydratable Films for Enumeration of Coliformes and Aerobic Bacteria in Dairy Products: Collaborative Study**, J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM., N° 2, 1989.

Denis, C., Bardet, M.C., Moras, P. - **4e gamme Contrôle bactériologique des légumes, Comparaison de différents milieux de Culture**, Infos-Citifl, N° 37, Décembre 1987.

Juran, J. M., Gryna, Frank M., **Controle da Qualidade: conceitos, políticas e filosofias da qualidade**, Editora McGraw-Hill, Volume I, páginas 19 – 228, 1990.

Juran, J. M., Gryna, Frank M., **Controle da Qualidade: Métodos Estatísticos clássicos aplicados à qualidade**, Editora McGraw-Hill, Volume VI, páginas 188 - 190, 1990.

McAllister, J.S., Ramos, M.S., and Fox, T.L. - **Evaluation of the 3M Dry Medium Culture Plate (PetrifilmTM SM) Method for Enumerating Bacteria in Processed Fluid Milk Samples**, Dairy and Food Sanitation, n° 12, pages 632-635, Decembre 1987.

McAllister, J.S., Stadtherr, M.P., and Fox, T.L. - **Evaluation of the 3M PetrifilmTM Culture Plate Method for Enumerating Aerobic Flora and Coliforms in Poultry Processing Facilities**, Journal of Food Protection, N° 8, pages 658-659, August 1988.

McGoldrick, K.F., Fox, T.L., and McAllister, J.S. - **Dry Medium for Detecting Contamination on Surfaces**, Food Technology, pages 77-80, April 1986.

PetrifilmTM Interpretation Guide – Yeast and Mould Count Plate.

PetrifilmTM Interpretation Guide – Aerobic Count Plate.

PetrifilmTM Interpretation Guide – *Enterobacteriaceae* Count Plate.

PetrifilmTM Aerobios Totales – Composición, 3M Santé.

PetrifilmTM Levaduras y Mohos – Composición, 3M Santé.

Petrifilm plates save Simplot time and money, Prepared Foods, 1986.

3MTM PetrifilmTM The concept of ready-to-use bacteriological analysis – Get ahead of Time.

Poumeryrol, Martine, **Denombrement de la Flore Aerobie Mesophile: Etude Comparative de la Methode D'Inclusion en Gelose et du Petrifilm SM**, Bull. Lab. Vét. N° 27/28, Septembre/Décembre 1987.

Restaino, L., Lyon, R.H. - **Efficacy of PetrifilmTM VRB for Enumerating Coliformes and Escherichia coli from Frozen Raw Beef**, Journal of Food Protection, n° 12, pages 1017-1022, December 1987.

Smith, L.B., Fox, T.L., Busta, F.F. - **Comparison of a Dry Medium Culture Plate (Petrifilm SM Plates) Method to the Aerobic Plate Count Method for Enumeration of Mesophilic Aerobic Colony-Forming Units in Fresh Ground Beef**, Journal of Food Protection, N° 12, Pages 1044-1045, December 1985.